

ATIVIDADE DE LIPOXIGENASES DURANTE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA¹

Ana Cláudia de Paula Dias^{2,6}

Múcio Silva Reis^{3,5}

Maria Goreti de Almeida Oliveira^{4,5}

Carlos Siqueyuki Sedyama^{3,5}

Maurílio Alves Moreira^{4,5}

RESUMO

Avaliou-se o comportamento de isoenzimas lipoxigenases durante o processo de germinação da soja com ou sem lipoxigenases na semente, em duas épocas de colheita. Sementes de linhagens com ausência das três lipoxigenases LOX1, LOX2 e LOX3 (CAC-1 triplo-nulo e Doko-RC triplo-nulo) e das variedades CAC-1 e Doko-RC foram colhidas no estágio de maturação R8 e aos 30 dias após o R8. A atividade das lipoxigenases, durante um período de 10 dias após a instalação do teste de germinação das sementes, foi determinada espectrofotometricamente a 234 e 280 nm. Os resultados indicaram que o perfil de atividade de LOX1 e LOX3 por miligrama de matéria fresca e por miligrama de proteína, nos materiais estudados, não foi afetado pelo retardamento da colheita. As duas variedades apresentaram perfil similar de atividade de LOX1, caracterizado por alta atividade na semente antes da embebição, seguida por declínio até o décimo dia após o início do teste de germinação. Não foi detectada atividade de LOX1 nas linhagens triplo-nulas. A atividade específica de LOX3 em sementes da variedade CAC-1 aumentou no 7º e 8º dias, ao passo que, em sementes de Doko-RC, declinou no 6º, 7º e 8º dias. No entanto, nas linhagens triplo-nulas, foi detectada atividade de LOX3 a partir do 8º dia após o início da germinação e, em Doko-RC triplo-nulo, além deste aumento final, observou-se aumento

¹ Aceito para publicação em 09.05.2002. Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada à UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

² Rua Tapuirama, 523/802. Bairro Osvaldo. 34400-436 Uberlândia, MG.

³ Dep. de Fitotecnia, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

⁴ Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFV. 36571-000 Viçosa, MG.

⁵ Bolsista do CNPq.

⁶ Autor para correspondência <acdias@triang.com.br>

entre o 3° e o 6° dias. Durante a germinação das sementes das linhagens triplo-nulas foi detectada atividade de LOX3.

Palavras-chaves: *Glycine max*, isoenzimas.

ABSTRACT

LIPOXYGENASES ACTIVITY DURING THE SOYBEAN SEEDS, GERMINATION

During the germination process of soybean seeds with or without lipoxygenases, the behaviour of the isoenzymes lipoxygenase was evaluated at two occasions during harvesting. Seeds of CAC-1 triple-null, Doko-RC triple-null, CAC-1 and Doko-RC were harvested at the R8 stage of maturity and 30 days after the R8. During a period of 10 days after the beginning of the seeds germination test, the lipoxygenases activity was determined by a spectrophotometric measurement at 234 and 280 nm. The results indicated that the profile of the LOX1 and LOX3 activity per fresh matter milligram and per protein milligram in the genotypes studied wasn't affected by the harvest delay. Both varieties showed a similar LOX1 activity profile, characterised by high activity in the seed before the steeping, followed by a lowering until the tenth day after the beginning of the germination test. LOX1 activity was not detected in triple-null lines. The LOX3 specific activity in CAC-1 seeds showed increase on the seventh and eighth days, whereas in Doko-RC seeds it lowered on the sixth, seventh and eighth days. On the other hand, in the triple-null lines, LOX3 activity was detected from the eighth day after the beginning of the germination, and in Doko-RC triple-null, besides final increase, there was an increase between the third and the sixth day. LOX3 this activity was detected during the triple-null lines seed germination.

Key words: *Glycine max*, isoenzymes.

INTRODUÇÃO

A semente de soja é uma fonte rica em lipoxigenases, contendo três isoenzimas, denominadas LOX1, LOX2 e LOX3. Diversas formas de lipoxigenases já foram caracterizadas em sementes de várias espécies, como: melancia (17), girassol (11), arroz (13) e cevada (9, 18).

Há vários trabalhos relacionando os produtos da ação de lipoxigenases com o processo de deterioração de sementes, porém pouco se sabe sobre seu papel fisiológico na semente. Hildebrand (6) relatou que a alta atividade de lipoxigenase nas sementes em germinação pode acelerar a ruptura de membranas celulares e facilitar o transporte de produtos armazenados para o desenvolvimento do embrião. Feussner et al. (4, 5) sugeriram que, durante a germinação conduzida na ausência de luz, a lipoxigenase inicia a mobilização de lipídios de reserva.

O aumento na atividade das lipoxigenases, associado à germinação e variação do nível de sua atividade durante este processo, tem sido observado em arroz (13), soja (10, 14, 16) e cevada (8, 18).

A expressão de isoenzimas lipoxigenases mostra um modelo complexo de desenvolvimento, com máxima expressão em tecidos mais metabolicamente ativos, como eixo embrionário e folhas jovens. Isso

parece indicar que as lipoxigenases, ou uma forma diferente das lipoxigenases da semente, podem desempenhar importante papel no desenvolvimento de plantas (1).

Visando melhorar as características organolépticas dos derivados da soja, pesquisadores têm removido as isoenzimas LOX1, LOX2 e LOX3 das sementes, por meio do melhoramento genético, tornando possível o desenvolvimento de variedades de soja com ausência de lipoxigenases nas sementes. Todavia, a função fisiológica dessas isoenzimas na semente ainda é desconhecida; suspeita-se que elas possam estar relacionadas, dentre outros, com o processo de germinação.

O objetivo do presente trabalho foi verificar o perfil de atividade de lipoxigenases durante a germinação de sementes de soja, em duas épocas de colheita, visando elucidar a relação estrutura/função de lipoxigenases neste processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes das variedades CAC-1 e Doko-RC e de linhagens com ausência das três lipoxigenases LOX1, LOX2 e LOX3 (CAC-1 triplo-nulo e Doko-RC triplo-nulo), obtidas por retrocruzamento, foram fornecidas pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa e pelo Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), respectivamente. As sementes das linhagens triplo-nulas utilizadas foram decorrentes de um *bulk* formado a partir de plantas que se encontravam na terceira geração do primeiro retrocruzamento.

Cerca de 400 sementes de cada variedade e das respectivas linhagens triplo-nulas foram multiplicadas no Campo Experimental Prof. Diogo Alves de Melo, do Departamento de Fitotecnia-UFV, em Viçosa, MG, no ano agrícola de 1996/97. Foram utilizadas quatro fileiras de 5 m de comprimento e espaçamento entre fileiras de 0,70 m, com densidade populacional de aproximadamente 20 plantas/m. As plantas de duas fileiras foram colhidas no estágio de maturação R8 da escala de Fehr e Caviness (3), e das outras duas, 30 dias após este estágio. Plantas individuais das linhagens triplo-nulas foram colhidas e suas sementes selecionadas com base na cor do hilo, de acordo com a cor característica da variedade progenitora recorrente, e, em seguida, agrupadas. As sementes colhidas das variedades e dos triplo-nulos foram mantidas em câmara fria e seca à temperatura de 10° C e umidade relativa do ar de 65 %, até o início dos trabalhos em laboratório.

Três sementes de cada tratamento, previamente esterilizadas em solução de álcool 50%, hipoclorito de sódio 0,8% e água destilada, respectivamente, durante 1 minuto, foram colocadas para germinar em três folhas de papel-toalha germitest, previamente umedecidas com água num volume de 2,5 vezes o peso do papel, formando-se rolos. As sementes foram posicionadas no quarto inferior do papel e os rolos colocados em germinador com temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A determinação da concentração de proteína e da atividade de lipoxigenases foi realizada diariamente, num período de 10 dias após a semeadura, coletando-se três

sementes por rolo, sendo cada semente uma repetição. O preparo do extrato vegetal, para estas determinações, foi feito utilizando-se 10 mg dos cotilédones das sementes e plântulas que foram macerados em cadinhos de porcelana previamente resfriados, mantidos a -20°C e homogeneizados na presença de 600 μL de tampão Tris-HCl 60 mM pH 8,2, contendo CaCl_2 15 mM e sacarose 13% (p/v). O homogenato foi centrifugado a $16200 \times g$ por 20 minutos a 4°C , para utilização do sobrenadante (extrato bruto).

A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA) desenvolvido por Smith et al. (15). Foram pipetados 50 μL de cada extrato vegetal e colocados dentro de tubos de ensaio; no branco foram pipetados 50 μL do tampão Tris-HCl 60 mM pH 8,2, contendo CaCl_2 15 mM e sacarose 13% (p/v). Em cada tubo de ensaio foi adicionado 1 mL de reagente de trabalho (50 partes de BCA:1 parte de solução de sulfato de cobre 4%), cujas soluções são comercialmente disponíveis. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C , um a um, permanecendo por 30 minutos cada um. Após o período de incubação os tubos foram retirados, um a um, e resfriados à temperatura ambiente por 20 minutos. A absorvância foi medida espectrofotometricamente a 562 nm, e a concentração de proteína foi determinada pela plotagem dos dados numa curva-padrão previamente determinada, em que foi utilizada como proteína-padrão a albumina sérica bovina. A quantidade de proteína por miligrama de matéria fresca foi obtida pela multiplicação dos valores de concentração de proteína pelo fator 1,2.

As atividades de LOX1 e LOX3 foram determinadas espectrofotometricamente, conforme Axelrod et al. (2), com modificações. Para a determinação da atividade de LOX1 utilizaram-se 1 mL de tampão borato de sódio 0,1 M, pH 9,5; 6 μL de linoleato de sódio 10 mM; e 2,5 μL de extrato bruto. Para a determinação da atividade de LOX3 foram utilizados 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 6,8; 35 μL de linoleato de sódio 10 mM; e 15 μL de extrato bruto. Mediu-se a absorvância a cada dois minutos, a 234 nm, para a determinação da atividade de LOX1 e a 280 nm, para a atividade de LOX3, utilizando-se para os cálculos os coeficientes de extinção molar $25.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e $22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

Quando à expressão dos resultados de atividade das lipoxigenases LOX1 e LOX3, foram calculados as médias e os desvios-padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de lipoxigenase 1 por miligrama de matéria fresca

A atividade de LOX1 por miligrama de matéria fresca nos cotilédones das sementes de CAC-1 triplo-nulo, CAC-1, Doko-RC triplo-nulo e Doko-

A atividade de LOX1 por miligrama de matéria fresca nos cotilédones das sementes de CAC-1 triplo-nulo, CAC-1, Doko-RC triplo-nulo e Doko-RC, colhidas no estágio R8 e 30 dias após, determinada diariamente até o décimo dia após a semeadura, está representada na Figura 1.

A atividade de LOX1 foi maior nas sementes não-embebidas e diminuiu ao longo do processo de germinação, em CAC-1. Já em CAC-1 triplo-nulo os valores foram muito baixos, sendo considerada nula a atividade (Figura 1A). Resultados semelhantes foram encontrados por Hildebrand e Hymowitz (7), segundo os quais a enzima ativa LOX1 nunca pode ser sintetizada nas sementes que tiveram a LOX1 removida. Tanto em CAC-1 como em CAC-1 triplo-nulo não foi observada diferença na atividade de LOX1 com o retardamento da colheita.

O perfil da atividade de lipoxigenase por peso de matéria fresca foi semelhante nas sementes de CAC-1 e Doko-RC (Figura 1 A e B).

Atividade específica de lipoxigenase 1

A atividade de LOX1 por miligrama de proteína nos cotilédones das sementes e das plântulas de CAC-1 triplo-nulo, CAC-1, Doko-RC triplo-nulo e Doko-RC, colhidas no estágio R8 e 30 dias após, determinada diariamente até o 10º dia após a semeadura, está representada na Figura 2.

O perfil da atividade de LOX1 por miligrama de proteína total extraída foi similar ao apresentado pela atividade de LOX1 por miligrama de matéria fresca, em sementes de CAC-1 e CAC-1 triplo-nulo (Figura 2A).

A atividade de LOX1 por miligrama de proteína total extraída (Figura 2 B) mostrou perfil semelhante ao apresentado pela atividade de LOX1 por miligrama de matéria fresca em Doko-RC triplo-nulo e Doko-RC; e não foi apresentada diferença entre as atividades de LOX1 nas sementes dos diferentes genótipos, colhidas nas duas épocas.

Segundo Hildebrand e Hymowitz (7), o perfil da atividade de LOX1 se assemelha mais ao perfil de proteína de reserva do que ao de uma enzima desempenhando papel dinâmico no metabolismo do desenvolvimento e da germinação de sementes. Dados obtidos por esses autores indicaram que a falta de LOX1 não teve efeito evidente no metabolismo da semente.

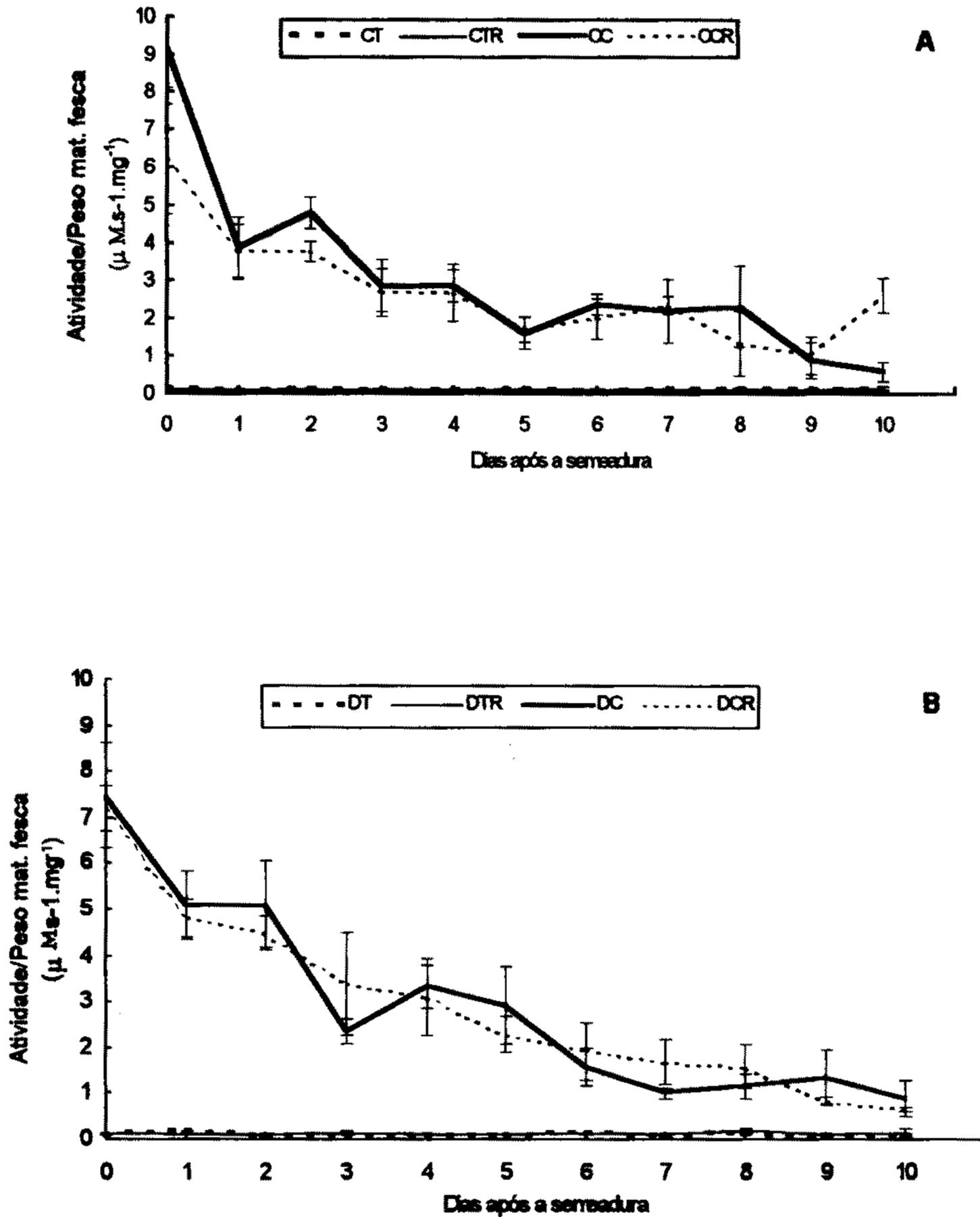


FIGURA 1 - Perfil de atividade de LOX1 por peso de matéria fresca ($A_{234} M \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$) nos cotilédones de sementes de: A) CAC-1 triplo-nulo (CT) e CAC-1 (CC) colhidas no estágio R8, e CAC-1 triplo-nulo (CTR) e CAC-1 (CCR) colhidas 30 dias após o estágio R8; B) Doko-RC triplo-nulo (DT) e Doko-RC (DC) colhidas no estágio R8, e Doko-RC triplo-nulo (DTR) e Doko-RC (DCR) colhidas 30 dias após o estágio R8, determinada até o 10º dia após a semeadura em substrato de papel.

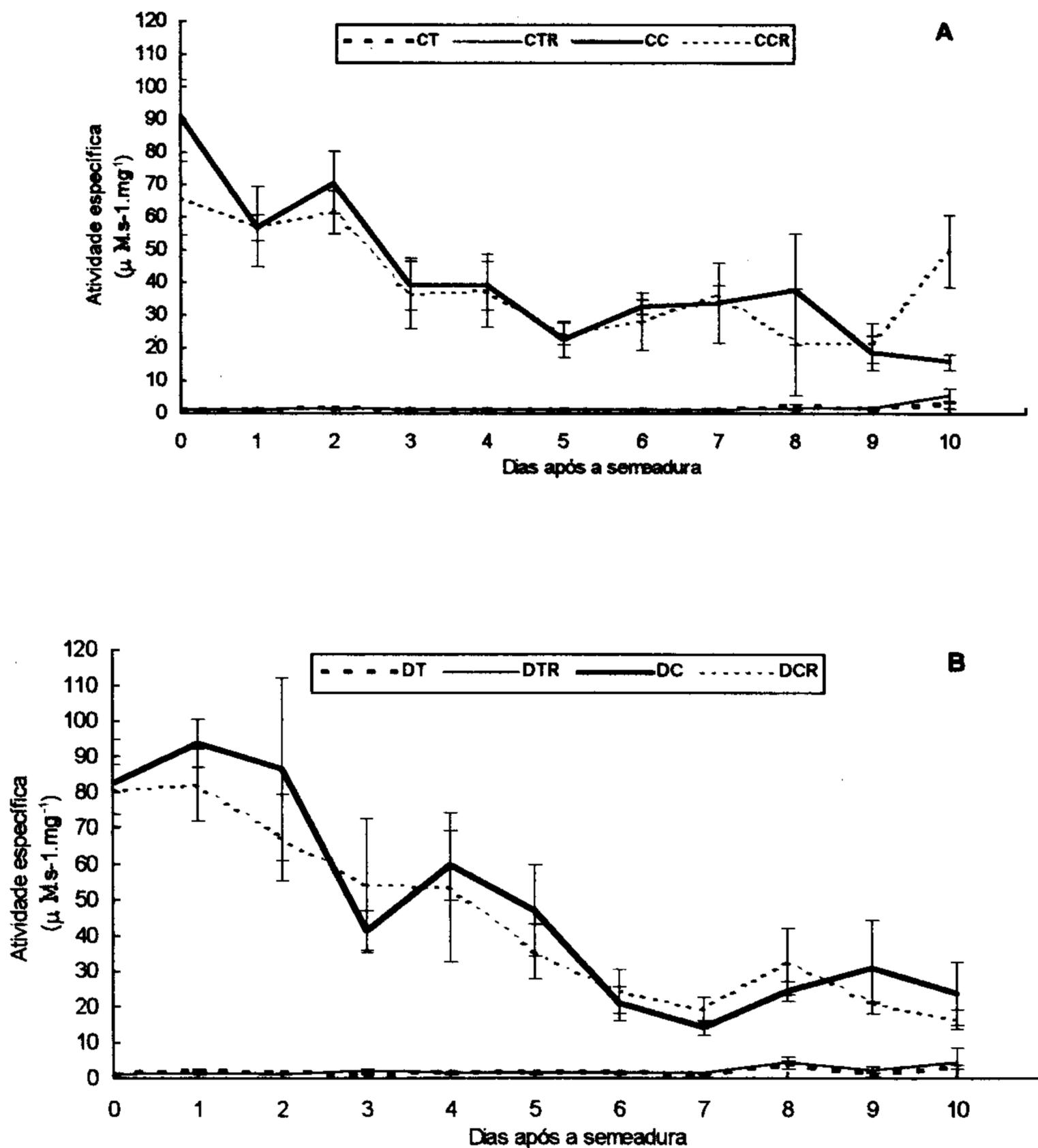


FIGURA 2 – Perfil de atividade específica de LOX1 ($A_{234} M \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$) nos cotilédones de sementes de: A) CAC-1 triplo-nulo (CT) e CAC-1 (CC) colhidas no estágio R8, e CAC-1 triplo-nulo (CTR) e CAC-1 (CCR) colhidas 30 dias após o estágio R8; B) Doko-RC triplo-nulo (DT) e Doko-RC (DC) colhidas no estágio R8, e Doko-RC triplo-nulo (DTR) e Doko-RC (DCR) colhidas 30 dias após o estágio R8, determinada até o 10º dia após a sementeira em substrato de papel.

Conforme Melan et al. (12), a LOX1 é produzida especialmente durante estádios iniciais da germinação e desempenha importante papel no funcionamento da epiderme, em arabdopsis.

A atividade de LOX1 apresentou declínio após o início da germinação nas variedades estudadas (Figuras 1 e 2). Resultados semelhantes foram obtidos em soja, em que Vernoooy-Gerritsen et al. (16), Park e Polacco (14) e Kato et al. (10) verificaram declínio na atividade de LOX1 com a germinação. Por outro lado, em arroz, Ohta et al. (13) não detectaram atividade de LOX1 em sementes germinadas; e, em girassol, Leoni et al. (11) não detectaram atividade em sementes não-germinadas.

Melan et al. (12), em arabdopsis, não detectaram atividade em sementes não-germinadas, e, em sementes recém-embebidas, relataram que a atividade de LOX1 aumentou até o segundo dia após esse período, permanecendo alta, e depois declinou. Yang et al. (18), trabalhando com sementes de cevada, verificaram que a atividade de LOX1 aumentou durante a germinação até o quinto dia. Por outro lado, Holtman et al. (8), também com sementes de cevada, observaram diminuição da atividade de LOX1 até o segundo dia após o início da germinação, a qual permaneceu, posteriormente, quase constante.

Atividade de lipoxigenase 3 por miligrama de matéria fresca

A atividade de LOX3 por miligrama de matéria fresca nos cotilédones das sementes de CAC-1 triplo-nulo, CAC-1, Doko-RC triplo-nulo e Doko-RC, colhidas no estádio R8 e 30 dias após, analisada diariamente até o 10º dia após a semeadura, está representada na Figura 3.

A atividade de LOX3 por miligrama de matéria fresca nas sementes de CAC-1 declinou no início da germinação, estendendo-se até o quinto dia; a partir deste, houve aumento, e após o sétimo dia, um novo declínio (Figura 3 A).

A atividade por miligrama de matéria fresca nas sementes de CAC-1 triplo-nulo apresentou pequeno aumento a partir do sexto dia após o início da germinação (Figura 3 A).

As sementes de Doko-RC, ao longo dos 10 dias, manifestaram, em geral, declínio na atividade de LOX3 por miligrama de matéria fresca (Figura 3 B), ao passo que as sementes de Doko-RC triplo-nulo manifestaram aumento na atividade de LOX3 a partir do terceiro dia após o início da germinação.

Esse aumento pode ter sido devido à síntese *de novo* da isoenzima LOX3 ou de uma LOX distinta desta. Para essa confirmação, seriam necessárias a purificação e caracterização cinética dessas isoenzimas.

Leoni et al. (11) verificaram aumento máximo na atividade de lipoxigenase em sementes de girassol, no período de quatro a cinco dias após o início da germinação.

Park e Polacco (14) relataram que, durante os cinco primeiros dias da germinação, no mínimo duas isoenzimas lipoxigenases, com pontos

isoelétricos diferentes de LOX1, LOX2 e LOX3, apresentaram atividade no hipocótilo e na radícula de plântulas de soja e foram detectadas em níveis equivalentes em genótipos com ou sem lipoxigenases.

Segundo Ohta et al. (13), o aumento na atividade de lipoxigenases na germinação de sementes de arroz é devido à síntese *de novo* da enzima, uma vez que, utilizando um inibidor de síntese de proteína, cicloheximida, este inibiu o aumento na atividade de lipoxigenase durante a germinação.

Atividade específica de lipoxigenase 3

A atividade de LOX3 por miligrama de proteína nos cotilédones das sementes de CAC-1 triplo-nulo, CAC-1, Doko-RC triplo-nulo e Doko-RC, colhidas no estágio R8 e 30 dias após, analisada diariamente até o 10º dia após a semeadura, está representada na Figura 4.

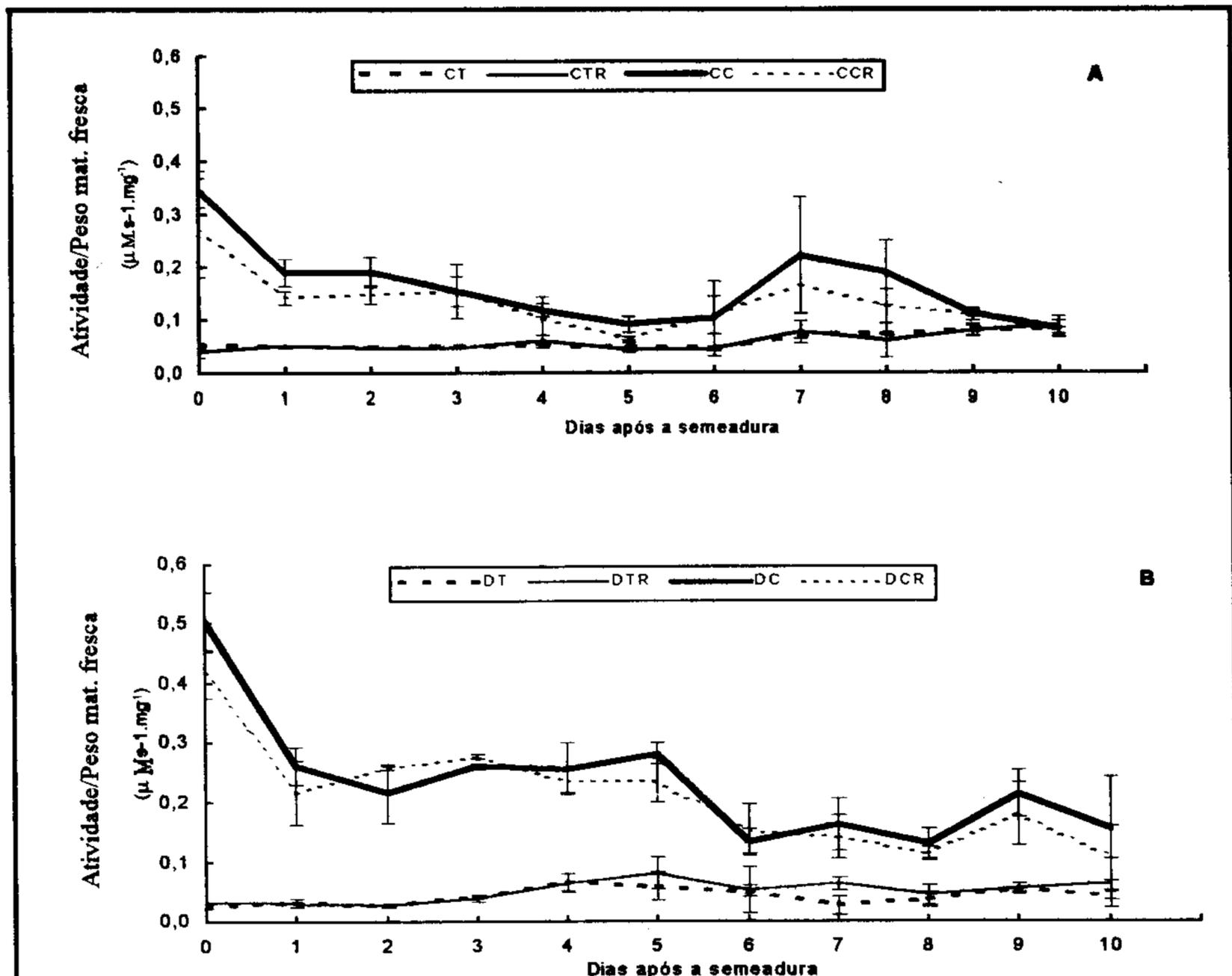


FIGURA 3 - Perfil de atividade de LOX3 por peso de matéria fresca ($A_{280} M \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$) nos cotilédones de sementes de: A) CAC-1 triplo-nulo (CT) e CAC-1 (CC) colhidas no estágio R8, e CAC-1 triplo-nulo (CTR) e CAC-1 (CCR) colhidas 30 dias após o estágio R8; B) Doko-RC triplo-nulo (DT) e Doko-RC (DC) colhidas no estágio R8, e Doko-RC triplo-nulo (DTR) e Doko-RC (DCR) colhidas 30 dias após o estágio R8, determinada até o 10º dia após a semeadura em substrato de papel.

O perfil da atividade de LOX3 por miligrama de proteína (Figura 4 A) foi semelhante ao perfil da atividade de LOX3 por miligrama de matéria fresca, apresentado pelas sementes de CAC-1 triplo-nulo e CAC-1, nas diferentes épocas de colheita, ficando mais evidente o aumento na atividade a partir do sexto dia após o início da germinação, nas sementes de CAC-1 triplo-nulo.

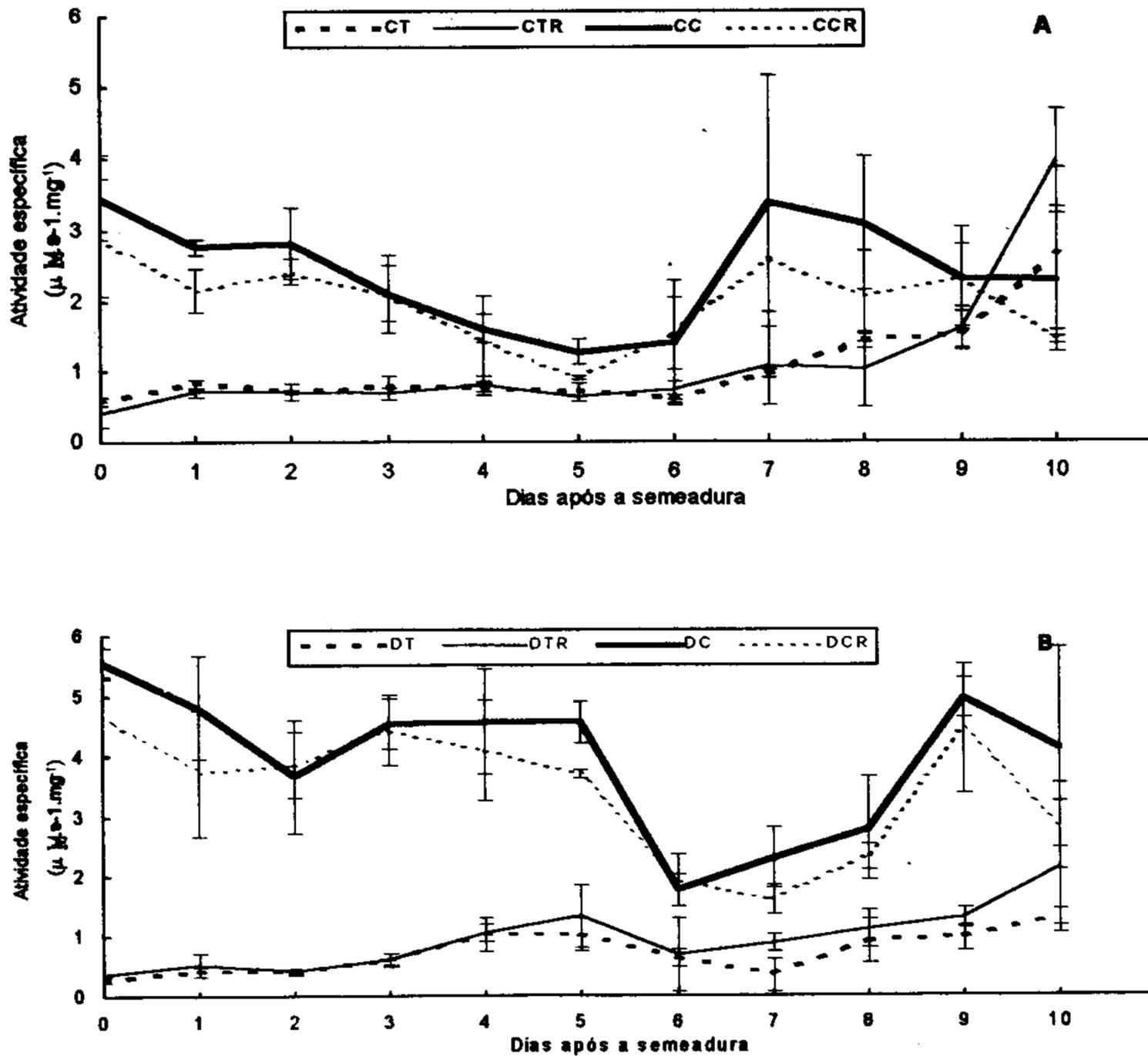


FIGURA 4 - Perfil de atividade específica de LOX3 ($A_{280} M \cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$) nos cotilédones de sementes: A) de CAC-1 triplo-nulo (CT) e CAC-1 (CC) colhidas no estágio R8, e CAC-1 triplo-nulo (CTR) e CAC-1 (CCR) colhidas 30 dias após o estágio R8; B) Doko-RC triplo-nulo (DT) e Doko-RC (DC) colhidas no estágio R8, e Doko-RC triplo-nulo (DTR) e Doko-RC (DCR) colhidas 30 dias após o estágio R8, determinada até o 10º dia após a semeadura em substrato de papel.

Na Figura 4 B podem ser observadas as variações na atividade de LOX 3 por miligrama de proteína, ao longo do período de germinação, com as sementes de Doko-RC apresentando um declínio inicial na atividade; posteriormente, elas mostraram aumento até o quinto dia, tendo os menores valores no sexto, sétimo e oitavo dias, retomando-se o aumento no sétimo dia após o início da germinação.

As sementes de Doko-RC triplo-nulo apresentaram aumento mais evidente na atividade a partir do terceiro dia; no sexto - sétimo dia houve um declínio; e, posteriormente, elas retomaram o aumento até o décimo dia. Este aumento na atividade específica de LOX3 a partir do sexto dia, nas sementes de Doko-RC triplo-nulo, foi observado também nas sementes de CAC-1 triplo-nulo.

Resultados semelhantes aos obtidos com sementes de Doko-RC triplo-nulo foram relatados por Kato et al. (10), que atribuíram o aumento na atividade a três novas formas de lipoxigenases em cotilédones de soja, principalmente a denominada por eles LOX4, uma isoenzima semelhante a LOX2 e LOX3, que aparece devido à síntese *de novo* da proteína. Embora as condições de crescimento das plântulas tenham sido semelhantes às deste trabalho, a atividade destas novas lipoxigenases declinam nos estádios finais da germinação, diferindo, neste ponto, dos resultados observados neste estudo.

CONCLUSÕES

1) A atividade das lipoxigenases durante a germinação das sementes não é prejudicada pelos efeitos do retardamento da colheita.

2) Durante a germinação surgem formas de lipoxigenase com atividades de LOX3.

3) A LOX1 apresenta maiores níveis de atividade do que a LOX3, porém não há atividade de LOX1 nas sementes das linhagens triplo-nulas, durante a germinação; já a LOX3 apresenta atividade nas sementes dessas linhagens.

4) A atividade de LOX3, nas sementes das linhagens triplo-nulas, apresenta picos em diferentes dias de germinação, variando conforme o cultivar que deu origem aos triplo-nulos.

REFERÊNCIAS

1. ALTSCHULER, M.; GRAYBURN, W. S.; COLLINS, G. B. & HILDEBRAND, D. F. Developmental expression of lipoxygenase in soybeans. *Plant Science*, 63:151-8, 1989.
2. AXELROD, B.; CHEESBROUGH, T. M. & LAAKSO, S. Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology*, 71:441-51, 1981.
3. FEHR, W. R. & CAVINESS, C. E. Stages of soybean development. Ames, Iowa State University, Cooperative Extension Service, 1979. 12p.

4. FEUSSNER, I.; WASTERACK, C.; KINDL, H. & KUHN, H. Lipoxygenase - catalyzed oxygenation of storage lipids is implicated in lipid mobilization during germination. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 92:11849-53, 1995.
5. FEUSSNER, I.; HAUSE, B.; NELLEN, A.; WASTERACK, C. & KINDL, H. Lipid-body lipoxygenase is expressed in cotyledons during germination prior to other lipoxygenase forms. *Planta*, 198:288-93, 1996.
6. HILDEBRAND, D. F. Lipoxygenases. *Physiologia Plantarum*, 76:249-53, 1989.
7. HILDEBRAND, D. & HYMOWITZ, T. Lipoxygenase activities in developing and germinating soybean seeds with and without lipoxygenase-1. *Botanical Gazette*, 144:212-6, 1983.
8. HOLTMAN, W.L.; DUYN, G. van; SEDEE, N. J. A. & DOUMA, A. C. Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley. *Plant Physiology*, 111:569-76, 1996.
9. HUGUES, M.; BOIVIN, P.; GAVILLARD, F.; NICOLAS, J.; THIRY, J. M. & FORGET, F. R. Two lipoxygenases from germinated barley-heat and kilning stability. *Journal of Food Science*, 59:885-9, 1994.
10. KATO, T.; OHTA, H.; TANAKA, K. & SHIBATA, D. Appearance of new lipoxygenases cotyledons after germination and evidence for expression of a major new lipoxygenase gene. *Plant Physiology*, 98:324-30, 1992.
11. LEONI, O.; IORI, R. & PALMIERI, S. Purification and properties of lipoxygenase in germinating sunflower seeds. *Journal of Food Science*, 50:88-92, 1985.
12. MELAN, M. A.; ENRIQUEZ, A. L. D. & PETERMAN, T. K. The LOX1 gene of *arabidopsis* is temporally and spatially regulated in germinating seedlings. *Plant Physiology*, 105:385-93, 1994.
13. OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B. & MORITA, Y. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiology*, 27:911-8, 1986.
14. PARK, T. K. & POLACCO, J. C. Distinct lipoxygenase species appear in the hypocotyl/radicle of germinating soybean. *Plant Physiology*, 90:285-90, 1989.
15. 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*, 150:76-85, 1985.
16. VERNOOY-GERRITSEN, M.; BOS, A. L. M.; VELDINK, G. A. & VLIEGENTHART, J. F. G. Localization of lipoxygenases 1 and 2 in germinating soybean seeds by an indirect immunofluorescence technique. *Plant Physiology*, 73:262-7, 1983.
17. VICK, B. A. & ZIMMERMAN, D. C. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase in germinating watermelon seedling. *Plant Physiology*, 57:780-8, 1976.
18. YANG, G.; SCHWARZ, P. B. & VICK, B. A. Purification and characterization of lipoxygenase isoenzymes in germinating barley. *Cereal Chemistry*, 70:589-95, 1993.