



Contenido de prolina en *Solanum lycopersicum* pretratado con glicina betaina y sometido a estrés salino

Proline content in *Solanum lycopersicum* pretreated with glycine betaine under salt stress

Mercedes Chaman Medina, Roger Veneros Terrones, Edita Araujo Castillo, Aureliano Ramírez Cruz, Jose Hidalgo Rodríguez, Bernabé S. Luis Alaya y Cynthia Ramos Otiniano

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Las plantas han desarrollado varios mecanismos protectores para contrarrestar el estrés salino, uno de ellos es la acumulación de solutos compatibles como prolina y glicina betaina. Sin embargo, algunos cultivos como el tomate no acumulan glicina betaina, ante esto surge la alternativa de la aplicación exógena de estos compuestos. En este trabajo, se propuso evaluar el contenido de prolina en relación al estado hídrico en plántulas de *Solanum lycopersicum* var. Río Grande "tomate" pretratado con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivadas en diferentes niveles de salinidad. Plántulas fueron tratadas con glicina betaina a concentraciones de 0, 1 y 10 mM, y luego sometidas a cloruro de sodio: 0, 100 y 200 mM agregada esta sal a la solución de riego. Después de 10 días de tratamiento se cuantificó prolina y contenido relativo de agua. El contenido de prolina aumentó con el grado de salinidad y la aplicación de Glicina betaina 1 mM produjo un aumento significativo en NaCl 100mM.

Palabras clave: prolina, glicina betaina, estrés salino, *Solanum*.

ABSTRACT

Plants have developed various protective mechanisms to counteract the salt stress; one of them is accumulation of compatible solutes such as proline and glycine betaine. However, some crops such as tomato not accumulate glycine betaine, this alternative to the exogenous application of these compounds arises. In this paper, we proposed evaluate content of proline in relation to water status in seedlings of *Solanum lycopersicum* var. Río Grande "tomato" pretreated with different concentrations glycine betaine and grown under different levels salinity. Seedlings were treated with glycine betaine concentrations 0, 1 and 10 mM, and then subjected to sodium chloride: 0, 100 and 200 mM this salt added to the irrigation solution. After 10 days treatment was quantitated proline and relative water content. Proline content increased with the degree salinity and application of 1 mM glycine betaine was significant increase in 100 mM NaCl.

Keywords: proline, glycine betaine, salt stress, *Solanum*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas exhiben una respuesta dual frente al estrés salino que implica una respuesta temprana y otra tardía; la primera, está relacionada al estrés osmótico resultado del potencial hídrico negativo del suelo salino y la segunda, a la acumulación de Na^+ en tejidos foliares¹. Solamente plantas con mecanismos adaptativos pueden evitar el efecto adverso de la salinidad². El ajustamiento osmótico a nivel fisiológico, es un mecanismo adaptativo involucrado en la tolerancia a la sequía o salinidad, el cual permite mantener la turgencia celular bajo condiciones de déficit hídrico y contrarrestar los efectos de una rápida disminución en el potencial hídrico foliar³. Esto último ocurre por la acumulación de altas concentraciones de iones inorgánicos o solutos orgánicos de bajo peso molecular. Si bien ellos juegan un rol crucial en el crecimiento de plantas superiores bajo condiciones salinas, su contribución varía entre especie, cultivares y entre diferentes compartimentos dentro de una misma planta.

En el tiempo, las plantas han desarrollado varios mecanismos protectores para contrarrestar el estrés abiótico tal como el frío, sequía y salinidad. Uno de los mecanismos es la acumulación de solutos compatibles⁴. Estos solutos son pequeños metabolitos orgánicos solubles en agua, no tóxicos a altas concentraciones que permiten a las células retener agua para evitar disturbios y permitir funciones normales cuando son expuestas a estrés abiótico⁵. Se incluyen entre los solutos compatibles a polioles, azúcares, aminoácidos y betainas, los cuales difieren entre especies⁶.

Hay evidencia que glicina betaina y prolina juegan un rol adaptativo en mediar el ajuste osmótico y proteger las estructuras subcelulares en plantas estresadas, estabilizando reacciones fotosintéticas, la estructura de proteínas extrínsecas del complejo fotosintético II, y síntesis de ATP y activación de enzimas^{6,7,8,9}.

La glicina betaina es la mejor betaina conocida, molécula bipolar pero eléctricamente neutra a pH fisiológico⁶, es un aminoácido derivado, soluble en agua, no tóxico, incoloro, naturalmente sintetizado en varias especies vegetales; sin embargo, muchas especies cultivadas importantes tipo papa o tomate son incapaces de acumularlo⁹. Es sintetizada a tasas elevadas en plantas bajo estrés abiótico^{10,11}. Los niveles de acumulación de GB son correlacionados con el aumento de la tolerancia por las plantas⁶. Muchas investigaciones revelan también que la acumulación de prolina contribuye al ajuste osmótico y tolerancia de las plantas expuestas a condiciones ambientales desfavorables. Por lo que se ha considerado como una respuesta universal de las plantas bajo estrés. La acumulación de prolina por deshidratación debido a un déficit hídrico o por aumento de la presión osmótica es la evidencia del rol que juega la prolina en la osmorregulación en plantas sometidas a los factores ambientales que producen el estrés hídrico.

En diversas especies la síntesis de glicina betaina es promovida por estrés por sequía y sal¹² como un soluto compatible que regula el balance osmótico intracelular; pero también ha sido demostrado su rol para estabilizar proteínas extrínsecas¹³, mantener la estructura de la membrana¹⁴, proteger el fotosistema II y síntesis de ATP contra los efectos inhibitorios del NaCl ¹⁵. Se ha encontrado, por ejemplo, que glicina betaina se acumula bajo estrés salino en trigo¹⁶ y en varias especies de Caryophyllaceae, Convolvulaceae, Compositae y Solanaceae¹⁷.

El tomate es una de las hortalizas más importantes y de amplia distribución en el mundo¹⁸; sin embargo, la salinidad puede reducir el rendimiento en las cosechas¹⁹, pero también se reporta que la salinidad mejora la calidad de los frutos al aumentar los sólidos solubles totales, contenido de ácido, y color²⁰. Se ha observado que muchas plantas cultivadas como las de tomate naturalmente no acumulan glicina betaina¹². Ante este hecho, la aplicación exógena de soluciones compatibles ha sido sugerida como un enfoque adicional, alternativo a la ingeniería genética para mejorar la productividad de los cultivos bajo condiciones de estrés²¹.

La aplicación exógena de glicina betaina aumenta en el vegetal su tolerancia a estrés por sequía y salino, puede mejorar el crecimiento y supervivencia de numerosas especies bajo condiciones de estrés y estabiliza, efectivamente, la estructura cuaternaria de enzimas, proteínas y mantiene un estado altamente ordenado de las membranas cuando concentraciones de sal o temperatura son extremas^{10,22,23,24}.

Las plantas de tomate no son capaces de sintetizar glicina betaina, pero son capaces de tomarlo cuando es aplicado exógenamente a las hojas²⁵. Ellas han sido consideradas que pueden servir de un buen sistema modelo para investigar el uso de la aplicación exógena cuando las plantas crecen en estrés ambiental. Estudios preliminares han mostrado, que la adición exógena de solución compatible a raíces de plantas jóvenes de tomate indujo tolerancia a las condiciones de estrés; sin embargo, en plantas maduras de tomate sensitiva a sales se ha reportado que ni prolina ni glicina betaina son capaces de contrarrestar los efectos del estrés salino²⁶. Este comportamiento nos lleva a considerar que la edad de la planta a la cual es expuesta a glicina betaina exógena juega un rol crítico en su respuesta al estrés salino.

En este trabajo se propone evaluar el contenido de prolina en relación al estado hídrico (contenido relativo de agua) en plántulas de *Solanum lycopersicum* var. Río Grande “tomate” pretratado con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivadas en diferentes niveles de salinidad, conseguida por concentraciones crecientes de NaCl.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo.

En este trabajo se utilizó plantas de *S. lycopersicum* Var. Río Grande, obtenidas a partir de semilla botánica certificada expendida comercialmente. Las semillas se colocaron a germinar en bandejas de polietileno sobre papel toalla humedecido con agua destilada y cubiertas con una película de plástico para mantener la humedad. Los sistemas de germinación fueron colocados en oscuridad hasta que los tallos de las plántulas alcanzaron un tamaño de 2 – 2.5 cm de longitud. Este material fue trasplantado y mantenido en recipientes de polietileno de 350 ml de capacidad, conteniendo solución nutritiva La Molina hasta que se estableció el primer par de hojas verdaderas, luego se traspasaron a recipientes de 1000 ml. Las plántulas crecieron en condiciones de invernadero a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta que tuvieron 4 semanas de edad, tiempo por el cual fueron mantenidas en solución nutritiva adecuadamente aireada.

Aplicación de glicina betaina y NaCl.

La aplicación de glicina betaina se realizó en dos etapas, cuando las semillas fueron embebidas y cuando las plántulas provenientes de estas semillas desarrollaron el primer par de hojas verdaderas. En ambos casos, se aplicó glicina betaina a las concentraciones de 0, 1.0, 10 mM; luego de dos horas del pretratamiento con glicina betaina fueron expuestas a NaCl a las concentraciones de 0, 100 y 200mM por 10 días.

Tanto para semillas como plántulas, éstas se distribuyeron en 3 grupos, cada uno conformado por 30 individuos, luego, completamente al azar se procedió a la aplicación de glicina betaina por aspersión y agregando Na Cl a la solución nutritiva. Se consideró tres replicas para cada tratamiento.

Cuantificación de prolina.

Para cuantificar prolina se utilizó el método descrito por Bates y cols.²⁷, se utilizó 0,5 g de tejido foliar o de raíz. Cada muestra fue congelada en nitrógeno líquido y homogenizada con ácido sulfosalicílico al 3%. El residuo fue removido por centrifugación a 13000 g por 10 min. Luego, 500 μl del extracto se hizo reaccionar con 500 μl de ácido acético glacial y 500 μl de ninhidrina ácida a 100°C por una hora. La reacción fue detenida en baño con hielo. El cromóforo conteniendo la prolina fue extraído con 1 ml de tolueno. La prolina fue cuantificada en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452, a 520 nm, usando L-prolina en la elaboración de la curva de calibración. La cantidad de prolina fue expresada en microgramos por gramo de peso fresco. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento.

Determinación del contenido relativo de agua (CRA).

Para determinar el CRA, se utilizó la primera hoja completamente expandida a partir del ápice de la planta, después de los respectivos tratamientos con glicina betaina y NaCl. Se registró el peso fresco (PF) de las hojas tan luego fueron retiradas de la planta. Luego se determinó el peso túrgido (PT), para lo cual, las hojas fueron colocadas en agua desionizada por 24 horas, después de este tiempo, las hojas fueron sacadas del agua, secadas sobre papel de filtro y pesadas. Finalmente, las hojas fueron secadas a 80°C hasta obtener un peso constante y se registró el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se determinó mediante la fórmula: $\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PT} - \text{PS}) \times 100$. Se consideró tres repeticiones por tratamiento.

Evaluación y análisis estadístico de datos.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias según la prueba de significación de Duncan con un nivel de confianza de 95%. Se usó el paquete estadístico Statgraphics plus 5.1.

RESULTADOS

Las plántulas de *S. lycopersicum* Var. Río Grande, tratadas con glicina betaina y cultivadas en soluciones con diferentes concentraciones de NaCl, mostraron cambios en el contenido prolina y el contenido relativo de agua.

El contenido de prolina en plántulas tratadas con glicina betaina 0 mM y cultivadas con 100 y 200 mM de NaCl mostraron un aumento significativo con respecto al control (0 mM de NaCl), alcanzando los valores más altos a 200 mM, aumentando hasta 2.4 veces con respecto a las plántulas control (Fig. 1). Al comparar el contenido de prolina en plantulas tratadas con 0, 1 y 10 mM de glicina betaina y cultivadas con 0 y 200 mM de NaCl no mostraron diferencias significativas; sin embargo, se observó diferencias significativas cuando las plántulas crecieron en NaCl 100 mM y fueron tratadas con glicina betaina 10mM.

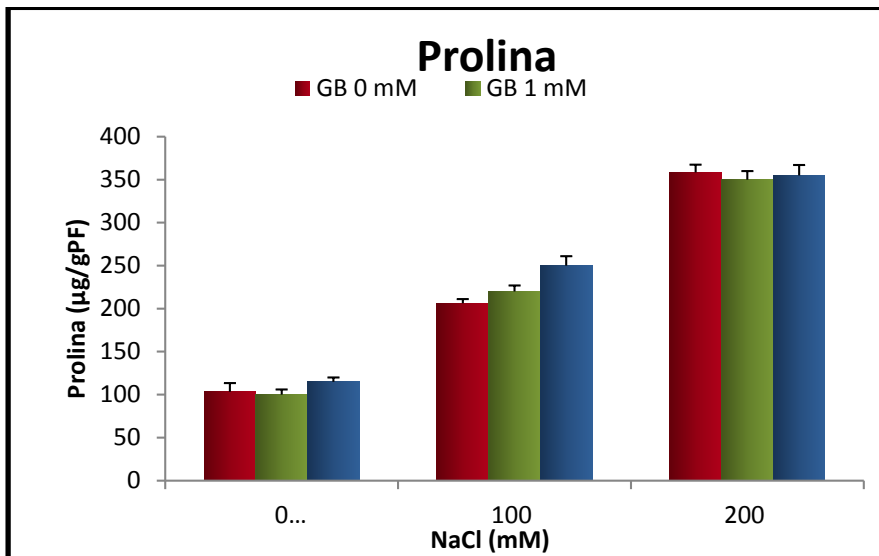


Fig. 1. Contenido de prolina en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande, tratada con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivada en concentraciones crecientes de NaCl por 10 días. Las barras verticales representan el error estándar (n = 3).

El contenido relativo de agua (CRA) disminuyó significativamente en *S. lycopersicum* var. Río Grande después de ser expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (Fig. 2). Mostro los valores más bajos a 200 mM de NaCl y 0 mM de glicina betaina (74 %); al comparar los promedios de las plántulas tratadas con 0, 1 y 10 mM de glicina betaina en las plántulas cultivadas con 0, 200 mM de NaCl no se encontró diferencias significativas en el CRA. En las plántulas cultivadas con 100 y 200 mM de NaCl se observo un aumento en el CRA, mas solo este aumento fue significativo entre los tratamientos 0 y 1 mM de glicina betaina en aquellas que crecieron en una concentración de 100 mM de NaCl.

DISCUSIÓN

En diversos trabajos se ha reportado la acumulación de prolina en tejidos, órganos de las plantas sometidas a varios tipos de estrés, entre ellos al estrés salino y que el aumento temporal de estos compuestos es importante en la respuesta de la planta al estrés. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran aumento significativo en el contenido de prolina en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande tratado con diferentes concentraciones de NaCl. Estos resultados concuerdan con los encontrados en tejido foliar de tres especies de tomate, *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* y *Solanum pennell*²⁸; así también con los resultados observados en hojas y tallos de dos cultivares de tomates, cultivados *in vitro* con la adición de NaCl a una concentración de 160 mM²⁹. La disminución de la turgencia es el disparador de la acumulación de prolina en plantas sujetas a condiciones de sequía ya que la pérdida de turgencia activa una compleja secuencia de eventos adaptativos correlacionados al nivel de estrés.

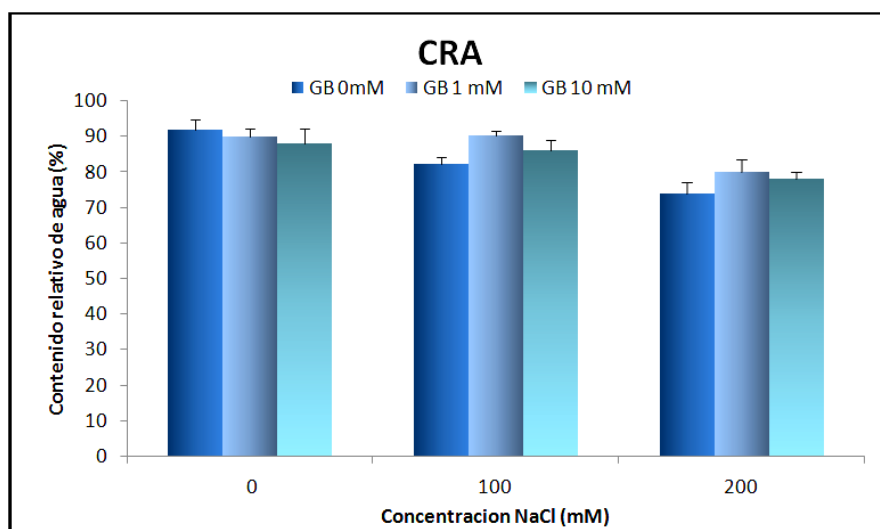


Fig 2. Contenido relativo de agua (CRA) en hojas de *Solanum lycopersicum* L. var. Río Grande, tratada con diferentes concentraciones de glicina betaina y cultivada en concentraciones crecientes de NaCl por 10 días. Las barras verticales representan el error estándar (n = 3).

La aplicación exógena de glicina betaina en plantas estresadas por sales ha sido descrita hace varias décadas y su función ha sido relativamente bien caracterizada³⁰. Cuando glicina betaina es aplicada exógenamente, ésta penetra en los tejidos foliares pronto, después de la aplicación y es rápidamente trasladada a las raíces, meristemos y hojas es expansión²⁵. Estos investigadores también han demostrado que glicina betaina queda sin metabolizar en los tejidos de la planta por varias semanas. Este comportamiento de glicina betaina estaría justificando el aumento del contenido de prolina en las plántulas de tomate tratadas con este metabolito, ya que además se menciona que una vez que la glicina betaina es trasladada a los órganos de la planta, actúa como un osmoprotector en las células³¹. Si bien las plantas de tomate no acumulan normalmente glicina betaina¹², se ha demostrado que glicina betaina es tomada rápidamente cuando es aplicada foliarmente y acumulada en sus hojas a varios niveles dependiendo de la concentración aplicada³².

El aumento de sales en la solución del suelo ocasiona disminución de los potenciales hídrico y osmótico, lo cual se refleja en el estado hídrico de la planta; es decir, la planta tiende a perder agua. Ante esta situación, la planta debe mantener un potencial hídrico más negativo que el sustrato para asegurar la absorción de agua y poder mantener una adecuada hidratación de sus tejidos³³.

En el presente trabajo se observó disminución del contenido relativo de agua (CRA) en *Solanum lycopersicum* var. Río Grande cuando fue expuesta a diferentes concentraciones de NaCl. Este comportamiento en el contenido relativo de agua estaría relacionado con la capacidad de respuesta de las especies al aumento de sales en el sustrato, es decir a su capacidad para generar potenciales hídricos que le permitan mantener la turgencia celular. En las plantas expuestas a concentraciones elevadas de sales, deben ocurrir cambios en el flujo de agua de tal manera que las células y los tejidos se adapten a esta situación. La absorción de agua se lleva a cabo gracias al mayor potencial osmótico de la raíz con respecto al suelo y que ocurre en cuanto las células dejan de estar turgentes³⁴. Estas condiciones posiblemente se generan en las plantas de tomate tras la síntesis y acumulación de solutos compatibles, ayudados también por la aplicación exógena de glicina betaina. Prolina y glicina betaina mejoran el estado hídrico de plantas estresadas. Tales efectos pueden ser debidos a la inhibición del eflujo de agua vía efecto de estos solutos sobre la estabilidad de la membrana y sobre la transpiración reducida vía efecto de la regulación estomática, además de que estos solutos pueden estar involucrados en la osmorregulación³⁵.

También podría estar participando en el mantenimiento del estado hídrico de las plantas la actividad de las acuaporinas, proteínas canales de membrana (PIP), que juegan un papel dinámico clave en el control del movimiento del agua en las células de la raíz, y las proteínas TIP a nivel del tonoplasto, responsables del control del agua transcelular, para restablecer y mantener la homeostasis celular de los cambios en el potencial osmótico celular ocasionado por las sales³⁶; donde la Glicina betaina aplicada exógenamente estaría contribuyendo a mantener un estado altamente ordenado de las membranas cuando concentraciones de sal o temperatura son extremas²⁴. La aplicación de prolina y glicina betaina reduce el daño de la membrana, mejora la toma de K⁺ y el crecimiento. Ambos solutos mejoran la desestabilización de proteínas y la protección de membranas¹⁴.

CONCLUSIONES

- El estrés salino generado por NaCl aumentó el contenido de prolina en plántulas de *S. lycopersicum* var. Río Grande.
- La aplicación de glicina betaina aumento el contenido de prolina en plantas de *S. lycopersicum* expuestas a NaCl 100 mM.
- El NaCl causa disminución en el contenido relativo de agua y aumento del contenido de prolina en hojas de *S. lycopersicum* var. Río Grande.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Munns RA. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypothesis. *Plant Cell Environ* 1993; 16: 15-24.
2. Blumwald E, Gilad S, Aharon M, Apse P. Sodium transport in plant cells. *Biochim et Biophys Acta* 2000; 1465:140-15.
3. Morgan JM. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1984; 35: 299-319.
4. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 1995; 25: 1099-1111.
5. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; 25: 1214-1222.
6. Rhodes D, Hanson AD. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol & Plant Mol Biol* 1993; 44: 357-384.
7. Hayashi H, Chen THH, Murata N. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of Arabidopsis during germination and early growth. *Plant Cell Environ* 1998; 21: 232-239.
8. Heuer B. Osmoregulatory role of proline in water and saltstressed plants. In: Pessaraki M (ed.) *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker 1994; pp.363-381.
9. Gorham J. Betaines in higher plants – biosynthesis and role in stress metabolism. In: Wallsgrove, R.M. (ed.), *Aminoacids and their Derivates in Higher Plants*. University Press, Cambridge 1995; pp.172-203.
10. Allard F, Houde M, Krol M, Ivanov A, et al. Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol* 1998; 39: 1194-1202.

11. Nomura M, Ishitani M, Takabe T, Rai AK, Takabe T. *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol* 1995; 107: 703-708.
12. Wyn RG, Storey R. Betaines. In: Paleg, LG, Aspinall D. (eds.), *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*. Academic Press, Sydney 1981; pp.172-205.
13. Papageorgiou GC, Fujimura N, Murata N. Protection of the oxygen-evolving photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1057: 361-366.
14. Jolivet Y, Lahrer F, Hamelin J. Osmoregulation in higher plants: the protective effect of glycinebetaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci Lett* 1982; 25: 193-201.
15. Murata N, Mohanty PS, Hayashi H, Papageorgiou GC. Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Lett* 1992; 296: 187-189.
16. Mamedov MD, Hayashi H, Wada H, Mohanty PS, Papageorgiou GC, Murata N. Glycinebetaine enhances and stabilizes the evolution of oxygen and the synthesis of ATP by cyanobacterial thylakoid membranes. *FEBS Lett* 1991; 294: 271-274.
17. Jokinen K, Somersalo S, Mäkelä P, Urbano P, et al. Glycinebetaine from sugar beet enhances the yield of field-grown tomatoes. *Acta Hort* 1999; 487: 233-236.
18. Maas EV. Salt tolerance of plants. *Appl Agric Res* 1986; 1: 12-26.
19. Tanwar BS. *Saline water management for irrigation*. International Commission on irrigation and drainage. New Delhi, India. 2003.
20. Zhao Y, Aspinall D, Paleg LG. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J Plant Physiol* 1992; 140: 541-543.
21. Itai C, Paleg LG. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. *Plant Science Lett* 1982; 25: 329-335.
22. Mäkelä P, Jokinen K, Kontturi M, Peltonen-Sainio P, et al. Foliar application of glycinebetaine—a novel product from sugar beet—as an approach to increase tomato yield. *Industr Crops Prod* 1998; 7: 139-148.
23. Mäkelä P, Kontturi M, Pehu E, Somersalo S. Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar applied glycinebetaine. *Physiol Plant* 1999; 105: 45-50.
24. Papageorgiou GC, Murata N. The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth Res* 1995; 44: 243-252.
25. Mäkelä P, Peltonen-Sainio P, Jokinen K, Pehu E, et al. Uptake and translocation of foliar-applied glycinebetaine in crop plants. *Plant Sci* 1996; 121: 221-230.
26. Heuer B. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Sci* 2003; 165, 693-699.
27. Bates L, Waldren R, Teare Y. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and soil* 1973; 39: 205-207.
28. Chen WP, Li PH, Chen THH. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant Cell Environ* 2000; 23: 609-618.
29. Amini F, Ehsanpour A. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. *Am J Biochem & Biotech* 2005; 1: 212-216.
30. Hanson AD, Wyse R. Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugarbeet and its progenitors in relation to salinity. *Plant Physiol* 1982; 70: 1191-1198.
31. Mc Cue KF, Hanson AD. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotech* 1990; 8: 358-362.
32. Park EJ, Jeknic Z, Chen THH. Exogenous Application of Glycinebetaine Increases Chilling Tolerance in Tomato Plants. *Plant Cell Physiol* 2006; 47: 706-714
33. Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. 2000.
34. Rojas Garcidueñas, M. La resistencia a la sequía. *Ciencia UANL* 2003; 3: 326-331.
35. Delauney AJ, Verma DPS. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 1993; 14: 215-223.
36. Bartels D, Ramanjulu S. Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sci* 2005; 24: 23-58.