

# ACUMULACION DE PROLINA EN RAICES DE DOS CULTIVARES DE NOPAL (*Opuntia spp.*) BAJO TENSION POR CALOR

María Luisa Bárcenas-Argüello; Arnoldo Flores-Hernández. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. Apartado Postal 8. Bermejillo, Dgo. 35230, México. aflores@chapingo.uruza.edu.mx

## RESUMEN

En nopal a pesar de ser un recurso de alto potencial en las zonas áridas, poco se ha realizado sobre su investigación bioquímica. En el presente estudio se utilizaron ápices de raíces adventicias primarias (E1) y secundarias (E2) de cladodios anuales de dos cultivares de *Opuntia megacantha* Salm-Dyck: VIII resistente (CT) y 35 susceptible (CS) a la sequía, sometidos durante tres horas a temperaturas de 25 (T1), 37 (T2) y 47°C (T3) en cámara de circulación de aire, para determinar el efecto de la tensión por calor sobre la concentración de prolina (Método de Bates) y su posible uso como marcador de la tolerancia al calor. Se utilizó un diseño de tratamientos factorial y un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico del contenido de prolina no mostró diferencia significativa entre temperaturas ni entre cultivares mientras que la edad fue altamente significativa ( $P=0.0001$ ) siendo mayor en E1 que en E2 (1.5036 y 0.5418 mg g<sup>-1</sup> peso seco respectivamente). Se sugiere controlar temperatura del sustrato y salinidad del agua para identificar la concentración de prolina como un índice de selección de la tolerancia al calor.

**Palabras clave:** aminoácido, estrés, temperatura, Cactaceae.

## SUMMARY

The pickly pear (*Opuntia spp.*) is a natural resource of high potential profits in the arid lands, however little biochemical research has been done. In this study apexes of primary (E1) and secondary (E2) adventitious roots of cladodes of a year of two cultivate of *Opuntia megacantha* Salm-Dyck: VIII resistant (CT) and 35 susceptible (CS) to the drought were used; They were put under temperatures of 25 (T1), 37 (T2) and 47°C (T3) in a camera with air circulation for three hours, to determine the effect and its possible use like marker of the tolerance to the heat. A factorial design of treatments and an experimental design totally at random was used. The statistical analysis did not show significant difference between temperatures nor between varieties. Age was highly significant ( $P=0.00011$ ) begin higher in E1 (1.5037 mg g<sup>-1</sup> dry weight) than in E2 (0.5418 mg g<sup>-1</sup> dry weight). Temperature control of soil and salinity of water for concentration use of proline is suggested as a tolerance to heat selection index.

**Key word:** Amino acid, stress, temperature, Cactaceae.

## INTRODUCCIÓN

La Comarca Lagunera es una región clasificada como árida, ubicada en el límite sur del Desierto Chihuahuense (Flores, 1994); en ella la agricultura resulta una actividad muy importante, abarcando una superficie de 171 029 ha, de las cuales 153 823 ha son de riego y 17 206 ha son de temporal (SAGAR, 1997).

Las fuentes que abastecen de agua a la población y a la superficie irrigada, son el subsuelo,

el río Nazas y el Aguanaval con un escurrimiento medio anual de 1 095 y 160 millones m<sup>3</sup> respectivamente. El escurrimiento del río Nazas es almacenado en la Presa Lázaro Cárdenas con una capacidad de 3 336 millones m<sup>3</sup>. Sin embargo, los volúmenes han estado muy por debajo de su capacidad total ello debido a la escasa precipitación registrada en los últimos años. La precipitación pluvial no aporta una cantidad de agua significativa ya que es muy escasa y mal distribuida y solo se capta un promedio de 257 milímetros anuales (SAGAR, 1997). Por otra parte, de la superficie cultivada se estima que un buen porcentaje es

regada con agua extraída del subsuelo, por lo que se ha detectado un fuerte abatimiento del manto acuífero. SAGAR (1997), reporta un total de 2 180 pozos vigentes. En la última década los bajos escurrimientos se traducen en una reducción en la superficie de cultivo y un abatimiento cada vez mayor del manto freático. Situación que obliga a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan mantener y/o incrementar la producción, mediante la utilización de especies que tengan la capacidad de eficientar el uso de agua, además de que cubran parte de las necesidades alimenticias y económicas de la población.

El nopal reúne las características requeridas para ser considerada una especie de producción alternativa en la Comarca Lagunera, ya que presenta atributos morfológico-fisiológicos para la tolerancia a la sequía (Granados y Castañeda, 1997), así como un alto valor nutricional e industrial (Borrego y Burgos, 1986) y de acuerdo con evaluaciones de cultivares de nopal en la región (Flores, 1994) es una opción de aprovechamiento de las cada vez mayores superficies que se dejan sin sembrar.

Sin embargo, se carece de estudios encaminados a conocer las características bioquímicas del nopal y los mecanismos involucrados en la tolerancia a las altas temperaturas entre los que se encuentra la acumulación del aminoácido prolina en respuesta al estrés estudiado en diferentes especies vegetales (Chu *et al.*, 1976; Pedroza, 1995; Kramer, 1974; Reynoso *et al.*, 1981; Skriver y Mundy, 1990; Nolte *et al.*, 1997; Oshanina, 1972; Kuznetsov *et al.*, 1993; Mojeda *et al.*, 1990; Ribaut y Pilet, 1991) y su posible utilización como un indicador de la tolerancia al calor en la selección de cultivares tolerantes (De la Rosa, 1993; Rensburg y Krüger, 1994; Thakur y Rai, 1981). La dificultad en su estudio se acentúa al considerar que la concentración del aminoácido se afecta por la edad o etapa fenológica y que existen diferencias de concentración entre los diversos órganos de la planta (Basra *et al.*, 1992; Voetberg y Sharp, 1991; Mutters, 1989; Esau, 1973).

En el presente estudio se utilizaron ápices de raíces adventicias primarias y secundarias de nopal ***Opuntia megacantha*** Salm-Dyck: cultivar VIII resistente y cultivar 35 susceptible a la sequía, con el objeto de generar información sobre el contenido de la prolina en la planta de nopal; y Determinar la variación de la concentración de prolina en raíces de los cultivares tolerante y susceptible a la sequía, sometidos a tensión por calor e identificar la concentración de prolina como un posible indicador de la tolerancia al calor.

El trabajo se llevó a cabo en el invernadero y laboratorio de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Aridas (URUZA) de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), localizada a los 25°52'28" Latitud Norte y 103°37'07" Longitud Oeste, con una altitud de 1119 msnm. (SAGAR, 1997), en los límites del Desierto Chihuahuense (Flores, 1994). Región que se caracteriza por poseer un clima BWhw(e), según la clasificación climática de Köppen modificada por García (1988).

**Preparación del sustrato y del material vegetal.** Se estimuló la formación de raíces adventicias a partir del tallo poniendo a "germinar" cladodios de la especie ***Opuntia megacantha*** claves VIII y 35 en sustrato arena de río 100%, en charolas de 5 cm de altura sin orificios de drenaje y con una capacidad aproximada de 4 kg. El cultivar clave VIII con pocas espinas, selección inicial para propósito tunero, proveniente de San Martín de las Pirámides, Estado de México, por sus características de excelente producción de biomasa y adaptación a condiciones de temporal se considera como el cultivar tolerante (Cv T). El cultivar clave 35 presenta poca adaptación al clima de la región manifestándose en bajo porcentaje de sobrevivencia y en la baja producción de penca y brote, se considera como el cultivar susceptible (Cv S). Ambos cultivares fueron evaluados en la URUZA, en donde el banco de germoplasma de nopal cuenta con 55 variedades colectadas desde 1987 (Flores, 1994). Se seleccionaron cladodios de un año de edad, se separaron de la planta y se lavaron antes de colocarlos de manera horizontal sobre las charolas con arena húmeda. Se procuró que existiera una superficie máxima de contacto de la penca con el sustrato. Se utilizó agua de riego en todos los tratamientos para representar con este aspecto la condición del sitio. Las charolas se colocaron en el interior del invernadero, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas.

Los tratamientos por calor y la preparación de las muestras para la cuantificación de prolina se realizaron en el Laboratorio. El diseño experimental fue completamente al azar y el diseño de tratamientos fue un factorial con dos cultivares, tres temperaturas y tres repeticiones, en donde la unidad experimental consistió en una charola con una penca. Las charolas se dividieron en 3 lotes para la aplicación del calor. Los lotes fueron colocados en una cámara con circulación de aire donde fueron sometidas a las temperaturas ambientales de 25°C, 37°C y 47°C. El grupo testigo se sometió a 25°C, el grupo de estrés intermedio a una temperatura de 37°C y el grupo de estrés intenso a 47°C, durante tres horas. La temperatura del sustrato se midió a un centímetro de profundidad antes de iniciar el tratamiento y al término del mismo. Inmediatamente

## MATERIALES Y METODOS

después de terminado el tratamiento se cortaron las puntas de las raíces (un centímetro aproximadamente). Se consideró como punta de la raíz aquella parte que no contaba con pelos radicales, estaba turgente y mostraba un color blanco transparente, desechándose aquellas que presentaban peridermis café y apariencia corchosa, ya que las raíces por efecto de las sales tienden a suberificarse (Kramer, 1989). Acto seguido, se sumergieron en nitrógeno líquido (-196°C), con lo cual se detiene la actividad celular, posteriormente fueron secadas en una estufa con circulación de aire a 50°C. Se trituraron separadamente y se embolsaron en polietileno conservándose a temperatura ambiente en un desecador hasta que se hicieron las evaluaciones del contenido de prolina.

Se determinaron las propiedades químicas del suelo y del agua de riego en el Laboratorio. Para la conductividad eléctrica se utilizó un puente de Wheatstone (Modelo 31 Conductivity Bridge). El valor de pH se obtuvo mediante el potenciómetro (Modelo 130 pH Meter). La determinación de cationes se realizó por el método de Versenato y el Sodio se estimó por diferencia y relacionándolo con la conductividad eléctrica. Se cuantificó la cantidad de carbonatos, bicarbonatos, sulfatos y cloruros.

Para cuantificar la cantidad de prolina en las muestras de ápices de raíz de nopal (con base en su peso seco) de los cultivares en estudio se elaboró primeramente una curva de calibración, usando el aminoácido puro L-prolina (sigma) la que sirvió de referencia para dicho cálculo, siguiendo la metodología propuesta por Bates *et al.* (1973). La curva de calibración de L-Prolina (sigma) se realizó con las lecturas de absorbancia (Y) obtenidas de las concentraciones de prolina (X) de 0, 3, 6, 9.....30 mg/l<sup>-1</sup> ya conocidas, aplicando una regresión lineal con el paquete estadístico SAS, de acuerdo a la ecuación:  $Y = a + bx$ .

La cuantificación de prolina en las muestras se realizó espectrofotométricamente según el método de Bates (1973) y las modificaciones propuestas por Gutiérrez *et al.* (1998). El espectrofotómetro se calibró con tolueno a una longitud de onda de 520 nm. Para cuantificar la cantidad de prolina en las muestras de nopal se despejó la fórmula de regresión obtenida de la curva de calibración para conocer la cantidad de prolina de acuerdo a la absorbancia detectada en las muestras de raíz de nopal, resultando la siguiente ecuación:

$$X = \frac{Y - 0.02136364}{0.05172727} \times fd$$

Donde:

X = Contenido de prolina en mg/g de peso seco (p.s.)

Y = Absorbancia a 520 nm

fd = factor de dilución (ml/g p.s.)

$$fd = \frac{\text{Volumen ( 0.01 L acido sulfosalisílico)}}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Para el Análisis estadístico de los resultados se utilizó un modelo factorial calculado con el paquete estadístico SAS para computadora personal y el procedimiento GLM.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis químico del agua y del extracto de saturación del suelo indican que las condiciones de producción de nopal en campo no son las ideales y para este trabajo puede resultar contraproducente (Cuadro 1). El agua, no es apropiada para riego bajo condiciones ordinarias por el alto contenido de sales presentes y por la concentración de Cl no es recomendable su uso para los cultivos sensibles a las concentraciones altas de este elemento porque puede ser perjudicial, aunque es baja en sodio y no existe peligro de que los suelos alcancen niveles peligrosos de sodio intercambiable. En cuanto al extracto de saturación del suelo, éste se clasifica como suelo salino, la lectura de conductividad indica que la cantidad de sales presentes es lo suficientemente alto para perjudicar el crecimiento de las plantas, no hay problemas de exceso de sodio (USDA, 1977). No obstante, lo anterior resulta de las condiciones reales de campo, bajo las cuales se han presentado respuestas diferenciales entre cultivares, destacándose en estudios previos diferencias significativas en adaptación, producción y calidad entre otros factores. Por lo tanto se siguieron las mismas condiciones (en lo posible) para extrapolar los resultados a campo.

**Cuadro 1.** Concentración de cationes y aniones (meq/l) en agua y suelo.

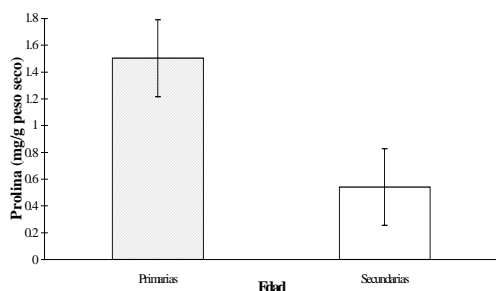
Agua de riego				Extracto de saturación del sustrato			
Aniones	meq/l	Cationes	meq/l	Aniones	meq/l	Cationes	meq/l
CO <sub>3</sub>	1.06	Ca	21	CO <sub>3</sub>	0	Ca	48
HCO <sub>3</sub>	2.226	Mg	5	HCO <sub>3</sub>	1.86	Mg	26
Cl	7.425	Na	2	Cl	56.69	Na	3
SO <sub>4</sub>	6.9			SO <sub>4</sub>	14.25		
Total	17.611		28	Total	72.8		77
p. H. 7.3		C.E.=2 800 µmhos		p.H. = 7.4		C.E.=7 700µmhos	

Las temperaturas registradas en el suelo disminuyeron con la profundidad, (Cuadro 2) debido sin duda alguna al efecto amortiguador de la humedad presente en el sustrato. Sin embargo, se asegura que si hay una condición de tensión por calor en el sistema radical a la temperatura ambiente de 37 y 47 °C, ya que la temperatura óptima del suelo para muchos cultivos templados es alrededor de 20 -25°C (Russell, 1977; Borrego y Burgos, 1986).

**Cuadro 2.** Temperaturas registradas en el sustrato de las charolas

Temperatura ambiente (°C) (Tratamiento)	Temperatura (°C) del sustrato a 1 cm de profundidad antes de iniciar el tratamiento	Temperatura (°C) del sustrato a 1 cm de profundidad al concluir el tratamiento
25	17	21
37	17	29
47	17	35

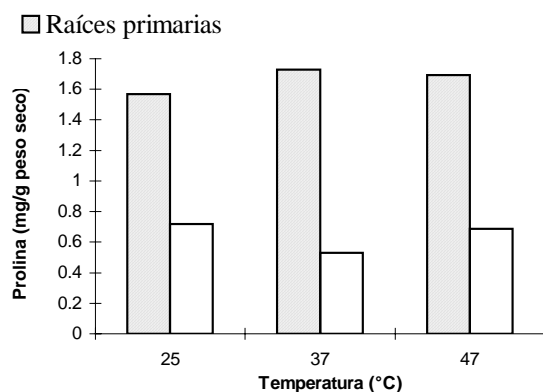
Los resultados obtenidos en la acumulación de prolina en raíces de nopal bajo las condiciones de humedad y salinidad presentes en el sustrato, probablemente originaron efectos que evitaron una significancia en las diferencias entre tratamientos por temperatura y entre cultivares. De las variables evaluadas, solo la edad presentó una diferencia altamente significativa ( $P=0.0001$ ) independientemente de la temperatura ( $P=0.6691$ ) y del cultivar ( $P=0.1784$ ). Basra (1992), Mutters (1989) y Tello (1994), indican que la acumulación de prolina se ve afectada por la edad o etapa fenológica. En este estudio hubo una tendencia a presentar una mayor acumulación del aminoácido en las raíces primarias (más viejas) que en las raíces secundarias (más jóvenes), con valores promedio de 1.5036 y 0.5418 mg g<sup>-1</sup> de peso seco respectivamente (Figura 1).



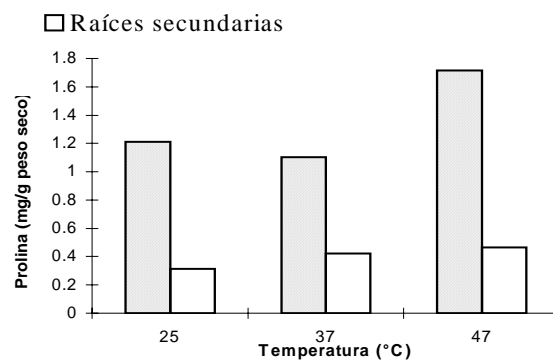
**Figura 1.** Efecto de la edad en la acumulación de prolina en ápices de raíces primarias y secundarias de nopal (*Opuntia megacantha* Salm-Dyck).

En los trabajos de Voetberg y Sharp (1991), Patil *et al.*, (1984) y Verslues y Sharp (1999), se detectó la mayor actividad y vigor de las zonas meristemáticas y de crecimiento de las raíces primarias, ya que son sitios de alta actividad de síntesis y duplicación celular. Por lo tanto, se debe considerar que las células de una raíz primaria con más formación y desarrollo son de dimensiones mayores y pueden acumular mayor cantidad de solutos en el citoplasma que las raíces en formación o secundarias. Flores (1997) y Basaldúa (1999), encontraron diferencias significativas en el contenido de prolina dependiente de la edad del brote. Flores reporta mayor contenido de prolina en los brotes de 2 meses con respecto a los brotes de 6 meses. Mientras que Basaldúa indica que los brotes de 3 meses acumularon más prolina con respecto a los brotes de 1 mes de edad con valores promedio de 1.0297 y 0.8147 mg g<sup>-1</sup> peso seco, respectivamente.

Las interacciones cultivar\*temperatura ( $P=0.812$ ), cultivar\*edad ( $P=0.8542$ ) y temperatura\*edad ( $P=0.8655$ ) así como cultivar\*temperatura\*edad ( $P=0.7343$ ) no presentaron diferencias significativas. En otros estudios la doble interacción presentó alta significancia estadística (Flores, 1997 y Basaldúa, 1999). En la Figura 2 incisos a) y b) se observa la mayor acumulación de prolina en los ápices de raíces primarias que en los ápices de raíces secundarias en los dos cultivares de nopal. En ambos cultivares la acumulación de prolina en las raíces primarias es superior a la acumulación de prolina en las raíces secundarias, independientemente de la temperatura y del cultivar.



**a)**



**b)**

**Figura 2.** Acumulación de prolina en ápices de raíces primarias y secundarias de dos cultivares de nopal a) cultivar tolerante (VIII) y b) cultivar susceptible (35) (*Opuntia megacantha* Salm-Dick) independientemente de la temperatura y del cultivar.

Aún cuando no se encontró diferencia significativa en la doble interacción, la importancia de esta interacción radica en que de presentarse alta significancia estadística, la concentración de prolina en raíz sería un índice de selección de cultivares de nopal tolerantes a la tensión por calor. Duncan y Widholm (1987), encontraron que la selección de líneas de maíz con tolerancia al frío requiere la selección de callos que acumulen altos contenidos de prolina. De la Rosa (1993), concluye que la

concentración de prolina en raíces de plántulas de 25 días, permite seleccionar genotipos de sorgo resistentes a salinidad. Flores (1997), indica que es posible utilizar la concentración de prolina como índice de selección de nopal para tolerancia o sensibilidad a elevadas temperaturas cuando se realiza en brotes de 2 meses de edad.

Basra *et al.*, (1992) y Mutters (1989), reportan que la acumulación de prolina varía entre los distintos tipos de órganos vegetales. Singh y Rai (1981), encontraron en *Cicer arietinum* L. que el cultivar susceptible acumuló más prolina que el cultivar tolerante. Además, éste último presentó valores más altos de prolina en la raíz y el cultivar susceptible acumuló más prolina en la parte aérea. Puede suponerse que la prolina tenga un comportamiento similar al del ácido abscísico (ABA) que al igual que la nicotina se sintetiza en la raíz y se acumula en las hojas (Skriver y Mundy, 1990; Bonner y Galston, 1973). Verslues y Sharp (1999), señalan que el catabolismo de la prolina en la zona de crecimiento de la raíz primaria de maíz ocurrió tan rápidamente como la síntesis de prolina teniendo como precursor el glutamato y que el aumento en la acumulación de prolina en raíz sugiere que existe traslocación de prolina desde otras partes de la planta. De tal manera, que en condiciones de tensión por temperatura, cuando la parte aérea demanda más prolina, ésta provenga de la sintetizada por las raíces. A este respecto, cabe señalar que se desconoce el mecanismo de síntesis y acumulación de prolina en nopal. En los últimos años, para identificar a los precursores en la síntesis del aminoácido prolina y los mecanismos de acumulación y transporte, se ha adicionado glutamato, arginina, ornitina y prolina radioactivas, al medio de cultivo en diversas situaciones de tensión y en varios cultivos (Verslues y Sharp, 1999; Duncan y Widholm, 1987; Chen y Kao, 1993; Le Dily *et al.*, 1993). Por lo arriba indicado, conviene realizar estudios encaminados a definir este mecanismo en nopal sometido a tensión por alta temperatura.

### CONCLUSIONES

La cantidad de prolina acumulada fue estadísticamente significativa entre las edades de las raíces, presentándose mayor concentración en las raíces primarias ( $1.5036 \text{ mg g}^{-1}$ ) que en las raíces secundarias ( $0.5418 \text{ mg g}^{-1}$ ).

No se observó efecto significativo de las temperaturas elevadas ni del tipo de cultivar sobre la concentración de prolina en raíz de nopal.

De acuerdo a las condiciones en que se llevó a cabo el presente trabajo, la concentración de prolina en raíces de nopal no puede ser utilizada como índice de selección de cultivares de nopal tolerantes a altas temperaturas.

### LITERATURA CITADA

- Basaldúa S., J. F. 1999. Determinación de prolina libre en brotes de nopal *Opuntia spp.* sometido a estrés por calor. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Basra, S. A. *et al.* 1992. Proline and polyamine accumulation in relation to heat tolerance in tomato. *In: Adaptation of food crops to temperature and water stress. Proceeding of an international symposium.* C. G. (De). AVRDC. 49:493-495.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. y Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Bonner, J. y Galston, A. W. 1973. Principios de fisiología vegetal. Aguilar. Madrid, España.
- Borrego E. F. y Burgos, V. N. 1986. El nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Chen, C. T. y Kao, C. H. 1993. Osmotic stress and water stress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. *Plant growth regulation.* 13: 197-202.
- Chu, T. M., A. Aspinall and L. G. Paleg. 1976. Stress metabolism VII. Salinity and proline accumulation in Barley. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:219-228.
- De la Rosa I., M. 1993. Contribución a la determinación del mecanismo morfofisiológico y bioquímico de resistencia a la salinidad de sorgo "Glossy". Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Duncan, D. R. y Widholm, J. M. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus. *Plant physiol.* 83, 703-708.
- Esau, K. 1973. Anatomía vegetal. 3 ed. Omega. España.
- Flores H., A. 1994. El nopal *Opuntia spp.* en la región árida lagunera. Pronasol-Conacyt-Plan Nueva Laguna. Universidad Autónoma Chapingo. México. Folleto de divulgación
- 1997. Características bioquímicas relacionadas con el estrés por calor en nopal (*Opuntia spp.*) Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3 ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 252 p.
- Granados S., D. y Castañeda P., A. D. 1997. El nopal: historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Trillas. México.

- Gutiérrez R., M., *et al.* 1998. Métodos avanzados en fisiología vegetal experimental. 2ª edición. Colegio de postgraduados en ciencias agrícolas. México.
- Kramer, P. J. 1974. Relaciones hídricas de suelo y planta. Ed. Edutex. México.
- Kuznetsov, V. V. *et al.* 1993. Why does heat shock increase salt resistance in cotton plants?. *Plant Physiol. Biochem.* 31 (2), 181-188.
- Le Dily, F. *et al.* 1993. Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 31(3) 303-310.
- Mojeda-Mojeda, R. *et al.* 1990. Study of drought resistance in sugarcane varieties using biochemical and physiological indicators. *Revista de la asociación de técnicos azucareros de Cuba.* 49: 2, 40-54.
- Mutters, R. G. 1989. Reproductive physiology of cowpea (*Vigna unguiculata*) at high temperature with different photoperiods. *Dissertation Abstract International. Science and Engineering.* Univ. de Col. Riverside. 49:8, 2955 b.
- Nolte, K. D., Hanson, A. D. y Gage, D. A. 1997. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: implications for genetic engineering of stress resistance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122 (1): 8-13.
- Oshanina, N. P. 1972. Nitrogen exchange of plants in the south-western Kyzilkum. *In: Ecophysiological foundation of ecosystems and productivity in arid zones.* Inter. Symp. U.S.S.R.
- Patil, S. J.; Panchal, Y. C. y Janardhan, K. V. 1984. Effect to short term moisture stress on free proline and relative water content in different plant parts of maize genotypes. *Indian Journal of Plant Physiology.* 27 : ( 4), 322-327.
- Pedroza, S. A. 1995. El déficit hídrico en las plantas. Principios y técnicas de manejo. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Rensburg, L. Van y Krüger, G. H. J. 1994. Applicability of abscisic acid and (or) proline accumulation as selection criteria for drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. *Canadian Journal of Botany.* 72: 1535-1540.
- Reynoso, T.; Gamboa, A.; Hernández, D. 1981. Transmisión de la resistencia a la salinidad en el alga dulceacuicola *Chlamydomonas reinhardtii*, inducida por prolina. Informe general de labores del Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur. México.
- Ribaut, J. M. y Pilet, P. E. 1991. Effects of water stress on the growth, the osmotic potential and the abscisic acid content of maize roots. *Physiologia plantarum* 81: 156-162. Copenhagen.
- SAGAR. 1997. Patronato para la investigación, fomento y sanidad vegetal. Anuario estadístico de la producción agropecuaria y forestal. SAGAR: Cd. Lerdo, Dgo. p 241.
- Skriver, K. y Mundy, J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The plant cell.* Vol. 2, 503-512.
- Singh, G. y Rai, V. K. 1981. Free proline accumulation and drought resistance in *Cicer arietinum* L. *Biologia plantarum (Praha).* 23 (2)
- Tello, G. E. 1994. Ajuste osmótico y distribución de materia seca en plantas de amaranto *Amaranthus hypochondriacus* L. bajo condiciones de estrés hídrico. Tesis profesional. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Thakur, P. S. y Tai, V. K. 1981. Growth characteristics and proline content in relation to water status in two *Zea mays* L. cultivars during rehydration. *Biologia plantarum (Praha).* 23 (2): 98-103.
- USDA 1977 Manual 60.. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. 6. Ed. Limusa. México
- Verslues, P. E. and Sharp, R. E. 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiology* 119: 1349-1360.
- Voetberg, G. S. y Sharp, R. E. 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials III. Role of increase proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiology.* 96 (4): 1125-1130.