

Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados⁽¹⁾

Rosa Bárbara Batista⁽²⁾, Maria Goreti de Almeida Oliveira⁽²⁾, Christiano Vieira Pires⁽²⁾, Newton Deniz Piovesan⁽²⁾, Sebastião Tavares de Rezende⁽²⁾ e Maurílio Alves Moreira⁽²⁾

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da planta de soja em responder à aplicação de ácidos graxos, substratos das lipoxigenases, pela “via das lipoxigenases” por meio da caracterização bioquímica e cinética do “pool” das lipoxigenases foliares. Dois genótipos de soja foram usados: um normal (variedade IAC-100) e outro desprovido das três lipoxigenases nas sementes (genótipo IAC-100 TN). As plantas foram tratadas com os ácidos araquidônico, linoléico e linolênico, no início do estágio V2 de desenvolvimento, até atingirem o estágio V3. Em seguida, os trifolíolos foram coletados 0, 24 e 48 horas após a última aplicação dos ácidos graxos. Os resultados mostraram um pico de atividade das lipoxigenases a pH 6,0 e 25°C de temperatura. Os valores de atividade das lipoxigenases nos dois genótipos foram maiores nos tratamentos que nos respectivos controles, e os valores de $K_{M\text{ app}}$ diminuíram 48 horas após a última aplicação dos ácidos linoléico e linolênico no tratamento em relação ao controle. Estes resultados sugerem que a planta de soja responde à aplicação de ácidos graxos nas folhas, com o aumento na atividade das lipoxigenases, e que a remoção das lipoxigenases da semente não afetou a resposta da planta a esse tipo de tratamento, uma vez que IAC-100 e IAC-100 TN apresentaram comportamentos bioquímico e cinético semelhantes.

Termos para indexação: *Glycine max*, atividade enzimática, oxirredutase, isoenzima, resposta da planta.

Biochemical and kinetic characterization of lipoxigenases of two soybean genotypes submitted to leaf spraying of polyunsaturated fatty acids

Abstract – The objective of this work was to evaluate the capacity of soybean plant to respond to spraying of fatty acids, lipoxxygenase substract, by lipoxxygenase pathway through the biochemical and kinetic characterization of the “pool” of lipoxxygenases from leaves. Two cultivars of soybean were used: one normal (cultivar IAC-100) and the other devoid of three lipoxxygenases in the seeds (cultivar IAC-100 TN). The plants were treated with arachidonic, linoleic and linolenic acids at the beginning of the development stage V2, up to the stage V3. The trifoliates were collected at 0, 24 and 48 hours after the last spraying of fatty acids. The results of the biochemical and kinetic studies showed a peak of lipoxxygenase activity at pH 6.0 and temperature at 25°C. The activity values for both genotypes were higher in the treatment than in the respective control, and the $K_{M\text{ app}}$ values decreased 48 hours after the last spray with linoleic and linolenic acids, in the treatments towards respective controls. These results suggest that the soybean plant responds to the application of fatty acids in the leaves by increasing lipoxxygenase activity, and that removing lipoxxygenases from the seed has not changed the response of the plant to the fatty acids treatment, since IAC-100 and IAC-100 TN presented similar biochemical and kinetic behaviors.

Index terms: *Glycine max*, enzymic activity, oxidoreductases, isoenzymes, plant response.

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 17 de maio de 2002.

⁽²⁾ Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, Avenida Peter Henry Rolfs, s/nº, CEP 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: rbatista@alunos.ufv.br, malmeida@mail.ufv.br, cvpires@alunos.ufv.br, piovesan@mail.ufv.br, srezende@mail.ufv.br, moreira@mail.ufv.br

Introdução

As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxirredutase; EC 1.13.11.12) são isoenzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno, para formar hidroperóxidos (Siedow, 1991). Quando os tecidos das

plantas são degradados por patógenos ou mecanicamente danificados, ocorre uma degradação seqüencial dos lipídios, na qual os produtos primários da reação das lipoxigenases, os hidroperóxidos, podem ser metabolizados por duas vias enzimáticas principais: hidroperóxido-liase e hidroperóxido-ciclase (Farmer & Ryan, 1992; Croft et al., 1993).

A hidroperóxido-liase produz aldeídos de seis carbonos, como o trans-2-hexenal (composto característico do sabor e odor de frutos e folhas), e a traumatina. Os aldeídos formados pela ação da lipoxigenase inibem, possivelmente, o crescimento de fungos, insetos e protozoários (Croft et al., 1993). A traumatina, também conhecida como hormônio do ferimento, bem como o ácido traumático, é um dos compostos que pode estar envolvido no processo de sinalização e divisão celular na resposta a ferimentos em plantas (Zimmerman & Coudron, 1979).

A hidroperóxido-ciclase produz o ácido 12-oxo-fitodienóico, que após uma redução e três β -oxidações, dá origem ao ácido jasmônico. Este composto possui atividade de regulador do crescimento e está envolvido nos processos de desenvolvimento na resposta da planta a lesões e a patógenos. Esta segunda atividade tem sido verificada principalmente na indução da expressão de genes que codificam inibidores de proteases (Farmer & Ryan, 1992; Croft et al., 1993).

Os principais substratos das lipoxigenases em plantas superiores são os ácidos linoléico e linolênico (Wang et al., 1999). O ácido linolênico é o ácido graxo mais abundante na maioria dos tecidos vegetais, constituindo-se em mais de 80% do grupo acil dos lipídios de membrana dos cloroplastos. O ácido linoléico encontra-se em maior concentração nas sementes e embriões (Hildebrand et al., 1988). Nas plantas, pode ser convertido em ácido linolênico pela ação de uma dessaturase (Farmer & Ryan, 1992).

Uma vez que tem sido descrito o envolvimento das isoenzimas lipoxigenases em vários processos fisiológicos, torna-se cada vez mais importante a caracterização bioquímica e cinética dessas isoenzimas, em especial das que estão presentes nas folhas, visando elucidar a participação da "via das lipoxigenases" na fisiologia da planta, principalmente nos mecanismos de defesa da soja a insetos e patógenos.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a bioquímica e a cinética das lipoxigenases em dois genótipos de soja e avaliar se a adição exógena dos substratos das lipoxigenases afeta a atividade dessas isoenzimas.

Material e Métodos

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade IAC-100 e do genótipo com ausência das lipoxigenases nas sementes (IAC-100 TN). O genótipo IAC-100 TN, desenvolvido pelo Programa de Melhoria da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV, é uma linhagem avançada, obtida a partir da variedade IAC-100, a qual se encontra no sexto ciclo (RC6F3) de retrocruzamentos, terceira geração de autofecundação. A alta similaridade genética entre IAC-100 e IAC-100 TN foi confirmada por meio de análise do DNA, utilizando-se marcadores moleculares do tipo RAPD "Random Amplified Polymorphic DNA" e, também, por meio de características fenotípicas (Oliveira et al., 1998). As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 3,0 kg de solo, em casa de vegetação.

As plantas de soja no estágio V2 de desenvolvimento (primeira folha trifoliolar completamente expandida) tiveram este trifólio isolado e submetido à pulverização em dias alternados, com soluções 10 mM de ácidos graxos contendo Triton X-100 0,01% (v/v) (Farmer & Ryan, 1992) até atingirem o estágio V3 de desenvolvimento (segunda folha trifoliolar completamente expandida). Plantas-controle receberam aplicação da solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v). Foram utilizados os ácidos araquidônico, linoléico e linolênico.

Foram utilizadas, como fonte de enzima, a primeira e a segunda folhas trifoliores de plantas de soja da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento (Fehr et al., 1971). Os três folíolos da primeira e da segunda folhas trifoliores foram coletados a 0, 24 e 48 horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos, congelados em N líquido e armazenados a -80°C . O preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C , de acordo com o método descrito por Ohta et al. (1986), com as seguintes modificações: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5 em substituição ao tampão fosfato 100 mM pH 6,5, além de não ter sido utilizado Triton X-100. Os folíolos, pesados e imediatamente congelados em N líquido, foram triturados em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, na proporção de 1:3 (p/v), e, em seguida, centrifugado a 17.200 g, por 60 minutos, a 4°C .

A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linolêico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod et al. (1981), o qual se baseia no aumento da absorbância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. A temperatura de reação foi mantida a 25°C.

Para a determinação da atividade a diferentes valores de pH, foram usados os seguintes sistemas-tampão: ácido cítrico/fosfato dissódico (2,0-2,5); ácido cítrico/citrato de sódio (3,0-3,5); ácido acético/acetato de sódio (4,0-4,5); ácido cítrico/citrato de sódio (5,0-5,5); monofosfato/fosfato dissódico (6,0-7,0); Tris-HCl (7,5-8,5), e ácido bórico/borato de sódio (9,0-10,0), na concentração de 50 mM.

Na determinação da atividade das lipoxigenases, em vários valores de temperaturas, foi observada a taxa de oxidação do ácido linolêico pelas lipoxigenases a 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. Utilizou-se banho-maria, bem como espectrofotômetro com temperatura controlada.

Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear.

Resultados e Discussão

Com o objetivo de caracterizar o pH ótimo de atuação das lipoxigenases foliares de plantas de soja submetidas à aplicação de substratos exógenos, realizaram-se as análises do efeito de pH sobre a atividade enzimática (Figura 1). Os perfis, dos demais tratamentos e seus respectivos controles, apresentaram-se semelhantes.

Houve dois picos de atividade das lipoxigenases a pH 4,5 e 6,0, nos dois genótipos, nos tratamentos, e em seus respectivos controles, tanto na resposta local quanto na sistêmica. Em pH 4,5, o valor da atividade foi semelhante nos dois genótipos, na resposta local e na sistêmica; entretanto, em pH 6,0, nos dois genótipos, o valor da atividade foi maior na resposta local do que na resposta sistêmica. As plantas tratadas com os substratos das lipoxigenases apre-

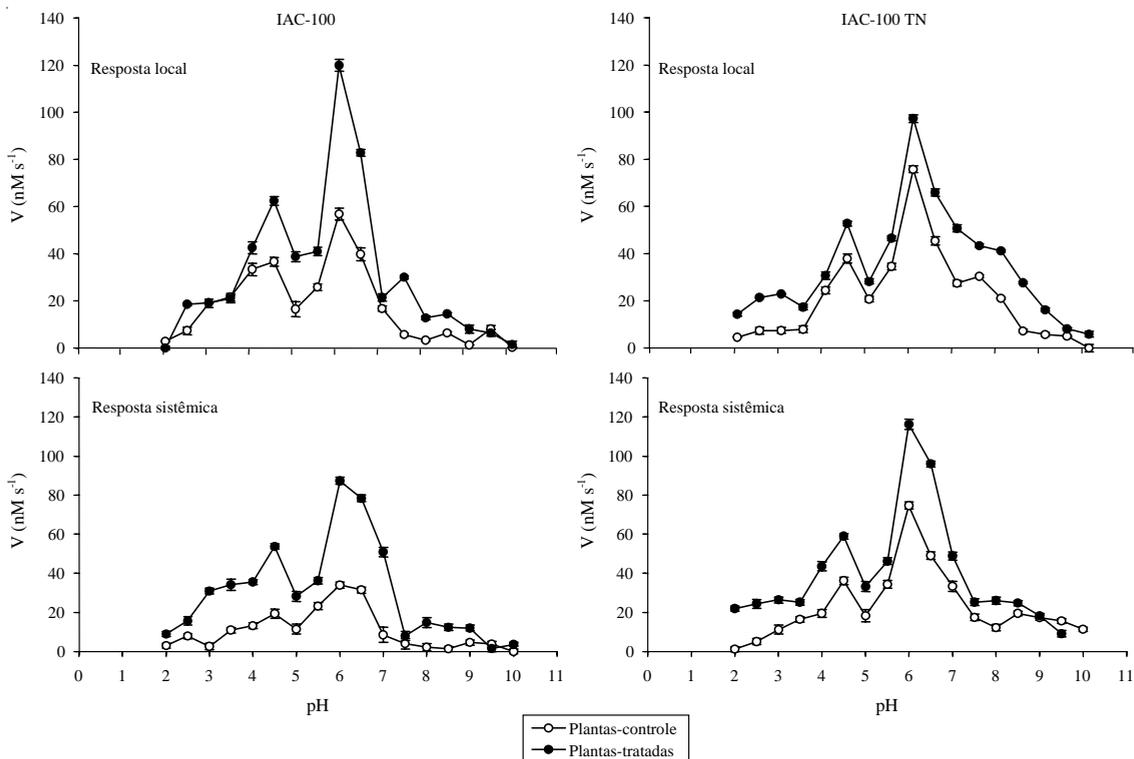


Figura 1. Atividade das lipoxigenases de folhas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 horas após tratamento com solução 10 mM de ácido linolênico em solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v), e seu respectivo controle [solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)], em diferentes valores de pH.

sentaram valores de atividade maior do que os respectivos controles. Esses resultados sugerem que a pulverização de ácidos graxos promoveu o aumento na atividade dessas enzimas.

Tanto na resposta local quanto na sistêmica, nos dois genótipos, a atividade em pH 6,0 apresentou-se maior do que a atividade em pH 4,5, sugerindo que o “pool” das lipoxigenases contém mais de uma forma das isoenzimas. Como o extrato foliar continha lipoxigenases e não formas purificadas, os resultados sugerem que o “pool” das lipoxigenases contém formas das isoenzimas com maiores valores de atividade a pH 4,5 e formas com maiores valores de atividade a pH 6,0, respondendo à aplicação de ácidos graxos. Contudo, a atividade apresentou-se maior em pH 6,0 nos tratamentos. Christopher et al. (1972), utilizando ácido linoléico como substrato das lipoxigenases de sementes de soja, demonstraram que a LOX 1 tem atividade máxima em pH 9,5, a LOX 2 em pH 6,5 e a LOX 3 possui máxima atividade numa ampla faixa de pH, ou seja, 5,0 a 9,0.

Os valores de pH ótimo observados estão dentro da faixa de pH ótimo verificada em lipoxigenases de

várias plantas: batata, pH 5,5-6,0 (Galliard & Phillips, 1971); semente de girassol, pH 6,2 (Leoni et al., 1985); folhas de tomate, pH 6,4-7,2 (Koch et al., 1992); pepino, pH 5,0 (Avdiushiko et al., 1994); pimentão, pH 6,5 (Minguez-Mosqueira et al., 1993); semente de ervilha, pH 6,8 (Redgel et al., 1995), culturas de oliveira (*Olea europaea*), pH 5,5 e 6,0-6,5 (Williams et al., 2000) e folhas de soja do genótipo IAC-100 e IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, pH 4,5 e 6,0 (Vieira et al., 2001).

A Figura 2 apresenta os perfis das curvas de temperatura versus atividade das lipoxigenases. Os perfis para os demais tratamentos e seus respectivos controles apresentaram-se semelhantes. O valor mais acentuado de atividade foi a 25°C, em ambos os genótipos e seus respectivos controles. O pico a 25°C foi o maior, porém não foi o único, o que indica, possivelmente, a presença de mais de uma forma de isoenzima lipoxigenase. A atividade foi maior nas plantas submetidas à aplicação foliar com ácidos graxos do que nos respectivos controles; isto sugere novamente, uma resposta das plantas de soja ao tratamento, evidenciada pelo aumento na atividade das lipoxigenases.

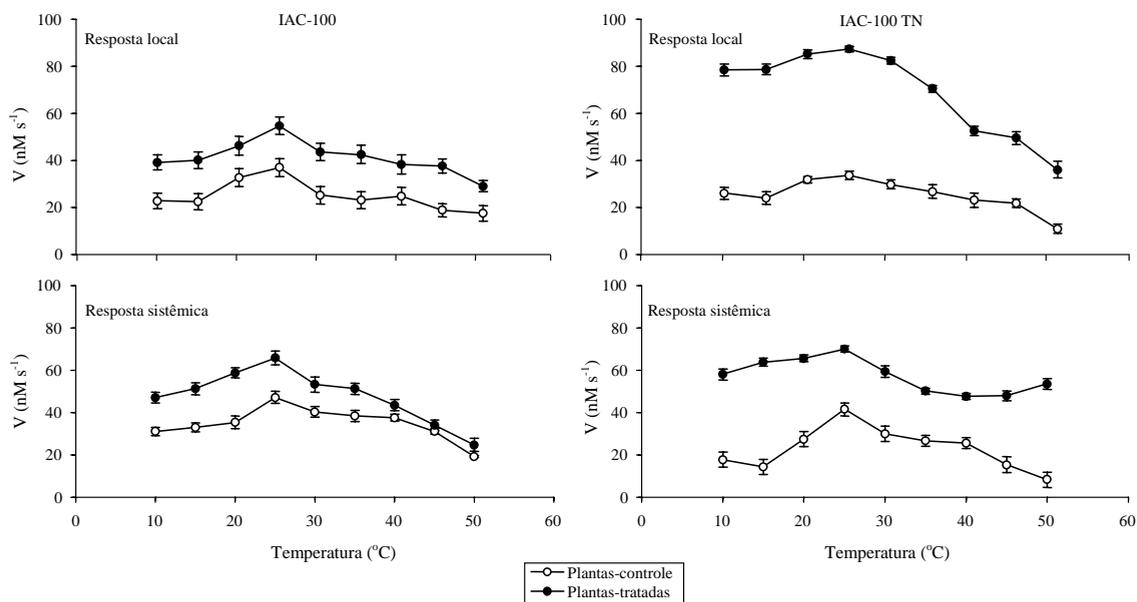


Figura 2. Atividade das lipoxigenases de folhas de soja dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, coletadas 48 horas após tratamento com solução 10 mM de ácido linolênico em solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v), e seu respectivo controle [solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v)], em diferentes valores de temperatura.

Outros autores também obtiveram um valor de temperatura ótima de 25°C para lipoxigenases foliares de soja: Lanna et al. (1996), trabalhando com plantas dos genótipos IAC-100, UFV-TN e Cristalina, no estágio V4 de desenvolvimento; Vieira et al. (2001), analisando plantas da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas a ferimento.

A determinação dos parâmetros cinéticos $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{máx app}}$ foi realizada a pH 6,0, em tampão fosfato de sódio 50 mM e 25°C. A Figura 3 apresenta o perfil do gráfico de Michaelis-Menten da atividade das lipoxigenases, e nela foi inserido o gráfico de Lineweaver-Burk. Em ambos os genótipos, o “pool” das lipoxigenases foliares submetidas à aplicação de ácidos graxos segue a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração do substrato analisada, uma vez que seus gráficos de atividade são curvas hiperbólicas.

Os valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{máx app}}$ das lipoxigenases foliares, nas respostas local e sistêmica dos genótipos IAC-100 e IAC-100 TN com seus respectivos controles estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença nos valores de $K_{M\text{ app}}$, nos períodos de 0 e 24 horas após tratamentos, nas respostas local e sistêmica de ambos os genótipos. Os valores de $K_{M\text{ app}}$ diminuíram 48 horas após a última aplicação, nos dois genótipos, nas respostas local e sistêmica, após tratamento com os ácidos linoléico e

linolênico; houve, portanto, respostas mais tardias aos tratamentos. Como o K_M é uma constante cinética que estabelece um valor aproximado ao nível intracelular de substrato, e sendo improvável que esse nível seja marcadamente maior ou menor que o valor de K_M , o decréscimo no valor de $K_{M\text{ app}}$ sugere uma melhor adaptação do substrato ao centro ativo da enzima, e, portanto, melhor eficiência catalítica (Oliveira et al., 1993). Além disso, os diferentes valores de $K_{M\text{ app}}$ também sugerem alteração no “pool” das lipoxigenases das folhas nos dois genótipos estudados, em resposta à aplicação foliar dos substratos.

Os valores de $K_{M\text{ app}}$ determinados no “pool” das lipoxigenases foliares foram menores nos tratamentos do que nos respectivos controles, tanto na resposta local, quanto na resposta sistêmica, em relação aos ácidos linoléico e linolênico, em ambos os genótipos. Os ácidos linoléico e linolênico são os principais substratos para lipoxigenases nas plantas, sendo que por ação de uma dessaturase, o ácido linoléico pode ser convertido em ácido linolênico (Farmer & Ryan, 1992). Essa diminuição dos parâmetros cinéticos demonstra que houve alteração na composição das formas das lipoxigenases presentes no “pool” de isoenzimas, em resposta à aplicação de ácidos graxos, o que sugere, também, que a planta de soja respondeu a esse tratamento mediante a “via das lipoxigenases”. Os valores dos

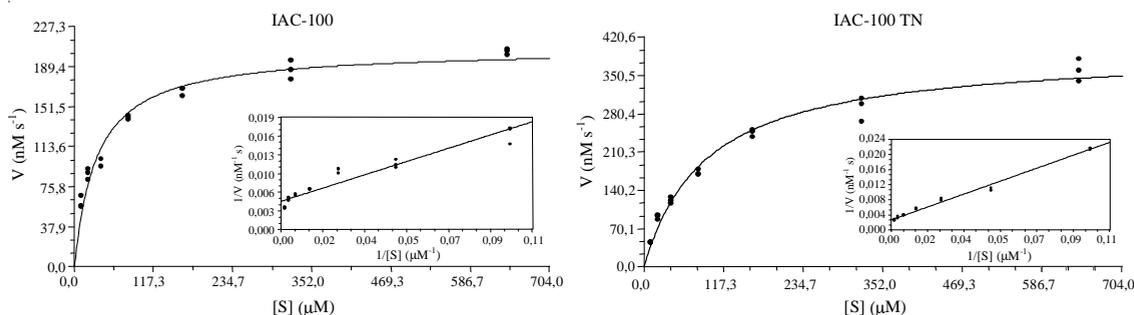


Figura 3. Gráfico de Michaelis-Menten da atividade de lipoxigenases sobre o ácido linoléico, em folíolos da primeira folha trifoliolar de plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento, coletados 48 horas após última aplicação de uma solução 10 mM do ácido linolênico em solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v). A linha contínua foi traçada com base em dados teóricos, utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção dos valores de $K_{M\text{ app}}$ e $V_{\text{máx app}}$. Os pontos são experimentais. Inserção do gráfico de Lineweaver-Burk.

parâmetros cinéticos no tratamento com aplicação do ácido araquidônico foram semelhantes aos dos controles. Esses valores também foram maiores do que os encontrados nas plantas tratadas com os ácidos linoléico e linolênico.

Em nenhum dos casos a aplicação exógena de ácido araquidônico, substrato das lipoxigenases no sistema animal (Macri et al., 1995), provocou alteração no valor de $K_{M\text{ app}}$, em relação aos controles. Isto sugere que os genótipos de soja estudados possivelmente não utilizaram preferencialmente este ácido como substrato exógeno. Farmer & Ryan (1992) trataram plantas de tomate com ácidos graxos e determinaram a produção de inibidores de proteases produzidos pela “via das lipoxigenases”. Esses autores observaram que os maiores indutores de inibidores foram os ácidos linoléico e linolênico, uma vez que esses ácidos são substratos das lipoxigenases em folhas de tomate. Verificaram ainda que as plantas tratadas com ácido araquidônico não produziram inibidores de proteases através da “via das lipoxigenases”.

As lipoxigenases encontram-se organizadas em uma grande família multigênica, que pode resultar,

em dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas lipoxigenases que diferem quanto à especificidade pelo substrato, parâmetros físico-químicos e cinéticos (Siedow, 1991). Além disso, tem sido relatado que o nível de atividade das lipoxigenases presentes em um dado tecido pode variar como resposta fisiológica da planta a diferentes tipos de estresses (Rosahl, 1996).

Kato et al. (1993) mostraram que a expressão do gene de soja para LOX 4 aumenta em folha após a remoção do dreno reprodutivo. Bunker et al. (1995) observaram a indução da expressão de dois genes adicionais de lipoxigenases *lox A* e *vlx C*, em folhas de soja após a remoção da vagem. Saravitz & Siedow (1996) obtiveram aumento de LOX 7 e LOX 8 após a injúria mecânica em folhas de soja. Portanto, tem sido demonstrado que a expressão de diferentes genes das lipoxigenases de soja pode ser induzida nas folhas como resposta a diferentes estresses.

Os dados deste trabalho mostram que houve certa semelhança no comportamento cinético dos dois genótipos, sugerindo, assim, que a remoção genética das três isoenzimas lipoxigenases da semente de soja não afetou a expressão das lipoxigenases de

Tabela 1. Parâmetro cinético da ação das lipoxigenases de soja, folíolos da primeira e segunda folha trifoliolar de plantas no estágio V3 de desenvolvimento, submetidas à aplicação de ácidos graxos.

Cultivar	Período (horas após a última aplicação das soluções dos ácidos graxos)	Controle		Ácido araquidônico		Ácido linoléico		Ácido linolênico	
		$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{\text{máx app}}$ (nM s^{-1})	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{\text{máx app}}$ (nM s^{-1})	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{\text{máx app}}$ (nM s^{-1})	$K_{M\text{ app}}$ (μM)	$V_{\text{máx app}}$ (nM s^{-1})
IAC-100	Primeira folha								
	0	104,1620	190,629	102,081	191,548	100,4020	189,869	106,1590	195,626
	24	100,4240	189,991	100,057	159,891	73,2907	133,676	75,7831	228,804
	48	82,4478	282,144	82,298	216,689	41,7030	230,109	33,5633	207,791
	Segunda folha								
	0	110,8500	238,158	120,244	247,552	108,6310	235,939	100,8990	228,207
24	104,6540	231,962	120,809	229,105	50,6700	176,226	59,4049	128,243	
48	96,0344	256,787	120,329	357,597	39,7545	225,830	38,0219	194,688	
IAC-100 TN	Primeira folha								
	0	109,659	231,200	101,541	293,089	104,6570	226,198	101,9870	223,530
	24	105,611	194,511	100,703	360,805	93,0370	221,004	92,6850	139,054
	48	107,370	175,898	102,588	269,499	89,0838	263,234	89,8445	392,272
	Segunda folha								
	0	234,705	370,020	229,265	364,581	230,7600	366,070	234,6910	370,006
24	196,657	346,034	172,321	246,172	103,4840	254,629	102,6540	140,802	
48	146,070	239,148	147,229	346,003	99,6340	275,280	96,3680	243,627	

folhas do genótipo IAC-100 TN. Este fato demonstra que a expressão dos genes das lipoxigenases da folha é independente da expressão dos genes das lipoxigenases da semente.

Conclusões

1. O valor de temperatura ótima das isoenzimas lipoxigenases, estudadas a pH 6,0, em respostas local e sistêmica, é de 25°C.

2. O ácido araquidônico não induz o aumento de atividade das lipoxigenases em folhas de soja dos genótipos estudados.

3. As plantas respondem ao tratamento por meio da “via das lipoxigenases”.

4. A remoção genética das lipoxigenases da semente não afeta a resposta da planta ao tratamento.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo apoio financeiro.

Referências

- AVDIUSHIKO, S. A.; YE, X. S.; KUE, J.; HILDEBRAND, D. F. Lipoxigenase is an abundant protein in cucumber exudates. **Planta**, Berlin, v. 193, p. 349-357, 1994.
- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxigenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.
- BUNKER, T. W.; KOETJE, D. S.; STEPHENSON, L. C.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; GRIMES, H. D. Sink limitation induces the expression of multiple soybean lipoxigenase mRNAs while the endogenous jasmonic acid level remains low. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 1319-1331, 1995.
- CHRISTOPHER, J. P.; PISTORIOUS, E. K.; AXELROD, B. Isolation of a third isoenzyme of soybean lipoxigenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 284, p. 54-62, 1972.
- CROFT, K. P. C.; JÜTTNER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatile products of the lipoxigenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Plant Physiology**, New York, v. 101, n. 1, p. 13-24, 1993.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 2, p. 129-134, Feb. 1992.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTOON, F. S. Development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, p. 91-93, 1971.
- GALLIARD, T.; PHILLIPS, D. R. Lipoxigenases from potato tubers: partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 124, p. 431-438, 1971.
- HILDEBRAND, D. F.; HAMILTON-KEMP, T. R.; LEGG, C. S.; BOOKJANS, G. Plant lipoxigenases: occurrence, properties and possible functions. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, Columbia, v. 7, p. 201-219, 1988.
- KATO, T.; SHIRANO, Y.; IWAMOTO, H.; SHIBATA, D. Soybean lipoxigenase L-4, a component of the 94-kilodalton storage protein in vegetative tissue: expression and accumulation in leaves induced by pod removal and by methyl jasmonate. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 34, n. 7, p. 1063-1072, 1993.
- KOCH, E.; MEIER, B. M.; EIBEN, H. G.; SLUSARENKO, A. A lipoxigenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic *Pseudomonas*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 9, p. 571-576, 1992.
- LANNA, A. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Kinetic parameters of leaf lipoxigenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxigenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 87-92, 1996.
- LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxigenase in germinating sunflower seeds. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 50, p. 88-92, 1985.
- MACRÌ, F.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; VIANELLO, A. Lipoxigenase activity of plasmalemma and its relation to plant cell senescence and stress response. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, Budapest, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1995.
- MINGUEZ-MOSQUEIRA, M. I.; JAREN-GALAN, M.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Lipoxigenase activity during pepper ripening and processing of paprika. **Phytochemistry**, New York, v. 32, n. 5, p. 1103-1108, 1993.

- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 911-918, 1986.
- OLIVEIRA, D. A.; PIOVESAN, N. D.; MORAES, R. M. A.; ROCHEBOIS, G. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Identification of the three genotypic classes for soybean lipoxygenases 1 and 3 based on enzymatic activity. **Biotechnology Techniques**, London, v. 12, n. 1, p. 71-74, 1998.
- OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHLOD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, n. 36, p. 26893-26903, 1993.
- REDGEL, D.; SCHEWE, T.; KUEHN, H. Comparative characteristics of lipoxygenase isoenzymes from green pea seeds. **Biochemistry**, Moscow, v. 60, n. 6, p. 715-721, 1995.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants: their role in development and stress response. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v. 50, p. 123-138, 1996.
- SARAVITZ, D. M.; SIEDOW, J. N. The differential expression of wound-inducible lipoxygenase genes in soybean leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, p. 287-299, 1996.
- SIEDOW, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 145-188, 1991.
- VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSÉ, I. C.; PIOVESAN, N. D.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plant submitted to wounding. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 5-12, 2001.
- WANG, C.; KEVAN, P. C.; CROFT, J. U.; HILDEBRAND, D. F. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in a lipid mobilization during soybean germination. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 37, p. 497-501, 1999.
- WILLIAMS, M.; SALAS, J. J.; SANCHEZ, J.; HARWOOD, J. L. Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). **Phytochemistry**, New York, v. 53, p. 13-19, 2000.
- ZIMMERMAN, D. C.; COUDRON, C. A. Identification of traumatin: a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. **Plant Physiology**, New York, v. 63, p. 536-541, 1979.