

FUNÇÃO BIOQUÍMICA DA VIA DAS LIPOXIGENASES EM PLANTAS DE SOJA SUBMETIDAS AO ATAQUE DE MOSCA-BRANCA (*Bemisia argentifolii*)

Biochemical function of lipoxygenases pathway of soybean plants submitted to the attack of whitefly (*Bemisia argentifolii*)

Francine Barbosa Silva¹, Maria Goreti de A. Oliveira², Maria Helena N. Brumano³, Christiano Vieira Pires⁴, Fabrício Tadeu de Almeida⁵, Joel Antônio Oliveira⁶, Anderson Martins Pilon⁷, Carlos Henrique Osório Silva⁸, Maurilio Alves Moreira⁹

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a capacidade da planta de soja de uma cultivar comercial, IAC-100, e de um genótipo IAC-100 TN que apresenta ausência de lipoxigenases nas sementes de responderem ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) pela via das Lipoxigenases. Foi realizada a caracterização cinética do *pool* de lipoxigenases. Os valores de K_{Mapp} decresceram nas plantas atacadas, sugerindo uma alteração no *pool* de lipoxigenases foliares. Valores similares de K_{Mapp} , entre os genótipos, indicam que a remoção de lipoxigenases de sementes não interferiram na expressão de lipoxigenases em folhas. Ocorreu aumento significativo na produção de inibidores de proteases. Com esses resultados, infere-se que a produção de inibidores de proteases está envolvida no mecanismo de defesa de soja ao ataque da mosca-branca.

Termos para indexação: Soja, lipoxigenases, mosca branca, defesa de planta.

ABSTRACT – This work evaluated the capacity of the soybean plant, from a commercial cultivar IAC-100 and from a genotype IAC-100 TN, with absence of lipoxygenases in their seeds, to respond to the attack by whitefly (sucking insect) by lipoxygenases pathway. The kinetic characterization of the “pool” of lipoxygenases was determined. The K_{Mapp} values decreased, suggesting a change in the “pool” of lipoxygenases in response to the attack by whitefly. The similar K_{Mapp} values suggest that the removal of the lipoxygenases from the seeds does not change the expression of LOX in the leaves. There was a noticeable increase in protease inhibitors. These results suggest that the production of protease inhibitors are involved in the defense mechanism of soybean plant against whitefly injury.

Index terms: Soybean, lipoxygenase, whitefly, plant defense.

(Recebido para publicação em 14 de abril de 2003 e aprovado em 15 de agosto de 2003)

INTRODUÇÃO

Lipoxigenases (E.C. 1.13.11.12) catalisam a dioxi- genação estereoespecífica de ácidos graxos poliinsaturados contendo o sistema cis,cis-1,4-pentadieno com formação dos respectivos derivados hidroperóxidos, originando, assim, moléculas reativas com atividades fisiológicas pronunciadas (VICK e ZIMMERMAN, 1983).

Duas principais vias para o metabolismo dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzidos pelas lipoxigenases, chamadas de Via das Lipoxigenases, vêm sendo propostas para plantas superiores. Essa via envolve a ação de duas enzimas, ou seja, hidroperóxido liase e hidroperóxido ciclase. Após a ação da hidroperóxido liase, pode ocorrer a produção de aldeídos, os quais podem inibir o crescimento de fungos, insetos e protozoários (CROFT et al., 1993), podendo também agir como

1. MS em Agroquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa/UFV – 36571-000 – Viçosa, MG.

2. Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, UFV. malmeida@mail.ufv.br

3. Doutora em Bioquímica Agrícola.

4. Estudante de Doutorado do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV.

5. Bolsista de iniciação científica/UFV.

6. Professor Assistente do Departamento de Química/UFV.

7. Estudante de Mestrado do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV.

8. Professor Adjunto do Departamento de Informática, UFV.

9. Professor Titular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/BIOAGRO, UFV.

um sinal químico na atração do inimigo natural do herbívoro para a planta danificada (PARÉ e TURLINSON, 1997). Essa via também pode produzir traumatina, conhecida como hormônio do ferimento, que pode estar envolvida no processo de sinalização e divisão celular em resposta a ferimentos em plantas. Já a hidroperóxido ciclase catalisa a formação de ácidos graxos cíclicos derivados do ácido 13-hidroperoxilinolênico, que são precursores da síntese de ácido jasmônico. Esse possui atividade de fitorregulador e está envolvido em processos de desenvolvimento, bem como na resposta da planta a insetos e patógenos, induzindo à síntese de genes que se expressam para inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1990, 1992).

No sistema de interação planta-inseto, as plantas têm utilizado uma variedade de moléculas protéicas tóxicas para sua proteção contra os insetos-praga. A produção de inibidores de proteases constitui num dos um dos mecanismos de defesa de plantas contra invasão de pragas (FARMER e RYAN, 1990).

Atualmente, a mosca-branca (*Bemisia argentifolii* = *Bemisia tabaci* raça B) tem se tornado um dos grandes problemas da agricultura brasileira. Na cultura da soja, causa grandes danos por ser um inseto sugador que se alimenta da seiva da planta, podendo levá-la à morte ou à diminuição da produção. Ao se alimentar, a mosca-branca excreta uma substância pegajosa (*honeydew*), que pode provocar o aparecimento de fungos e ainda abaixar a capacidade fotossintética e outras funções fisiológicas da planta (FERREIRA e AVIDOS, 1998).

Como as lipoxigenases fazem parte da via de transdução de sinais no mecanismo de defesa de plantas contra insetos-praga, torna-se cada vez mais importante a caracterização bioquímica e cinética de cada uma das isoenzimas lipoxigenases, em especial, daquelas presentes nas folhas, e, conseqüentemente, o conhecimento das suas funções bioquímico-genéticas e fisiológicas relacionadas às funções de defesa das plantas a danos causados por pragas e patógenos, e, na regulação do metabolismo vegetal pela Via das Lipoxigenases.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas plantas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] da cultivar IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN com ausência de lipoxigenases nas sementes. O genótipo IAC-100 TN, desenvolvido pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV, é um genótipo avançado obtido a partir da cultivar

IAC-100, que se encontra na quinta geração do primeiro ciclo retrocruzamento (RC1F5). A alta similaridade genética entre IAC-100 e IAC-100 TN foi confirmada por meio de análise de DNA, utilizando-se marcadores moleculares do tipo RAPD "Random Amplified Polymorphic DNA" e também mediante características fenotípicas. As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade para 4,0 Kg de solo, sob condições de casa-de-vegetação. Essas plantas foram colocadas em gaiolas de filó e submetidas a uma população de moscas-brancas. A infestação artificial de mosca-branca foi realizada de forma que as densidades observadas no experimento superaram a densidade de 6 insetos por folíolo, o que suplanta o nível de dano econômico em culturas onde tal determinação existe no País, como é o caso de tomate (GUSMÃO, 2000). Após 12, 24, 48 e 72 horas de ataque, o primeiro trifolíolo foi coletado para posterior obtenção de extratos foliares. Decorridos esses tempos, os vasos foram transferidos para outra gaiola de filó com ausência completa de moscas-brancas. Em seguida, o mesmo procedimento de coleta foi efetuado nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas, após a retirada do inseto.

A fonte de enzimas foi a primeira folha trifoliolar de plantas de soja no estágio vegetativo V3 de desenvolvimento (FEHR e CAVINESS, 1977). O primeiro trifolíolo foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . O preparo do extrato bruto foliar foi realizado de acordo com o método de Ohta et al. (1986). A determinação de proteínas totais, no extrato bruto, foi realizada de acordo com o método de Smith et al. (1985). A atividade de lipoxigenase sobre o ácido linoléico foi determinada segundo o método descrito por Axelrod et al. (1981).

Para determinação do pH ótimo, os seguintes sistemas-tampão foram usados: 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 mmol.L^{-1} . A absorvância da mistura de reação a 234 nm foi determinada de 30 em 30 segundos por um período de 2,5 minutos, a 25°C . Para determinação da temperatura ótima, foi utilizado banho-maria, bem como espectrofotômetro com sistema de temperatura controlada a 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C . Os parâmetros cinéticos, no estado estacionário, foram obtidos por meio de regressão não-linear, empregando-se o programa de computação Enzfitter (LEATHERBARROW, 1987).

A determinação de inibidores de proteases foi realizada pela inibição da atividade da tripsina utilizando-se D,L-BApNA como substrato, de acordo com o método de Kakade et al. (1974). Para avaliar se os valores ΔI (diferença no nível de inibição de tripsina entre a planta submetida ao ataque do inseto e a planta-controle) obtidos no experimento são uma evidência significativa de que a presença do inseto aumenta a inibição tríplica, aplicou-se o teste *t* nas médias das diferenças ao longo do tempo. Testou-se a hipótese de que a diferença média é igual a zero, contra a hipótese alternativa unilateral de que a diferença é maior do que zero. Esse mesmo procedimento foi adotado para verificar se os dois genótipos (IAC-100 e IAC-100 TN) respondem à presença dos insetos de forma similar, porém, com testes bilaterais. Utilizou-se o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois picos mais acentuados de atividade de lipoxigenases foram observados a pH 4,5 e 6,0 para os dois genótipos analisados e seus respectivos controles (Figura 1). A atividade específica em diferentes valores de pH foi maior nos testes, sugerindo que as plantas de soja, submetidas ao ataque de mosca-branca, responderam a esse estresse pelo aumento de atividade de lipoxigenases. Os valores de pH ótimo observados estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores: Lanna et al. (1996) caracterizaram lipoxigenases de folha de soja dos genótipos Cristalina e IAC-100 com alta atividade em pH 6,0, genótipo UFV-TN com pH ótimo em 7,0 e ainda outros picos de atividade a pH 4,5 e 7,5. Vieira et al. (2001) também caracterizaram lipoxigenases de folhas de soja submetidas a ferimento mecânico, observando picos de pH para formação de hidroperóxidos em pH 4,5 e 6,0.

O maior valor de atividade específica de lipoxigenases ocorreu a 25°C para os dois genótipos e seus respectivos controles (Figura 2). Verifica-se mais uma vez que a atividade de lipoxigenases apresentou-se maior nos testes, indicando, novamente, que um dos mecanismos de resposta é a ativação da Via das Lipoxigenases. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Lanna et al. (1996) para lipoxigenases foliares de soja no estágio V4 de desenvolvimento dos genótipos IAC-100, UFV-TN e Cristalina. Também estão de acordo com os dados obtidos por Vieira et al. (2001) para lipoxigenases foliares de soja, no estágio V3 de desenvolvimento, de plantas da variedade IAC-100 e do genótipo IAC-100 TN, submetidas a ferimento mecânico, onde apresentaram pico de atividade a 25°C.

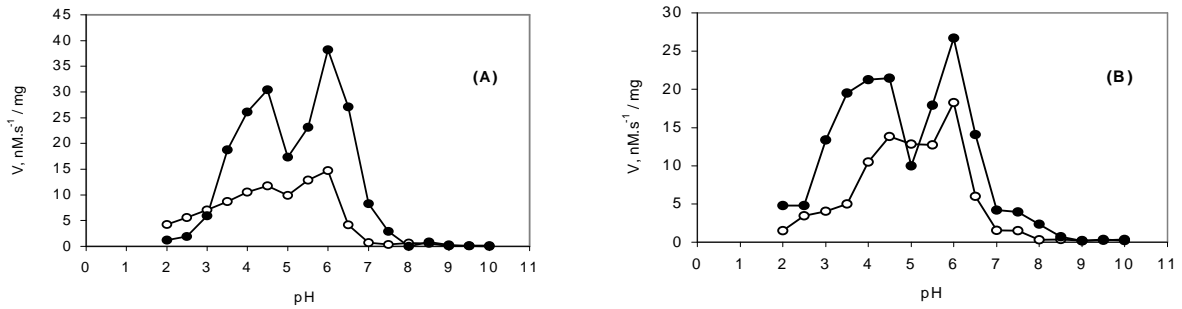
O K_M reflete o ambiente celular, ou seja, o valor de K_M estabelece o nível aproximado de substrato intracelular. A constante de Michaelis-Menten indica

uma adaptação relativa do substrato ao centro ativo da enzima. Assim, o substrato que apresenta um menor valor de K_M tem maior afinidade aparente pela enzima, sugerindo melhoria na eficiência catalítica (SEGEL, 1975; LEHNINGER et al., 1995).

Ambos os genótipos apresentaram gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que o *pool* de lipoxigenases de folhas de soja submetidas à ataque de mosca-branca segue a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de concentração de substrato analisada (Figuras 3).

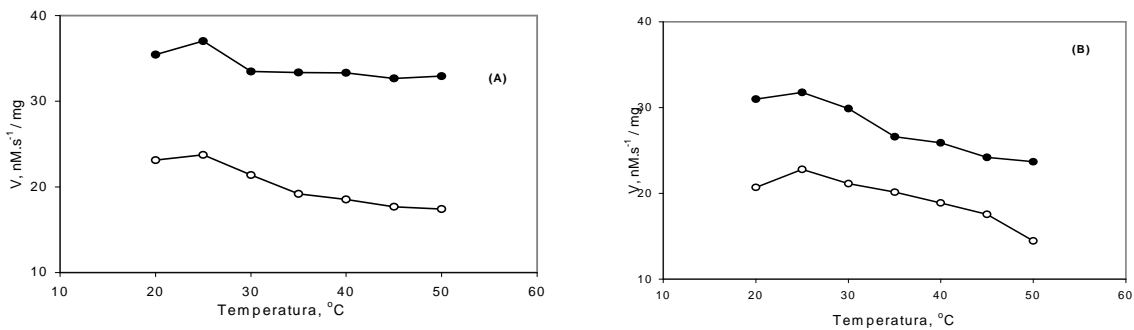
Para os dois genótipos, os valores de K_{Mapp} determinados no *pool* de lipoxigenases de folhas de soja, em 12, 24, 48 e 72 horas, em presença do inseto, apresentaram-se menores do que os respectivos controles (TABELA 1). Além disso, os valores de K_{Mapp} decresceram, para ambos os genótipos, com o tempo de ataque da planta pelo inseto (de 12 até 72 horas). Esse decréscimo indica uma alteração no *pool* de lipoxigenases, demonstrando uma otimização da atuação dessas isoenzimas em resposta ao ataque de mosca-branca. A diferença pouco pronunciada nos valores de K_{Mapp} , entre os dois genótipos, sugere que a remoção genética das três lipoxigenases de sementes, com o propósito de aumentar a aceitabilidade deste grão na dieta alimentar, não alterou a resposta da planta de soja contra insetos-praga.

Um dos produtos finais da Via das Lipoxigenases é o ácido jasmônico, sendo esse um sinalizador para a ativação de genes de defesa de plantas a insetos, os quais expressam para inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992). Assim, foi realizada a determinação de inibidores de proteases, observando aumento na produção deles em relação ao controle, em todos os tempos analisados, tanto durante a presença do inseto na planta (12, 24, 48 e 72 horas) quanto após a sua remoção (6, 12, 24 e 48 horas) (TABELA 2). De acordo com as análises estatísticas, concluiu-se que para o genótipo IAC-100 os valores são significativos a 1,3% e 3,32% na presença e após a remoção do inseto, respectivamente. Para o genótipo IAC-100 TN na presença do inseto, há evidências significativas ($p=1,48\%$) de efeito de inibição, ao passo que, após a remoção do inseto, as evidências são significativas a 5,16% de probabilidade. Não há evidências de que o efeito dos insetos na inibição da atividade de tripsina seja diferente entre os genótipos IAC-100 e IAC-100 TN durante a presença dos insetos ($p=17,72\%$) ou mesmo após a remoção dos insetos ($p=52,81\%$). Isso mostra que a remoção das lipoxigenases da semente da soja não afetou a resposta da planta ao ataque do inseto.



(●—●) representa a atividade do *pool* de lipoxigenases foliares das plantas atacadas por mosca-branca.
 (○—○) representa a atividade do *pool* de lipoxigenases foliares das plantas controle.

FIGURA 1 – Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, cultivar IAC-100 (A) e genótipo IAC-100 TN (B), em vários valores de pH. Primeiros trifolíolos coletados 24 horas após a remoção do inseto.



(●—●) representa a atividade do *pool* de lipoxigenases das plantas atacadas por mosca-branca.
 (○—○) representa a atividade do *pool* de lipoxigenases das plantas controle.

FIGURA 2 – Atividade específica de lipoxigenases de folhas de soja, cultivar IAC-100 (A) e genótipo IAC-100 TN (B), em vários valores de temperatura. Primeiros trifolíolos coletados 24 horas após a remoção do inseto.

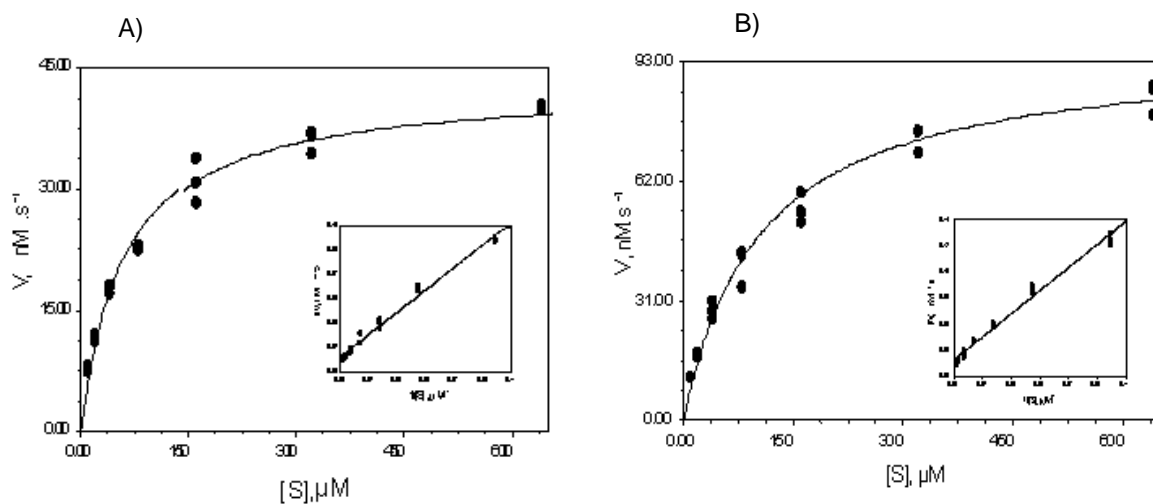


FIGURA 3 – Gráfico de Michaelis-Menten para a formação de hidroperóxido do ácido linoléico catalisada pelo *pool* de lipoxigenases foliares de plantas de soja, genótipos IAC-100 e IAC-100 TN representados respectivamente pelas letras A e B. Primeiro trifólio coletado 24 horas após a remoção do inseto. Condições experimentais: reação em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, a 25°C. Concentração do ácido linoléico 0,01 a 0,64 mM. Quantidade de extrato bruto: 1 μ L. Concentração de proteína total no extrato bruto: 0,96 mg/mL. A linha contínua foi traçada baseada em dados teóricos utilizando-se a equação de Michaelis-Menten para a obtenção de $K_{M\text{app}}$ e $V_{\text{máx app}}$. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico de Lineweaver-Burk.

TABELA 1 – Parâmetros cinéticos do *pool* de lipoxigenases de plantas de soja, obtidos a partir do primeiro trifólio coletado 12, 24, 48 e 72 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	IAC-100		IAC-100 TN	
	$K_{M\text{app}}$ (μ M)	$V_{\text{máx app}}$ (nM.s ⁻¹)	$K_{M\text{app}}$ (μ M)	$V_{\text{máx app}}$ (nM.s ⁻¹)
	122,47 (Controle)	227,70 (Controle)	116,74 (Controle)	112,22 (Controle)
Em presença do inseto				
12	87,78	131,39	96,15	81,92
24	79,69	83,64	80,84	70,15
48	68,65	69,36	60,41	61,42
72	36,77	71,86	54,29	87,06
Após remoção do inseto				
6	40,19	76,03	51,45	84,21
12	44,67	60,28	44,50	71,87
24	58,99	42,99	51,23	60,33
48	94,48	74,33	101,51	95,88

Esses resultados estão de acordo com Farmer e Ryan (1992) e Creelman e Mullet (1997), quando sugerem que o ácido jasmônico seja parte integral de um sistema de transdução de sinais intracelulares que regulam a transcrição de genes que codificam inibidores de proteases. A expressão de inibidores de tripsina em plantas de tabaco mostraram a redução na reprodução de mosca-branca, *Bemisia tabaci*. Portanto, inibidores de proteases em plantas mostram afetar o desenvolvimento de vários herbívoros (TAYLOR e LEE, 1997).

Assim, os resultados de aumento da atividade de lipoxigenases e de inibidores de proteases indicam um possível mecanismo de resposta da planta de soja ao ataque da mosca-branca, passando pela Via das Lipoxigenases. Isso parece ocorrer pelo aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e, em seguida, pelo aumento da ação da hidroperóxido ciclase, le-

vando à conversão dos hidroperóxidos formados em ácido 12-oxo-fitodienólico e, posteriormente, a ácido jasmônico. Este último é proposto interagir com um receptor de membrana, ativando a expressão de genes que expressam inibidores de proteases (FARMER e RYAN, 1992). Dessa forma, com esses resultados reforça-se a hipótese de que as isoenzimas lipoxigenases são enzimas-chave no mecanismo de resposta de plantas de soja contra herbívoros e que o acúmulo de inibidores de proteases esteja envolvido nesse mecanismo.

Uma importante estratégia que poderá ser utilizada no controle de insetos-praga, como é o caso da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*), é a produção de cultivares que expressem uma maior quantidade de inibidores de proteases em folhas para conferir plantas tolerantes ou resistentes a insetos-praga.

TABELA 2 – Inibição de tripsina por inibidores de proteases obtidos a partir do extrato bruto dos primeiros trifolhos coletados 12, 24, 48 e 72 horas (presença do inseto) e 6, 12, 24 e 48 horas (após remoção).

Tempo (horas)	Inibição trípica			
	(mg tripsina inibida.g ⁻¹ de proteína)			
	IAC-100		IAC-100 TN	
	Controle	Mosca-branca	Controle	Mosca-branca
Em presença do inseto				
12	32,19 ¹ ± 12,37	60,29 ± 8,66	10,53 ± 3,84	35,81 ± 3,54
24	27,97 ± 2,99	36,12 ± 5,69	13,59 ± 4,94	27,46 ± 1,56
48	57,69 ± 15,13	95,89 ± 13,46	4,36 ± 1,15	13,44 ± 0,52
72	76,20 ± 6,91	104,84 ± 1,12	48,42 ± 1,32	58,47 ± 1,30
Após remoção do inseto				
6	7,28 ± 0,05	25,88 ± 2,05	9,10 ± 2,40	47,45 ± 3,41
12	29,35 ± 6,68	31,87 ± 4,70	29,72 ± 0,58	30,93 ± 1,69
24	19,71 ± 1,41	57,02 ± 1,80	6,41 ± 1,81	25,50 ± 8,00
48	9,05 ± 0,35	31,05 ± 9,50	4,72 ± 1,13	66,31 ± 5,51

¹Valores são a média das análises de três repetições ± desvio-padrão.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M.; LAASKO, S. Lipoxygenases from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441-451, 1981.
- CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. **Annual Review of Plant and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 355-381, 1997.
- CROFT, K. P. C.; JÜNTTER, F.; SLUSARENKO, A. J. Volatiles products of the lipoxygenase pathway involved from *Phaseolus vulgaris* (L) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, New York, v. 101, p. 13-24, 1993.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings National Academy of Sciences**, Washington, v. 87, p. 7713-7716, 1990.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wounding inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, Dordrecht, v. 4, p. 129-134, 1992.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p.
- FERREIRA, L. T.; AVIDOS, M. F. D. Mosca-Branca: presença indispensável no Brasil. **BioTecnologia – Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 4, 1998.
- GUSMÃO, M. R. **Avaliação de vetores de virose, predadores e parasitóides e plano de amostragem para mosca-branca em tomateiro**. 2000. 42 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, p. 376-382, 1974.
- LANNA, A. C.; OLIVEIRA, M. G. A.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Kinetic parameters of leaf lipoxygenase pools from normal soybean genotypes and a line devoid of seed lipoxygenases. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 87-92, 1996.
- LEATHERBARROW, R. J. **Enzfitter manual biosoft**. London: [s.n.], 1987. 42 p.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, p. 911-918, 1986.
- PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. De novo biosynthesis of volatiles inducible by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiology**, New York, v. 114, p. 1161-1167, 1997.
- RYAN, C. A. Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Stanford, v. 28, p. 425-449, 1990.
- SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics**. New York: John Wiley & Sons, 1975. 957 p.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics: version 8.2**. 6. ed. Cary, 2001.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 15, p. 76-85, 1985.
- TAYLOR, M. A. J.; LEE, M. J. Trypsin isolated from the midgut of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, is inhibited by synthetic pro-peptides in vitro. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, [S.l.], v. 235, p. 606-609, 1997.
- VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. **Biochemistry and Biophysics**

Research Communications, [S.l.], v. 111, p. 470-477, 1983.

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 plants submitted to wounding. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 5-12, 2001.