

## INFLUENCIA DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL CONTENIDO DE CERAS EPICUTICULARES EN ETAPAS FENOLÓGICAS DEL SORGO

### INFLUENCE OF WATER STRESS ON THE EPICUTICULAR WAX LOAD IN DEVELOPMENT STAGES OF SORGHUM

José Alberto López-Santillán<sup>1\*</sup>, Sergio Castro Nava<sup>2</sup> y Alfredo J. Huerta<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria, Tam. CP 87149. E-mail jalopez@uamta.uat.mx, <sup>2</sup> Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Cd. Victoria, Tam. C.P. 87149, Tel (01) 1318-7149 y Fax (01) 1318-1721, E-mail [scastro@uamta.uat.mx](mailto:scastro@uamta.uat.mx), <sup>3</sup> Botany Department, Miami University, Oxford, Ohio, USA. 45056.

\*Autor responsable

#### RESUMEN

En un experimento efectuado durante 1992, se evaluó el efecto del temporal sobre la producción de ceras epicuticulares por hojas de cinco genotipos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) en diferentes etapas fenológicas. Se muestrearon segmentos de hoja en etapa vegetativa (53 días después de la siembra, DDS), en antesis (68 DDS) y en llenado de grano (83 DDS), en las que se cuantificó la cantidad de ceras epicuticulares mediante un método colorimétrico. Se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.01$ ) entre genotipos, entre etapas fenológicas y entre condiciones de humedad. En promedio, la concentración de cera aumentó en 21 % en la condición de temporal, en comparación con la de riego. Tal aumento de ceras epicuticulares fue superior en 64 % en la etapa de llenado de grano que en la etapa vegetativa. Se concluyó que el aumento de concentración de ceras epicuticulares en la lámina de hoja de sorgo, se da en respuesta al estrés hídrico, en magnitud que depende del genotipo y del grado de estrés.

**Palabras clave adicionales:** *Sorghum bicolor* L. Moench, ceras epicuticulares, riego, temporal, etapa fenológica.

#### SUMMARY

An experiment was carried out during 1992, to study the effect of rainfed conditions on the leaf epicuticular wax load during three development stages of five sorghum genotypes. Leaf samples were taken during vegetative stage 53 days after sowing (DAS), anthesis (68 DAS) and grain filling (83 DAS). Epicuticular wax was determined by a colorimetric method. The results showed statistical differences ( $P \leq 0.01$ ) in the leaf wax load among genotypes water stress levels and phenological stages. In general all five genotypes under rainfed conditions increased the leaf epicuticular wax load by 21 % as compared to the watered plants. The leaf epicuticular wax load at the grain filling stage was 64 % higher than at the vegetative stage. It was concluded that the water stress level and the genotype affect the leaf epicuticular wax load.

**Additional index words:** *Sorghum bicolor* L. Moench, epicuticular wax, rainfed conditions, irrigated conditions, development stages.

#### INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los factores de mayor importancia en la producción de cultivos agrícolas, debido a que su deficiencia afecta significativamente el rendimiento, por lo que el estudio de las relaciones hídricas en las plantas es ampliamente justificado. Las relaciones hídricas afectan directamente el metabolismo de las plantas y estimulan la expresión de diversos mecanismos que permiten la adaptación de las plantas a condiciones de estrés en diversas etapas fenológicas de las mismas.

Los cultivos agrícolas, principalmente en zonas semiáridas, sufren períodos de sequía durante alguna etapa de su desarrollo y a menudo la expresión del rendimiento depende de algunos mecanismos para disminuir la transpiración y así prevenir daños por deshidratación. Cuando el estrés hídrico alcanza un nivel significativo en las plantas, ocurren mecanismos como cierre estomático (Krieg, 1983), enrollamiento, doblado o pérdida de hojas (Maití, 1986), ajuste osmótico, etc., que disminuyen la pérdida de agua por la planta.

La transpiración a través de la cutícula foliar depende de sus características morfológicas, anatómicas y bioquímicas, así como de las condiciones ambientales imperantes (Chatterton *et al.*, 1975; Begnston *et al.*, 1978).

Se ha observado que la cantidad de ceras epicuticulares se incrementa en condiciones de estrés, como consecuencia de una adaptación de la planta a condiciones de deficiencia hídrica (Castro y Huerta, 1994). En el caso del sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), este mecanismo es importante para su adaptación a condiciones de sequía, ya que le permite una mayor eficiencia del control estomático, mayor



reflexión de la radiación solar, disminución de la transpiración cuticular, y mayor eficiencia en el uso del agua en términos de la relación entre el intercambio de carbono y la transpiración (Chatterton *et al.*, 1975). El grado de deposición de ceras epicuticulares sobre las hojas de sorgo, depende de las características genéticas e hídricas de las plantas (Jordan *et al.*, 1983).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue estimar el efecto del estrés hídrico en la producción de ceras epicuticulares por las láminas foliares de genotipos de sorgo para grano adaptados a la zona agrícola del Centro de Tamaulipas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

La resistencia a la sequía, desde el punto de vista agronómico, es la capacidad de la planta para producir rendimiento económico en condiciones de deficiencia de humedad, en función de su potencial genético y de la interacción del genotipo con la tensión hídrica (Muñoz, 1980). En el sorgo se presentan cuatro mecanismos de resistencia a la sequía: 1) Escape, determinado por la maduración temprana o precocidad, la cual está asociada con la reducción de los requerimientos de agua; 2) Evasión, que es el mecanismo mediante el cual algunos genotipos mantienen consistentemente altos potenciales hídricos en sus hojas; 3) Tolerancia, dada por la respuesta de sus tejidos a la reducción en el potencial hídrico de las hojas; y 4) Resistencia por recuperación (Blum, 1979).

El ciclo biológico del sorgo se puede dividir en tres etapas: 1) La vegetativa, que comprende la germinación, desarrollo de la plántula, crecimiento de algunas hojas y el establecimiento de una porción importante del sistema radical; 2) La etapa reproductiva, que se inicia cuando el meristemo apical cambia su actividad de vegetativa (produce sólo primordios de hojas) a reproductiva (inicia la diferenciación de estructuras reproductivas), continúa con el desarrollo de la inflorescencia y termina con la antesis; y 3) La fase de llenado de grano, que se caracteriza por el desarrollo y madurez del grano y la senescencia de las hojas hasta madurez fisiológica del grano (Paul, 1990). La etapa de diferenciación de la panícula es el período más crítico del sorgo a la tensión de humedad; si durante esta etapa la planta no sufre un grado alto de estrés la producción de semilla ocurrirá satisfactoriamente (Krieg, 1983).

Una forma en que las plantas se adaptan a un ambiente deficiente de humedad, es mediante la reducción de la pérdida de agua a través de la parte aérea de la planta, lo

que en unos casos se logra con cambios en la forma de la hoja, que restringen su superficie transpirante, o bien mediante la senescencia de la misma (Tijerina, 1989). Otra característica relacionada con la resistencia a la sequía es la deposición de ceras epicuticulares sobre las láminas (Haque *et al.*, 1992) y las vainas de las hojas (Jenks *et al.*, 1992), ya que estas ceras aumentan el control estomático de la pérdida de agua y reducen la conducción cuticular del vapor de agua (Jordan *et al.*, 1984; Clarke *et al.*, 1994); las ceras epicuticulares también incrementan la reflexión de la energía radiante y reducen la captación de radiación en el dosel, así como mejoran la eficiencia en el uso del agua medida como el cociente entre el intercambio de carbono y la transpiración (Chatterton *et al.*, 1975).

De esta manera, el incremento de ceras epicuticulares por unidad de área foliar es un mecanismo que permite disminuir la transpiración cuticular de la planta (Galeano *et al.*, 1986), y además provee protección física contra la abrasión e insectos (Edwards, 1982; Premachandra *et al.*, 1993). Aún más, Peters (1993) observó mayor susceptibilidad a pudriciones e infecciones foliares en mutantes de sorgo con menor cantidad de cera epicuticular que en comparación con aislóneas con mayor cantidad de esas ceras, lo cual, de acuerdo con el mismo autor, parece estar asociado con diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición química y en la estructura de las ceras epicuticulares.

La cantidad de ceras epicuticulares depositada sobre la lámina y vaina de las hojas de sorgo depende de las condiciones ambientales y del patrimonio genético de las variedades. La deposición de ceras se incrementa en altas temperaturas y su sequía (Jordan *et al.*, 1983; Premachandra *et al.*, 1992). La disminución del potencial hídrico en las plantas propicia el aumento de la deposición de cera sobre las hojas y la reducción de la toma de pérdida de agua (Skoss, 1955); sin embargo, la lluvia intensa y el riego por aspersión disminuyen la cantidad de ceras epicuticulares debido al efecto de lavado que ejercen sobre superficie foliar (Ebercon *et al.*, 1977; Mayeux y Jordan, 1987). Los estudios de Jordan *et al.* (1983) confirmaron que la cantidad de cera epicuticular depositada sobre las hojas, varía entre genotipos y también entre ambientes. Algunos autores consideran que la etapa de desarrollo también influye en la deposición de ceras epicuticulares en sorgo (Schieferstein y Loomis, 1956) y zacate johnson (*Sorghum halapense*) (Mc Whorter, 1993), ya que dicha deposición ocurre sólo en hojas jóvenes y durante un corto período después de la expansión de la hoja, probablemente porque está relacionada con la etapa de desarrollo y con la solidificación de la cutícula.



El mejoramiento genético de la resistencia a la sequía mediante la selección de caracteres fisiológicos ha sido una tarea difícil, en parte porque el clima es muy variable, y en parte porque las metodologías fisiológicas son difíciles de aplicar en programas de fitomejoramiento a un alto número de genotipos (Jordan *et al.*, 1983). No obstante, Castro y Huerta (1994) consideran que la cantidad de ceras epicuticulares puede ser un criterio útil para seleccionar genotipos resistentes a la sequía, en combinación con otras características, para aprovechar la variabilidad genética.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se evaluaron cuatro líneas experimentales de sorgo para grano y un híbrido comercial (Cuadro 1). Las líneas fueron generadas en el Programa de Mejoramiento Genético de Sorgo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT). Estos materiales se establecieron durante el ciclo temprano de 1992 (fecha de siembra 27 de marzo y cosecha 15 de julio), en la Facultad de Agronomía de la UAT, localizada en el municipio de Cd. Victoria, Tam., bajo dos tratamientos de humedad (temporal y riego); en el tratamiento de temporal se dejó de regar a los 40 días después de la siembra, mientras que en el de riego las plantas permanecieron con humedad edáfica favorable durante todo su ciclo biológico. Los estados fenológicos en los que se midió el contenido de ceras epicuticulares (CCE), fueron: prefloración, floración, y postfloración; los muestreos de las láminas foliares se realizaron al final de la primera etapa (53 DDS), al momento de la floración (68 DDS) y a la mitad de la última etapa (83 DDS); es decir, a los 13, 28 y 43 días después de que se suprimió el riego para el tratamiento de estrés hídrico.

Cuadro 1. Genotipos de sorgo para grano utilizados en el estudio de la influencia del estrés hídrico sobre la cantidad de ceras epicuticulares, y algunas de sus características agronómicas

Genotipo	Días a floración	Altura de planta (cm)	Longitud de panoja (cm)
UAT 30	67	130	19
UAT 134	67	122	20
UAT 124	70	116	20
UAT 52	68	132	24
RB 3030*	70	125	26

\*Híbrido comercial

El diseño experimental fue uno de bloques completos al azar con arreglo de parcelas subdivididas, en donde la parcela grande fue el genotipo, la subparcela la condición de humedad y la sub-subparcela la etapa fenológica, con

dos repeticiones. La unidad experimental fue un surco de 5 m de largo y 0.80 m de ancho, conteniendo una densidad de población equivalente a 150 000 plantas por hectárea.

Para las determinaciones de la CCE de una planta por parcela, se tomaron 30 cm<sup>2</sup> de área laminar de la parte central de la antepenúltima hoja ligulada (incluyendo haz y envés). La medición del CCE se hizo mediante el método colorimétrico propuesto por Ebercon *et al.* (1977), en el cual la extracción de la cera se logra sumergiendo las muestras durante 15 segundos en cloroformo contenido en tubos de ensayo; dado que el cloroformo funciona como solvente, éste se evaporó con calor, el sumergir los tubos de ensayo en agua hirviente; posteriormente, para la formación de coloración se utilizaron 5 mL de un reactivo a base de dicromato de potasio y ácido sulfúrico, para finalmente realizar lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro Sequoia Turner Modelo 340 a una longitud de onda de 590 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (Cuadro 2) muestra que hubo diferencias altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) en la CCE entre genotipos, condiciones de humedad y entre etapas fenológicas; en cambio, las interacciones genotipo x condición ( $G \times C$ ), genotipo por etapa ( $G \times E$ ), condición x etapa ( $C \times E$ ) y genotipo x condición x etapa ( $G \times C \times E$ ), en ningún caso tuvieron efectos significativos.

Cuadro 2. Análisis de varianza para la cantidad de ceras epicuticulares de cinco genotipos de sorgo para grano sembrados en condiciones de riego y temporal, en tres etapas fenológicas.

F.V.	G.L.	C.M.	P>F
Genotipo	4	0.0000420	0.0007 **
Error Gen	4	0.0000020	
Condición	1	0.0006110	0.000 **
Gen x Cond	4	0.0000090	2.680 ns
Error Cond	5	0.0000050	
Etapas	2	0.0024270	0.000 **
Gen x Etapas	8	0.0000240	0.091 ns
Cond x Etapas	2	0.0000030	0.793 ns
Gen x Cond x Etapas	8	0.0000090	0.616 ns
Error Etapas	20	0.0000120	
C.V. = 10.11 %			

\*\* = Significancia ( $P < 0.01$ ); ns = No significancia ( $P \leq 0.05$ )

Al comprar entre genotipos, destaca la línea UAT-30 por tener la mayor CCE, y la línea UAT-152 por el menor valor (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con lo obtenidos previamente por Castro y Huerta (1994), en los que los genotipos mencionados presentaron un comportamiento semejante.



## INFLUENCIA DEL ESTRÉS HÍDRICO EN CERAS EPICUTICULARES

Cuadro 3. Cantidad de ceras epicuticulares ( $\text{mg cm}^{-2}$ ) en la hoja de genotipos de sorgo para grano sometidos a dos condiciones de humedad, y la relación temporal/riego.

Genotipo	Condición de humedad		Promedio	T/R
	Riego	Temporal		
UAT-30	0.0331	0.0384	0.0357 a	1.16
RB-3030	0.0310	0.0396	0.0353 ab	1.28
UAT-124	0.0307	0.0373	0.0340 ab	1.21
UAT-134	0.0302	0.0343	0.0322 ab	1.14
UAT-152	0.0278	0.0351	0.0314 b	1.26
Promedio	0.0305 b	0.0369 a	0.0337	1.21

a,b. Promedios seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.01$ ); T/R = Temporal/Riego.

En la condición de temporal los cinco genotipos presentaron una cantidad significativamente mayor ( $P \leq 0.01$ ) de ceras epicuticulares que en la condición de riego (Cuadro 3), superioridad que en promedio fue de 21 %. Resultados similares observaron Bengston *et al.* (1978), Jordan *et al.* (1984) y Premachandra *et al.* (1992), quienes consideraron que un incremento en la CCE podría estar asociado con una mayor resistencia al déficit hídrico; esto último no fue posible comprobarlo en este estudio. Cabe señalar que el aumento registrado en este estudio resultó menor al encontrado anteriormente por Castro y Huerta (1994), posiblemente debido a las diferencias en el grado de severidad del estrés aplicado.

La jerarquización de los genotipos de acuerdo con su CCE fue similar en las dos condiciones de humedad edáfica (Cuadro 3), lo cual es consistente con el hecho de que no existió significancia estadística para la interacción genotipo por condición de humedad (Cuadro 2). Si bien todos los genotipos tuvieron mayor CCE en temporal que en riego, desatan las líneas RB-3030 y UAT-152 por haber logrado un incremento de mayor nivel por efecto de la deficiencia de agua (28 y 26 %, respectivamente).

En cuanto a las etapas fenológicas estudiadas, en el Cuadro 4 se muestra que, en promedio de genotipos, la etapa de postfloración superó en 64 % a la etapa de prefloración, lo que permite suponer que ocurre una continua acumulación de ceras epicuticulares sobre las láminas foliares durante el desarrollo de la planta. En la etapa de floración el promedio de la CCE en las hojas tendió a ser menor pero estadísticamente igual al de prefloración; esto pudo deberse a la precipitación pluvial (185 mm) ocurrida a los 60 y 61 DDS; es decir, siete y ocho días antes del muestreo de floración, la cual pudo haber lavado las ceras epicuticulares foliares en todos los genotipos y en ambas condiciones de humedad (Cuadro 4).

El efecto de lavado fue reportado por Ebercon *et al.* (1977) y por Mayeux y Jordan (1987). Es necesario señalar que a los 30 DDS se presentó otra precipitación pluvial (90 mm), que no tuvo efecto en este estudio porque ocurrió antes del inicio del tratamiento de estrés hídrico.

De acuerdo con el cociente temporal/riego, el aumento de la CCE se observó en las tres etapas fenológicas aquí evaluadas, que fue mayor en las etapas de prefloración y floración (29 y 27 %, respectivamente), en comparación con la etapa de postfloración (Cuadro 4).

Las líneas de regresión ajustadas para representar el proceso de acumulación de ceras sobre las hojas de sorgo (Figura 1) indican que la tasa de acumulación de cera sobre las hojas es similar entre las dos condiciones de humedad, lo cual sugiere que el mayor contenido de ceras epicuticulares en las hojas del sorgo sometido a deficiencia de agua, debió ocurrir el principio del período de sequía, iniciado en este caso a los 40 DDS.

Cuadro 4. Cantidad de ceras epicuticulares ( $\text{mg cm}^{-2}$ ) en la hoja de sorgo para grano, en tres etapas fenológicas, tanto en riego como en temporal. Promedios de cinco genotipos.

Etapa Fenológica	Condición de humedad		Promedio	T/R
	Riego	Temporal		
Prefloración	0.0247	0.0319	0.0283 a	1.29
Floración	0.0234	0.0296	0.0265 a	1.27
Postfloración	0.0435	0.0493	0.0464 b	1.13

a,b. Promedios seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales ( $P \leq 0.01$ ); T/R = Temporal/Riego.

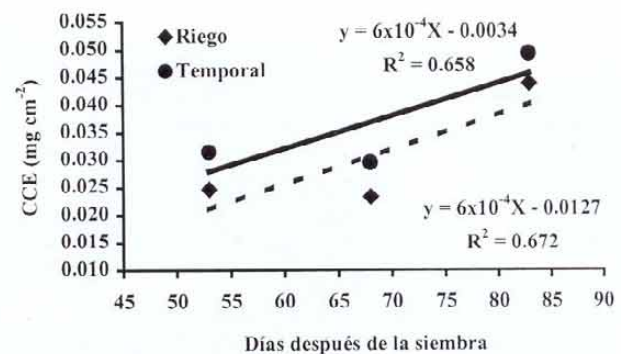


Figura 1. Cantidad de ceras epicuticulares (CCE) en función de días después de la siembra bajo condiciones de riego y temporal. Cada punto representa el promedio de cinco genotipos de sorgo.



## CONCLUSIONES

La deficiencia de humedad edáfica ocurrida en condiciones de temporal, provocó una mayor acumulación de ceras epicuticulares en la lámina foliar de cinco genotipos de sorgo, en magnitudes variables entre genotipos.

En la etapa llenado del grano la cantidad de ceras epicuticulares fue 64 % mayor que en la etapa de prefloración, lo que evidencia la acumulación de tales ceras durante el desarrollo de la planta.

La línea UAT-30 superó a los demás genotipos en contenido de ceras epicuticulares, en promedio de ambientes, mientras que las líneas RB-3020 y UAT-152 tendieron a acumular más ceras en condiciones de temporal que los demás genotipos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT el financiamiento otorgado para la realización de la presente investigación (Proyecto 0464-N9118), y a los Dres. Joaquín Ortiz Cereceres y al Dr. Angel Martínez Garza por sus aportaciones y recomendaciones para una mejor interpretación de los resultados y redacción del presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Begnston, C., S. Larsson, and C. Liljenberg. 1978. Effects of water stress on cuticular transpiration rate and amount and composition of epicuticular wax in seedlings of six oat varieties. *Physiol. Plant.* 49: 319-324.
- Blum, A. 1979. Genetic improvement of drought resistance in crop plants: A case for sorghum. In: *Stress Physiology in Crop Plants*. H. Mussell, R.C. Staples (eds.). John Wiley and Sons. N.Y. pp: 429-445.
- Castro N., S. y A. J. Huerta. 1994. Contenido de ceras epicuticulares en genotipos de sorgo como respuesta al estrés hídrico. *Rev. Fitotec. Mex.* 17:67-75.
- Clarke, J.M., T.N. McCaig, and R.M. DePauw. 1994. Inheritance of glaucousness and epicuticular wax in durum wheat. *Crop Sci.* 34:327-330.
- Chatterton, N.J., W.W. Hann, J.B. Powell, and D.R. Lee. 1975. Photosynthesis and transpiration of bloom and bloomless sorghum. *Can. J. Plant Sci.* 55:641-643.
- Ebercon, A., A. Blum, and W.R. Jordan. 1977. A rapid colorimetric method for epicuticular wax content of sorghum leaves. *Crop Sci.* 17:179-180.
- Edwards, P.B. 1982. Do waxes on juvenile eucalyptus leaves provide protection from grazing insects? *Aust. J. Ecol.* 70:347-352.
- Galeano, R., M.D. Rumbaugh, D.A. Johnson, and J.L. Bushnell. 1986. Variation in epicuticular wax content of alfalfa cultivars and clones. *Crop Sci.* 26:703-706.
- Haque, M.M., D.J. Mackill, and K.T. Ingram. 1992. Inheritance of leaf epicuticular wax content in rice. *Crop Sci.* 32:865-868.
- Jenks, M.A., P.J. Rich, P.J. Peters, J.D. Axtell, and E.N. Ashworth. 1992. Epicuticular wax morphology of bloomless(bm) mutants in sorghum bicolor. *Int. J. Plant Sci.* 153:311-319.
- Jordan, W.R., R.L. Monk, F.R. Miller, D.T. Rosenow, L.E. Clark, and P.J. Shouse. 1983. Environmental physiology of sorghum. I. Environmental and genetic control of epicuticular wax load. *Crop Sci.* 23: 552-558.
- \_\_\_\_\_, P.J. Shouse, A. Blum, F.R. Miller, and R.L. Monk. 1984. Environmental physiology of sorghum. I. Epicuticular wax load and cuticular transpiration. *Crop Sci.* 24:1168-1173.
- Krieg, J.D. 1983. Sorghum. In: *Crop Water Relations*. Teare, I.D., and M.M. Peet (eds.). John Wiley and Sons. N.Y. pp: 352-368.
- Maiti, R. 1986. Morfología, Crecimiento y Desarrollo del Sorgo. *Fac. Agronomía, UANL. Marín, N.L. México.* pp: 125-127.
- Mayeux, H.S. and W.R. Jordan. 1987. Rainfall removes epicuticular waxes from *Isocoma* leaves. *Bot. Gaz.* 148:420-425.
- Mc Whorter, CH. G. 1993. Epicuticular wax on johnsongrass (*Sorghum halapense*) leaves. *Weed Sci.* 41:475-482.
- Muñoz O., A. 1980. Técnicas de investigación para la resistencia a la sequía y heladas en maíz. *Informativo de Maíz. No. Extraordinario de investigación. Vol. III:37-41.*
- Paul, C.L. 1990. Agronomía del Sorgo. Traducción al español Paul, C. L. y M. G. López A. ICRISAT India. pp. 24.
- Peters, P.J. 1993. Development and characterization of epicuticular wax mutants in *Sorghum bicolor*. M.C. Thesis, Purdue University. 90 p.
- Premachandra, G.S., H. Seneoka, K. Fujita, and S. Ogata. 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *J. Exp. Bot.* 43:1569-1576.
- \_\_\_\_\_, D.T. Hahn, and R.J. Joly. 1993. A simple method for determination of abaxial and adaxial epicuticular wax load in intact leaves of *Sorghum bicolor* L. *Can. J. Plant Sci.* 73:521-524.
- Schieferstein, R.H., and W.E. Loomis. 1956. Wax deposits on leaf surfaces. *Plant Physiol.* 31:240-247.
- Skoss, J.D. 1955. Structure and composition of plant cuticle in relation to environmental factors and permeability. *Bot. Gaz.* 117:55-72.
- Tijerina C., H.L. 1989. Efecto de la sequía en el desarrollo del algodón. In: *El Agua en las Plantas Cultivadas*. A. Larqueé-Saavedra (comp.). Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp: 27-58.