

# Cambios Isoenzimáticos Inducidos por Estrés Hídrico y Temperatura en Pasto Llorón<sup>1</sup>

C.V. Echenique\*, P.A. Polci\*

## ABSTRACT

The effects of low water potentials and two temperature regimes on isozymic patterns of peroxidases, esterases and acid phosphatases were studied on seedlings and plants of two cultivars of weeping lovegrass, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees with different drought resistance. In mature plants of both cultivars, water stress induced an increase in number and relative intensity of esterases and peroxidases, while acid phosphatases showed only increased band activity. Seedlings also showed qualitative and quantitative isozymic changes and an interaction between water stress and temperature was detected. These changes were reversible. When seedlings were returned to growth in water, they exhibited isozymic patterns similar to normal growing plants. Plant responses differed depending on their drought tolerance; the drought-tolerant cultivar showed a higher peroxidase and lower acid phosphatase activity than the less-tolerant one. This trait, along with a rapid recovery capacity, might indicate that the observed changes could be an adaptive response, and not plant damage.

## RESUMEN

Se estudiaron los efectos de bajos potenciales hídricos y dos regímenes de temperatura sobre los patrones isoenzimáticos de peroxidasas, esteratas y fosfatasas ácidas en plántulas y plantas de dos cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees., con diferente resistencia a la sequía. En ambos cultivares, el estrés hídrico produjo un aumento en el número e intensidad relativa de bandas de esteratas y peroxidasas; las fosfatasas ácidas mostraron aumento de actividad, pero no del número de bandas. En plántulas se observaron también alteraciones cualitativas y cuantitativas de los zimogramas y una interacción entre estrés hídrico y temperatura. Estos cambios fueron reversibles. Transferidas las plántulas a agua destilada, sus patrones isoenzimáticos fueron similares a los correspondientes controles. Como respuesta al estrés, el cultivar tolerante mostró mayor actividad de peroxidasas y menor actividad de hidrolasas ácidas. Y esto, sumado a la rápida capacidad de recuperación de las plántulas, indicaría que los cambios observados serían adaptables, más que por el daño debido al estrés.

Palabras clave: Pasto llorón, resistencia a sequía, estrés hídrico - temperatura, isoenzimas.

## INTRODUCCIÓN

Las respuestas de las plantas al estrés hídrico incluyen cambios metabólicos, que les permiten eludir o sobreponerse a tal situación. Estos cambios dependen del genótipo, de la intensidad y duración del estrés y de las etapas ontogénicas en que se produce (Soriano 1980). Hsiao (1973) indicó que los cambios en el metabolismo, producidos por estrés moderado, representan respuestas regulativas de la planta, mientras que puede sucumbir ante un estrés severo.

Los procesos de aclimatación en las plantas están controlados por un sistema genético regulado, directa o indirectamente, por los factores ambientales, particularmente baja temperatura (Levitt 1980; Li y Sakai 1982; Sarhan y Chevrier 1985). El mecanismo involucrado es poco conocido, pero se inducen en la planta respuestas que le permiten tolerar el frío y soportar el congelamiento (Levitt 1972), probablemente a través de la síntesis o acumulación de proteínas específicas (Sarhan y Perras 1987). Estos patrones alterados de síntesis proteica podrían ser el resultado de regulación de la expresión génica a nivel de transcripción y podrían proveer información sobre la capacidad de adaptación de la planta (Sarhan y Perras 1987). La aclimatación a la sequía ha sido menos estudiada, pero podrían ocurrir fenómenos similares (Graff 1980), produciéndose cambios en la composición de las bases del RNA (Kessler y Frank-Tishler 1962). Estos cambios pueden reflejarse en las enzimas, esperando que las células puedan sintetizarlas con similar actividad, pero menos susceptibles al daño por desecación. Mantener un conjunto de enzimas más estables frente al estrés permite a la planta ma-

<sup>1</sup> Recibido para publicar el 18 de enero de 1994

\* Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, San Andrés 800, 8000 Bahía Blanca. Buenos Aires, Arg

yor supervivencia. Esta es una diferencia fundamental entre cultivares resistentes y no resistentes.

Por otra parte, la deshidratación severa provoca numerosos cambios en el citoplasma que podrían tener profundos efectos sobre la estructura de las proteínas u otros grandes polímeros, que dependen del agua para su estructura, como el DNA o el RNA. La pérdida de algunas enzimas claves podría impedir a la célula retomar la actividad metabólica normal luego de la rehidratación. Se han señalado incrementos en la degradación y disminución de la síntesis de sustancias metabólicas importantes, como ésteres de fosfato y proteínas, a consecuencia de la desecación (Tood y Yoo 1964). Hay un balance más favorable entre síntesis y degradación en las variedades resistentes. Una alteración en el equilibrio entre enzimas sintéticas e hidrolíticas sería la causa principal de muerte por sequía en las plantas

Otra característica de los cultivares resistentes al estrés ambiental sería la capacidad de evitar el daño en los tejidos, que conduce a la descompartimentalización y liberación de enzimas desde el complejo lipoproteico y las organelas (Viera da Silva 1976).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de bajos potenciales hídricos y cambios de temperatura sobre los patrones isoenzimáticos de peroxidasas, esterases y fosfatasas ácidas y el posible carácter adaptable de alteraciones en dichos patrones. Este estudio se realizó en plantas y plántulas, que pertenecen a dos cultivares de pasto llorón. *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, con diferente resistencia a la sequía.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y tratamientos de sequía

- Plantas de los cultivares Morpa y Don Eduardo (INTA, EE Anguil), que crecieron a la intemperie en recipientes de 10 000 cc. fueron sometidas a sequía por supresión del suministro de agua durante 5 d, al cabo de los cuales se tomaron las muestras. Plantas regadas normalmente se utilizaron como controles.
- Semillas de los cultivares Morpa y Don Eduardo germinadas en cajas de Petri, en cámara de cultivo a 18°C y 28°C con un fotoperíodo de nueve horas.

Se realizaron tres tratamientos: control (humedecidas diariamente con agua destilada) y estrés 1 y 2, con polietilenglicol de peso molecular 6000 (PEG-6000) (MERK), disuelto en agua destilada, de -0.3 y -0.6 MPa de potencial osmótico respectivamente, renovado diariamente. Las soluciones de PEG-6000 se prepararon de acuerdo con Steuter *et al.* (1981). Cuando la parte aérea medía 1 cm, se realizó el primer estudio electroforético.

Para el estudio de recuperación, las plántulas tratadas con PEG-6000 fueron lavadas y transferidas a cajas similares humedecidas con agua destilada. Luego de permanecer durante 7 d en estas condiciones, se repitió el estudio electroforético.

### Electroforesis

- Plantas: se obtuvieron extractos al macerar en mortero un trozo de lámina foliar de 10 cm de largo de hojas jóvenes, completamente expandidas y recién cortadas. El homogenato se obtuvo con 150 µl de buffer tris-cítrico 0.05 M por borato de sodio 0.19 M (9:1 V/V), pH 8.3 y se absorbió en trozos de papel Whatmann no. 3 de 6 x 5 milímetros.
- Plántulas: se tomaron 10 mg de hoja de 1 cm de altura y se maceraron con 100 µl de buffer tris-cítrico 0.015 M pH 8.6.

La electroforesis se realizó en geles de almidón al 13% (SIGMA, Lot. 25 F-0364) de 12 x 15 x 0.6 cm en dos sistemas buffer:

- Planta: el buffer utilizado para preparar el gel fue tris-cítrico 0.05 M por borato de sodio 0.19 M (9:1 v/v), pH 8.3. Como buffer de electrodos se utilizó borato de sodio 0.19 M, pH 8.3.
- Plántulas: como buffer para preparar el gel se utilizó tris-cítrico 0.015 M, pH 8 y para los electrodos se utilizó el borato de sodio 0.3 M, pH 8.6.

Los extractos se sembraron a 5 cm del borde catódico del gel y se aplicó una corriente de 25 mA durante 3.5 h a 4° centígrados.

El revelado de isoenzimas se realizó en los siguientes medios de incubación:

**Esterasas:** 100 ml de buffer tris-HCl 0.1 M pH 6.0 con 5 mg de Fast Garnett GBC, más el agregado de 2 ml de acetato de alfa naftilo al 1% en acetona al 50 por ciento. El gel se incubó a 37°C en oscuridad durante aproximadamente dos horas.

**Peroxidasas:** 100 ml de buffer acetato de sodio 0.2 M, pH 5.0 con 50 mg de 3-amino-9-etil carbazol disueltos en 5 ml de dimetilformamida. En el momento del revelado, se agregaron 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 10% y se incubó a temperatura ambiente.

**Fosfatasas ácidas:** 50 ml de buffer acetato de sodio 0.2 M, pH 5.0 y 2 ml de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  0.1 M, con 17 mg de Fast Garnett GBC (SIGMA), más el agregado de 20 mg de fosfato ácido de alfa naftilo disueltos en 2 ml de buffer acetato en el momento del revelado. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad.

**Contenido relativo de agua:** Se determinó en las plantas de acuerdo con Turner (1985).

## RESULTADOS

En las plantas de ambos cultivares, el estrés hídrico produjo un aumento de actividad en los tres sistemas isoenzimáticos, que consistió en cambios cualitativos (en el número de bandas) y cuantitativos (en la intensidad relativa de cada banda) en los zimogramas de peroxidasas y esterazas, en tanto que en fosfatasas ácidas los cambios fueron solamente cuantitativos (Fig. 1).

Las isoperoxidasas más afectadas por el estrés fueron las de mayor movilidad (Fig. 1a, zona b); así las plantas pertenecientes a 'Don Eduardo' se observaron más activas.

La actividad de las esterazas y fosfatasas ácidas se incrementó como consecuencia del estrés; pero fueron mayores, en términos relativos, en plantas pertenecientes al cultivar Morpa (Fig. 1b y 1c).

En las plántulas, se evidenció la interacción entre los factores temperatura y estrés hídrico. Se determinaron cambios cualitativos en los sistemas isoenzimáticos analizados en ambos cultivares al variar la temperatura (Figs. 2 a 7). A 30°C aumentó la actividad general de peroxidasas en el cultivar Don Eduardo, fundamentalmente en las zonas "a" y "b", con disminución en la banda más catódica (zona c) (Fig. 2a). En 'Morpa' hubo

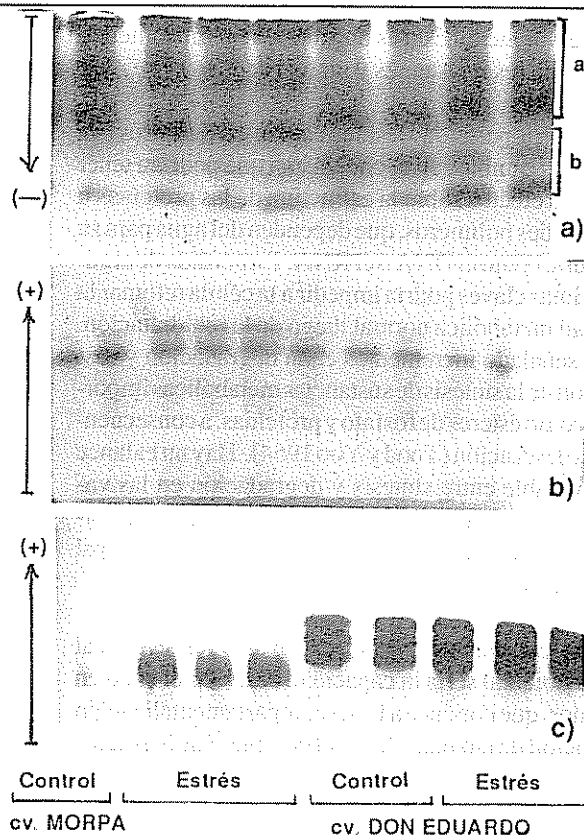


Fig. 1. Patrones isoenzimáticos de hojas de pasto llorón: a) peroxidasas, b) esterazas, c) fosfatasas ácidas.

**Leyenda:** Contenido relativo de agua: cv. Don Eduardo, control: 92.5%; estrés: 62.2%; cv. Morpa, control: 94.4%; estrés: 57.4%.

**Nota:** La flecha indica la dirección de la migración electroforética.

aumento de actividad en la zona "a" y disminución en "b" y "c", con desaparición total de una banda.

La actividad de las esterazas en plántulas se incrementó con la aparición e intensificación de bandas al disminuir el potencial osmótico de la solución (Fig. 3). También aumentó la actividad de fosfatasas ácidas con la aparición de nuevas bandas en 'Don Eduardo' (Fig. 4), si bien el sistema, en este caso, no fue tan "resolutivo" como en las plantas adultas.

En 'Morpa', a 20°C, se observó la desaparición de bandas de peroxidasas en las zonas "a" y "c" (Fig. 5b), mientras que en 'Don Eduardo' se intensificaron las bandas con el estrés más severo, sobre todo la de mayor movilidad (Fig. 6b). En las plántulas de control a esta temperatura, se observaron isozimas de peroxidasas de

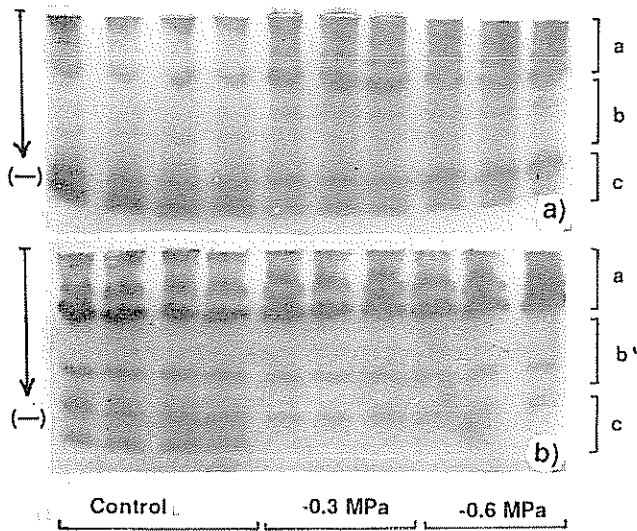


Fig. 2. Isoenzimas de peroxidadas de plántulas de pasto llorón, que creció bajo 30°C.: a) cv. Don Eduardo; b) cv. Morpa.

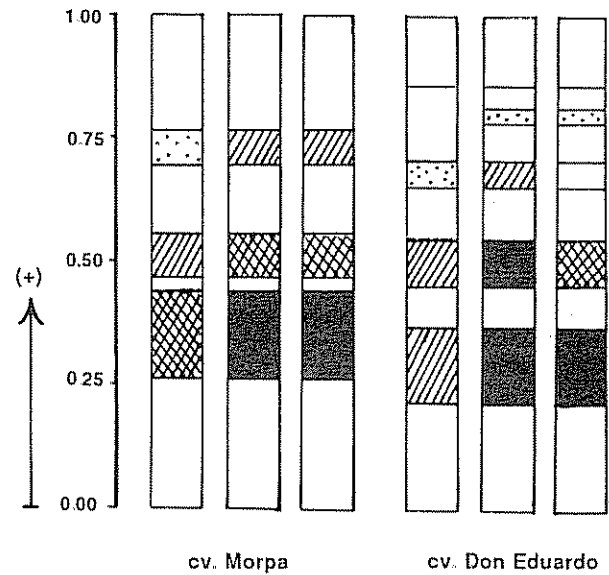


Fig. 4. Isoenzimas de fosfatasa ácida de plántulas de pasto llorón crecido bajo 30°C.; intensidad de las bandas en orden decreciente.

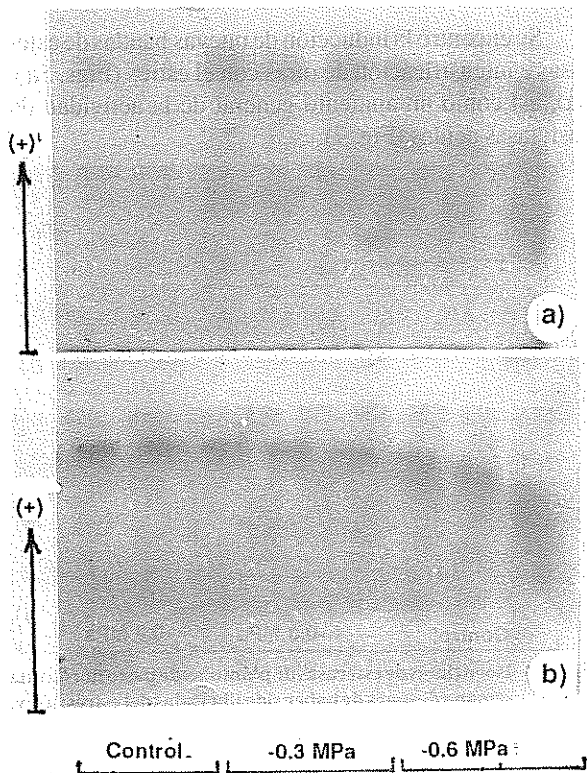


Fig. 3. Isoenzimas de esterases de plántulas de pasto llorón, que creció bajo 30°C.: a) cv. Morpa; b) cv. Don Eduardo.

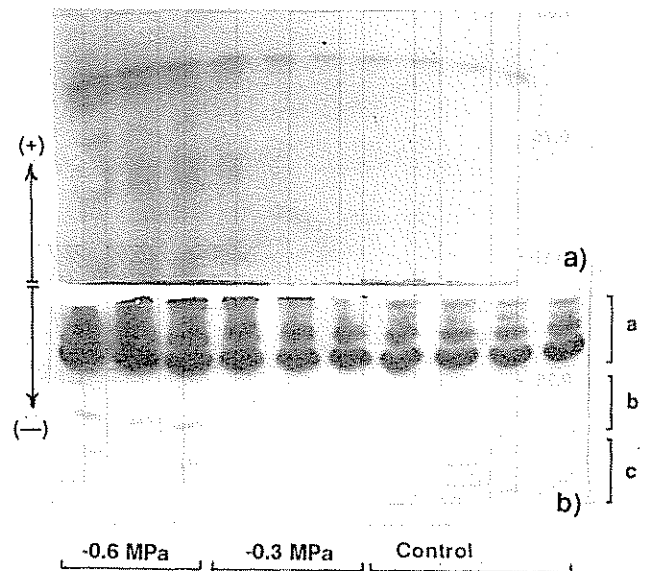


Fig. 5. Isoenzimas de esterases (a) y peroxidadas (b) de plántulas de pasto llorón crecido en 20°C, en el cv. Morpa.

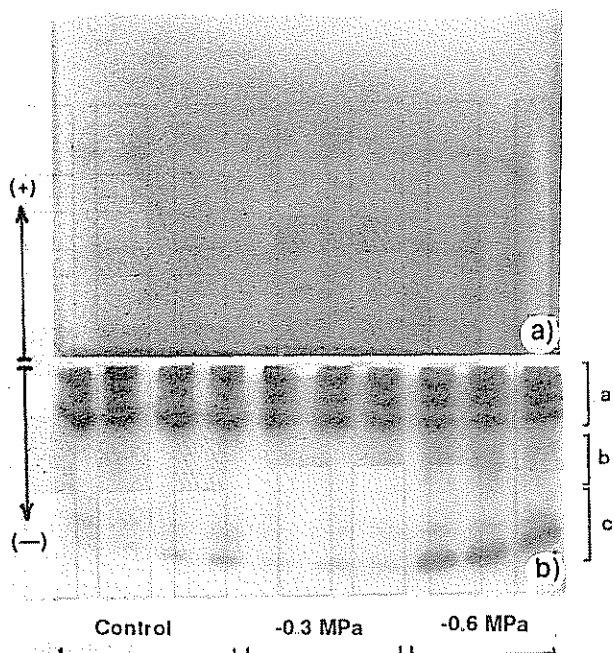


Fig. 6. Isoenzimas de esterases(a) y peroxidasas(b) de plántulas de pasto llorón crecido en 20°C, en el cv. Don Eduardo

movilidad electroforética, ausentes en una temperatura de 30°C, probablemente por el efecto de la temperatura sobre su síntesis o actividad. En los controles, la actividad de peroxidasas fue mayor a 30° centígrados.

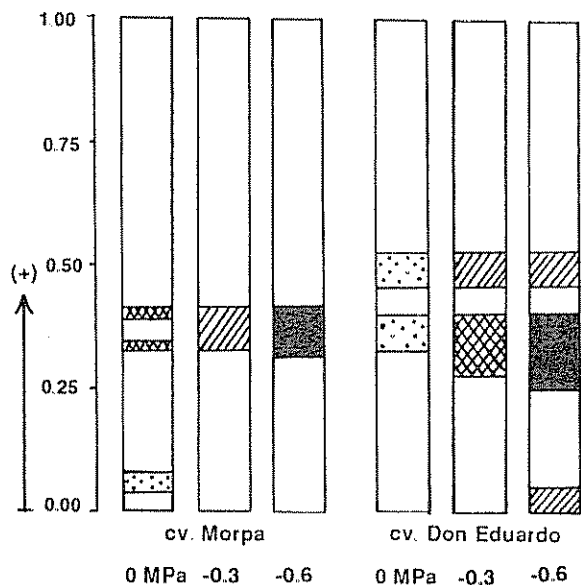


Fig. 7. Isoenzimas de fosfatasas ácidas de plántulas de pasto llorón crecido en 20°C.; intensidad de las bandas en orden decreciente

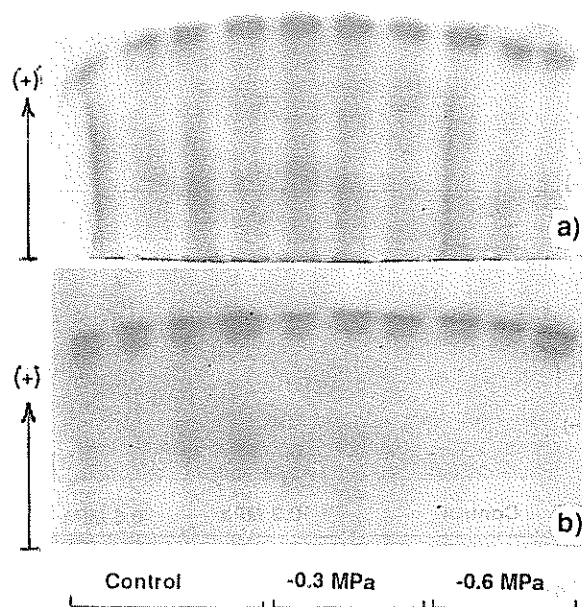


Fig. 8. Isoenzimas de peroxidasas de plántulas de pasto llorón una semana después de haber sido liberadas del estrés: a) cv. Don Eduardo; b) cv. Morpa.

Se encontró la inducción de nuevas bandas de esterases e intensificación de otras con el estrés (Figs. 5a y 6a), así como un aumento general de la actividad de fosfatasas ácidas (Fig. 7).

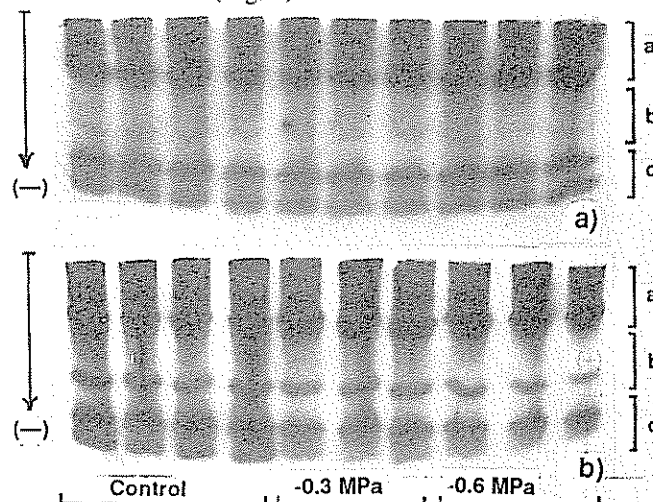


Fig. 9. Isoenzimas de esterases de plántulas de pasto llorón una semana después de haber sido liberadas del estrés: a) cv. Don Eduardo; b) cv. Morpa.

Luego de transferir todas las plántulas a agua destilada, los patrones isoenzimáticos no mostraron diferencias cualitativas y demostraron una rápida recuperación (Figs. 8 y 9).

## DISCUSIÓN

La respuesta de las plantas de ambos cultivares fue diferente y estaría relacionada con la habilidad diferencial de las mismas para tolerar condiciones de estrés ambiental, fundamentalmente, de sequía. Las plantas pertenecientes al cv. Don Eduardo son más resistentes a la sequía (Echenique y Curvetto 1986) y mostraron características de tolerancia protoplasmática a la desecación (Echenique *et al.* 1989). Esta tolerancia estaría relacionada con el mantenimiento de las estructuras celulares intactas debido a una mayor integridad de las membranas, aun con bajos potenciales hídricos en los tejidos (Echenique *et al.* 1989). Las peroxidasas, junto al superóxido dismutasa y catalasa, forman parte del sistema de control de peróxidos en las células vegetales (Dhindsa y Matowe 1981; Kalir y Poljakoff-Mayber 1981) y de protección de las membranas celulares. En este trabajo fue evidente un incremento general de la actividad de peroxidasas en plantas y en plántula y, aún más, en el cultivar tolerante con activación de bandas fundamentalmente de movilidad electroforética alta.

Estos resultados indican que, en parte, la tolerancia protoplasmática observada previamente podría deberse a un sistema más efectivo de remoción de peróxidos. Los efectos de los peróxidos sobre las membranas señalan la necesidad de un sistema de control para prevenir su acumulación (Dhindsa y Matowe 1981). Formando parte de este sistema se encuentran las peroxidasas, que, junto con el superóxido dismutasa y catalasa, están involucradas en la defensa de las células aeróbicas contra el radical superóxido y  $H_2O_2$ , productos de la reducción parcial de  $O_2$  (Kalir y Poljakoff-Mayber 1981), provocada por la desecación (Bewley 1979) y otras condiciones ambientales extremas. En un trabajo previo se observó un aumento de la actividad del superóxido dismutasa en plantas de pasto llorón sometidas a sequía con PEG-6000 (Echenique *et al.* 1989).

La activación de las peroxidasas depende de varios reguladores de crecimiento y cambia durante el desarrollo (Galston y Davis 1969), de acuerdo con los factores ambientales tales como temperatura (De Jong *et al.* 1968; McCown *et al.* 1969a, b; Roberts 1967), enfermedades y daño (Kanazawa *et al.* 1967; Novacky y Hampton 1968); así correlaciona los cambios isoenzimáticos con la aclimatación (Roberts 1967).

Gerloff *et al.* (1967) y McCown *et al.* (1969a, b) encontraron cambios cualitativos y cuantitativos en peroxidasas de alfalfa y *Dianthus*, respectivamente. En

el primer caso, las diferencias entre cultivares aclimatados y no aclimatados no fueron lo suficientemente claras; mientras que en *Dianthus* con la aclimatación se desarrollaron bandas adicionales de peroxidasas durante la exposición a bajas temperaturas. En arroz, Mali y Mehta (1977) descubrieron bandas de peroxidasas características de plantas tolerantes a la sequía y sugirieron que las enzimas que presentan esos cambios se encuentran implicadas en la tolerancia.

En otros organismos, como *Drosophila* (Ashburner y Bonner 1979), levaduras (Deshaies *et al.* 1988) y también plantas superiores (Barnet *et al.* 1980; Cooper y Ho 1983), ante un cambio brusco de temperatura, aparecen nuevas proteínas que podrían proveer termotolerancia (Loomis y Wheeler 1980; Mitchell *et al.* 1979), siendo más eficientes o menos sensibles a tal situación. Esto podría ser el resultado de la transcripción diferencial, indicando la capacidad de adaptación de la planta (Cloutier 1983; Sarhan y Perras 1987; Smith 1970).

En plantas del cultivar Don Eduardo, la actividad de fosfatasa ácida fue menor. Viera Da Silva (1976) encuentra que el déficit hídrico induce una importante solubilización de fosfatasa ácida y otras hidrolasas en especies susceptibles de algodón. Asimismo, estas enzimas muestran solubilización en plantas que evitan la sequía, no así en aquellas que la toleran (Viera da Silva 1969). Liberadas, las hidrolasas ácidas pueden tener una acción destructiva y la mayoría de los efectos deletéreos del estrés podrían ser explicados por tales destrucciones (Viera da Silva 1976). Los cultivares más resistentes al estrés hídrico logran mantener un balance más favorable entre síntesis y degradación cuando se enfrentan a este factor ambiental, lo que puede atribuirse al cultivar Don Eduardo.

Cheng *et al.* (1968) encontraron que la deshidratación, en determinados períodos de la germinación del trigo, resulta en transcripciones incorrectas y no se produce el complemento enzimático normal. Esto se debe a daños irreparables a nivel del ADN y ARN. En pasto llorón, y en las condiciones en que se realizó este estudio, los cambios resultaron ser reversibles, ya que después de una semana sin estrés hídrico no se observaron prácticamente diferencias en relación con las plantas normalmente regadas.

Como conclusión, se puede decir que la capacidad de rápida recuperación, sumada a un mayor incremento en actividad de peroxidasas fundamentalmente en el cultivar tolerante, indica que tales cambios tienen natu-

raleza adaptable y forman parte del proceso de inducción de tolerancia a la sequía y aclimatación en diferentes temperaturas.

Si bien se observaron bandas que se modifican como consecuencia del estrés y un incremento general de peroxidasas podría conferir tolerancia, por el momento, no puede atribuirse esta característica a una banda en particular.

#### LITERATURA CITADA

- ASHBURNER, M.; BONNER, Y. J. 1979. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17:241-254
- BARNET, T.; ALTSCHULER, M.; McDANIEL, C. N.; MASCARENHAS, J. P. 1980. Heat shock-induced proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *European Journal of Biochemistry* 46:83-88
- BEWLEY, J. D. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Review of Plant Physiology (EE UU)* 30:195-238
- CHENG, D.; SARID, S.; KATCHALSKI, E. 1968. The role of water stress in the inactivation of messenger RNA of germinating wheat embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 61:1378-1383
- CLOUTIER, Y. 1983. Changes in the electrophoretic patterns of the soluble proteins of winter wheat and rye following cold acclimatization and desiccation stress. *Plant Physiology (EE UU)* 71:400-403
- COOPER, P.; HO, T. D. 1983. Heat shock proteins in maize. *Plant Physiology* 71:215-222
- DE JONG, D. W.; OLSON, A. C.; HAWKER, K. M.; JANSEN, E. F. 1968. Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension. *Plant Physiology (EE UU)* 43:841-844
- DESHAIES, R. J.; KOCH, B. D.; WERNER-WASHBURNE, M.; CRAIG, E.; SCHEKMAN, R. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial polypeptides. *Nature* 332:800-805
- DHINDSA, R. S.; MATOWE, W. 1981. Drought tolerance in two mosses, correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal Experimental Botany* 32:79-91
- ECHENIQUE, C. V.; CURVETTO, N. R. 1986. Efectos del déficit hídrico en cinco cultivares de pasto llorón, *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees sens. lat.: Niveles de clorofila y prolina y permeabilidad de membranas celulares. *Phyton* 46:195-206.
- ECHENIQUE, C. V.; GARCIA, M. G.; CURVETTO, N. R. 1989. An ultrastructural study of weeping lovegrass *Eragrostis curvula* (Schr.) Nees.: Effects of water stress. *Micr. Electr. Biol. Cel.* 13(1):97-112
- ECHENIQUE, C. V.; POVERENE, M.; CURVETTO, N. R. 1989. Efecto del ácido abscísico y estrés hídrico sobre tres sistemas isoenzimáticos en pasto llorón. *In* Reunión Latinoamericana (10); Reunión Nacional de Fisiología Vegetal (18). Misiones, Puerto Iguazú, Arg. 8 p
- GAFF, D. F. 1980. Protoplasmic tolerance of extreme stress. *In* Adaptation of plants to water and high temperature stress. N.C. Turner, P. J. Kramer (Eds). New York, John Wiley. p 207-230
- GALSTON, O. A.; DAVIS, P. J. 1969. Hormonal regulation in higher plants. *Science* 163:1288-1297
- GERLOFF, E. D.; STAHMANN, M. A.; SMITH, D. 1967. Soluble proteins in alfalfa roots as related to cold hardiness. *Plant Physiology* 42:895-899
- HSIAO, T. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570
- KALIR, A.; POLJAKOFF-MAYBER, A. 1981. Changes in activity of malate dehydrogenase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase in leaves of *Helimione portulacoides* (L.): Aellen exposed to high sodium chloride concentrations. *Annals of Botany* 47:75-85
- KANAZAWA, Y. T.; ASAHI, I.; URITANI, I. 1967. Changes of B-type haem content in relation to peroxidase biosynthesis in injured sweet potato roots. *Plant and Cell Physiology* 8:249-262
- KESSLER, B.; FRANK-TISHLER, J. 1962. Dehydration-induced synthesis of nucleic acids and changing of composition of ribonucleic acid: A possible protective reaction in drought-resistant plant. *Nature* 196:542-543
- LEVITT, J. 1972. The nature of stress injury and resistance. *In* Responses of plants to environmental stresses. J. Levitt (Ed). New York, Academic Press. p 168-171
- LEVITT, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. New York, Academic Press. v 1, p 116-227
- LI, P. H.; SAKAI, A. 1982. Plant cold hardiness and freezing stress: Mechanisms and crop implications. *In* International Plant Cold Hardiness Seminar. Proceedings. New York, Academic Press. v 2, p. 1-87
- LOOMIS, W. F.; WHEELER, S. 1980. Heat shock response of *Dictyostelium*. *Developmental Biology* 79:399-408.
- MALI, P. C.; MEHTA, S. L. 1977. Effect of drought on proteins and isozymes in rice during germination. *Phytochemistry* 16:643-646.
- MCCOWN, B. H.; BECK, G. E.; HALL, I. C. 1969a. The hardening response of three clones of *Dianthus* and the corresponding complement of peroxidase isozymes. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 94:691-693.
- MCCOWN, B. H.; HALL, I. C.; BECK, G. E. 1969b. Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental change. *Plant Physiology* 44:210-216
- MITCHELL, H. K.; MOLLER, G.; PETERSEN, N.; LIPPS, L. 1979. Specific protection from phenocopy induction by heat shock. *Developmental Genetics* 1:63-74
- NOVACKY, A.; HAMPTON, R. E. 1968. Peroxidase isozymes in virus infected plants. *Phytopathology* 58:301-305

- ROBERTS, D.W.A. 1967. Peroxidase isozymes in wheat leaves grown at 6° and 20°. *Plant Physiology* 42:16.
- SARHAN, F.; CHEVRIER, N. 1985. Regulation of RNA synthesis by DNA - dependant RNA polymerases and RNases during cold acclimation in winter and spring wheat. *Plant Physiology* 78:250-255.
- SARHAN, F.; PERRAS, M. 1987. Accumulation of a high molecular weight protein during cold hardening of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant and Cell Physiology* 28:1173-1179.
- SMITH, R.L. 1970. Peroxidase polymorphism in cultivated oats. *Avena sativa* L. and *A. byzantina* C. Koch. *Crop Science* 10:273-276.
- SORIANO, A. 1980. Ecofisiología del stress en las plantas. *Revista de la Facultad de Agronomía* no. 1:1-12.
- STEUTER, A.A.; MOZAFAR, A.; GOODWIN, J.R. 1981. Water potential of aqueous polyethylene glycol. *Plant Physiology* 67:64-67.
- TURNER, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* 58:339-366.
- TODD, G.W.; YOO, B.Y. 1964. Enzymatic changes in detached wheat leaves as affected by water stress. *Phyton* 21:61-68.
- VIERA DA SILVA, J. 1969. Comparaison entre cinq espèces de *Gossypium* griant à l'activité de la phosphatase acide après un traitement osmotique: Etude de la vitesse de solubilisation et de formation de l'enzyme. *Z. Pflanzanphysiol* 60:385-387.
- VIERA DA SILVA, J. 1976. Water stress, ultrastructure and enzymatic activity. In *Water and plant life*. O.L. Lange, L. Kappen, E.D. Schulze (Eds.) New York, Springer-Verlag.

## FE DE ERRATAS

Turrialba 42(3):375-381

Page	Line	Says:	Should say:
375 left column	15	genotype variety.	variety genotype.
376 left column	22	Two tissue extraction	Two different methods of extraction
376 right column	4	to detect the presence of SDS	for the presence of SDS
380 left column	8	We do not that	We do not what
380 left column	27	IEF' and SDS-PAGE	IEF - and SDS PAGE