

Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía*

Growth and, proline and carbohydrate content of bean seedlings subjected to drought stress

Teresa Susana Herrera Flores^{1§}, Joaquín Ortíz Cereceres^{2†}, Adriana Delgado Alvarado³ y Jorge Alberto Acosta Galleros⁴

¹Colegio de Postgraduados- *Campus* Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5 C. P. 56230. Montecillo Texcoco. Estado de México. ³Colegio de Postgraduados- *Campus* Puebla. Carretera Federal México-Puebla km 125.5, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760. Tel. 01 595 9520200 Ext. 2012. (adah@colpos.mx). ⁴Campo Experimental Bajío (CEBAJ). km 6.5. Carretera Celaya-San Miguel de Allende. C. P. 38010. Celaya, Guanajuato. Tel. 01 461 6115323. Ext. 164. (acosta.jorge@inifap.gob.mx). [§]Autora para correspondencia: susyherrera75@yahoo.com.mx.

Resumen

El estrés por sequía en el altiplano de México, es un factor limitante en el rendimiento del frijol. En el presente trabajo se estudiaron las respuestas fisiológicas (crecimiento) y bioquímicas (carbohidratos solubles y prolina) en la radícula de plántulas de frijol resistente, Pinto Villa, y susceptible a la sequía Bayo Madero, ambas de la raza Durango, para identificar características rápidas de medir que sean confiables para selección por resistencia a estrés por sequía. La radícula de las plántulas se sometió a cuatro potenciales de humedad: -2.07, -0.52, -0.27 megapascuales (MPa) y un testigo -0.16 MPa. Para las determinaciones de carbohidratos solubles y prolina se eliminó el potencial de -0.16 MPa, ya que provocó la pudrición del hipocótilo en el punto de unión con el cotiledón, en este caso el potencial de -0.27 se consideró como testigo. La radícula de ambas variedades tuvo mayor longitud en los tratamientos de menor estrés. En el potencial más crítico, -2.07 Mpa, Pinto Villa, acumuló mayor cantidad de prolina y sacarosa que Bayo Madero, mientras que los niveles de almidón fueron similares. Se observó correlación altamente significativa entre la elongación de la radícula con la acumulación de prolina, glucosa y fructosa ($r= 0.99$ respectivamente). La

Abstract

Drought stress in the highlands of Mexico is a limiting factor in bean yields. In this work we studied the physiological responses (growth) and biochemical (soluble carbohydrates and proline) in the radicle of seedlings resistant beans, Pinto Villa and, susceptible to drought Bayo Madero, both of Durango race, in order to identify quick features to measure their reliability for selection of resistance to drought stress. The radicle of the seedlings were subjected to four moisture potentials: -2.07, -0.52, -0.27 megapascals (MPa) and a control -0.16 MPa. For determining the soluble carbohydrates and proline, the potential -0.16 Mpa was removed, since it caused the hypocotyl rot at the junction with the cotyledon, in this case the potential of -0.27 was considered as control. The radicle of both varieties had greater length in the treatments with less stress. In the most critical potential, -2.07 MPa, Pinto Villa, accumulated more proline and sucrose than Bayo Madero, while starch levels were quite similar. Highly significant correlation was observed between the elongation of the radicle with the accumulation of proline, glucose and fructose ($r= 0.99$ respectively). The accumulation of compatible solutes (glucose, fructose, sucrose and proline) in the radicle

* Recibido: septiembre de 2011
Aceptado: abril de 2012

acumulación de solutos compatibles (glucosa, fructosa, sacarosa y prolina) en la radícula desarrollada en condiciones de estrés, favorece su crecimiento en etapas tempranas de desarrollo. Los solutos compatibles son apropiados como indicadores bioquímicos de selección de variedades resistentes al estrés de humedad durante los primeros tres días de la germinación.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris* L., carbohidratos, prolina, solutos compatibles.

Introducción

El frijol es uno de los cultivos de mayor importancia en México, representa para la economía de los productores una fuente importante de ocupación e ingreso y una garantía de seguridad alimentaria. Se cultiva en todas las regiones del país, entre las que destaca la región del Altiplano del Centro-Norte con clima templado-semiárido, que comprende los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, y Guanajuato, donde en el ciclo primavera-verano se siembra 68% de la superficie nacional con este cultivo. La principal limitante para su producción es la escasa disponibilidad de humedad, situación que se agudiza en regiones con régimen pluvial restringido como en Zacatecas, Durango, San Luis Potosí y Chihuahua, donde la precipitación fluctúa entre 400 y 450 mm anuales. Para disminuir los efectos negativos de la escasa disponibilidad de humedad, es conveniente y práctico seleccionar especies vegetales o genotipos dentro de ellas que posean indicadores distintivos de tolerancia al estrés hídrico (Munns, 2002). Los indicadores fisiológicos como la concentración de prolina, carbohidratos y enzimas antioxidantes proporcionan información precisa sobre la capacidad que muestran las especies vegetales de adaptarse a ambientes limitantes de humedad y con ello cumplir con su ciclo biológico, por ello son superiores, en relación a los indicadores agronómicos (altura de planta, longitud de raíz y área foliar) cuando se hace selección para componentes de tipo complejo como la tolerancia a la sequía (Yeo, 1994). A pesar de que existe un gran número de investigaciones relacionadas con el estrés hídrico, orientadas principalmente hacia relaciones hídricas, fotosíntesis y acumulación de diferentes metabolitos orgánicos, aún no se conocen bien los sitios metabólicos en los que dicho estrés daña a la planta, ni los mecanismos adaptativos utilizados por las plantas para sobrevivir a esas condiciones adversas (Munns, 2002; Hieng *et al.*, 2004).

developed under conditions of stress, favors its growth in early stages of development. Compatible solutes are suitable as biochemical indicators for selection of varieties resistant to moisture stress during the first three days of germination.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., carbohydrates, proline, compatible solutes.

Introduction

Beans are one of the most important crops in Mexico, represents the economics of producing a major source of employment and income and, ensuring food security. It is grown in all regions of the country, among which, the Altiplano region of North Central with semiarid, temperate climate, including the States of Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí and Guanajuato, where in the spring-summer planting, 68% of the national crop. The main constraint for production is the limited availability of moisture, which worsens in regions with limited rainfall regime, such as the case for Zacatecas, Durango, San Luis Potosí, and Chihuahua, where rainfall ranges between 400 and 450 mm annually. In order to reduce the negative effects of low moisture availability is convenient and practical to select plant species or genotypes within them that have distinctive indicators of tolerance to water stress (Munns, 2002). Physiological indicators such as concentration of proline, carbohydrate and antioxidant enzymes provide accurate information on the ability to show the plant species to adapt to limited humidity environments, and thus fulfilling their life cycle, thereby exceed, in relation to the agronomic indicators (plant height, root length and leaf area) when making a selection for components of complex type, such as drought tolerance (Yeo, 1994). Although, there is a large number of research related to water stress, it's mainly oriented towards water relations, photosynthesis and accumulation of various organic metabolites, still poorly understood metabolic sites in which the stress damage to the plant, nor adaptive mechanisms used by plants to survive these adverse conditions (Munns, 2002; Hieng *et al.*, 2004).

Different biochemical parameters have been reported related to tolerance to water stress, including no evidence that, the amino acids glycine, betaine and proline play an adaptive role in mediating osmotic adjustment and

Se han descrito diferentes indicadores bioquímicos relacionados con la tolerancia al estrés por déficit hídrico, inclusive hay evidencias de que los aminoácidos glicina, betaina y prolina juegan un papel adaptativo al mediar el ajuste osmótico y proteger los órganos de las plantas bajo estrés. El ajuste osmótico es un mecanismo involucrado en la tolerancia al estrés osmótico el cual es disminuido por la acumulación neta de solutos. Los principales solutos que se acumulan son iones potasio (K) (Gnanasiri *et al.*, 1995), azúcares (Yakushiji *et al.*, 1996) y aminoácidos como la prolina (Verslues y Sharp, 1999). Estos solutos son conocidos como “solutos compatibles” y no interfieren con la función metabólica normal de las plantas aún a altas concentraciones. Por ejemplo, en una línea de sorgo tolerante a la sequía se mostró la capacidad para acumular iones de potasio en el grano y mantener un alto contenido relativo de agua y presión de turgencia en condiciones de estrés, en comparación con una línea susceptible (Gnanasiri *et al.*, 1995). Mientras que en el fruto de mandarina “satsuma” (*Citrus unshiu* Marc.) se evidenció que las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa incrementaron en condiciones de estrés de humedad debido al ajuste osmótico (Yakushiji *et al.*, 1996). El ajuste osmótico también ocurre debido al incremento en la acumulación de prolina en la zona de crecimiento de la raíz primaria en plántulas de maíz, lo cual juega un papel importante en el mantenimiento de la elongación de la raíz a bajos potenciales de agua (Voetberg y Sharp, 1991).

La energía radiante captada por las plantas, transforma el agua y el CO₂ en compuestos orgánicos (azúcares) y es necesaria para la síntesis y transporte de solutos para el ajuste osmótico (Munns, 2002). Sin embargo, la excesiva acumulación de iones puede alterar el balance entre la absorción y la función de otros iones en la célula. Cuando la acumulación de solutos compatibles es necesaria en condiciones críticas de estrés, se espera que los azúcares y aminoácidos, que no afectan el metabolismo a pesar de tener un alto peso molecular, sean usados como solutos compatibles. De tal forma que la contribución relativa de cada soluto al ajuste osmótico puede variar con la intensidad del estrés (Ogawa y Yamauchi, 2006). Por otra parte se sabe que a pesar de que existen indicadores morfológicos, fenológicos, fisiológicos, y bioquímicos de la tolerancia al déficit hídrico, utilizados por los fitomejoradores con el propósito de optimizar la selección de plantas tolerantes al estrés en diferentes cultivos agrícolas, la expresión de estos indicadores varía, dependiendo de las características de la especie, de la etapa en que se aplica el estrés y de su intensidad y duración (Hieng *et al.*, 2004).

protect the organs of the plants under stress. The osmotic adjustment is a mechanism involved in osmotic stress tolerance which is decreased by the net accumulation of solutes. The main solutes accumulated are potassium ions (K) (Gnanasiri *et al.*, 1995), sugars (Yakushiji *et al.*, 1996) and amino acids such as proline (Verslues and Sharp, 1999). These solutes are known as “compatible solutes” and do not interfere with the regular metabolic function of plants even at high concentrations. For example, in a line of drought-tolerant sorghum, there was the ability to accumulate potassium ions in the grain and maintain a high relative water content and turgor pressure under stress, compared with a susceptible (Gnanasiri *et al.*, 1995). While in the fruit of tangerine “satsuma” (*Citrus unshiu* Marc.) demonstrated that, the concentrations of sucrose, glucose and fructose increased moisture stress conditions due to the osmotic adjustment (Yakushiji *et al.*, 1996). The osmotic adjustment also occurs due to increased accumulation of proline in the area of primary root growth in maize seedlings, which plays an important role in the maintenance of root elongation at low water potentials (Voetberg and Sharp, 1991).

Radiant energy captured by plants, transforms the water and CO₂ into organic compounds (sugars) and is necessary for the synthesis and transport of solutes to the osmotic adjustment (Munns, 2002). However, the excessive accumulation of ions can alter the balance between the absorption and function of other ions in the cell. When the accumulation of compatible solutes is required in critical conditions of stress, it is expected that sugars and amino acids, which do not affect the metabolism despite having a high molecular weight, are used as compatible solutes. So that, the relative contribution of each solute osmotic adjustment may vary with the intensity of stress (Ogawa and Yamauchi, 2006). On the other hand, we know that even though, there are indicators of morphological, phenological, physiological, and biochemical tolerance to water deficit, used by breeders in order to optimize the selection of stress of tolerant plants in various agricultural crops, the expression of these indicators varies, depending on the characteristics of the species, the stage in which the stress is applied and the intensity and duration (Hieng *et al.*, 2004).

Based on the foregoing, the present study aimed to evaluate the effect of water deficit on growth and the level of soluble carbohydrates and proline in the radicle of bean seedlings

Con base en lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del déficit de humedad sobre el crecimiento y el nivel de carbohidratos solubles y prolina en la radícula de plántulas de frijol resistente a la sequía (Pinto Villa) y susceptible a la sequía (Bayo Madero), para identificar indicadores rápidos y confiables para selección por resistencia a estrés de humedad. Bajo las siguientes hipótesis de que la concentración de los carbohidratos sacarosa y almidón, así como de prolina, será mayor en la variedad resistente que en la susceptible. La concentración de glucosa y fructosa se presentará en menor proporción en ambas variedades por efecto del estrés por sequía.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron dos variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Pinto Villa, resistente a la sequía y Bayo Madero susceptible a la sequía, ambas pertenecientes a la Raza Durango (Singh *et al.*, 1991). Pinto Villa es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado III, con tallos y ramas débiles semierectas, con guías cortas sin habilidad para trepar (CIAT, 1987). Alcanza la floración alrededor de los 43 días después de la siembra y la madurez fisiológica se presenta entre los 90 y 104 días después de la siembra, en Chihuahua (Acosta *et al.*, 1995). Esta variedad ha mostrado plasticidad fenológica en respuesta a factores ambientales adversos, como falta de humedad y bajas temperaturas en la etapa de llenado de grano, la que se manifiesta en un aceleramiento de la madurez y plasticidad fisiológica en parte debido a su sensibilidad al fotoperiodo, lo que le permite tener una amplia adaptación (Acosta y White, 1998), alcanza rendimientos de 1 723 kg ha⁻¹ en temporal y 2 500 kg ha⁻¹ en riego (Rosales *et al.*, 2004).

Bayo Madero, es una variedad de hábito de crecimiento indeterminado III, con tallos y ramas débiles semierectas, las guías son cortas sin habilidad para trepar (CIAT, 1987). Para llevar a cabo la experimentación se pusieron a germinar 200 semillas de cada variedad en una cámara oscura (Oven Termacron mr, Wisconsin), a temperaturas entre 25 y 27 °C. Después de 3 ó 4 días, cuando la radícula de ambas variedades alcanzó una longitud de 3 a 5 cm, ésta se marcó con tinta china 2 mm arriba del ápice. Las plántulas se trasplantaron a tubos de PVC de 10 cm de largo y 6 cm de diámetro, con capacidad de 20 g de vermiculita grado 1

resistant to drought (Pinto Villa) and susceptible to drought (Bayo Madero), to identify fast and reliable indicators for selection for resistance to moisture stress. Under the following hypothesis that, the concentration of sucrose and starch carbohydrates, and proline will be greater in the resistant strain in the subject. The concentration of glucose and fructose are present to a lesser extent in both varieties by the effect of drought stress.

Materials and methods

Plant material

Two improved varieties of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) were used, Pinto Villa, resistant to drought and Bayo Madero susceptible to it, both belonging to the race Durango (Singh *et al.*, 1991). Pinto Villa is a variety of indeterminate growth habit III, with weak stems and semi-erect branches, with short guides and no ability to climb (CIAT, 1987). Reaching flowering about 43 days after sowing and physiological maturity occurs between 90 and 104 days after sowing in Chihuahua (Acosta *et al.*, 1995). This variety has shown phenological plasticity in response to adverse environmental factors such as the lack of moisture and low temperatures in the grain filling stage, which is manifested in an acceleration of the maturity and physiological plasticity, in part because of its sensitivity to photoperiodism, allowing to have a wide adaptation (Acosta and White, 1998), yields reached 1 723 kg ha⁻¹ in rainfed conditions and, 2 500 kg ha⁻¹ in irrigation (Rosales *et al.*, 2004).

Bayo Madero is a variety of indeterminate growth habit III, with weak stems and semi-erect branches, the guides are short without the ability to climb (CIAT, 1987). In order to perform the experiment, seeds of each array were germinated, 200 in a dark chamber (Oven Termacron mr, Wisconsin) at temperatures between 25 and 27 °C. After 3 or 4 days, when the radicle of both varieties reached a length of 3 to 5 cm, it was marked with ink, 2 mm above the apex. The seedlings were transplanted to PVC tubing, 10 cm long and 6 cm in diameter, with capacity of 20 g of vermiculite grade 1 as a substrate, which functions as an insulating mineral. The tubes were covered with black polyethylene to keep the condition of darkness and favoring only the length of the radicle.

como sustrato, que funciona como un aislante mineral. Los tubos se cubrieron con polietileno negro para mantener la condición de oscuridad y favorecer sólo la longitud de la radícula.

Tratamientos de sequía

Se aplicaron cuatro tratamientos de humedad del sustrato 6, 10, 12 y 100% que correspondieron a potenciales de agua en Megapascals (MPa) de -2.07, -0.52, -0.27 y -0.16 respectivamente, determinados con cámaras psicrométricas (modelo C-52, Wescor) y con un microvoltímetro de punto de rocío (modelo HR-33T, Wescor). Las cámaras se calibraron con una solución de cloruro de sodio (NaCl) de una molaridad conocida en aumento. La humedad de 6% fue el tratamiento de mayor estrés, mientras que la de 100% se consideró como el testigo. Se hicieron cuatro muestreos de la radícula de ambas variedades, a las 24, 48, 72 y 144 h después del trasplante.

Las determinaciones bioquímicas (prolina, glucosa, fructosa, sacarosa y almidón) se realizaron en la radícula, la cual se obtuvo de los tratamientos de humedad en la forma descrita anteriormente, excepto que se eliminó el tratamiento 100% de humedad (-0.16 MPa), ya que provocó la pudrición del hipocótilo en el punto de unión con el cotiledón, por lo que para este propósito sólo se tuvieron tres tratamientos de humedad (6, 8 y 12%); en este caso el tratamiento de 12% (-0.27 MPa), se consideró como el testigo.

Crecimiento

Con una cinta métrica con aproximación de 1 mm, se midió la longitud de la radícula, a partir de la marca hecha, posteriormente se separaron las siguientes estructuras de la plántula: testa, cotiledones + hojas primarias + hipocótilo y radícula, las cuales se colocaron para su secado en una estufa de circulación de aire durante 72 h a 70 °C.

Prolina

La extracción y determinación de prolina, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Bates (1973), que consistió en una determinación colorimétrica en la solución, después de la reacción con ninhidrina ácida se midió la absorbancia a 520 nm de los productos disueltos en tolueno en un espectrofotómetro UV/VIS (Evolution 300, Thermo), con una curva de calibración utilizando L-prolina (Sigma).

Drought treatments

Four moisture treatments were applied to the substrate 6, 10, 12 and 100% corresponded to water potentials in megapascals (MPa) of -2.07, -0.52, -0.27 and -0.16 respectively, determined by a psychrometric chamber (model C-52, Wescor) and a dew point microvoltmeter (model HR-33T, Wescor). The chambers were calibrated with a solution of sodium chloride (NaCl) of a known molarity increasing. The humidity of 6% was the treatment of higher stress, while that of 100% was considered the control. There were four samples of the radicle of both varieties, at 24, 48, 72 and 144 h after its transplantation.

Biochemical determinations (proline, glucose, fructose, sucrose and starch) were performed in the radicle, which was obtained from the moisture treatments as described above except that, the treatment was removed at 100% humidity (-0.16 MPa) at the hypocotyl rot caused at the junction with the cotyledon, so that for this purpose had only three moisture treatments (6, 8 and 12%), in which case the treatment of 12% (-0.27 MPa), was considered the control.

Growth

With a tape measure with 1 mm accuracy, the length of the radicle was measured from the mark just made, and then the following structures were removed from the seedling: testa, cotyledons + primary leaves + hypocotyl and radicle, which were placed for drying in an air circulation oven for 72 h at 70 °C.

Proline

The extraction and determination of proline was carried out following the method described by Bates (1973), which consisted of a colorimetric determination in the solution after reaction with ninhydrin acid, measured at 520 nm of absorbance of the product dissolved in toluene in a UV/VIS (Evolution 300, Thermo) with a calibration curve using L-proline (Sigma).

Soluble sugars and starch

The sugars were extracted with 80% ethanol (v/v) and were determined enzymatically following the route of glycolysis, according to Scholes *et al.* (1996). The readings were taken on a Multiskan microplate reader (Ascent[®], Thermo Electron

Azúcares solubles y almidón

Los azúcares se extrajeron con etanol al 80% (v/v) y se determinaron enzimáticamente siguiendo la ruta de la glicólisis, de acuerdo con Scholes *et al.* (1996). Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas Multiskan (Ascent[®], Thermo Electron Co., Finland) a 340 nm, frente a curvas patrón de glucosa, fructosa y sacarosa. Una vez extraídos los azúcares solubles de la radícula, los residuos sólidos se utilizaron para la determinación de almidón a través de la medición de glucosa.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y para determinar la significancia estadística para cada una de las variables medidas, se hizo un análisis de varianza con una distribución factorial. Las fuentes de variación consideradas fueron variedades (Var), tratamientos de humedad (Trat Hum), la interacción Var x Trat Hum, el error experimental y el total. Se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey con una $\alpha=0.05$. Para conocer su grado de asociación se hizo un análisis de correlación entre la longitud de la radícula (LR) y las acumulación de prolina (PRO), glucosa (GLU), fructosa (FRU), sacarosa (SAC) y almidón (ALM), en la radícula de cada variedad; los análisis se realizaron con el paquete SAS[®] 8.0.

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra que en las dos variedades estudiadas, Pinto Villa y Bayo Madero, las características longitud de radícula (Figuras 1A y 1B), biomasa total (Figuras 1C y 1D) y biomasa de radícula (Figuras 1E y 1F), tuvieron una respuesta similar en los cuatro potenciales de agua estudiados durante el periodo de evaluación. Por ejemplo, en las primeras 24 h los tratamientos de mayor tensión mostraron efecto negativo sobre las tres características. En ambas variedades en la tensión más negativa, por ejemplo, sequía severa (-2.07 MPa ó 6% de humedad) no se detectaron diferencias en las respuestas en ninguna de las variables a través del tiempo de exposición a los tratamientos. En las dos variedades, después de las 48 h de tratamiento la longitud (Figuras 1A y 1B) y la biomasa de la radícula (Figuras 1E y 1F) mostraron incrementos, particularmente la biomasa de la radícula alcanzó el valor máximo en el tratamiento de -0.27 MPa (12% de humedad), con una declinación posterior, debido posiblemente a la pudrición observada en el tratamiento -0.16 MPa (100% de humedad). La longitud (Figuras 1A y

Co., Finland) at 340 nm, against the standard curves of glucose, fructose and sucrose. After removing the soluble sugars of the radicle, the solid residue was used for the determination of starch through the measurement of glucose.

We used a completely randomized design and, in order to determine the statistical significance for each of the variables measured, there was an analysis of variance with a factorial distribution. Sources of variation were considered varieties (Var), moisture treatments (Trat Hum), the interaction Var x Trat Hum, the experimental error and the total. We used the comparison test of Tukey $\alpha=0.05$. In order to know the degree of association, an analysis of correlation between the length of the radicle (LR) and the accumulation of proline (PRO), glucose (GLU), fructose (FRU), sucrose (SAC) and starch (ALM) was made in the radicle of each variety, the analyzes were performed using the SAS[®] 8.0.

Results and discussion

The Figure 1 shows that in both varieties, Pinto Villa and Bayo Madero, radicle length features (Figures 1A and 1B), total biomass (Figures 1C and 1D) and biomass of radicle (Figures 1E and 1F), had a similar response in the four studied water potentials during the evaluation period. For example, in the first 24 h, the treatments showed an increased tension of negative effect on all of them. In both varieties in the more negative voltage, for example, severe drought (-2.07 MPa to 6% moisture) there was no difference in the responses in any of the variables over time of exposure to the treatments. In both varieties, after 48 h of treatment, length (Figures 1A and 1B) and biomass of radicle (Figures 1E and 1F) showed increases, particularly the biomass of the radicle reached the maximum value in the treatment of -0.27 MPa (12% moisture) with a subsequent decline, possibly due to the decay observed in the treatment -0.16 MPa (100% humidity).

The length (Figures 1A and 1B) and biomass of the radicle (Figures 1E and 1F) reached its maximum values at 144 hours in the treatment of -0.27 MPa (12% moisture) in both varieties. The results obtained in the length of the radicle agree with those observed by Akmal and Hirasawa (2004) in wheat seedlings developed in vermiculite, where most of the radicle length was observed in the potentials of -0.03 MPa moisture (less stress), while in water potentials between -0.4 and -0.5 MPa (high stress), the length decreased to the half, at -0.03 MPa. In the same manner as observed by Ogawa and

1B) y la biomasa de la radícula (Figuras 1E y 1F) alcanzaron sus valores máximos a los 144 horas en el tratamiento de -0.27 MPa (12% humedad) en las dos variedades. Los resultados obtenidos en la longitud de la radícula coinciden con lo observado por Akmal e Hirasawa (2004) en plántulas de trigo desarrolladas en vermiculita, en donde la mayor longitud de la radícula se observó en los potenciales de humedad de -0.03 MPa (menor estrés), mientras que en potenciales hídricos entre -0.4 y -0.5 MPa (mayor estrés), la longitud disminuyó a la mitad de lo observado en -0.03 MPa. De la misma manera que lo observado por Ogawa y Yamauchi (2006) donde la longitud de la radícula de maíz se vio significativamente afectada por el potencial de agua de -0.13 MPa. En maíz, potenciales de humedad de -0.40 ó -0.80 MPa no influyeron sobre el crecimiento de la raíz; sin embargo, el crecimiento disminuyó significativamente cuando el potencial de agua fue de -1.60 MPa; lo que revela que la región de mayor división celular que es la punta de la raíz, es afectada por pavos potenciales de agua reduciendo su crecimiento (Shimazaki *et al.*, 2005).

Yamauchi (2006) where the length of the radicle of maize was significantly affected by the potential of -0.13 MPa. In maize, moisture potential -0.40 or -0.80 MPa did not effect on the root's growth, but growth slowed significantly when water potential was -1.60 MPa, showing that, the region with greatest cell division, which is the root's tip is affected by reducing the water (Shimazaki *et al.*, 2005).

It is noteworthy that, the decrease in soil moisture can be reflected in the plants in several aspects, including the reduction of cellular growth, the most sensitive indicator of water stress in the plants, the expansion of the leaf and the photosynthetic rate and in stomatal closure and the accumulation of some solutes in the cells (Taiz and Zeiger, 2002).

The amino acid proline is one of the metabolites that accumulate in plants more often when they are in conditions of water stress and salinity, so it is considered to be involved in a mechanism of resistance to stress (Lutts *et al.*, 1999). In the present paper, we found that the accumulation of

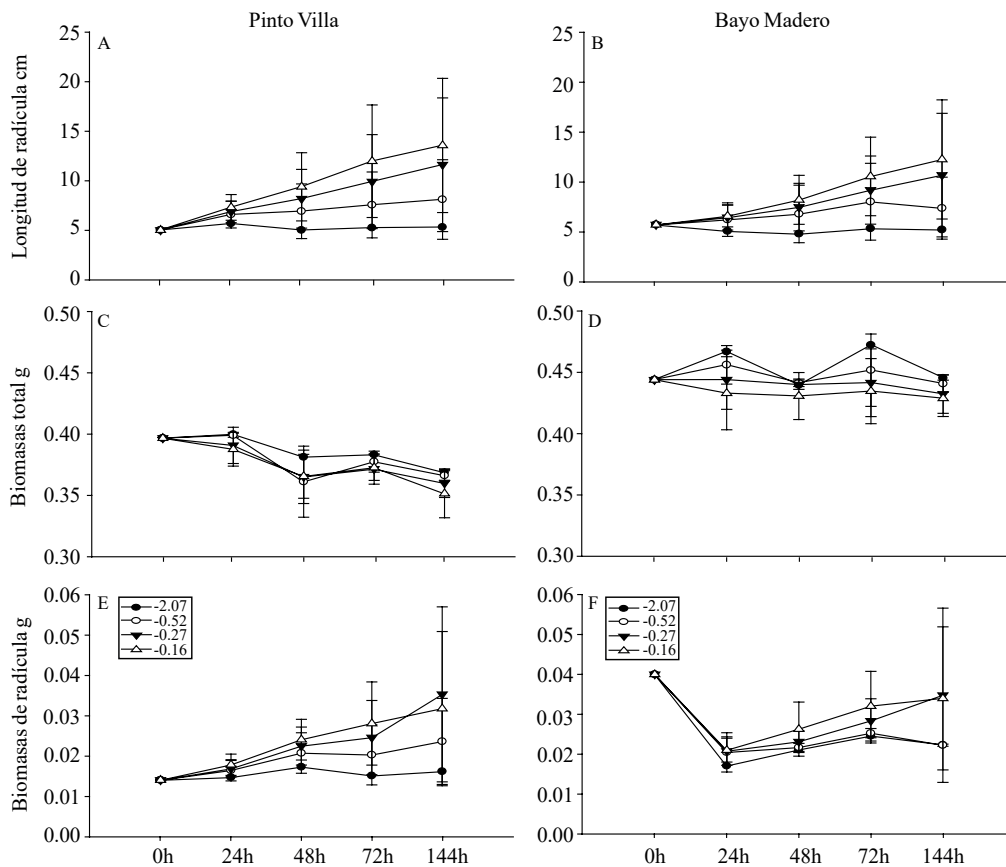


Figura 1. Longitud de radícula (A, B); biomasa de la plántula (C, D); y biomasa radicular (E, F) de dos variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, en cuatro potenciales de humedad (MPa), en un periodo de 144 h.

Figure 1. Radicle length (A, B); seedling's biomass (C, D); and root biomass (E, F) of two varieties of beans Pinto Villa and Bayo Madero in four moisture potentials (MPa) in 144 h period.

Es importante mencionar que la disminución de la humedad del suelo se puede reflejar en las plantas en varios aspectos, como la reducción del crecimiento celular que es el indicador más sensible al estrés de agua en las plantas; de la expansión de la hoja y de la tasa fotosintética, así como en el cierre de los estomas y en la acumulación de algunos solutos en las células (Taiz y Zeiger, 2002).

El aminoácido prolina es uno de los metabolitos que se acumulan con mayor frecuencia en las plantas cuando estas se encuentran en condiciones de estrés de agua y de salinidad, por lo que se considera que está involucrado en un mecanismo de resistencia al estrés (Lutts *et al.*, 1999). En el presente estudio se encontró que la acumulación de prolina en la zona de elongación de la raíz fue significativamente superior en Pinto Villa en relación a Bayo Madero, con una media de 481.69 nanomoles de prolina por gramo de peso fresco ($\text{nmol g}^{-1} \text{pf}$), mientras que en Bayo Madero sólo se acumularon 323.55 ($\text{nmol g}^{-1} \text{pf}$). Durante las 72 h del periodo de evaluación en las dos variedades de frijol, la cantidad y tendencia de acumulación de prolina en las dos variedades fue diferente en los tres potenciales de agua establecidos (Figura 2). Por ejemplo, Pinto Villa, en el potencial de agua de -0.27 MPa (12% de humedad) mantuvo el contenido de prolina sin cambio significativo (Figura 2A), mientras que en los otros dos potenciales de humedad la prolina tendió a incrementarse, conforme transcurrió el periodo de estudio y la mayor cantidad de este soluto se detectó en el potencial de agua de -2.07 MPa que corresponde al 6% de humedad. Estos resultados coinciden con lo reportado en raíces de plántulas de maíz cultivadas en vermiculita con bajos potenciales de agua, donde el incremento en la concentración de prolina ($1\ 200 \text{ nmol g}^{-1} \text{pf}$) fue progresivo con la disminución del potencial de agua (-1.6 MPa) (Voetberg y Sharp, 1991). La prolina es uno de los solutos compatibles que se acumula en mayor cantidad en condiciones de estrés, comparado con otros aminoácidos, lo que indica que en estas condiciones la prolina es sintetizada en “células fuente” y se transporta a “tejido de demanda”, conocido como zona de elongación, usando energía proporcionada por compuestos orgánicos (Hare y Cress, 1997).

A este respecto se ha documentado (Voetberg y Sharp, 1991; Verslues y Sharp, 1999) que como respuesta a algún tipo de estrés (sequía, salinidad o frío), las células no vacuoladas de la punta de la raíz acumulan altos niveles de prolina en el estroma del cloroplasto y en el citoplasma, mientras que otros solutos (azúcares, ácidos orgánicos, potasio) se acumulan en la vacuola. Debido a que el citoplasma representa una pequeña fracción del volumen celular, las concentraciones

proline in the root elongation was significantly higher in Pinto Villa in relation to Bayo Madero, with an average of 481.69 nanomoles of proline per gram of fresh weight ($\text{nmol g}^{-1} \text{mp}$), while Bayo Madero only accumulated 323.55 ($\text{nmol g}^{-1} \text{pf}$). During the 72 h of the evaluation period in the two varieties of beans, the amount and pattern of proline accumulation in both was different in the three established water potentials (Figure 2).

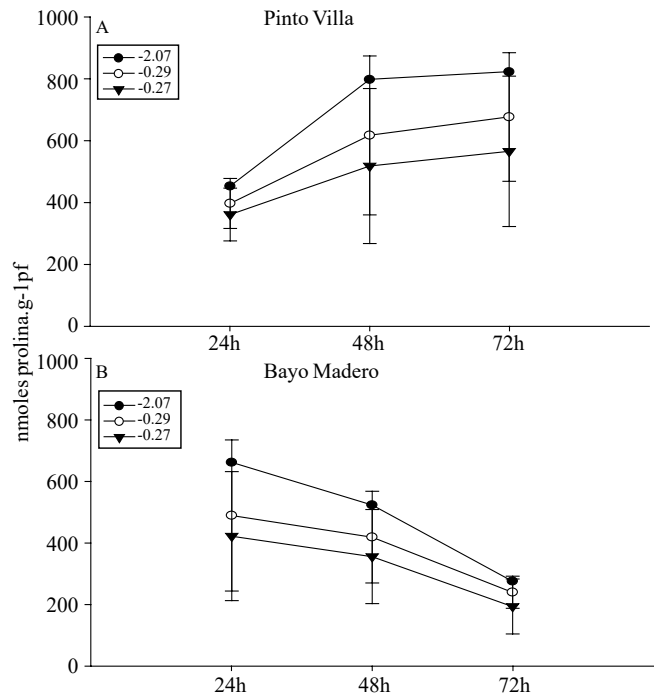


Figura 2. Acumulación de prolina en la radícula de dos variedades de frijol A) Pinto Villa y B) Bayo Madero, en tres potenciales de humedad (mpa) durante un periodo de 72 h.

Figure 2. Proline accumulation in the radicle of two varieties A) Pinto Villa and B) Bayo Madero, in three moisture potentials (MPa) for a 72 h period.

For example, Pinto Villa, in the water potential of -0.27 MPa (12% moisture), proline content maintained without significant changes (Figure 2A), whereas in the other two potential proline, the moisture tended to increase time passed and, even more of this solute was detected in the water potential of -2.07 MPa corresponding to 6% moisture. These results agree with those reported in roots of maize's seedlings grown in vermiculite with low water potentials, where the increase in the concentration of proline ($1\ 200 \text{ nmol g}^{-1} \text{FW}$) was progressive with decreasing water potential (-1.6 MPa) (Voetberg and Sharp, 1991). Proline

locales de la prolina en el citoplasma pueden ser mucho más altas que a nivel de la masa del tejido (Versleus y Sharma, 2010). Por otra parte también se ha reconocido que las funciones de protección de la prolina pueden ser compartidas con solutos compatibles especializados que se acumulan durante el estrés, tales como la glicina betaína y alcoholes de azúcar (Versleus y Sharma, 2010), y se sugiere que la acumulación de prolina puede depender de los niveles de carbohidratos como la sacarosa (Hare y Cress, 1997).

Recientemente un estudio de metabolómica demostró que inclusive en *Arabidopsis* existen muchos carbohidratos complejos adicionales que se acumulan bajo estrés, pero que no han sido identificados (Wilson *et al.*, 2009). En este trabajo se mostró que en la acumulación de carbohidratos solubles en el nivel de humedad de -2.07 MPa, la variedad Pinto Villa tuvo valores numéricamente mayores que Bayo Madero, particularmente en el contenido de glucosa (Figuras 3A y 3B), fructosa (Figuras 3C y 3D) y sacarosa (Figuras 3E y 3F), pero en el caso de almidón (Figuras 3G y 3H) Bayo Madero superó a Pinto Villa. Esta respuesta coincide con lo detectado en dos variedades de maíz, donde la concentración de azúcares solubles aumentó en la raíz y en el vástago, mientras que el almidón disminuyó cuando se tuvo un potencial hídrico de -1.76 MPa (Nayer y Reza, 2008), lo que se atribuye a que la alta concentración de azúcares puede ser el resultado de la degradación del almidón, debido a que éste juega un papel muy importante en la acumulación de azúcares en la célula (Patakas y Noitsakis, 2001). Los resultados observados en la acumulación de los azúcares, coinciden también con lo que reportan Hoesktra y Butink (2001) quienes mencionan que la presencia de azúcares solubles como la sacarosa, glucosa y fructosa, está relacionada con la adquisición de la tolerancia a sequía en las plantas; además, en hojas de plantas de papas transgénicas, el incremento de glucosa y fructosa en la pared celular de las vacuolas, está asociado con la acumulación de prolina y almidón, con la inhibición de la fotosíntesis y con el incremento de la respiración, respuestas que fueron asociadas con síntomas del estrés de agua (Scholes *et al.*, 1996).

Los carbohidratos constituyen el principal componente de la reserva de muchas semillas e incluyen azúcares solubles de bajo peso molecular, oligosacáridos, polisacáridos de la pared celular y almidón. En general la glucosa, fructosa y sacarosa alcanzaron su máximo nivel a las 48 h de aplicado el tratamiento y después permanecieron sin cambio o tendieron a incrementarse a las 72 h; aunque en ningún caso hubo diferencias estadísticas significativas entre las dos variedades. Particularmente en la variedad Pinto Villa

is one of the compatible solutes that accumulates in larger quantities under stress, compared with other amino acids, indicating that in these conditions the proline is synthesized in “source cells” and transported to “tissue demand” known as a zone of elongation, using energy provided by organic compounds (Hare and Cress, 1997).

In this respect it has been documented (Voetberg and Sharp, 1991; Versleus and Sharp, 1999) that in response to some type of stress (drought, salinity or cold), the vacuolated cells of the root's tip accumulate high levels of proline in the chloroplast stroma and in the cytoplasm, while other solutes (sugars, organic acids, potassium) are accumulated in the vacuole. Since the cytoplasm is a small fraction of a cell's volume, the local concentrations of proline in the cytoplasm can be much higher than the level of the tissue's mass (Versleus and Sharma, 2010). On the other hand, it has also been recognized that, the protection functions of proline can be shared with specialized compatible solutes accumulate during stress, such as glycine betaine and sugar alcohols (Versleus and Sharma, 2010), and this suggests that proline accumulation may depend on levels of carbohydrates such as sucrose (Hare and Cress, 1997).

Recently a metabolomics study showed that even in *Arabidopsis* there are many additional complex carbohydrates that are accumulated under stress, but have not been identified (Wilson *et al.*, 2009). In this work it was shown that, the accumulation of soluble carbohydrates in the moisture level of -2.07 MPa, Pinto Villa was numerically higher than Bayo Madero, particularly in the glucose content (Figures 3A and 3B), fructose (Figures 3C and 3D) and sucrose (Figures 3E and 3F), but in the case of starch (Figures 3G and 3H), Bayo Madero beat Pinto Villa. This response coincides with that detected in two varieties of maize, where the concentration of soluble sugars increased in the roots and stems, while the starch was decreased when a water potential of -1.76 MPa (Nayer and Reza, 2008) this is attributed to the high concentration of sugars, resulting from the degradation of starch, because it plays an important role in the accumulation of sugars in the cell (Patakas and Noitsakis, 2001). The observed results in the accumulation of sugars, also coincide with Butink Hoesktra (2001) who stated that, the presence of soluble sugars such as sucrose, glucose and fructose, is related to the acquisition of tolerance to drought in plants, moreover, in leaves of transgenic potato plants, the increase of glucose and fructose in the cell wall of vacuoles is associated with accumulation of proline and starch, with

en los tratamientos de humedad de -0.27 MPa, y de -1.29 MPa, los niveles de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón fueron fluctuantes, aunque superiores (en distinto grado) en el tratamiento más húmedo (-0.27 MPa) en relación al intermedio (-1.29 MPa). Lo anterior coincide con lo observado por Mayer y Poljak Off Mayber (1989) que muestra que los carbohidratos solubles incrementaron en todas las estructuras de la plántula de *Vigna sesquipedalis* después de 48 h de germinación.

the inhibition of photosynthesis and respiration increased, responses that were associated with symptoms of water stress (Scholes *et al.*, 1996).

Carbohydrates are the main component of the subject of many seeds and include sugars soluble low molecular weight oligosaccharides, polysaccharides, cell wall and starch. In general, glucose, fructose and sucrose peaked at 48 h of the treatment applied and then, remained unchanged or tended to

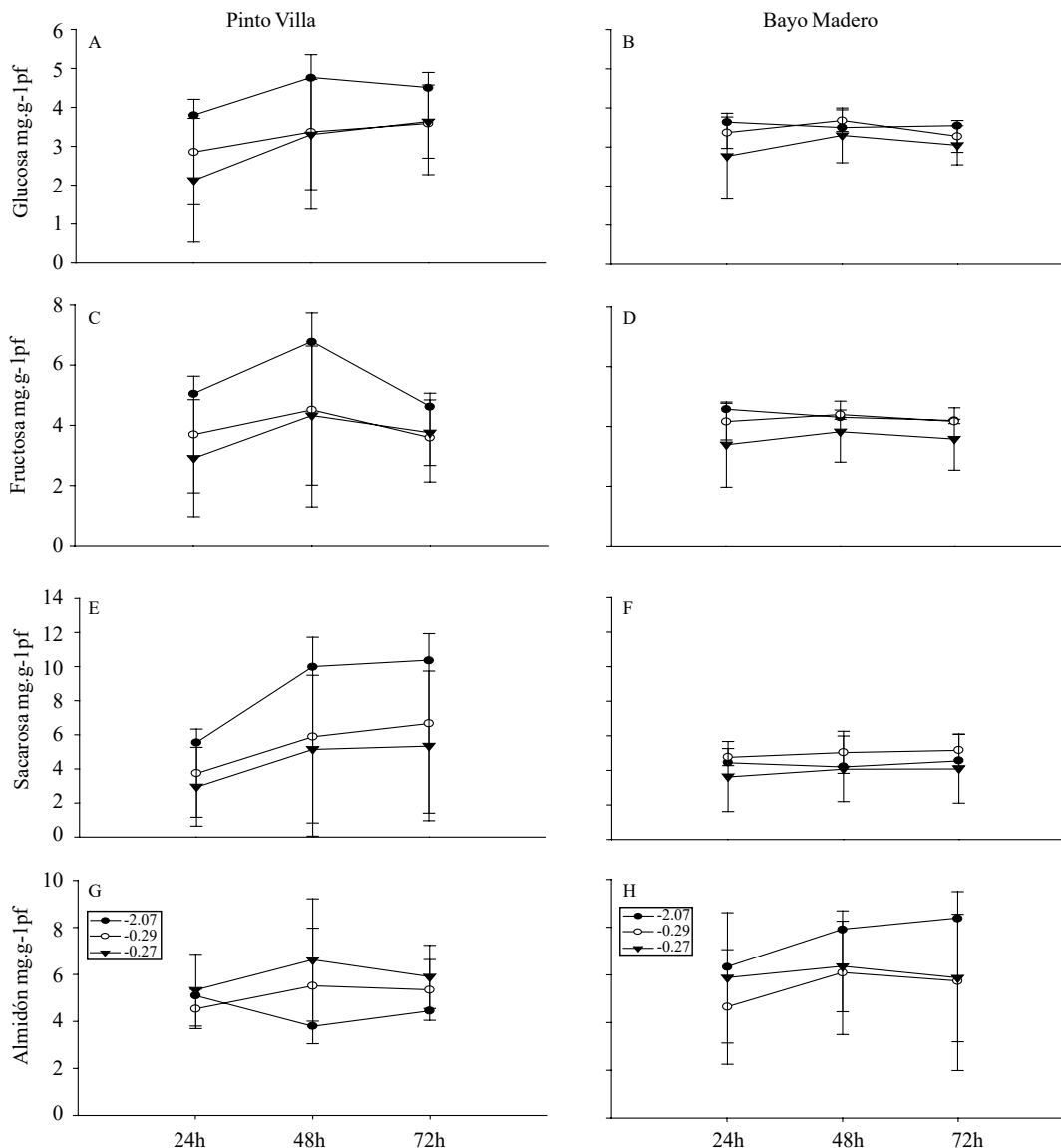


Figura 3. Niveles de carbohidratos solubles y almidón en la radícula de las variedades de frijol Pinto Villa y Bayo Madero, sometidos a cuatro potenciales de humedad (MPa) durante un periodo de 72 h. A) y B) contenido de glucosa; C) y D) contenido de fructosa; D) y E) contenido de sacarosa; F) y G) contenido y almidón.

Figure 3. Starch and soluble carbohydrates levels in the radicle of varieties Pinto Villa and Bayo Madero, subjected to four moisture potentials (MPa) for a 72 h period. A) and B) glucose content; C) and D) fructose content; D) and E) sucrose content; F) and G) content and starch.

El estrés de agua induce varias modificaciones tempranas en el metabolismo de carbono y carbohidratos. En maíz expuesto al estrés de humedad el contenido de carbohidratos se llega a incrementar hasta 42%, debido a que el déficit de agua puede inducir un aumento en el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en la hoja y en algunos casos pueden ser solamente la sacarosa o las hexosas (Pelleschi *et al.*, 1997). Los azúcares solubles, especialmente la sacarosa se deposita en semillas, polen y en tejidos vegetativos en las variedades tolerantes a sequía; así en hojas deshidratadas de *Crasterostigma plantagineum*, la 2-octulosa acumulada se convierte a sacarosa, la que comprende 40% de la biomasa (Oliver y Bewley, 1997).

En plántulas de dos años de edad de dos especies de árbol de judea (*Cercis canadienses* var. *canadienses* y var. *mexicana*), se observó que la sacarosa fue el carbohidrato soluble que tuvo la mayor concentración en las hojas, en condiciones de sequía y humedad con relación a glucosa y fructosa, aun cuando la concentración disminuyó en el tratamiento de sequía, además de que se acumularon otros osmolitos como mioinositol, ononitol y pinitol, lo cual indica que la acumulación de diferentes osmolitos en plantas desarrolladas en estrés de sequía es común (Griffin *et al.*, 2004). El incremento en la acumulación de sacarosa y hexosas se puede deber al aumento en la hidrólisis del almidón, que consiste en el rompimiento de los enlaces glucosídicos por una molécula de agua, para producir glucosa que después es utilizada en la respiración celular para producir energía y para la síntesis de sacarosa; además se sabe que la acumulación de sacarosa y hexosas tiene un papel importante en el ajuste osmótico en las especies vegetales (Westgate y Boyer, 1985).

Lo cual sustenta los resultados obtenidos en este trabajo en la variedad de frijol resistente a la sequía, Pinto Villa, la cual a partir de las 48 h de estrés al potencial de humedad de -2.7 MPa presentó los niveles más bajos de almidón en relación con humedades más altas (-0.27 y -1.29 MPa) (Figura 3G), en contraste con la variedad susceptible Bayo Madero, donde el contenido de almidón a ese mismo potencial de humedad (-2.7 MPa) tendió a incrementarse y ser superior respecto a los potenciales más bajos (Figura 3H), lo que indica que durante este periodo crítico de inicio de la germinación en condiciones de un estrés de humedad de 6%, el almidón disponible en la variedad de frijol resistente (Pinto Villa), se hidroliza para generar azúcares solubles disponibles que en conjunto con la prolina participan como solutos compatibles de protección contra el estrés de humedad.

increase 72 h, although there were not statistically different between the two varieties. Particularly in Pinto Villa, the moisture treatments -0.27 MPa, -1.29 MPa and the levels of glucose, fructose, sucrose and starch were fluctuating, but higher (to varying degrees) in the wet treatments (-0.27 MPa) relative to the intermediate (-1.29 MPa). This coincides with the observations of Mayer and Poljak Off mayber (1989) showing that soluble carbohydrates increased in all structures of the seedling of *Vigna sesquipedalis* after 48 h of germination.

Water stress induces various early modifications in carbon metabolism, and carbohydrates. In maize exposed to moisture stress, carbohydrate content is increased to reach 42% due to the shortage of water, inducing an increase in the content of sucrose, glucose and fructose in the leaf and in some cases may be only sucrose or hexoses (Pelleschi *et al.*, 1997). Soluble sugars, especially sucrose is deposited in the seeds, pollen and in vegetative tissues in drought tolerant varieties; thus dehydrated leaves of *Crasterostigma plantagineum*, 2-octulosa accumulated is converted to sucrose, which comprises 40% of the biomass (Oliver and Bewley, 1997).

In two year old seedlings of two species of Judea (*Cercis canadienses* var. *canadienses* and var. *mexicana*) showed that sucrose was the soluble carbohydrate with the highest concentration in leaves under drought conditions and moisture with respect to glucose and fructose, even when the concentration decreased in the drying treatment, besides other osmolytes were accumulated, such as myo-inositol, pinitol and ononitol, indicating that, the accumulation of different osmolytes in plants grown under drought stress is common (Griffin *et al.*, 2004). The increase in the accumulation of sucrose and hexoses may be due to the increase in the hydrolysis of starch, which consists in breaking the glycosidic bonds by a molecule of water, to produce glucose, which is then used in cellular respiration to produce energy and for the synthesis of sucrose; it is also known that, the accumulation of sucrose and hexoses have an important role in the osmotic adjustment in plant species (Westgate and Boyer, 1985).

This supports the results obtained in this work in a variety of drought resistant beans, Pinto Villa, which after 48 h of stress, the potential of -2.7 MPa moisture presented the lowest levels of starch in relation to higher humidities (-0.27 and -1.29 MPa) (Figure 3G), in contrast to the susceptible variety Bayo Madero, where the starch content to that moisture, the

Con base en los resultados de este trabajo se puede sugerir que la acumulación de prolina, y de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa), producidos por la degradación del almidón, se expresaron en mayor cantidad en la variedad de frijol resistente a la sequía, Pinto Villa, con respecto a Bayo Madero que es una variedad susceptible, por lo que se pueden considerar como indicadores bioquímicos confiables para ser utilizados como métodos de selección a nivel de germinación durante las primeras 72 h de desarrollo de la radícula.

Conclusiones

En Pinto Villa y Bayo Madero, el potencial de menor estrés (-0.27 MPa) favoreció la elongación de la radícula con respecto a los potenciales de mayor estrés. En la acumulación de biomasa total y entre los tratamientos de humedad en Pinto Villa y Bayo Madero no se detectaron diferencias estadísticas significativas. La mayor acumulación de prolina en Pinto Villa tuvo un papel importante en el mantenimiento de la elongación de la radícula en estas condiciones ambientales de desarrollo. La baja concentración de almidón en la radícula de Pinto Villa disminuyó por el proceso de degradación y dio lugar a la síntesis y acumulación de azúcares solubles, sacarosa, fructosa y glucosa, en el potencial de estrés de humedad de -2.07 MPa. Los solutos compatibles glucosa, fructosa, sacarosa y prolina evaluados en la zona de elongación de la radícula de frijol se pueden utilizar durante las primeras 72 h de la germinación como indicadores bioquímicos de selección de variedades resistentes al estrés de humedad.

Literatura citada

- Acosta, G. J. A.; Ochoa, M. R.; Arrieta, M. M. P.; Ibarra, P. F.; Pajarito, R. A. and Sánchez, V. I. 1995. Registration of "Pinto Villa". *Common Bean. Crop Sci.* 35:1211.
- Acosta, G. J. A. and White, J. W. 1998. Phenological plasticity as an adaptation by common bean to rainfed environments. *Crop Sci.* 35:199-204.
- Akmal, M. and Hirasawa, T. 2004. Growth responses of seminal roots of wheat seedlings to a reduction in the water potential of vermiculite. *Plant Soil.* 267:319-328.
- Bates, L. S. 1973. Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant Soil* 39:205-207.

same potential (-2.7 MPa) tended to increase and be higher compared to lower potentials (Figure 3H), indicating that during this critical period of initiation of germination under conditions of moisture stress of 6%, the starch available in the resistant bean variety (Pinto Villa) is hydrolyzed to generate available soluble sugars together with proline as compatible solutes involved in protection from moisture stress.

Based on these results, we may suggest that the accumulation of proline and soluble sugars (glucose, fructose and sucrose) produced by the degradation of starch were expressed in greater amounts in the range of drought-tolerant beans, Pinto Villa, with respect to Bayo Madero so, it can be considered reliable biochemical indicators to be used as screening methods at the level of germination within 72 h of development of the radicle.

Conclusions

In Pinto Villa and Bayo Madero, the potential for reduced stress (-0.27 MPa) favored the elongation of the radicle with respect to the potential of increased stress. The total biomass accumulation of moisture between the treatments in Pinto Villa and Bayo Madero did not detect significant differences. The greatest accumulation of proline in Pinto Villa played an important role in maintaining the elongation of the radicle in these environmental conditions. The low concentration of starch in the radicle decreased by the degradation process led to the synthesis and accumulation of soluble sugars, sucrose, fructose, and glucose and, the potential for moisture stress of -2.07 MPa. The compatible solutes glucose, fructose, sucrose and proline evaluated in the elongation zone of the radicle can be used within 72 h of germination as a biochemical indicator for selection of moisture stress resistant varieties.

End of the English version



- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Aart Van Shoonhoven, P.; Pastor-Corrales, J. y Marcial, A. Cali, Colombia. 56 p.
- Gnanasiri, S. P.; Hahn, D. T.; Rhodes, D. and Joly, R. J. 1995. Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. *J. Exp. Bot.* 46:1833-1841.

- Griffin, J. J.; Ranney, T. G. and Pharr, D. M. 2004. Heat and drought influence photosynthesis, water relations, and soluble carbohydrates of two ecotypes of redbud (*Cercis Canadensis*). *J. Ame. Soc. Hortic. Sci.* 129:497-402.
- Hare, P. D. and Cress, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79-102.
- Hieng, B.; Ugrinovic, K.; Sustar-Vozlic J. and Kidric, M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *J. Plant Physiol.* 161(5):519-30.
- Hoekstra, F. A.; Golovina, E. A. and Butinik, J. 2001. Mechanism of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:431-438.
- Lutts, S.; Majerus, V. and Kinet, J. M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oriza sativa*) seedlings. *Physiol. Plantarum.* 105:450-458.
- Mayer, A. M. and Poljak Off-Mayber, A. 1989. The germination of seeds. Fourth edition. 270 p.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
- Nayer, M. and Reza, H. 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World App. Sci. J.* 3(3):448-453.
- Ogawa, A. and Yamauchi, A. 2006. Root osmotic adjustment under osmotic stress in maize seedlings. 2. Mode of accumulation of several solutes for osmotic adjustment in the root. *Plant Produc. Sci.* 9(1):39-46.
- Oliver, M. J. and Bewley, J. 1997. Desiccation-tolerance of plants tissues: a mechanistic overview. *Horticultural Reviews.* 18:171-214.
- Patakas, A. and Noitsakis, B. 2001. Leaf age effects on solute accumulation in water-stressed grapevines. *Plant Physiol.* 158:63-69.
- Pelleschi, S.; Rocher, J. P. and Prioul, J. L. 1997. Effects of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant Cell Environ.* 20: 493-503.
- Rosales, S. R.; Acosta, G. J. A.; Muruaga, M. J. S.; Hernández, C. J. M.; Esquivel, E. G. y Pérez, H. P. 2004. Variedades mejoradas de frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro técnico Núm. 6. 148 p.
- Scholes, J. Bundock, N.; Wilde, R. and Rolfe, S. 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta.* 200:265-272.
- Shimazaki, Y.; Ookawa, T. and Hirasawa, T. 2005. The root tip and accelerating region suppress elongation of the decelerating region without any effects on cell turgor in primary roots of maize under water stress. *Plant Physiol.* 139:458-465.
- Singh, P. S.; Gepts, P. and Debouck, D. G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Econ. Bot.* 45(3):379-396.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Ed. 3. Sinauer Associates. Sunderland. M. A. *Plant Physiol.* 591-623 pp.
- 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 increases proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119:1349-1360.
- Verslues, P. E. and Sharma, S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The arabidopsis book* 8:e0140. doi:10.1199/tab.0140.
- Voetberg, G. S. and Sharp, R. E. 1991. Growth of the maize primary root at low water potentials. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 96:1125-1130.
- Westage, M. E. and Boyer, J. S. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth and low water potentials in maize. *Planta.* 164:540-549.
- Wilson, P. B.; Estavillo, G. M.; Field, K. J.; Pornsiriwong, W.; Carroll, A. J.; Howell, K. A.; Woo, N. S.; Lake, J. A.; Smith, S. M.; Millar, A. H.; Von Caemmerer, S. and Pogson, B. J. 2009. The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J.* 58:299-317.
- Yakushiji, H.; Nonami, H.; Fukuyama, T.; Ono, S.; Takagi, N. and Hashimoto, Y. 1996. Sugar accumulation enhanced by osmoregulation in *Saluma mandarin* fruit. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 121:466-472.
- Yeo, A. R. 1994. Physiological criteria in screening and breeding. *In: Yeo, A. R. and Flowers, T. J. (Eds.). Soil Mineral Stresses. Approaches to crop improvement.* Springer-Verlag, Berlin. 37-60 pp.