

Influence d'un choc hydrique sur l'activité de la phosphatase acide chez le Cotonnier (*Gossypium*)

PAWEL HANOWER et JANINA BRZOZOWSKA
*Laboratoire de Physiologie Végétale, O.R.S.T.O.M.
Centre d'Adiopodoumé, B.P. 20, Abidjan (Côte d'Ivoire)*

(Manuscrit reçu le 8 décembre 1972)

RÉSUMÉ

La phosphatase acide des feuilles de Cotonnier est localisée dans les fractions particulières, principalement au niveau des chloroplastes.

Après l'éclatement des chloroplastes une certaine activité demeure liée à la fraction membranaire. L'enzyme semble être fortement attachée aux membranes.

Le choc hydrique entraîne une augmentation de l'activité totale de la phosphatase acide et l'apparition d'une activité importante dans le cytoplasme, aux dépens, en grande partie, des chloroplastes.

L'effet inhibiteur de l'acide chlorogénique ainsi que du jus cytoplasmique riche en polyphénols sur l'activité de la phosphatase acide a pu être mis en évidence.

SUMMARY

Acid phosphatase of cotton leaves is localized in particular fraction, principally in chloroplasts.

After exposure of chloroplasts to hypotonic media some activity remains associated with the membrane fraction. The enzyme seems to be strongly attached to the chloroplast membranes.

Water stress induces an increase in total activity of acid phosphatase and the appearance of high activity in cytoplasmic fraction, for the great part to the detriment of chloroplastic activity.

The inhibition of the enzyme activity by either exogenic chlorogenic acid or cytoplasmic fraction rich in phenolic compounds is demonstrated.

ABRÉVIATIONS

PEG: polyéthylèneglycol; PNP: p-nitrophénol; PNP-phosphate: p-nitrophényl phosphate; TRIS: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

14 NOV 1973
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 6422 B. S. Finel.

INTRODUCTION

Dans la cellule végétale la présence des phosphatases est signalée aussi bien au niveau de particules que dans la fraction soluble (MEYER *et al.*, 1971). Selon certains auteurs (YIN, 1945 ; NIR et POLJAKOFF-MAYBER, 1966 ; RAGETLI *et al.*, 1966 ; RAGETLI, 1967) une fraction importante de l'enzyme se trouve dans les chloroplastes.

Or, d'après ILJIN (1930, 1933, 1935, 1953, 1957), la déshydratation provoque une destruction de la structure de protoplasme. STOCKER (1948) soutient que la destruction de la structure protoplasmique augmente la perméabilité en libérant les enzymes respiratoires et hydrolytiques et conduit à la diminution de la photosynthèse des chloroplastes. Selon KURSANOV (1940, 1946), OPARINE et KADEN (1945) et OPARINE (1953), la déshydratation provoque une libération des enzymes liées au complexe lipoprotéique, d'où augmentation de l'activité hydrolytique.

NIR et POLJAKOFF-MAYBER (1966) ont trouvé une augmentation de l'activité de la phosphatase acide sous l'effet de la sécheresse chez la Blette.

VIEIRA DA SILVA (1968, 1969, 1970) a étudié les effets de la carence hydrique sur l'activité de la phosphatase acide chez des cotonniers. Il a noté que le traitement osmotique avait pour conséquence non seulement une libération de la phosphatase dans la phase soluble mais que l'activité spécifique totale augmentait aussi.

Il est évident que l'augmentation de l'activité enzymatique sous l'effet de la sécheresse peut résulter soit d'une levée d'inhibition ou d'une activation de zymogène, soit d'une synthèse *de novo*.

D'un autre côté, au cours de nos recherches sur la sécheresse chez des cotonniers, nous avons trouvé une baisse des teneurs en polyphénols (BRZOZOWSKA *et al.*, 1973) aussi bien sous l'effet d'une pression osmotique provoquée par un traitement au polyéthylèneglycol, que sous l'effet d'une sécheresse (naturelle) provoquée par un dessèchement du sol.

Sachant que les composés phénoliques peuvent inhiber l'activité de certaines enzymes (AGATOVA *et al.*, 1968 ; LOOMIS et BATAILE, 1968 ; STRUMEYER et MALIN, 1969 ; BALDRY *et al.*, 1970 ; MUSZYNSKA et REIFER, 1970 ; SINGH et WORT, 1970) on pouvait légitimement se demander si, dans le cas de la sécheresse, la baisse des polyphénols ne pouvait pas être la cause de l'augmentation de l'activité phosphatasique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Une variété de Cotonnier très sensible à la sécheresse, HAR 444-2, issue de croisements entre *G. hirsutum*, *G. arboreum* et *G. raimondii*, a été utilisée pour cette étude.

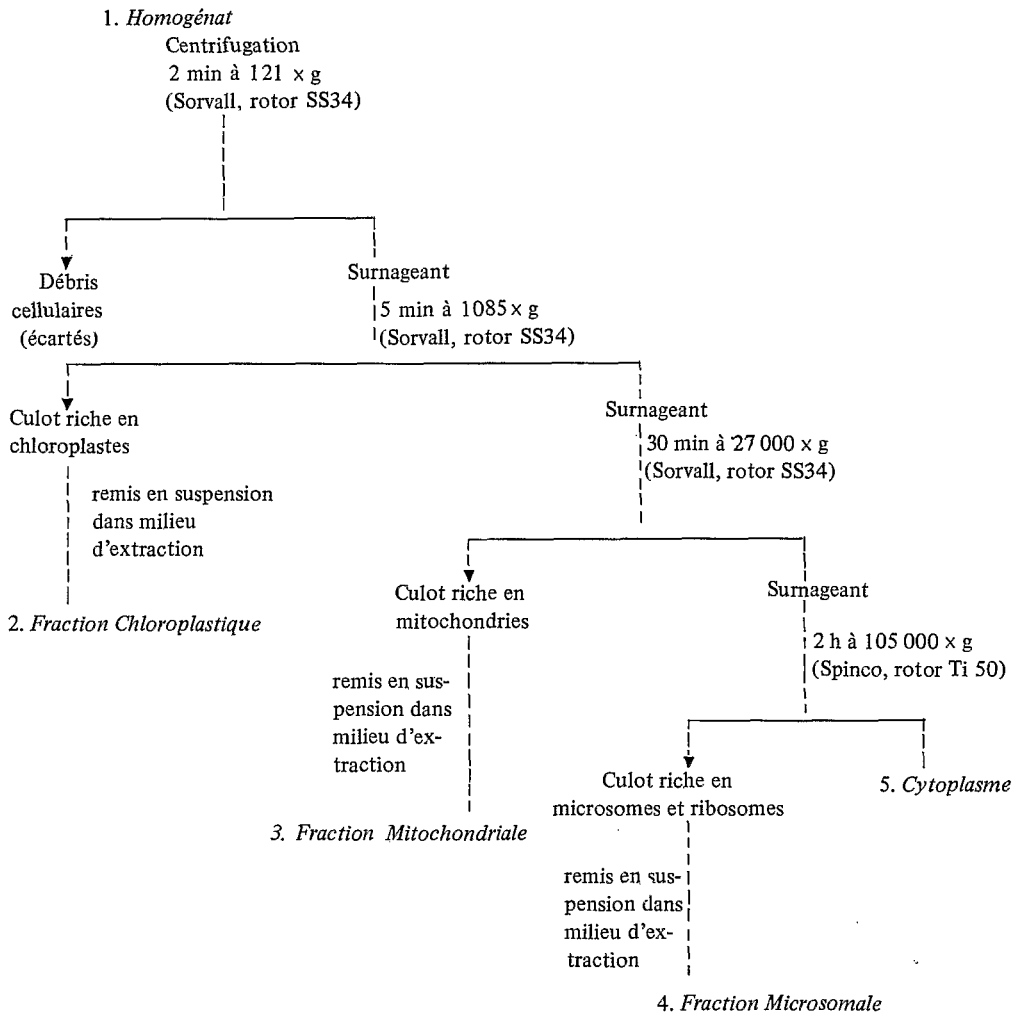
Les plantes ont été cultivées en serre, soit en pots de terre, soit en aquiculture, sur une solution nutritive d'Hoagland modifiée (VIEIRA DA SILVA, 1970), additionnée d'oli-

goéléments (HEWITT, 1952). Le choc hydrique a été provoqué de deux manières différentes : par abaissement à -20 joules par mole du potentiel osmotique de la solution de culture à l'aide du polyéthylène glycol 600 (PEG), ou par dessèchement du sol par suite de l'arrêt de l'arrosage jusqu'au flétrissement des feuilles. La sécheresse a été induite au stade critique pour le cotonnier, à la floraison.

Les mesures de l'activité phosphatasique ont été réalisées sur les quatrième et cinquième feuilles à partir de l'apex, prélevées à 7 heures 30. Vingt heures avant le prélèvement, les plantes ont été placées à l'obscurité afin de diminuer le chargement de chloroplastes en amidon.

Les feuilles dépourvues des pétioles ont été coupées en petits fragments dans le milieu d'extraction (matière fraîche : volume = 1 : 10) ayant la composition suivante : saccharose 0,4 M, cystéine 3 mM, sérum albumine de bœuf 100 mg/l, tampon Tris 25 mM, pH 7,8. Le broyage a été réalisé dans un mixer, d'abord, quelques secondes à petite vitesse, puis, pendant 15 secondes à la vitesse maximum.

Le broyat a été filtré à travers 8 couches de gaze, essorées dans un presse-fruits. Toutes les opérations ont été effectuées dans la chambre froide à 4°C . Le fractionnement de l'homogénat ainsi obtenu a été réalisé selon le schéma ci-dessous :



Les fractions chloroplastiques témoin et PEG ainsi obtenues contenaient respectivement 87 % et 82 % de la chlorophylle de l'homogénat dépourvu de débris cellulaires (surnageant de centrifugation 2 min à $121 \times g$).

Dans certains cas, l'homogénat a été centrifugé de façon à obtenir uniquement le surnageant cytoplasmique. Dans d'autres, la fraction chloroplastique a été purifiée sur le gradient linéaire de saccharose variant de 20 à 70 % (dissous dans milieu d'extraction), en centrifugation zonale (Spinco, rotor zonal Ti 14). La densité correspondant au « pic » de chloroplastes récupérés du gradient a été de 1,22 à 1,24. Après l'éclatement des chloroplastes ainsi purifiés, par suite d'un traitement hypotonique, les fractions chloroplastiques soluble (surnageant) et membranaire (culot) ont été récupérées par centrifugation de 15 minutes à $27\,000 \times g$. Le culot a été lavé deux fois et centrifugé dans les mêmes conditions.

L'activité de la phosphatase acide (E C 3.1.3.2.) a été mesurée selon la méthode de LINHART et WALTER (1963), à pH 5,4, avec PNP-phosphate comme substrat (10 mM), incubation à la température de 30 °C, volume total du milieu réactionnel = 2 ml. Les résultats sont exprimés en μ moles de *p*-nitrophénol (PNP) libéré dans une unité de temps par rapport à la matière sèche de tissu foliaire.

Pour tester l'effet inhibiteur des composés phénoliques endogènes et exogènes sur l'activité de la phosphatase acide, le cytoplasme en provenance des feuilles des plantes soumises au choc hydrique a été additionné soit de cytoplasme provenant des feuilles témoins, riche en composés phénoliques, soit de l'acide chlorogénique, à deux doses différentes chacun. L'incubation et les mesures d'activité ont été effectuées dans les conditions habituelles.

La chlorophylle a été dosée selon ARNON (1949).

RÉSULTATS

Les résultats réunis dans le tableau I rendent compte de l'effet d'un choc osmotique sur l'activité de l'enzyme au niveau de différentes fractions cellulaires. Dans toutes les fractions, les activités ont été mesurées après l'addition du Triton X-100 et représentent donc, pour chacune d'elles, « l'activité totale ». Dans le cytoplasme ces mesures ont été complétées par des mesures directes, sans Triton. Les valeurs obtenues (exprimées en μ moles de PNP libéré par heure et par g de matière sèche de tissu foliaire) : 0 pour le cytoplasme témoin et 75,8 pour le cytoplasme PEG, se sont montrées tout à fait comparables à celles obtenues avec Triton.

L'apparition d'une activité importante dans le cytoplasme, aux dépens, en grande partie, des chloroplastes, confirme, dans les grandes lignes, les résultats antérieurs obtenus par VIEIRA DA SILVA (1970).

Chez les témoins, l'activité la plus élevée est décelable au niveau de la fraction chloroplastique, mais la fraction riche en mitochondries révèle, elle aussi, une activité non négligeable.

Chez les plantes ayant subi le choc, l'activité est la plus élevée dans le cytoplasme. Toutefois une activité appréciable se maintient au niveau des fractions riches en chloroplastes et en mitochondries. Une faible activité est aussi liée à la fraction riche en microsomes et ribosomes.

Ceci dit, il ne faut pas perdre de vue que chacune des fractions est contaminée par d'autres, en particulier la fraction mitochondriale qui contient des fragments chloroplastiques. Néanmoins, le fractionnement ayant été effectué de manière identique pour les deux variantes, la comparaison entre elles demeure valable.

TABLEAU I
Répartition de l'activité entre les différentes fractions cellulaires

Fraction	Activité de la phosphatase acide			
	en μ moles PNP libéré par heure et par g de la matière sèche de tissu foliaire		en % de l'activité de l'homogénat	
	Témoins	P E G	Témoins	P E G
Homogénat	90,6	127,2	100	100
Débris cellulaires	5,1*	1,2*	5,6	0,9
Fraction riche en chloroplastes	59,9	25,1	66,1	19,7
Fraction riche en mitochondries	25,6	21,6	28,3	17,0
Fraction riche en microsomes et ribosomes	trace	2,8	—	2,2
Cytoplasme	—	76,5	—	60,1

* Par différence : activité de l'homogénat — somme d'activités des autres fractions.

D'autres essais ont été réalisés sur les chloroplastes purifiés sur un gradient de saccharose, supposés contenir une forte proportion de chloroplastes intacts, en provenance de feuilles de plantes témoins et des plantes ayant souffert de la sécheresse. Les mesures de contrôle faites au préalable sur les surnageants cytoplasmiques correspondants ont révélé l'absence de l'activité chez les premières, preuve d'un fractionnement correct, et une activité importante chez les secondes, symptôme caractéristique du choc hydrique subi.

L'activité a été mesurée d'une part, directement sur les chloroplastes récupérés du gradient, et d'autre part, après leur éclatement, sur le surnageant et le culot membranaire obtenus suivant le procédé décrit plus haut.

Les résultats du tableau II montrent que l'activité au niveau des chloroplastes après la sécheresse est nettement inférieure à celle des chloroplastes témoins. La différence provient de l'activité très faible de la fraction soluble, en cas de choc. Cette perte d'activité pourrait être expliquée soit par l'augmentation, sous l'effet de la sécheresse, de la perméabilité des membranes, soit par la perte ou l'endommagement de l'enveloppe chloroplastique, entraînant la libération de l'enzyme dans le cytoplasme.

Il est intéressant de constater qu'une activité non négligeable reste liée à la fraction membranaire et ceci malgré les lavages répétés du culot. Elle est de même ordre pour les deux lots de chloroplastes. L'enzyme semble être fortement attachée aux thylakoïdes.

Partant de l'hypothèse que les composés phénoliques, très abondants dans les feuilles du cotonnier, pouvaient exercer une action inhibitrice sur la phosphatase acide et ayant, par ailleurs, démontré qu'un choc hydrique entraîne une baisse sensible des phénols (BRZOWSKA *et al.*, 1973) en même temps qu'une augmentation de l'activité de l'enzyme, des essais ont été réalisés afin de vérifier s'il existait un rapport entre ces deux phénomènes.

TABLEAU II
Localisation de l'enzyme au niveau des chloroplastes

Fraction	Activité de la phosphatase acide en μ moles PNP libéré par heure et par g de la matière sèche de tissu foliaire	
	Témoins	Sécheresse
Chloroplastes "intacts"	8,28	1,60
Chloroplastes "intacts" + Triton	8,91	1,61
Surnageant chloroplastique*	7,87	0,34
Fraction chloroplastique membranaire*	1,41	1,31
Somme : fractions soluble (surnageant) et membranaire	9,28	1,65

* Obtenus par centrifugation des chloroplastes après leur éclatement.

TABLEAU III
Effet inhibiteur du cytoplasme témoin et de l'acide chlorogénique exogène sur l'activité de la phosphatase acide du cytoplasme après le choc osmotique au PEG
Pour toutes les variantes le volume du milieu réactionnel = 2 ml.

Essai N°	Variante	Cytoplasme		Acide chlorogénique exogène additionné au milieu réactionnel en μ g	Activité de la phosphatase acide	
		Cytoplasme PEG incubé en mg de la matière sèche de tissu foliaire	Témoin additionné au milieu réactionnel en mg de la matière sèche de tissu foliaire		en μ moles PNP libéré après 2 heures d'incubation*	en % de l'activité du cytoplasme PEG
1	Cytoplasme PEG	6,4	—	—	1,363	100
2	Cytoplasme Témoin	—	6,4	—	trace	—
3	Cytoplasme PEG + cytoplasme Témoin à la dose I	6,4	1,5 x 6,4	—	1,236	90,7
4	Cytoplasme PEG + cytoplasme Témoin à la dose II	6,4	3 x 6,4	—	1,113	81,7
5	Cytoplasme PEG + Acide chlorogénique à la dose I	6,4	—	75	1,158	85,0
6	Cytoplasme PEG + Acide chlorogénique à la dose II	6,4	—	150	0,983	72,1

* Moyennes de 6 dosages. L'analyse de la variance a montré des différences hautement significatives entre toutes les variantes ($F = 529$). La plus petite différence significative = 0,018.

Le cytoplasme provenant des feuilles des plantes ayant subi un choc osmotique et de ce fait relativement pauvre en polyphénols a été additionné soit du cytoplasme témoin, riche en polyphénols, soit de l'acide chlorogénique, constituant phénolique foliaire du cotonnier, et son activité enzymatique a été mesurée. Le choix de doses appliquées a été basé d'une part, sur les teneurs en phénols de feuilles de cotonniers témoins (3,0-3,5 % de la matière sèche) et d'autre part, sur les résultats de dosages de phénols faits directement sur le cytoplasme témoin (1,0-1,1 % de la matière sèche de tissu foliaire primitif).

Comme le montrent les résultats du tableau III, tant le cytoplasme témoin que l'acide chlorogénique inhibent la phosphatase acide du cytoplasme en provenance du choc. L'effet inhibiteur est, dans les limites d'erreur, proportionnel à la dose appliquée.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos résultats confirment ceux des auteurs déjà cités, à savoir que la déshydratation entraîne une augmentation de l'activité de la phosphatase acide totale et une apparition d'une activité relativement importante de cette enzyme dans la fraction cytoplasmique.

De plus, nous avons constaté que, dans les conditions normales, la fraction riche en mitochondries manifeste une activité phosphatasique assez importante à côté de l'activité la plus élevée de la fraction riche en chloroplastes. Ceci semble indiquer que la phosphatase acide des feuilles de Cotonnier est localisée dans ces organites.

L'activité phosphatasique est presque identique dans les fractions mitochondriales qu'elle provienne des témoins ou du traitement osmotique. Ceci indiquerait que le choc hydrique n'a pas affecté les mitochondries dans leur rapport avec la phosphatase acide.

Le fait que même après plusieurs lavages une certaine activité reste attachée à la fraction chloroplastique membranaire pourrait témoigner en faveur d'une hypothèse suivant laquelle cette enzyme serait liée aux membranes.

SCHNEIDER (1971) rapporte que les tanins, réagissant non spécifiquement avec les protéines de thylakoïdes, sont capables de changer la perméabilité des membranes. D'après SALKOVA et DEMENYUK (1970) le vieillissement des tissus provoque un changement de perméabilité des membranes intracellulaires et, par conséquent, une diminution de l'activité polyphénoloxidasique des chloroplastes au profit du cytoplasme. Or, la sécheresse peut être comparée à un vieillissement de la plante (SHAH et LOOMIS, 1965 ; BEN-ZIONI *et al.*, 1967 ; WOOLHOUSE, 1967).

Nos études ne nous permettent pas de conclure dans quelle mesure les phénomènes observés résultent d'une augmentation de la perméabilité membranaire ou de la destruction pure et simple des membranes avec libération de l'enzyme contenue normalement à l'intérieur des particules, voire fixée sur les lipoprotéines membranaires.

Nous avons néanmoins démontré l'effet inhibiteur du jus cytoplasmique témoin sur l'activité de la phosphatase acide du jus cytoplasmique des feuilles ayant subi un traitement osmotique.

De même, nous avons pu voir que l'acide chlorogénique exogène est capable d'inhiber l'activité de la phosphatase acide *in vitro*. A ce propos, il est à noter que l'action inhibitrice des composés phénoliques, dont l'acide chlorogénique, sur différentes enzymes y compris les hydrolases telles par exemple que l'amylase, l'invertase, l'arginase et les phosphatases est signalée par de nombreux auteurs. (STRUMAYER et MALIN, 1969 ; BALDRY et *al.*, 1970 ; MUSZYNSKA et REIFER, 1970 ; SINGH et WORT, 1970). Selon certains (MASON, 1955), l'inactivation des enzymes par les tanins et les produits de leur oxydation, les quinones, est due à leur action sur les groupements SH.

Nous avons par ailleurs (BRZOWSKA et *al.*, 1973) démontré que les teneurs en polyphénols sont plus élevées chez les feuilles témoins que chez les feuilles ayant subi un traitement osmotique.

Il nous paraît possible de conclure que l'augmentation de l'activité phosphatase totale provoquée par la déshydratation puisse être due, tout au moins en partie, aux variations de la teneur en composés phénoliques. De même, que l'apparition de l'activité phosphatase dans le cytoplasme sous l'effet d'un choc hydrique ne proviendrait pas uniquement de la libération de l'enzyme des structures chloroplastiques mais également d'une levée d'inhibition.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer ici notre gratitude à Monsieur le Professeur C. LIORET pour ses critiques du présent travail.

Nous remercions également Monsieur R. CHEZEAU pour l'aide technique dans l'exécution de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- AGATOVA A. I., VARTANYAN L. S., HONIGBERG E. M. et EMANUEL N. M., 1968. — Action des polyphénols sur des enzymes. In *Composés phénoliques et leur fonction biologique*. 1^{er} Symposium sur les composés phénoliques, 14-17 octobre, Moscou, 146-154.
- ARNON D. I., 1949. — Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, **24**, 1-15.
- BALDRY C. W., BUCKE C. et COOMBS J., 1970. — Effects of some phenoloxidase inhibitors on chloroplasts and carboxylating enzymes of sugar cane and spinach. *Planta*, **94**, 124-133.
- BEN-ZIONI A., ITAI C. et VAADIA Y., 1967. — Water and salt stresses, kinetin and protein synthesis in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **42**, 361-365.

- BRZOWSKA J., HANOWER P. et TANGUY J., 1973. — Polyphénols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique. *Phytochemistry* (sous presse).
- HEWITT J., 1952. — *Sand and water culture methods used in study of plant nutrition*. Comm. Agr. Bureau éd., Farnham Royal, Bucks, England, p. 189.
- ILJIN W. S., 1930. — Die Ursachen der Resistenz von Pflanzenzellen gegen Austrocknen. *Protoplasma*, **10**, 379-414.
- ILJIN W. S., 1933. — Über Absterben der Pflanzengewebe durch Austrocknung und ihre Bewahrung for dem Trockentode. *Protoplasma*, **19**, 414.
- ILJIN W. S., 1935. — Die Lebensfähigkeit der Pflanzenzellen in trockenem Zustand. *Planta*, **24**, 742-754.
- ILJIN W. S., 1953. — Causes of death of plants as a consequence of loss of water : conservation of life in dessicated tissues. *Bull. Torrey bot. Cl.*, **80**, 166-177.
- ILJIN W. S., 1957. — Drought resistance in plants and physiological processes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **8**, 257-274.
- KURSANOV A. T., 1940. — *L'effet réversible des enzymes dans la cellule végétale vivante*. Acad. Sci. Moscou et Leningrad.
- KURSANOV A. T., 1946. — L'absorption des enzymes par les tissus des plantes supérieures. *Biokhimiya*, **11**, 333-348.
- LINHART K. et WALTER K., 1963. — In *Methods of enzymatic analysis*. H. U. Bergmeyer éd., Academic Press, New-York, p. 783.
- LOOMIS W. D. et BATTLE J., 1968. — Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, **5**, 423-438.
- MASON H. S., 1955. — Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, **16**, 105-185.
- MEYER H., MAYER A. M. et HAREL E., 1971. — Acide phosphatases in germinating lettuce. Evidence for partial activation. *Physiol. Plantarum*, **24**, 95-101.
- MUSZYNSKA G. et REIFER I., 1970. — The arginase inhibitor from sunflower seeds : Purification and inhibitory properties. *Acta biochim. polon.*, **17**, 247-252.
- NIR I. et POLJAKOFF-MAYBER A., 1966. — The effect of water stress on activity of phosphatases from swiss chard chloroplasts. *Israël J. Bot.*, **15**, 12-16.
- OPARINE A. I., 1953. — Variation de l'activité des enzymes dans la cellule végétale sous l'effet des facteurs extérieurs. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 67-82.
- OPARINE A. I. et KADEN S. S., 1945. — La transformation de la beta amylase dans les grains de blé en germination. *Biokhimiya*, **10**, 25-36.
- RAGETLI H. W. J., 1967. — Virus-host interactions, with emphasis on certain cytopathic phenomena. *Canad. J. Bot.*, **45**, 1221-1234.
- RAGETLI H. W. J., WEINTRAUB M. E. et RINK U. U., 1966. — Latent acid phosphatase in chloroplasts. *Canad. J. Bot.*, **44**, 1723-1725.
- SALKOVA E. G. et DEMENYUK M. N., 1970. — Effect of the physiological state of fruits on the properties of polyphenol oxidase present in the chloroplasts. *Dokl. Biokhim.*, **192**, 186-188.
- SCHNEIDER V., 1971. — Der Einfluss von Tannin auf die reversible, lichtabhängige Volumenänderung von isolierten Thylakoiden. *Z. Pflanzenphysiol.*, **64**, 15-21.
- SHAH C. B. et LOOMIS R. S., 1965. — Ribonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. *Physiol. Plantarum*, **18**, 240-254.
- SINGH B. et WORT D. J., 1970. — Effects of pyrocatechol on some metabolic processes of mature sugar beet (*Beta vulgaris*) plants. *Physiol. Plantarum*, **23**, 920-927.

- STOCKER O., 1948. — Beiträge zu einer Theorie der Dürresistenz. *Planta*, **35**, 445-466.
- STRUMEYER D. H. et MALIN M. J., 1969. — Identification of the amylase inhibitor from seed of *Loeti sorghum*. *Biochim. biophys. Acta*, **184**, 643-645.
- VIEIRA DA SILVA J. B., 1968. — Le potentiel osmotique du milieu de culture et l'activité soluble et latente de la phosphatase acide dans le *Gossypium thurberi*. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, 729-732.
- VIEIRA DA SILVA J. B., 1969. — Comparaison entre cinq espèces de *Gossypium* quant à l'activité de la phosphatase acide après un traitement osmotique. Étude de la vitesse de solubilisation et de formation de l'enzyme. *Z. Pflanzenphysiol.*, **60**, 385-387.
- VIEIRA DA SILVA J. B., 1970. — Recherches sur diverses manifestations de la résistance à la sécheresse chez les Cotonniers. *Thèse Doct. (Etat) Sci. nat.*, Orsay.
- WOOLHOUSE, H. W., 1967. — The nature of senescence in plants. In *Symp. Soc. Exp. Biol. XXI. Aspects of the biology of ageing*. H. W. WOOLHOUSE éd., Cambridge Univ. Press, 179-213.
- YIN H. C., 1945. — A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues. *New Phytol.*, **44**, 191-195.