

PERFILES ISOENZIMATICOS DE SUPEROXIDO DISMUTASA EN CAFETO

por

Martha Daza*, Virginia Montes de Gómez**, Marco Quijano-Rico***,
& L.A. Del Río****

Resumen

Daza, M., V. Montes, M. Quijano & L. Del Río: Perfiles no enzimáticos de superóxido dismutasa en Cafeto. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 18 (70): 403-408, 1992. ISSN 0370-3908.

Se determinaron los perfiles (SOD; EC 1.15.1.1) presentes en extractos crudos de hojas de cafeto. Las metaloenzimas se identificaron con base en su sensibilidad diferencial a los inhibidores KCN 2mM y peróxido de hidrógeno 5mM. En la variedad Caturra, *Coffea arabica* L., (susceptible a la roya del cafeto) se encontraron al menos tres bandas con actividad SOD: la más anódica posiblemente una Mn-SOD, una banda intermedia con actividad Cu, Zn-SOD, y una banda catódica, probablemente una Fe-SOD.

En el híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*) y en la var. Colombia (*C. arabica* x Híbrido de Timor), resistentes a la roya se detectaron al menos 5 bandas con actividad SOD: la más anódica, probablemente una Mn-SOD, 3 bandas intermedias, posiblemente Cu, Zn-SODs y una banda catódica, probablemente una Fe-SOD. En *C. liberica* se encontraron 2 isoenzimas Cu, Zn-SODs. La presencia de isoenzimas parece estar relacionada genéticamente con las especies analizadas. La Fe-SOD ha sido detectada en pocas familias de plantas superiores.

Palabras clave: Superóxido dismutasas, Fe-superóxido dismutasa, Mn-superóxido dismutasa, Cu, Zn-superóxido dismutasa, cafeto.

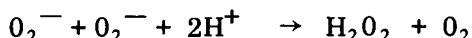
Abstract

The isoenzymatic profiles of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) present in crude extracts of leaves of *Coffea arabica* and *Coffea liberica*, were determined. The different metaloenzymes were identified according to their differential sensibility to the inhibitors KCN 2 mM and H₂O₂ 5 mM. In the Caturra variety, (susceptible to the rust) at least 3 electrophoretic bands with SOD were found: The most anodic, possibly a Mn-SOD; an intermediate band with Cu-Zn-SOD activity, and a cathodic band, probably Fe-SOD. In the Timor hybrid (*C. arabica* x *C. canephora*) and the Colombia variety (*C. arabica* L x Timor hybrid), both resistant to coffee rust, at least five bands with SOD activity were detected: The most anodic, probably Mn-SOD; 3 intermediate bands with SOD activity, possibly Cu-Zn-SOD, and a cathodic band, probably Fe-SOD.

In *C. liberica* only 2 isoenzymes Cu-Zn-SOD were found. The presence of the different isoenzymes apparently is related genetically with the two species that were analysed. The Fe-SOD has been found in few families of higher plants.

Introducción

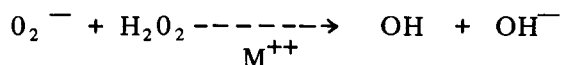
Las superóxido dismutasas (SOD; E.C. 1.15.1.1) constituyen una familia de metaloenzimas que catalizan la dismutación de los radicales libres superóxido (O_2^-) según la siguiente ecuación:



Esta actividad enzimática fue descubierta por McCord y Fridovich en 1969.

Los radicales superóxido en células vegetales pueden generarse en: cloroplastos, Asada (1984); mitocondrias, Boveris (1984) y en membranas microsomales, Mayak et al, (1983).

Los radicales superóxido pueden causar daño directamente a los tejidos biológicos, Tepperman et al (1990) o a través de la generación de especies activadas del oxígeno como el radical hidroxilo (OH), Halliwell y Gutteridge, (1985) mediante una reacción Haber-Weiss, catalizada por metales, así:



M^{++} puede ser Cu, Fe o Ti.

Estas metaloenzimas se presenta en tres formas moleculares que difieren entre sí, según su grupo prostético metálico ligado a la enzima. Una clase contiene Cu, Zn y a ella pertenecen la primera superóxido dismutasa aislada por McCord y Fridovich en 1969 de eritrocitos bovinos y las dos restantes contienen Fe y Mn respectivamente.

En general la toxicidad del oxígeno esta determinada por tres procesos: 1) inactivación de enzimas por oxidación de grupos tiol o de los metales en el sitio activo, 2) hidroxilación de compuestos aromáticos y 3) peroxidación de lípidos, Frank, (1985).

Las superóxido dismutasas son un componente esencial de los sistemas de detoxificación del oxígeno en todos los organismos.

Las Fe-SODs han sido detectadas en pocas familias de plantas superiores (tabla 1) Salin y Bridges, (1982) detectaron la presencia de Fe-SODs tan solo en un total de tres familias (Gingkoaceae, Nymphaeaceae y Cruciferae) de 43 analizadas.

Las distintas SODs se identifican con base en su sensibilidad diferencial a los inhibidores KCN 2mM y H_2O_2 5mM, (tabla 2).

En desarrollo del presente trabajo se identifican las distintas isoenzimas superóxido dismutasas presentes en extractos crudos de hojas de cafeto de las variedades Caturra y Colombia de la especie *C. arabica* L., del Híbrido de Timor (*C. canephora* x *C. arabica* L.) y de la especie *C. liberica* Bull sobre geles de poliacrilamida al 10% empleando el método fisicoquímico de Weissiger y Fridovich (1973) y su sensibilidad diferencial a los inhibidores KCN 2mM y H_2O_2 5mM.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se emplearon hojas (segundos pares y bien desarrollados) de cafeto de las variedades Caturra (*C. arabica* L.) y Colombia (*C. arabica* L. x Híbrido de Timor), de la especie *C. liberica* Bull, provenientes de la finca "Misiones" (Viotá, Cundinamarca); lo mismo que del Híbrido de Timor (*C. canephora* x *C. arabica* L.), proveniente de la finca "Naranjal" (Chinchiná, Caldas).

Preparación de los extractos crudos de hojas de cafeto

Las hojas se lavaron con abundante agua desmineralizada, se secaron con papel absorbente y se mantuvieron en la nevera durante 5 minutos, con el objeto de evitar los cambios bruscos de temperatura. Posteriormente se les retiró la nervadura central, se pesaron y se cortaron en pequeños pedazos y se homogeneizaron en el medio indicado en la tabla 3, (relación peso/volumen, 1/4)) empleando un homogenizador Sorvall a velocidad máxima durante 2-3 minutos. El homogeneizado se filtró a través de dos capas de una tela de algodón previamente con agua desmineralizada y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos, en una centrifuga refrigerada a 4°C, recogiendo los sobrenadantes para los ensayos correspondientes.

Determinación de actividad isoenzimática SOD

Las distintas isoenzimas de superóxido dismutasa se individualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando la técnica vertical en geles cilíndricos, Davis (1964). Se emplearon geles al 10% en acrilamida y 0.53% en bisacrilamida. A cada gel se aplicaron aprox. 90µg de proteína vegetal. Tampon Tris Gly-HCl 38 mM, 3.5 mA/Gel 1 cm ø.

La actividad SOD fue localizada por el método fisicoquímico de Weissiger y Fridovich (1973), basado en la reducción del azul del nitrotetrazolio (NBT) por los radicales libres superóxido generados por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametil-etilendiamina (TEMED).

* Investigador Becario Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y los Productos Naturales (LIQC).

** Profesor Asociado Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

*** Director LIQC. Calle 26A No. 37-28 Santafé de Bogotá, D.C. Colombia.

**** Director de Unidad de Bioquímica Vegetal, Estación Experimental del Zaidín, Granada, España.

Tabla 1
Distribución de Fe-SODs en plantas superiores

Familia	Especie	Referencia
Ginkgoaceae	<i>Ginkgo biloba</i>	(1)
Nymphaeaceae	<i>Nuphar luteum</i>	
	subsp. <i>macrophyllum</i> (Small) Beal	(2)
	<i>Nympha odorata</i> Ait.	(3)
Cruciferae	<i>Brassica campestris</i> L.	(3)
	<i>Brassica rapa</i> L.	(3)
	<i>Brassica oleracea</i> L.	(3)
	<i>Raphanus sativus</i> L.	(3)
	<i>Rorippa sessiflora</i> (Nutt) Hitchcock	(3)
Rutaceae	<i>Citrus limonum</i>	(4)
Solanaceae	<i>Lycopersicum sculentum</i>	(5)
Leguminosae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	(5)

(1) Duke y Salin, 1985, (2) Salin y Bridges, 1982, (3) Bridges y Salin, 1981, (4) Sevilla et al, 1984, (5) Kwiatowski y Kaniuga, 1984.

Tabla 2
Identificación de las distintas isoenzimas superóxido dismutasas con base en su sensibilidad diferencial al KCN y al H₂O₂

Isoenzima	Inhibidor	
	KCN 2 mM	H ₂ O ₂ 5 mM
Cu, Zn-SOD	sensible (1) (2)	sensible (3) (4) (5)
Mn-SOD	insensible (1) (2)	insensible (1) (2) (6)
Fe-SOD	insensible (1) (2)	sensible (7) (8) (9)

(1) Fridovich, 1986, (2) Asada et al, 1973, (3) Hodgson y Fridovich, 1973, (4) Rigo et al, 1986, (5) Bray et al, 1974, (6) Bridges y Salin, 1981, (7) Yakamura et al, 1986, (8) Salin y Bridges, 1982, (9) Salin, 1985.

Tabla 3
Medio de estracción para superóxido dismutasas de hojas de cafeto

Compuesto	Concentración
Buffer Tris-HCl, pH 7.2	50 mM
Dititritol	5 mM
Metabisulfito de potasio	10 mM
EDTA-Na	1 mM
Polivinilpolipirrolidona (PVPP)	1 %
Albúmina sérica bovina (ASB)	0.5 %
Tritón X-100	0.2 %

En estas condiciones los geles se tiñen uniformemente de violeta excepto en aquellas zonas donde hay actividad SOD, que aparecen incoloras. Para ello los geles se incubaron en oscuridad a 25°C en una solución de NBT 2.45×10^{-3} M en buffer fos-

fato 50 mM pH 7.8, durante 20 minutos. A continuación se eliminó el NBT por medio de un lavado rápido con buffer fosfato 50 mM, pH 7.8 y se adicionó una solución de TEMED 0.28 mM y riblofavinina 2.8×10^{-5} M en el buffer anterior, manteniéndose a 25°C durante 15 minutos. Seguidamente se lavaron los geles con buffer fosfato 50 mM, pH 7.8 y se iluminaron con dos lámparas fluorescentes Sylvania hasta alcanzar el máximo contraste entre las zonas acromáticas y la coloración de fondo del azul de formazan.

La identificación de las diferentes bandas con actividad SOD se efectuó mediante el uso de inhibidores KCN 2 mM y H₂O₂ 5 mM. Una vez terminada la electroforesis, los geles se incubaron en buffer fosfato 50 mM, pH 7.8 en presencia y en ausencia de KCN y 2 mM y H₂O₂ 5 mM durante 45 minutos a 25°C. Una vez lavados los geles con buffer 50 mM, pH 7.8, se llevó a cabo el revelado

fotoquímico de actividad superóxido dismutasa por el método del NBT descrito anteriormente.

Después de reveladas las distintas bandas con actividad SOD, los geles se registraron densitométricamente mediante un fotómetro-integrador Vernon Mod PHI-6.

Resultados y Discusión

Al someter los extractos crudos de hojas de diferentes variedades de cafeto a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y posterior tinción con NBT e identificación de las distintas bandas con actividad SOD, empleando como criterio su sensibilidad diferencial a los inhibidores: KCN 2 mM y H_2O_2 5 mM, se encontró:

En la variedad Caturra (*C. arabica* L.), susceptible a la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.) la presencia de al menos 3 bandas con actividad SOD, (Fig. 1). La banda más catódica, probablemente una Mn-SOD por su insensibilidad a ambos inhibidores empleados, la banda intermedia sensible tanto al cianuro como al peróxido, atribuible de ser una Cu, Zn-SOD y la banda más anódica, posiblemente una Fe-SOD por su sensibilidad al peróxido de hidrógeno más no al cianuro.

Las Fe-SOSs han sido detectadas en pocas familias de plantas superiores, (tabla 1). La identificación de una Fe-SOD en la especie *C. arabica* L., familia Rubiaceae, aumenta el pequeño número de familias de plantas superiores en las cuales ha sido encontrada esta isoenzima.

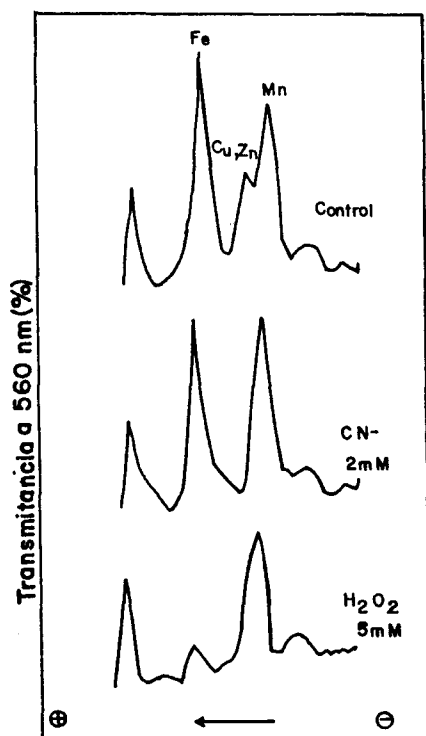


Figura 1. Perfil isoenzimático de SOD presentes en extractos crudos de hojas de cafeto (*C. arabica* L.; var. Caturra, Viotá). Basado en electroforesis sobre poliacrilamida (10% acrilamida 0,53% Bisacrilamida) pH 8,2 Tampon Tris-Gly-HCl 38 mM.

La identificación de las Fe-SODs en extractos crudos de otras fuentes: *Escherichia coli*, Yost y Fridovich (1973); *Brassica campestris*, Salin y Bridges (1981) y *Nuphar luteum*, Bridges y Salin (1982) basada en su sensibilidad al H_2O_2 sobre geles de poliacrilamida ha sido confirmada por estos mismos autores trabajando con la enzima purificada y por análisis del contenido en metal por espectroscopía de absorción atómica, (tabla 4).

Bray et al (1974) demostraron que la exposición de la Cu, Zn-SOD (eritrocitos bovinos) a concentraciones de H_2O_2 1 mM ocasionaba una inactivación completa de la enzima antes de 1 minuto.

Tabla 4
Contenido en metales de la Fe-SOD de *Nuphar luteum* (lirio de agua) y de *Brassica campestris* (mostaza).

Metal (átomos dímico)	N. luteum ¹ ppm	B. campestris ² ppm
Fe	1.6 + 3	0.75 + 0.2
Mn	— 0.3	— 0.07
Cu	— 0.1	—
Zu	—	— 0.3

(1) Salin y Bridges, 1982, (2) Salin, 1985.

En la inactivación de la Fe-SOD por H_2O_2 , Yakamura et al, (1986) encontraron una modificación en los aminoácidos histidina, triptófano y cisteína y propusieron que la inactivación ocurre cuando el hierro férrico es reducido a ferroso.

Observamos además, un banda con aparente actividad SOD, localizada exactamente en el frente de migración electroforética, cianuro y peróxido resistente, (Fig. 1). Creemos que esta es un artefacto probablemente debido a los compuestos fenólicos presentes en los extractos crudos de las hojas de cafeto, ya que no se tiñó con azul de Coomassie y por tanto no corresponde a peptidos.

Há sido demostrado por Robak y Gryglewski, (1988) en un sistema "in vitro" que los flavonoides son capturadores de radicales superóxido y por tal razón presentan una actividad similar a la de la enzima superóxido dismutasa.

Al comparar los perfiles isoenzimáticos presentes en extractos crudos de hojas de cafeto provenientes de plantas adultas de la variedad Caturra (aprox. 5 años de edad) desarrolladas en el campo con los presentes en extractos crudos de hojas de plántulas de aprox. año y medio de edad, se observó en estos últimos la carencia de la isoenzima Cu, Zn-SOD, (Fig. 2).

Hassan y Moody, (1986) plantean que el aumento de la actividad SOD en procariotes en respuesta a cambios específicos en el crecimiento,

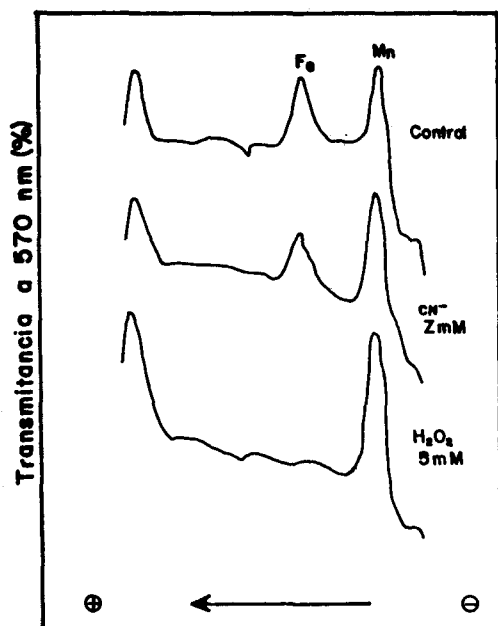


Figura 2. Perfil isoenzimático de SOD presentes en extractos crudos de hojas de Cafeto (*C. arabica* L. var. *Caturra*, Invernadero). Basado en electroforesis sobre poliacrilamida (10% acrilamida 0,53% Bisacrilamida) pH 8,2 Tampon Tris-Gly-HCl 38 mM.

puede ser explicado teniendo en cuenta que a ratas de crecimiento altas corresponden altas ratas de respiración y por lo tanto altas ratas de producción de radicales superóxido.

Es importante resaltar el hecho de la expresión diferencial de estas isoenzimas en etapas tempranas del desarrollo (plántulas) donde se encontraron únicamente dos metaloenzimas SOD (Mn-SOD y Cu, Zn-SOD) y en estadio adulto, el cual presentó tres isoenzimas (Mn-SOD, Cu, Zn-SOD y Fe-SOD).

Tanto en el Híbrido de Timor, el cual es un híbrido natural que se originó en la isla de este nombre por el cruzamiento espontáneo entre las especies *C. arabica* L. y *C. canephora* y que posee el mismo número de cromosomas correspondientes al arábigo, Moreno y Castillo, (1984) como en la variedad Colombia (*C. arabica* L x Híbrido de Timor), se detectó la presencia de al menos 5 bandas con actividad SOD, (Fig. 3).

La banda más catódica, atribuible de ser una Mn-SOD por su insensibilidad a los inhibidores empleados; 3 bandas con actividad Cu, Zn-SOD por su sensibilidad tanto al cianuro como al peróxido de hidrógeno y una banda anódica, posiblemente una Fe-SOD.

A diferencia de las variedades de cafeto que poseen genes de la especie *C. arabica* L., las cuales presentaron en sus perfiles isoenzimáticos SOD, las tres isoenzimas SOD (Mn-SOD, Cu, Zn-SOD y Fe-SOD), en la especie *C. liberica* Bull se detectó, únicamente la presencia de dos bandas con actividad SOD, atribuibles de ser Cu, Zn-SOD por su sensibilidad tanto al cianuro como al peróxido de hidrógeno, (Fig. 4).

Sobresale el hecho que los cafetos resistentes a la roya: variedad Colombia, Híbrido de Timor y *C. liberica* Bull posean una mayor proporción de isoenzimas Cu, Zn-SODs que la variedad susceptible, Caturra. El Híbrido de Timor y la variedad Colombia poseen tres isoenzimas Cu, Zn-SODs; *C. liberica* dos, mientras que la variedad Caturra una.

Acorde con los resultados obtenidos se puede concluir que las variedades de cafeto estudiadas que poseen genes de la especie *C. arabica* L., como: Híbrido de Timor, Colombia y Caturra presentan en su perfil isoenzimático SOD, la Fe-isoenzima.

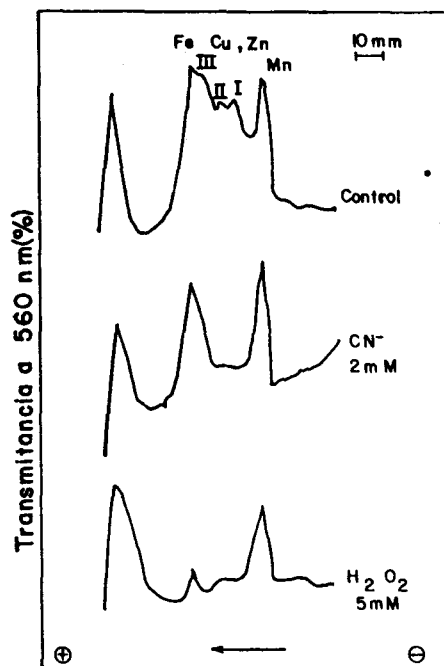


Figura 3. Perfil isoenzimático SOD de extractos crudos de hojas de Cafeto (*C. canephora* x *C. arabica* L.: Híbrido de Timor, Chinchina). Basado en electroforesis sobre poliacrilamida (10% acrilamida y 0,53% Bisacrilamida) pH 8,2 Tampon Tris Gly HCl 38 mM.

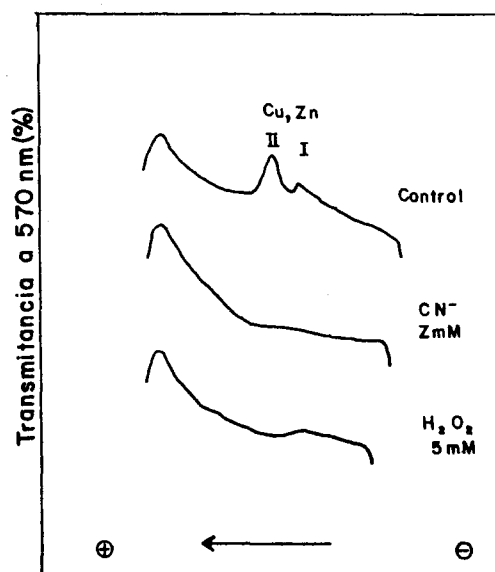


Figura 4. Perfil isoenzimático Superóxido Dismutasa en extractos crudos de hojas de cafeto (*C. liberica* Bull). Electroforesis en poliacrilamida. Tampon Tris Gly-Gly-HCl 38 mM Acrilamida 10%, Bisacrilamida 0,53%.

Es importante resaltar que las Fe-SODs se consideran propias de procariotes. La familia a la cual pertenece el cafeto (Rubiaceae) junto con las familias Leguminosae y Solanaceae son las más avanzadas evolutivamente en las que se ha detectado esta isoenzima.

También se puede plantear que exista una posible regulación dependiente del estadio de desarrollo del cafeto sobre la expresión de las diferentes isoenzimas SOD. En el estadio de desarrollo vegetativo se observó únicamente la presencia de una Mn y una Fe-SOD, en la variedad Caturra, mientras que en el estadio adulto se encontró, además, la presencia de una Cu, Zn-SOD.

La caracterización molecular y la localización subcelular de estas isoenzimas en diferentes especies y variedades de cafeto proveerá más información al respecto.

Esta familia (Rubiaceae) constituye una excelente fuente de material para la investigación acerca de la evolución de estas metaloenzimas y de los posibles mecanismos de regulación de su expresión. Esto debido a la presencia de las tres isoenzimas (Mn-SOD, Cu, Zn-SOD y Fe-SOD) en una sola especie (*C. arabica* L.), la presencia únicamente de Cu, Zn-SOD en otra (*C. liberica* Bull) y la variación de la expresión con la edad de la planta.

Bibliografía

- Asada, K., M. Urano, & M. Takahashi 1973. Subcellular Localization of Superoxide Dismutase in Spinach Leaves and Preparation and Properties of Crystalline Superoxide Dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 36: 257.
- Asada, K. 1984. Chloroplasts Formation of Active Oxygen and its Scavenging. *Meth. Enzymol.*, 105: 422.
- Boveris, A. 1984. Determination of the Production of Superoxide Radicals and Hydrogen Peroxide in Mitochondria. *Meth. Enzymol.*, 105: 429.
- Bridges, S. & M. Salín 1981. Distribution of Iron-containing Superoxide Dismutase in Vascular Plants. *Plant Physiol.*, 68: 275.
- Davis, R. 1964. Dis Electrophoresis-II. Methods and Application to Human Serum Proteins. *Am. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 404.
- Duke, M. & M. Salín 1985. "Purification and Characterization of an Iron-containing Superoxide Dismutase from Eukaryote *Ginkgo biloba* Arch. Biochem. Biophys., 243: 305.
- Frank, L. 1985. Oxygen Toxicity in Eukaryotes in Superoxide Dismutase, 3: 1. Oberley, L. (ed.). CRC Press, Boca Raton. Florida.
- Fridovich, I. 1986. Superoxide Dismutases. *Advances in Enzymology and Related Area of Molecular Biology*, 58: 61. Meister, A. (ed.). John Wiley and Sons, Inc.
- Halliwell, B. & J. Gutteridge 1985. The Role of Transition in Superoxide-mediated Toxicology in Superoxide Dismutase, 3: 45. Oberley, L. (ed.). CRC Press, Boca Raton. Floridas.
- Hassan, H. & C. Moody 1986. Regulation of the Biosynthesis of Superoxide Dismutase in Prokaryotes in Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine. Rotilio, G. (ed.). Elsevier, p. 274.
- Hodgson, E. & I. Fridovich 1975. The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase with Hydrogen Peroxide: Inactivation of the Enzyme. *Biochem.*, 14: 24.
- Kwiatowski, J. & Z. Kaniuga 1984. Evidence for Iron-containing Superoxide Dismutase in Leaves of *Lycopersicum sculetum* and *Phaseolus vulgaris*, cultivar Piekny-Jas. *Acta Physiol. Plant.*, 6: 197.
- Mayak, S., R. Ledge & J. Thompson 1983. Superoxide Radical Production by Microsomal Membranes from Senescing Carnation Flowers. An Effect on Membrane Fluidity. *Phytochem.*, 22: 1375.
- McCord, J. & I. Fridovich 1969. Superoxide Dismutases, an Enzymic Function for Erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 244: 6049.
- Moreno, C. & J. Castillo 1987. La variedad Colombia, un nouveau cultivar de *Coffea arabica*, de type composite, résistant a *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. ASIC, 12^o Colloque, Montreux, p. 657.
- Rigo, A., P. Viglino, M. Scarpa & G. Rotilio 1966. Reduction and Oxidation of Bovine Superoxide Dismutase by H₂O₂ in Superoxide and Superoxide Dismutases in Chemistry, Biology and Medicine. Rotilio, G. (ed.). Elsevier Science Publishers, p. 184.
- Robak, J. & R. Gryglewski 1988. Flavonoids are Scavengers of Superoxide Anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 837.
- Salin, M. & S. Bridges 1982. Isolation and Characterization of an Iron-containing Superoxide Dismutase from Water Lily, *Nuphar luteum* in Oxy Radical and their Scavenger Systems. Cohen, G. & R. Greenwald (eds), 1: 344. Elsevier Publishing Co., Inc., N.Y.
- Salin, M. 1985. Preparation of Iron-containing Superoxide Dismutase from Eukaryotic Organisms. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Greenwald, R. (ed.). CRC Press, Inc, Boca Raton. Florida, p. 9.
- Sevilla, F.L., del Río & E. Hellin 1984. Superoxide Dismutases from *Citrus* Plant: Presence of two Iron-containing Isoenzymes in Leaves of Lemon Trees, (*Citrus limonum* L.). *J. Plant Physiol.*, 116: 381.
- Tepperman, J. & P. Dismann 1990. Transformed Plants with Elevated Levels of Chloroplastic Superoxide Dismutase are not resistant to Superoxide Toxicity. *Plant Mol. Biol.*, 14: 501.
- Weissiger, R. & I. Fridovich 1973. Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, 248: 3582.
- Yakamura, F., D. Ohmori & R. Zuzuki 1986. Inactivation of Iron Superoxide Dismutase by Hydrogen Peroxide in Superoxide and Superoxide Dismutases in Chemistry, Biology and Medicine. Rotilio, G. (ed.), p. 212. Elsevier Science Publishers.
- Yost, F. & I. Fridovich 1973. An Iron-containing Superoxide Dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 248: 4905.