

Daño oxidativo y contenido de antioxidantes durante la senescencia de cotiledones de soja (*Glycine max*, var Hood)

RUTH G KOZAK Y SUSANA PUNTARULO*

Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Durante la senescencia de cotiledones de soja, el contenido total de clorofila disminuyó de 307 ± 23 a $115 \pm 23 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ pf luego de transcurridos 7 y 20 días de desarrollo, respectivamente. El contenido de clorofila b decreció un 34% durante el período indicado, mientras que el contenido de clorofila a mostró una disminución del 65,8%. El contenido de proteínas, expresado por cotiledón, se mantuvo constante durante los 7 días iniciales de desarrollo y disminuyó significativamente al cabo de los 10 días. La velocidad de salida de electrolitos no mostró diferencias significativas durante los 15 días iniciales y aumentó en forma significativa luego de transcurridos 20 días de desarrollo, sugiriendo alteraciones en la permeabilidad de las membranas. El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, considerado como un índice de la peroxidación de lípidos, mostró un aumento del 95% entre los días 7 y 10, sugiriendo que la peroxidación de lípidos de membrana podría ser un estadio temprano del deterioro producido durante la senescencia. El contenido de α -tocoferol, uno de los principales agentes protectores contra procesos de oxidación de las membranas biológicas, aumentó 4 veces en los cotiledones entre los 10 y los 20 días de desarrollo de las plántulas. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que el mecanismo/s conducentes a la senescencia en cotiledones de soja involucrarían el desarrollo de condiciones de estrés oxidativo que llevarían a una respuesta antioxidante, a los efectos de limitar el deterioro oxidativo.

Palabras clave: daño oxidativo, peroxidación, antioxidantes, α -tocoferol, cotiledones.

*A quien debe dirigirse la correspondencia: Dra. Susana Puntarulo. Tel/Fax: (541) 962-7928

Recibido el 25 de octubre de 1995. Aceptado el 25 de octubre de 1996.

Oxidative damage and antioxidant content during senescence of soybean (*Glycine max*, var Hood) cotyledons

SUMMARY

During senescence of soybean cotyledons, the content of total chlorophyll decreases from 307 ± 23 to $115 \pm 23 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ FW after 7 and 20 days of development, respectively. The content of chlorophyll b decreases 34% during that period, meanwhile the content of chlorophyll a shows a decrease of 65.8%. The protein content, expressed as mg per cotyledon, is constant over the initial 7 days and decreases significantly after 10 days of development. The leakage of electrolytes does not show significant differences during 15 days, but statistically significant increases are detected after 20 days of development, suggesting alterations in the permeability of membranes. The content of tiobarbituric reactive substances, taken as index of lipid peroxidation, shows an increase of 95% between the 7 and 10 days, suggesting that lipid peroxidation could be considered as an early event related to senescence-dependent damage in cotyledons. The content of α -tocopherol, one of the main protector agents of biological membranes against oxidation, increases 4-fold in cotyledons between 10 and 20 days of development. The results presented here suggest that mechanism/s leading to senescence in soybean cotyledons include the setting of oxidative stress conditions that trigger antioxidant responses to limit the damage.

Key words: oxidative damage, peroxidation, antioxidants, α -tocopherol, cotyledons.

INTRODUCCIÓN

Las teorías sobre el envejecimiento pueden ser clasificadas en dos grandes categorías: (a) senescencia programada y (b) senescencia como deterioro indiscriminado. En las plantas, la senescencia es un fenómeno estrictamente controlado, ejecutado con finalidades específicas (Pauls y Thompson, 1984). Sin embargo, la senescencia es un síndrome multifactorial, en el cual el metabolismo de los radicales libres jugaría un papel importante (Leshem, 1988) y por lo tanto, los procesos degradativos dependientes de la peroxidación lipídica serían responsables de ciertos cambios inespecíficos producidos durante la senescencia.

La pérdida de la integridad de la membrana celular es una característica inherente a la senescencia en las plantas, y se evidencia a través de estudios ultraestructurales y de permeabilidad (Simon, 1974). Importantes cambios en las propiedades físicas de los

lípidos de las membranas durante la senescencia contribuirían a la pérdida de la permeabilidad selectiva de estas estructuras. McKersie y Thompson (1977) han informado que en las membranas microsomales de cotiledones senescentes la temperatura de transición de fase de los lípidos aumenta más de 50°C entre los días 2 y 9, luego de iniciada la germinación. Por otro lado, se ha sugerido que la actividad de la enzima lipoxigenasa convertiría ácido aminociclopropano carboxílico a etileno a través de la producción de especies activas (Kacperska y Kubacka-Zebalska, 1989); sin embargo, el significado fisiológico de este sistema ha sido cuestionado (Wang y Yang, 1987). Además, informes de Pauls y Thompson (1984) indican que la actividad de la enzima lipoxigenasa aumenta con la edad de los cotiledones de *Phaseolus vulgaris*, mientras que en cotiledones intactos de soja la actividad de lipoxigenasa no aumenta con la senescencia (Peterman y Siedow, 1985).

Tanto las células vegetales como las animales, cuentan con sistemas de defensa específicos que llevan a prevenir la formación o a atrapar especies activas del oxígeno. Estos sistemas incluyen enzimas, tales como la superóxido dismutasa, peroxidasas y catalasa (Kalir *et al.*, 1984); antioxidantes hidrosolubles, tales como el ácido ascórbico, glutatión y compuestos polifenólicos (Rabinovich y Fridovich, 1983; Kunert y Ederer, 1985; Pastori y Trippi, 1992) y antioxidantes liposolubles como los tocoferoles (Janiszowska y Korczak, 1980; Simontacchi *et al.*, 1993).

Dada la estrecha relación entre la generación de oxidantes y la capacidad antioxidante celular, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta antioxidante no enzimática frente a la senescencia, en cotiledones de soja mediante la evaluación del daño oxidativo y del contenido de antioxidantes hidro y liposolubles. El daño a membranas se estimó a través de la velocidad de salida de electrolitos y el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Además, se determinaron los efectos de la senescencia sobre el contenido de las sustancias antioxidantes, α -tocoferol y glutatión, y sobre el contenido de clorofila.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon semillas de soja (*Glycine max*, var Hood) recientemente cosechadas, con un contenido de humedad del 13 al 17%, exhibiendo un porcentaje de germinación superior al 95% a 25°C. Las semillas fueron incubadas en una cámara húmeda a 27 °C, en solución de Steinberg modificada (pH 7,0), cuya composición es: 1,27 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,27 mM $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$; 0,22 mM NH_4NO_3 ; 0,18 mM SO_4K_2 ; 0,63 mM NO_3K ; 32 mM K_2HPO_4 ; 11 μM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,37 μM MnCl_2 ; 6,58 μM H_3BO_3 ;

0,70 μM ZnSO_4 ; 0,16 μM CuSO_4 y 9 μM Na_2MoO_4 (Tiffin, 1966).

La irradiancia en la superficie de las plántulas fue aproximadamente de 38 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$, con fotoperiodos de 12:12 h (luz:oscuridad). Se utilizaron tubos Philips TL 40-W/54 (luz de día-fluorescente), que presentan máximos de emisión a 410, 440 y 550 nm, a una distancia aproximada de 1,5 m.

El peso fresco fue determinado inmediatamente luego de la separación de los cotiledones de la plántula. El peso seco fue medido en cotiledones mantenidos 72 h en estufa a 60°C.

La velocidad de salida de electrolitos fue determinada a través de los cambios en la conductancia de 25 ml de agua destilada en los cuales se sumergieron tres cotiledones durante 15 min (Bartoli *et al.*, 1995).

El contenido de clorofila en los cotiledones fue determinado según Lichtenthaler (1987). La extracción de los pigmentos se realizó mediante el tratamiento con acetona, y posterior centrifugación a 15.000 g durante 15 min en una centrifuga refrigerada Sorvall RC5.

Preparación de homogeneizados

Los cotiledones fueron separados de las plántulas y homogeneizados (0,5 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en solución reguladora Tris-HCl 60mM - KCl 100 mM (pH 7,0) empleando un homogeneizador Potter-Elvehjem. El sobrenadante proveniente de una centrifugación a 750 g durante 10 min fue empleado para las determinaciones posteriores.

El contenido de proteínas fue determinado empleando el método de Bradford (1976). Se utilizó seroalbúmina bovina como referencia.

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

El contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los cotiledones fue determinado según Fraga *et al.* (1989).

A 1 ml de homogeneizado se le agregó 0,7 ml de ácido tricloroacético (TCA) 30% (p/v) y se completó un volumen final de 2 ml con solución reguladora (Tris-HCl 60 mM - KCl 100 mM, pH 7,0). Los sobrenadantes provenientes de una centrifugación a 750 g durante 10 min fueron adicionados con 200 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) 3% (p/v), 50 μ l de solución etanólica de butil hidroxi tolueno (BHT) 4% (p/v), 1 ml HCl 2 N y 300 ml ácido fosfotúngstico. Luego se incubó con ácido tiobarbitúrico 0,7% (p/v) durante 45 min en un baño a 95 °C y el producto de reacción se extrajo con n-butanol. La fluorescencia en la fase butanólica se midió mediante el empleo de un espectrofluorómetro Hitachi F-3010 (excitación 515, emisión 555 nm). Soluciones estándar preparadas a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano fueron utilizadas como referencia.

Determinación del contenido de tioles totales

El contenido de tioles totales fue determinado según Sies y Akerboom (1984) siguiendo espectrofotométricamente a 412 nm la reducción de DTNB [5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid)]. Los homogeneizados fueron preparados en TCA 3% (p/v) y luego de una centrifugación a 750 g durante 10 min, los sobrenadantes fueron diluidos al décimo en solución reguladora de fosfatos 100 mM (pH 7,5). El medio de reacción consistió en DTNB 0,5 mM, glutatión reductasa 0,5 U.ml⁻¹ y NADPH 0,2 mM.

Determinación del contenido de α -tocoferol

La determinación del contenido de α -tocoferol fue realizada según Desai (1984). A 1 ml de homogeneizado se le agregó 1 ml de etanol y 4 ml de hexano. Luego de mezclar en vortex, las fases fueron separadas por centrifugación. Alicuotas de 3 ml de la fase superior fueron evaporadas bajo nitrógeno y

resuspendidas con 0,3 ml de etanol:metanol 1:1. El contenido de α -tocoferol fue determinado por HPLC con detección electroquímica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso fresco de los cotiledones aislados de plántulas de soja mostró un incremento sostenido durante los 10 días iniciales del desarrollo de la plántula (146 ± 13 y 228 ± 6 mg/cotiledón al cabo de 2 y 10 días, respectivamente). Sin embargo, el peso seco decreció de 59 ± 4 a 24 ± 2 mg.cotiledón⁻¹ en el mismo período. A partir de estos perfiles, se determinó el contenido de humedad de los cotiledones que se incrementó del 40 al 90% entre los 2 y 10 días de desarrollo de la plántula, para luego mantenerse constante hasta los 20 días (Fig. 1). El contenido de proteínas, expresado por cotiledón, se mantuvo constante durante los 7 días iniciales de desarrollo y disminuyó significativamente al cabo de 10 días (Fig. 1).

La clorofila en plantas superiores consiste en una mezcla de clorofila *a*, como pigmento mayoritario y clorofila *b*, como pigmento accesorio; siendo ambas clorofilas genuinos componentes de las membranas fotosintéticas. Se ha descrito que tanto las condiciones de crecimiento como los factores ambientales pueden modificar la relación entre el contenido de clorofilas *a* y *b* (Lichtenthaler, 1987). El contenido total de clorofila en los cotiledones disminuyó de 307 ± 23 a 115 ± 23 g/mg Peso Fresco luego de transcurridos 7 y 20 días de desarrollo, respectivamente. El contenido de clorofila *b* decreció un 34% durante el período indicado, mientras que la clorofila *a* mostró una disminución del 65,8%, según se indica en la Tabla 1. Estos datos sugieren que el proceso inicial de hidratación no fue acompañado por un consumo de proteínas del cotiledón, pero que una vez transcurridos 10 días desde el inicio de la germinación aparecieron signos de deterioro evi-

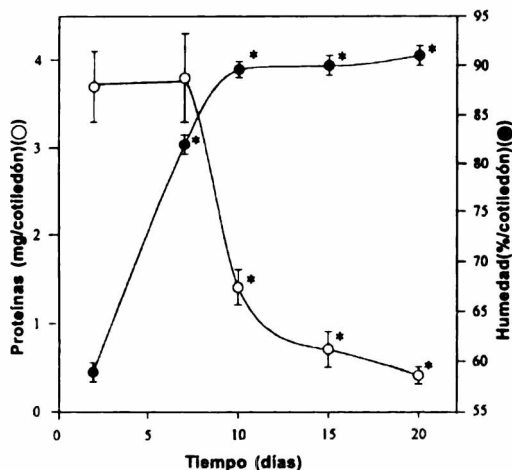


Figura 1. Efecto de la senescencia sobre el contenido de proteínas (○) y el porcentaje de humedad (●) en cotiledones de soja durante los 20 días iniciales de desarrollo.

* significativamente distinto ($P < 0,05$, análisis de varianza de una variable) comparado con el valor a 2 días de desarrollo. Los valores son promedios de 3 a 5 experimentos independientes.

Effect of senescence on protein content (○) and percentage of humidity (●) in soybean cotyledons over the initial 20 days period.

* significantly different ($P < 0.05$, one way analysis of variance) compared to values at 2 days of development. Values are averages of 3 to 5 independent experiments.

Tabla 1. Contenido de clorofila total, clorofila a clorofila b y relación clorofila a/b durante el proceso de senescencia de cotiledones de soja.

Total chlorophyll, chlorophyll a chlorophyll b and ratio chlorophyll a/b during the senescence of soybean cotyledons.

tiempo (días)	clorofila total ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF)	clorofila a ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF)	clorofila b ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ PF)	clorofila a/b
7	307 ± 23	237 ± 21	70 ± 5	3,3
10	253 ± 69	187 ± 50	67 ± 19	2,8
15	230 ± 45	161 ± 37*	70 ± 11	2,3
20	115 ± 23*	81 ± 23*	46 ± 4*	1,8

* significativamente distinto ($P < 0,05$; análisis de varianza de una variable) comparado con el valor a 7 días de desarrollo. Los valores son promedios de 3 a 5 experimentos independientes.

* significantly different ($P < 0.05$, one way analysis of variance) compared to values at 7 days of development. Values are averages of 3 to 5 independent experiments.

denciados como disminución en el contenido de proteínas y disminución en el contenido de clorofila. Además, la relación entre los contenidos de clorofila a y b disminuyó, probablemente debido a una mayor estabilidad de la clorofila b (Brown *et al.*, 1991), durante el proceso de senescencia de cotiledones sugiriendo alteraciones en la capacidad fotosintética del tejido.

La evaluación de la velocidad de salida de electrolitos desde los tejidos vegetales es un método ampliamente usado para estimar la permeabilidad de la membrana en relación con condiciones de estrés ambientales, crecimiento y desarrollo y de variación genotípica (Whitlow *et al.*, 1992). La incubación de cotiledones de plántulas de soja en agua destilada condujo a incrementos significativos de la conductividad del medio al emplearse cotiledones de más de 15 días de desarrollo (Fig. 2), sugiriendo un deterioro en la permeabilidad de las membranas.

El daño peroxidativo a los lípidos de la membrana ha sido considerado como un evento crítico capaz de conducir a la injuria celular (Chow, 1991). En presencia de radicales libres las membranas celulares que contienen una relativamente alta proporción de lípidos poliinsaturados se transforman en blan-

co de los procesos de oxidación. La peroxidación de ácidos grasos esenciales puede perturbar la fina estructura de las membranas biológicas y por lo tanto, afectar a la permeabilidad como asimismo a otras funciones de la membrana (Chow, 1991). El proceso de peroxidación lipídica ha sido asociado con la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana y la formación de hidroperóxidos, radicales intermediarios y otros productos secundarios. El malondialdehído (MDA) es uno de los varios compuestos de bajo peso molecular formado a través de la descomposición de productos primarios y secundarios de la peroxidación lipídica. A bajo pH y elevada temperatura el MDA participa en una reacción de adición nucleofílica con el ácido tiobarbitúrico (TBA) generando un aducto fluorescente (TBARS). Estas características permitieron la amplia utilización de este método de cuantificación de la peroxidación lipídica en numerosos materiales biológicos (Janero, 1996). La Figura 2 muestra un aumento del 95% en el contenido de TBARS entre los días 7 y 10 de desarrollo, sin cambios significativos posteriores. Este aumento precedió a las alteraciones de permeabilidad de la membrana, sugiriendo que el daño oxidativo puede jugar un papel en el deterioro producido durante la senescencia de los cotiledones.

El glutatión es un compuesto presente en células animales y vegetales, y parece tener una gran importancia en la protección de las membranas contra el daño producido por radicales libres mediante la reacción con los mismos (Meister, 1983; May y Lever, 1993). Levitt (1962) ha desarrollado una hipótesis según la cual, tanto el contenido de glutatión, como la actividad de la enzima glutatión reductasa estarían involucrados en los mecanismos que permiten tolerar o impedir el desarrollo del estrés oxidativo en plantas. Sin embargo, Smith *et al.* (1989) mostraron resultados contradictorios. Los datos presentados en la Tabla 2 indican que el contenido total de tioles en cotiledones de soja, considerados como un índice del contenido de glu-

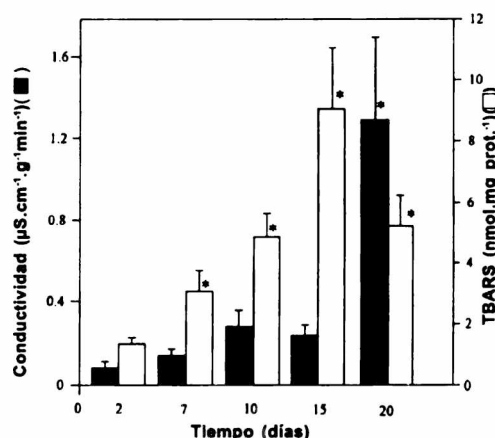


Figura 2. Efecto de la senescencia sobre conductividad (■) y el contenido de sustancia reactivas al ácido tiobarbitúrico (□) en cotiledones de soja.

* significativamente distinto ($P < 0.10$, análisis de varianza de una variable) comparado con el valor a 2 días de desarrollo. Los valores son promedios de 3 a 5 experimentos independientes.

Effect of senescence on conductivity (■) and content of thiobarbituric reactive substances (TBARS) (□) in soybean cotyledons.

* significantly different ($P < 0.10$, one way analysis of variance) compared to values at 2 days of development. Values are averages of 3 to 5 independent experiments.

tación reducido, disminuyó significativamente entre los 7 y los 20 días de desarrollo. Dado que las reacciones de óxido-reducción son centrales para numerosos aspectos de la función celular (Shan *et al.*, 1990), puede considerarse a la depleción de glutatión como un efecto potenciador del daño oxidativo producido durante la senescencia de los cotiledones. El menor contenido de glutatión en los cotiledones senescentes, en comparación con el observado en cotiledones de plántulas en los estadios iniciales de desarrollo, sugiere además, un activo consumo del antioxidante en los tejidos senescentes, que podría ser consecuencia de un incremento en la generación de especies activas en estas condiciones.

Los tocoferoles han sido identificados como importantes agentes protectores contra la peroxidación de lípidos (Kunert y Boger,

Tabla 2. Contenido total de sustancias con grupos tioles y de α -tocoferol durante el proceso de senescencia de cotiledones de soja.

Total thiol groups and α -tocopherol content during the senescence of soybean cotyledons.

tiempo (días)	Grupos tioles totales (nmol.cotiledón ⁻¹)	α -tocoferol (nmol.cotiledón ⁻¹)
7	85 ± 20	0,04 ± 0,01
10	67 ± 20	1,6 ± 0,6*
15	13 ± 3*	6 ± 1*
20	2,3 ± 0,2*	7 ± 1*

* significativamente distinto ($P < 0,05$, análisis de varianza de una variable) comparado con el valor a 7 días de desarrollo. Los valores son promedios de 3 a 5 experimentos independientes.

* significantly different ($P < 0,05$, one way analysis of variance) compared to values at 7 days of development. Values are averages of 3 to 5 independent experiments.

1984) y se ha señalado que existe un perfil característico de distribución de los diferentes tocoferoles dependiendo de la especie y el grado de desarrollo del órgano en estudio (Franzen y Haab, 1991). Se ha informado que los tocoferoles son capaces de proteger a la clorofila del daño producido por radicales libres (Kunert y Boger, 1984) e incluso disminuir la velocidad de senescencia (Dhinsa *et al.*, 1982); sin embargo, este último efecto no ha podido ser confirmado (Kar y Feierabend, 1984). Durante la senescencia de los cotiledones de soja se verificó un aumento significativo y sostenido del contenido de α -tocoferol (Tabla 2). Entre los 7 y los 10 días de desarrollo, además de verificarse una marcada disminución en el contenido de proteínas por cotiledón (Fig. 1), y un aumento del 95% en el contenido de TBARS (Fig. 2), no se observaron cambios en la conductividad de los cotiledones, que posteriormente aumenta en forma drástica al cabo de 20 días. En el mismo período, el contenido de α -tocoferol aumentó 40 veces (Tabla 2). A pesar de que no ha sido descrita la naturaleza química de la señal biológica responsable de desencadenar la síntesis de tocoferoles, estudios previos realizados en ejes embrionarios de soja sometidos a distintas condiciones de estrés oxidativo y

envejecimiento (Simontacchi *et al.*, 1993), en concordancia con resultados de Kunert y Ederer (1985) obtenidos en hojas envejecidas, permiten suponer que un aumento significativo en la velocidad de generación de especies activas del oxígeno sería el causante del aumento verificado en el contenido de α -tocoferol. Debido a su potente acción antioxidante, el aumento en el contenido de los tocoferoles estaría destinado a mantener el daño oxidativo sobre las macromoléculas de interés biológico dentro de ciertos límites, de forma tal que la funcionalidad de las membranas no se vea alterada. Al progresar el envejecimiento, incrementos posteriores en la velocidad de producción de especies activas del oxígeno no podrían ser adecuadamente compensados por aumentos equivalentes en el contenido de tocoferoles y a partir de los 15 a 20 días de desarrollo se comenzaron de verificar signos de deterioro, como el aumento en la conductividad (Fig. 2) y el consumo de otros antioxidantes tales como el glutatión (Tabla 2). De esta forma, la iniciación del proceso de deterioro estaría asociado a una disminución del contenido de los antioxidantes no-enzimáticos hidrosolubles (tales como el glutatión). Es importante señalar que los antioxidantes se encuentran estrechamente relacionados en-

tre sí. Los tioles pueden actuar activamente como agentes regeneradores de los tocoferoles (Shan *et al.*, 1990) y los tocoferoles pueden intervenir en la reparación de los radicales tiolos (Sies y Murphy, 1991). La significativa disminución en el contenido de glutatión se produjo solamente cuando el contenido de tocoferol dejó de incrementarse, sugiriendo que el consumo de glutatión podría estar vinculado a procesos de regeneración de los tocoferoles.

CONCLUSIONES

La conexión entre daño oxidativo y senescencia por un lado, y los mecanismos de defensa antioxidante por el otro, han sido postulados tanto para animales como para vegetales. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la senescencia en cotiledones de soja modifica la capacidad antioxidante no-enzimática total del tejido a través de mecanismos complejos que involucran a los antioxidantes hidrosolubles (glutatión) y liposolubles (tocoferol). El daño oxidativo sobre las membranas biológicas se verifica en condiciones tales que permiten superar el control ejercido por las defensas antioxidantes. Frente a las condiciones impuestas por el progreso de la senescencia, el aumento en el contenido de α -tocoferol podría ser considerado como una respuesta celular temprana tendiente a minimizar el daño oxidativo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Fundación Antorchas, la Universidad de Buenos Aires y la International Foundation for Science (Suecia). SP es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET y RK es becario del CONICET.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartoli CG, M Simontacchi, JJ Gulamet, E Montaldi and S Puntarulo** (1995) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM. *Plant Science* 104: 161-168.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brown SB, Houghton GD and Hendry GAF** (1991) Chlorophyll breakdown. *Chlorophylls* (ed. H Scheer), pp 465-489. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chow CK** (1991) Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical in Biology and Medicine* 11: 215-232.
- Desai I** (1984) Vitamin E analysis methods for animal tissues. *Methods in Enzymology* 105: 138-146.
- Dhindsa RS, PL Plumb-Dhindsa and DM Reid** (1982) Leaf senescence and lipid peroxidation: effects of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiologia Plantarum* 56: 453-457.
- Fraga CG, BE Leibovitz and AL Tappel** (1987) Halogenated compounds as initiators of lipid peroxidation in tissue slices. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3: 119-123.
- Franzen J and MM Haab** (1991) Vitamin E content during development of some seedlings. *Phytochemistry* 30: 2911-2913.
- Janero DR** (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical in Biology and Medicine* 9: 515-540.
- Janiszowska W and G Korczak** (1980) The intracellular distribution of tocopherols in *Calendula officinalis* leaves. *Phytochemistry* 19: 1391-1392.
- Kacperska A and M Kubacka-Zebalska** (1989) Formation of stress ethylene depends both on ACC synthesis and on the activity of free radical-generating system. *Physiologia Plantarum* 77: 231-237.
- Kalir A, G Omri and A Poljakoff-Mayber** (1984) Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portuiacoides* exposed to salinity. *Physiologia Plantarum* 62: 238-244.
- Kar M and J Feierabend** (1984) Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta* 160: 385-391.
- Kunert KJ and P Borger** (1984) The diphenyl ether herbicide oxyfluorfen: action of antioxidants. *Journal Agricultural Food Chemistry* 32: 725-728.
- Kunert KJ and M Ederer** (1985) Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants, vitamin C and E. *Physiologia Plantarum* 65: 85-88.

- Leshem Y** (1988) Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical in Biology and Medicine* 5: 39-49.
- Levitt J** (1962) A sulfhydryl-disulfide hypothesis of frost injury and resistance in plants. *Journal of Theoretical Biology* 3: 355-391.
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- May MJ and C Leaver** (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* 103: 621-627.
- McKersie BD and JE Thompson** (1977) Lipid crystallization in senescent membranes from cotyledons. *Plant Physiology* 59: 803-807.
- Meister A** (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477.
- Pastori GM and VS Trippi** (1992) Oxidative stress induce high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. *Plant and Cell Physiology* 33: 957-961.
- Pauls KP and JE Thompson** (1984) Evidence for the accumulation of peroxidized lipids in membranes of senescing cotyledons. *Plant Physiology* 75: 1152-1157.
- Peterman TK and JN Siedow** (1985) Behavior of lipoxygenase during establishment, senescence, and rejuvenation of soybean cotyledons. *Plant Physiology* 78: 690-695.
- Rabinovich HD and I Fridovich** (1983) Superoxide radicals, superoxide dismutase and oxygen toxicity in plants. *Phytochemistry and Photobiology* 37: 679-690.
- Shan X, TY Aw and DP Jones** (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacological Therapy* 47: 61-71.
- Sies H and TPM Akerboom** (1984) Glutathione disulfide (GSSG) efflux from cells and tissues. *Methods in Enzymology* 105: 445-451.
- Sies H and ME Murphy** (1991) Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology* 8: 211-224.
- Simon EW** (1974) Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytology* 73:377-420.
- Simontacchi M, A Caro, CG Fraga and S Puntarulo** (1993) Oxidative Stress Affects α -tocopherol Content in Soybean Embryonic Axes upon Imbibition and Germination. *Plant Physiology* 103: 949-953.
- Smith IK, TL Vierheller and CA Thorne** (1989) Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum* 77: 449-456.
- Tiffin LO** (1966) Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron uptake analysis. *Plant Physiology* 41: 510-514
- Wang TT and SF Yang** (1987) The physiological role of lipoxygenase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in oat leaves. *Planta* 170: 190-196.
- Whitlow TH, NL Basauk, TG Ranney and D Reichert** (1991) An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissue. *Plant Physiology* 98: 198-205.