



INFLUÊNCIA DO L-DOPA NAS ENZIMAS RESPONSÁVEIS PELO PROCESSO DE LIGNIFICAÇÃO EM RAÍZES E CAULE DE SOJA

*Rita de Cássia Siqueira Soares¹, Graciene de Souza Bido¹, Anderson Ricardo Soares²,
Maria de Lourdes Lucio Ferrarese², Osvaldo Ferrarese Filho³*

RESUMO: L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), aminoácido não protéico, é um precursor de alcalóides, fenilpropanóides, lignina, melanina e atua como poderoso aleloquímico. Sua atuação em plantas é pouco conhecida e seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill) não têm sido relatados. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar as atividades das enzimas Fenilalanina amônia liase (PAL) e Cinamil álcool desidrogenase (CAD), além de quantificar os conteúdos de lignina em raízes e caule de soja, submetidas ao aleloquímico L-DOPA. Assim, sementes de soja foram germinadas (três dias, 25°C) e plântulas uniformes foram transferidas para recipientes contendo 350 mL de solução nutritiva (pH 6,0, sem ou com L-DOPA 0,5 mM). Após 22 dias de exposição das raízes (14 horas claro/10 horas escuro, 25°C), as atividades das enzimas e o conteúdo de lignina foram determinados. Os resultados revelaram respostas significativas das raízes e do caule. Nas raízes, observamos um aumento da atividade da PAL, e uma diminuição da atividade da CAD sob ação de L-DOPA. No caule, ocorreram reduções nas atividades das duas enzimas, em comparação com os controles. O conteúdo de lignina teve uma diminuição significativa apenas nas raízes. Os resultados relatados denotam uma relação entre a atividade das enzimas e a produção de lignina. Embora os mecanismos completos ainda não tenham sido resolvidos, as alterações enzimáticas, a produção e a incorporação de lignina e o aumento na rigidez da parede celular contribuem para a redução no crescimento da raiz.

PALAVRAS-CHAVE: Aleloquímico; L-3,4-dihidroxifenilalanina; PAL; CAD, lignina.

1 INTRODUÇÃO

As plantas superiores regularmente liberam compostos orgânicos no ambiente os quais são adicionados ao solo. Alguns destes compostos têm sido citados como agentes de interações entre plantas, fenômeno conhecido como alelopatia. Estes compostos são liberados por vários mecanismos incluindo a lixiviação pela água pluvial, exsudação pelas raízes, decomposição natural de partes das plantas na superfície ou no próprio solo. A ação primária dos compostos alelopáticos ainda não foi estabelecida, mas alguns efeitos fisiológicos são conhecidos. Tipicamente os aleloquímicos interferem nas plantas superiores suprimindo a germinação, causam injúrias durante o crescimento da raiz e meristemas e, então, inibem o crescimento das plantas. Embora as plantas de cobertura

¹ Doutoranda do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CNPq. ritacsiqueira@hotmail.com, gsbido@hotmail.com

² Professor(a) Doutor(a) do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Departamento de Bioquímica. arsoares2@uem.br, mlferrarese@uem.br

³ Orientador, Professor Doutor e Pesquisador da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Departamento de Bioquímica – Bolsista em produtividade do CNPq. oferrarese@uem.br

do solo forneçam valor à colheita quando adicionadas em sistemas agrônômicos, muitas espécies utilizadas como coberturas são tóxicas devido às altas concentrações de fitoquímicos, próprios da alelopatia.

Mucuna pruriens (L.) DC. var. *utilis* é um exemplo de planta de cobertura do solo bem sucedida e com vários produtos naturais altamente ativos. *Mucuna* tem sido amplamente cultivada em áreas tropicais como enriquecedora do solo, cobertura para controle de plantas daninhas e silagem. Tem sido relatado que vários agentes químicos secundários são produzidos pelas sementes, folhas e raízes de *Mucuna* (Prakash et al., 2001; Nishihara et al., 2002). O principal composto fitotóxico encontrado é o aminoácido não-protéico L-3,4-dihidroifenilalanina (L-DOPA), que é utilizado no tratamento sintomático da doença de Parkinson. Além disso, este composto é liberado das raízes de *Mucuna* para o solo e inibe o crescimento de espécies de plantas vizinhas. Esta ação alelopática tem sido relatada em um grande número de espécies de plantas, mas o conhecimento sobre o mecanismo de ação do L-DOPA é escasso.

Nas plantas, L-DOPA é precursor de muitos alcalóides, catecolaminas, flavonóides, melanina e fenilpropenóides. A via dos fenilpropenóides é uma das mais importantes devido ao seu papel na síntese de compostos fenólicos e de uma ampla série de produtos secundários em plantas, incluindo lignina. Fenilalanina amônia liase (PAL), cinamil álcool desidrogenase (CAD) e peroxidase (POD) têm sido associadas com a polimerização de monolignóis e conseqüentemente a lignificação.

Considerando que não há relatos sobre os efeitos de L-DOPA exógeno em raízes de soja e devido ao importante papel da lignificação no crescimento da raiz, esta pesquisa teve por objetivo investigar a absorção e os efeitos de L-DOPA nas atividades da PAL e CAD, além do conteúdo de lignina em raízes e caule de soja.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos Gerais. Sementes de soja (*Glycine max* var. BRS 232) foram previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 2% e em seguida acondicionadas em folha de papel Germitest CEL-060 umedecida com água e postas em câmara escura, a 25°C e 80% de umidade relativa. Após três dias de germinação, as plântulas foram selecionadas e transferidas para recipientes de acrílico contendo 350 mL de solução nutritiva de Dong et al (2006) tamponada em pH 6,0. Os recipientes foram acondicionados em câmara com temperatura controlada (25°C), sistema de aeração contínua e uma iluminação com densidade de fluxo de fótons (PFD) de 290 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ onde permaneceram por 22 dias. O fotoperíodo utilizado foi de 14 horas claro/10 horas escuro. Para prevenir sintomas causados por deficiência de nutrientes, a solução nutritiva foi periodicamente substituída durante o período de cultivo. No tratamento com L-Dopa (0,5 mM) o aleloquímico foi adicionado à solução nutritiva no 10º, 12º, 14º, 16º, 18º e 20º dia de cultivo. Para o tratamento controle uma solução nutritiva sem o aleloquímico foi adicionada.

Atividade da PAL. Raízes frescas (1 g) foram maceradas em 0,1 M de tampão borato de sódio pH 8,8. Os homogeneizados foram centrifugados (2.200×g, 15 min, 4°C) e o sobrenadante foi usado como preparação enzimática (Ferrarese et al., 2000). A mistura de reação (100 μmoles de tampão borato pH 8,7, contendo adequada quantidade do extrato enzimático em um volume final de 1,55 ml) foi incubada a 40°C por 5 min para o ensaio da atividade da PAL. Quinze μmoles de L-fenilalanina foram adicionados para iniciar a reação, que foi interrompida após uma hora com 50 μl de 5 M HCl. As amostras foram filtradas através de filtro de 0,45 μm (Hamilton® Co., Nevada, USA) e analisadas (20 μl) em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® (Tóquio, Japão). A fase móvel utilizada foi metanol/água (70/30, v/v), com fluxo de 0,8 ml min⁻¹, para uma corrida isocrática de 10 min. *t*-Cinamato, o produto da PAL, foi identificado a 275 nm por

comparação com os valores do tempo de retenção do padrão. Controles paralelos sem L-fenilalanina ou com *t*-cinamato (adicionado como padrão interno à mistura de reação) foram realizados como descrito por Ferrarese et al. (2000). A atividade da PAL foi expressa como $\mu\text{mol } t\text{-cinamato h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca.

Atividade da CAD. Raízes frescas (2g) foram maceradas com 3 ml de um meio de extração contendo 40 mM de β -mercaptoetanol e 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.3). O homogeneizado foi centrifugado (2,200g, 15 min) e o sobrenadante foi usado como extrato enzimático (dos Santos et al., 2006). A reação ocorreu a 30°C, com uma mistura contendo 200 μl de extrato enzimático, 104 nmol NADPH, e 150 nmol de tampão Tris-HCl (pH 8.0). Para iniciar a reação, 50 nmol de sinapil aldeído foram adicionados, e a reação foi parada depois de 3 min de incubação pela adição de 50 μl de HCl 5N. Controles paralelos com adição de sinapil aldeído ao meio de reação (sem NADPH) foram analisados. As amostras foram filtradas através de filtro de 0,45 μm (Hamilton® Co., Nevada, USA) e analisadas (20 μl) em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu® (Tóquio, Japão). A fase móvel utilizada foi metanol/ácido acético 4% em água (20;80, v/v), com fluxo de 1,2 ml min⁻¹, para uma corrida isocrática de 20 min. Sinapil álcool foi identificado a 345 nm por comparação com os valores do tempo de retenção do padrão. Atividade da CAD foi expressa como $\mu\text{mol sinapil aldeído consumido min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de material fresco.

Quantificação da lignina. Para tal análise, inicialmente foram obtidas as paredes celulares isentas de proteínas, conforme a metodologia proposta por Ferrarese et al., 2002. A seguir, esse material foi usado para a determinação do teor total de lignina pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila (Morrison, 1972). Uma porção (20 mg) do material foi acondicionada em tubo de centrifuga e 500 μl de acetilbromida 25% foram acrescentados. As amostras foram aquecidas a 70°C, 30 min, transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida com adição de 0,9 ml de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2 ml de ácido acético gelado. As amostras foram centrifugadas (1.000×g, 5 min), o sobrenadante diluído e usado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina foi determinada de acordo com uma curva padrão e foi expressa em mg lignina g⁻¹ de parede celular.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do L-DOPA em soja variou de acordo com a parte da planta analisada. Como podemos observar na **figura 1**, houve um aumento maior que 270% na atividade da PAL nas raízes de soja. Porém, no caule verificamos uma diminuição (58,17%) na atividade da mesma enzima. O L-DOPA é convertido à tirosina, e esta pode ser convertida a fenilalanina. A acumulação desses aminoácidos pode fornecer substrato para a PAL que é a enzima chave no metabolismo dos fenilpropenóides. Essa enzima é responsável pela conversão da L-fenilalanina para ácido cinâmico, e este por sua vez, sofre uma série de reações na via até a síntese de lignina (Boerjan et al., 2003). A raiz como principal órgão de acesso das plantas, provavelmente, absorveu uma maior quantidade do aleloquímico, que sofre reações para fornecer o substrato para a enzima. Este fato não foi observado no caule, uma vez que o L-DOPA já teria sido parcialmente metabolizado na raiz.

Na **figura 2**, verificamos uma diminuição significativa da enzima CAD apenas no caule (aproximadamente 26%). O conteúdo de lignina diminuiu mais de 40% na raiz, enquanto no caule não houve uma diferença significativa (**figura 3**).

Os fenilpropenóides intermediários podem ser catalisados pela CAD, que é a enzima envolvida na conversão do p-hidroxi-cinamaldeído para os álcoois correspondentes, o último passo da biossíntese de monolignóis até a polimerização

oxidativa a parede celular (Blanco Portales et al., 2002; Zhang et al., 2010). Como não houve aumento da atividade dessa enzima em nenhuma das partes da planta analisada, provavelmente também não ocorreu aumento na formação dos monômeros da molécula de lignina e conseqüentemente no conteúdo deste polímero.

Porém, apesar de ter sido verificado o aumento da atividade da PAL em raízes, é possível que os produtos dessa reação estejam sendo desviados para outras vias (formação de flavonóides, terpenos, por exemplo) que não a formação de lignina.

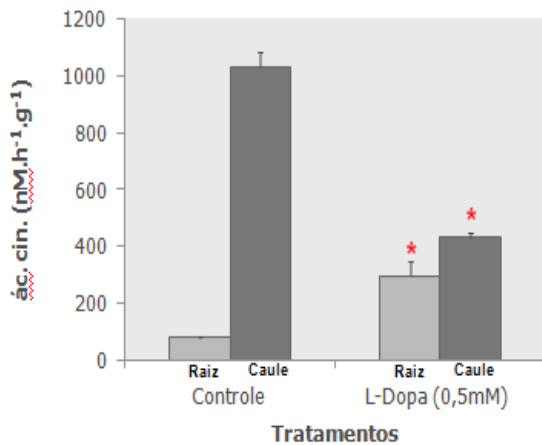


Figura 1. Determinação da atividade da Fenilalanina amônia liase (PAL) em plantas de soja submetidas ao aleloquímico L-DOPA.

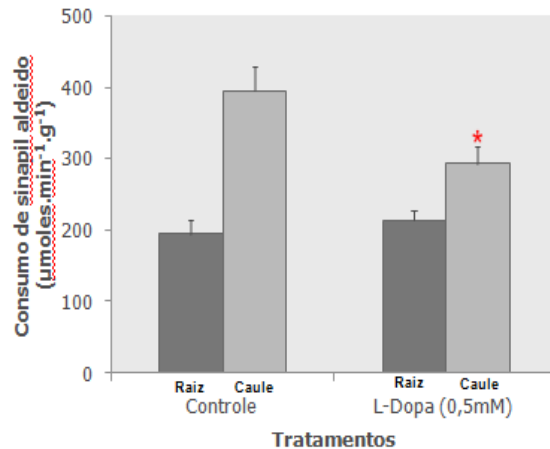


Figura 2. Determinação da atividade da Cinamil álcool desidrogenase (CAD) em plantas de soja submetidas ao aleloquímico L-DOPA.

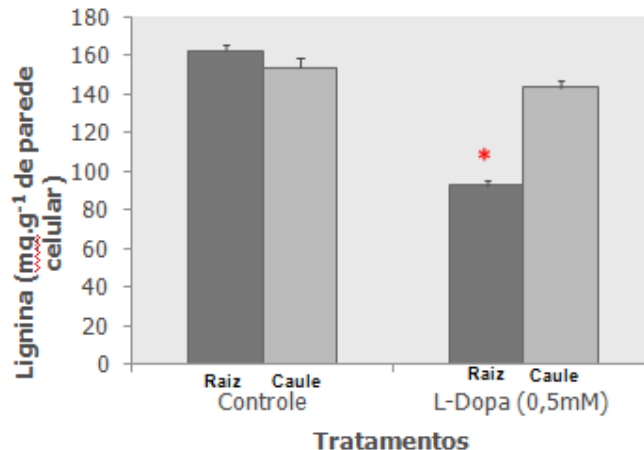


Figura 3. Quantificação dos teores de lignina em plantas de soja submetidas ao aleloquímico L-DOPA.

CONCLUSÃO

Os resultados revelam o L-DOPA como um composto aleloquímico que interfere o metabolismo vegetal, diminuindo a lignificação de raízes.

REFERÊNCIAS

BLANCO PORTALES, R., MEDINA ESCOBAR N., LÓPEZ RÁEZ J. A., GONZÁLEZ REYES J. A., VILLALBA J. M., MOYANO E. 2002. Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase

BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. 2003. Lignin Biosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54:519–46.

DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, 64, p. 1659-1666, 2006.

DOS SANTOS, W.D., FERRARESE, M.L.L., FERRARESE-FILHO, O. 2006. High performance liquid chromatography method for the determination of cinnamyl alcohol dehydrogenase in soybean. **Plant Physiol. Biochem.** 44:511-515.

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

FERRARESE, M.L.L., ZOTTIS, A., FERRARESE-FILHO, O. 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. **Biologia.** 57:541-543.

MORRISON I.M. 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. **J Sci Food Agric.** 23:455.

NISHIHARA, E.; ARAYA, H.; HIRADATE, S.; FUJII, Y. The inhibition of lettuce growth by diffused L-3,4,-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in *Mucuna* accessions. **Third World Congress in Allelopathy**, p.246. 2002.

PRAKASH, D.; NIRANJAN, A.; TEWARI, S.K. Some nutritional properties of the seeds of three *Mucuna* species. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.52, p.79-82, 2001.

ZHANG L., WANG G., CHANG J., LIU J., CAI J., RAO X., ZHANG L., ZHONG J., XIE J., ZHU S. 2010. Effects of 1-MCP and ethylene on expression of three CAD genes and lignification in stems of harvested Tsai Tai (*Brassica chinensis*). **Food Chem.** 123:32-40.