

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
Iztacala - U.N.A.M.



B052/81  
Ej. 2

RESISTENCIA A LA SEQUIA II:  
EFECTO DE ANALOGOS DEL ACIDO SALICILICO  
SOBRE LA TRANSPIRACION DE EXPLANTES DE  
Phaseolus vulgaris L.

POR: JOSE LUIS ANDRADE TORRES

T E S I S  
ELABORADA PARA OBTENER EL GRADO DE  
B I O L O G O



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis familiares  
y amigos.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco de manera especial al Dr. Alfonso Larqué-Saavedra por su continuo interés en mi trabajo de tesis, su apoyo y sus consejos.

Del mismo modo deseo manifestar mi agradecimiento a:

El personal del Laboratorio de Fisiología Vegetal - del Colegio de Postgraduados, en especial a la Sra. María Teresa Aguilar y al Sr. Agustín Rodríguez por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio.

El M. C. Marcos Soto por su asesoría y ayuda en la identificación de compuestos químicos.

Las siguientes personas por la atenta revisión del presente trabajo y sus sugerencias:

Biol. María Eugenia Heres Pulido

M. C. Ernesto Aguirre

Biol. Carlos Acosta

Biol. Silvia Zepeda

El Colegio de Postgraduados por el apoyo financiero y las facilidades materiales para la realización de mi tesis.

## I N D I C E

INTRODUCCION . . . . .	1
REVISION DE LITERATURA . . . . .	4
1.- La transpiración vegetal. Un mal inevitable? . . . . .	4
2.- Fisiología de estomas. Principales teorías explicativas . . . . .	6
3.- El control de la transpiración . . . . .	10
4.- Los antitranspirantes químicos naturales . . . . .	13
5.- El ácido salicílico. Un inhibidor natural en las plantas . . . . .	15
MATERIALES Y METODOS . . . . .	19
I.- Bioensayo con explantes de frijol . . . . .	20
II.- Ensayos preliminares con pH . . . . .	23
III-Experimentos con las sustancias análogas del ácido salicílico . . . . .	24
IV- Experimentos con diferentes concentraciones molares de salicilatos . . . . .	29
V.- Experimentos con diferentes valores de pH . . . . .	29
RESULTADOS . . . . .	31
A.- Resultados de los ensayos preliminares . . . . .	31
B.- Resultados de los experimentos con las sustancias análogas del ácido salicílico . . . . .	31

C.- Resultados de los experimentos de los salicilatos suministrados en diferentes concentraciones mola- res . . . . .	38
D.- Resultados de los experimentos obtenidos a dife- rentes valores de pH . . . . .	40
DISCUSION . . . . .	46
CONCLUSIONES . . . . .	55
BIBLIOGRAFIA . . . . .	57

## I N T R O D U C C I O N

La poca disponibilidad de agua en muchas regiones, sumada al hecho de que las plantas -en general- pierden hacia la atmósfera el 99% del agua que absorben, ha sido preocupación de muchos investigadores. Esta pérdida de agua se realiza principalmente por los estomas (proceso conocido como transpiración); por lo que, si pudiésemos reducir esta pérdida, menor cantidad de agua de lluvia o riego sería necesaria para favorecer el desarrollo de los cultivares. Sabemos por otro lado que la falta de agua es el factor más limitante en la producción, dando lugar al déficit hídrico de las plantas.

En la actualidad se han incrementado los estudios en varios campos de la hidrociencia, especialmente en lo que se refiere a la optimización del recurso agua. Destacan dentro de estas investigaciones las de los fisiólogos vegetales, actualmente convencidos de que un medio de conservar agua es regular la transpiración de las plantas (sin afectar la fotosíntesis). Esto se apoya teóricamente en el hecho de que al provocar un cierre artificial en los estomas, debe afectarse en mayor grado la transpiración que la fotosíntesis (Gale y Hagan, 1966).

Con el fin de regular la transpiración, ha sido practicada la aplicación a las plantas de un sinnúmero de sus

tancias que actúen como antitranspirantes, dentro de los que destacan los inhibidores naturales de la transpiración. Mansfield (1978), señala que el Bixido de carbono ( $CO_2$ ) y el ácido absísico (ABA) ofrecen la mayor capacidad de regular la apertura estomatal, pero no la garantía de que se puedan utilizar de manera eficaz y económica.

El trabajo realizado por Larqué-Saavedra en el año de 1978, vino a demostrar que el ácido acetilsalicílico (mejor conocido como aspirina) provocó la disminución de la velocidad de transpiración, en experimentos realizados con frijol (Phaseolus vulgaris L.). En esta misma investigación, la cinética de transpiración con ácido acetilsalicílico y ácido abscísico fueron paralelas, es decir, mostraban un comportamiento similar. La reducción de la velocidad de transpiración en las plantas tratadas con ácido acetilsalicílico (ASA) fue más allá del 43% con respecto a la del testigo. Posteriormente (De León, 1979; Larqué-Saavedra, 1979) se encontró que el ASA también afectaba apertura estomatal en trozos de epidermis de Commelina communis incubadas con esta sustancia.

El presente trabajo tiene como objetivos:

a) Conocer los efectos antitranspirantes de sustancias análogas del ácido salicílico, utilizando el bioensayo de explantes de frijol.

b) Establecer alguna posible correlación entre la -  
estructura química y actividad biológica.

## REVISIÓN DE LITERATURA

## 1.- La transpiración vegetal. Un mal inevitable?

Desde el momento en que las plantas colonizaron el medio terrestre, el balance hídrico pasó a ser el problema fundamental para la supervivencia de las mismas. Es por esto que la gran diversidad de modificaciones estructurales en las plantas, adquiridas durante su evolución, están necesariamente ligadas con su adaptación a la superficie terrestre.

Debido a la gran vulnerabilidad a la desecación de las plantas, éstas desarrollaron una barrera sobre la epidermis, compuesta por materiales hidrófobos (cutina y ceras) y llamada cutícula, la cual es impermeable al agua y también al bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Por otro lado, la necesidad de los vegetales por asimilar  $\text{CO}_2$ , requirió que se desarrollara, también en la epidermis, células especializadas en la apertura y cierre de un poro, sistema llamado estoma. El desarrollo de los estomas y de un espacio de aire intercelular (cámara subestomática), aseguró el intercambio de gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) entre los tejidos y el medio atmosférico (Doyle, 1970).

La transpiración, en la historia evolutiva de las plantas, está inscrita conjuntamente con la necesidad vegetal de asimilar  $\text{CO}_2$ . De manera que podemos estar de acuerdo con Curtis (citado por Kramer, 1974), autor que desde 1926 señala

a la transpiración como un "mal inevitable", inevitable por lo que ya ha sido señalado, y mal porque si falta trae comunmente como consecuencia daños por desecación y baja productividad - en cultivos.

Ha sido planteada la importancia de la transpiración como un proceso implicado en el transporte de agua e iones minerales a través de la planta y en la disminución de la temperatura de las hojas (Clements, 1934; Rashke, 1960; Coudret y Ferron, 1977). Sin embargo, se ha comprobado experimentalmente, que solo bajo ciertas condiciones, los procesos ennumerados - pueden ser afectados significativamente por una reducción o - supresión de la transpiración, pero, en cambio cuando la transpiración excede a la absorción de agua, sucede la indeseable situación de "stress" hídrico con graves daños a la planta -- (Gale y Hagan, 1966).

Rashke (1975) nos señala que los estomas deben cumplir por lo tanto, con una doble tarea; por un lado, admitir bióxido de carbono en la planta para la fotosíntesis y, por - el otro, conservar el estado hídrico de la planta. De forma - tal, que el sistema estomatal de la planta debe tener una regpuesta efectiva a cambios medioambientales que pudieran provo - car una mayor evaporación del agua (temperatura elevada, vien - to, etc.) y, como segunda línea de defensa (muy desarrollada - en plantas con experiencia en "stress" hídrico), el control -

hormonal, relacionado a la producción de ác. abscísico (ABA) y otros compuestos, en respuesta a la disminución del potencial hídrico epidermal. (Davies, Mansfield y Orton, 1978).

En resumen, es de especial relevancia el mejorar -- estas líneas de defensa con el fin de incrementar la eficiencia de utilización del agua y con esto, hacer de la transpiración un mal que se podría evitar, Davies et al (1978).

2.- Fisiología de estomas. Principales teorías explicativas.

Actualmente sabemos que los estomas responden a muchas variaciones medioambientales, tales como luz, temperatura, concentración de  $\text{CO}_2$  del aire, cambios en los contenidos de agua, viento, cambios de pH, etc. Estos factores, en forma individual o combinados actúan para que los estomas se abran o se cierren. Además, se sabe que para que los estomas se abran, las células oclusivas (ó de cierre) deben tomar agua y consecuentemente aumentar de volumen. ¿Cual es la causa de que se realice ese transporte de agua hacia las células de cierre? Salisbury (1978), explica la posibilidad de que el potencial osmótico del protoplasma de las células oclusivas llegue a ser más pequeño que el de las células subsidiarias, de esta forma el agua entra a ellas por ósmosis provocando apertura. Pero, de todo esto surge una segunda pregunta: ¿Que es

lo que causa los cambios de potencial osmótico en estas células?

Para contestar esto último, se han propuesto muchas teorías que tratan de explicar a que se debe, en última instancia, que el estoma se abra o cierre. Entre ellas destacan dos: La teoría "clásica" ó de la fotosíntesis y la teoría del "ión potasio" (Fujino, 1967; Coudret y Ferron, 1977), a las cuales haremos referencia.

La teoría "clásica" fué propuesta primero por Sayre en 1926 (Fujino, 1967) y ha sido modificada por otros investigadores. Se basa principalmente en que la demanda fotosintética por el  $\text{CO}_2$  del citoplasma provoca un aumento del pH en las células de cierre; esto hace que la reacción de conversión de almidón a azúcar -catalizada por la enzima fosforilasa- se efectúe. De esta forma, el cambio en el pH resulta en la acumulación de azúcares y una disminución en el potencial osmótico de las células estomáticas; el agua se absorbe y, por lo tanto, el estoma se abre. Cuando no existe demanda de  $\text{CO}_2$ , este se acumula disminuyendo el pH y sucediendo los eventos anteriores en forma inversa, el estoma se cierra. Sin embargo, existen evidencias experimentales que se oponen a la aceptación de esta teoría, como el hecho de que las células estomáticas de muchas plantas no contienen almidón, además de que la reacción de conversión de almidón a glucosa resulta dema--

siado lenta para los movimientos estomatales de la mayoría de las plantas (Fujino, 1967).

En lo que respecta a la teoría "iónica del potasio", Coudret y Ferron (1977) señalan que desde 1922 Iljin y en 1943 Imamura, comprobaron sobre fragmentos de epidermis que existía un transporte activo de iones entre las células de cierre y el medio de incubación. Fujino (1967) señala, por otro lado el papel del ATP y la ATPasa en los intercambios de ión potasio ( $K^+$ ) en estas mismas células. Posteriormente en 1968, en la comprobación del método de estudio del comportamiento estomático sobre fragmentos de epidermis aisladas, Fisher comprobó la absorción del ión potasio por las células estomáticas de Vicia faba, concluyendo en la necesidad de que los discos foliares y fragmentos de epidermos necesariamente deben estar en contacto con soluciones con cloruro de potasio (KCl), para obtener respuestas satisfactorias.

En posteriores estudios (Fisher y Hsiao, 1968) se pone en evidencia una relación entre el grado de apertura estomática y la concentración de KCl del medio de incubación de los fragmentos de epidermis desprendida. Desde 1969, Humble y Hsiao señalaron que el proceso de apertura estomática en Vicia faba requiere específicamente el  $K^+$ , debido a que cationes tales como  $NH_4^+$ ,  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$ , no provocaron apertura.

Finalmente, las hipótesis formuladas por Fisher y - Hsiao (1968) sobre el papel del potasio en la apertura estomatal, permite establecer una teoría iónica explicativa de los movimientos estomáticos sugerida por Levitt desde 1967, donde se señala que el intercambio de  $K^+$  por  $H^+$  es consecuencia de una estimulación de la hidrólisis de almidón y con la consiguiente producción de aniones orgánicos compensadores de cargas. Esta interpretación posteriormente condujo a Levitt (1974) a deducir un transporte de protones en los movimientos estomáticos. Ahora bien, Willmer y Pallas (1973) detectaron la presencia de fosfoenol piruvato carboxilasa en concentraciones elevadas en el citoplasma de las células de cierre de Tulipa gesnariana y Commelina communis; esto, asociado con la acción de la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa en los cloroplastos, se traduce en la síntesis de aniones orgánicos, a los cuales se les atribuye un papel en el mantenimiento del balance iónico del citoplasma; este papel es, en efecto necesario para el intercambio de cationes.

En resumen, el estoma es un lugar de actividades intensas y relacionadas con las células vecinas. Bowling (1976), en un estudio sobre el funcionamiento estomatal de Commelina communis, atribuye un papel fundamental al ácido málico en la fisiología de intercambio iónico en estomas; y en 1977 Dittrich

y Rashke concluyen que el ácido málico lo pueden producir las células de cierre mediante tres procesos que ocurren simultáneamente:

- a) Oxidación en el ciclo de Krebs
- b) Gluconeogénesis
- c) Liberación específica por medio de otras actividades respiratorias mitocondriales.

En cuanto a esto último han sido observadas (Pearson y Milthorpe, 1974) numerosas mitocondrias altamente diferenciadas cuya proporción en las células de cierre es tres veces más elevada que el contenido de cloroplastos. Más adelante será abordada la intervención que tiene sobre este proceso el control hormonal, cuyo descubrimiento ocurrió en forma paralela a la de los movimientos del potasio y su participación en los mecanismos estomatales.

### 3.- El control de la transpiración.

Después de haber revisado el proceso de la transpiración vegetal, se comprende porque se ha pensado desde hace -- tiempo en mejorar el balance hídrico de las plantas por una -- acción que controle la transpiración. Uno de los medios de in -- tervención sobre este proceso, ha sido la aplicación sobre -- las hojas de gran número de sustancias con acción antitrans -- pirante.

El problema actual consiste en encontrar un medio -- para la conservación del agua por la planta, o sea reducir la transpiración y afectar en forma mínima el consumo de  $\text{CO}_2$  por los tejidos vegetales. Es decir, aumentar la eficiencia de -- uso de agua sin reducir el crecimiento (Trucker y Mansfield, 1971; Coudret y Ferron, 1977).

Las pruebas realizadas con el fin de establecer un control químico sobre los estomas comienzan con la utiliza--- ción de productos empleados como fungicidas tales como: el -- cloruro de clorocolina (CCC) y el acetato de fenilmercurio -- (PMA).

El cloruro de clorocolina es capaz de impedir la -- apertura normal de los estomas al disminuir la producción de ATP (Imbamba, 1973), inhibiendo la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En cuanto al PMA, son numerosas las investi--- gaciones al respecto (Davenport, 1966, 1967; Davenport, Fisher y Hagan, 1971; Coudret y Ferron, 1977). Este producto es poco móvil y permanece en la epidermis de las hojas y su acción an--- titranspirante es también de naturaleza metabólica. Según Davenport (1971) en PMA inhibe una parte de la fotofosforilación no cíclica, al nivel de la cadena de transporte de electrones que pasa por el citocromo  $b_{559}$ , actuando además sobre el ---- transporte de iones minerales, especialmente del fósforo. De

esta manera el PMA tiene acción análoga al CCC, afectando al nivel de la producción de ATP y debido a esto, impide de manera indirecta el influjo de  $K^+$  a las células oclusivas (Coudret y Ferron, 1977). Además, en otras experiencias con el PMA (Mansfield, 1978; Coudret et al, 1977) se ha comprobado que se detiene el crecimiento y se disminuye la producción de materia seca, así como otros efectos dañinos a las plantas.

A diferencia de las sustancias citadas anteriormente, se han probado otra serie de compuestos que forman películas hidrófobas, constituyendo un revestimiento externo sobre la superficie de las hojas, lo cual ocasiona un impedimento mecánico al paso del vapor de agua. Dentro de estos compuestos destaca el oxietileno decosanol, llamado comercialmente Hidrasil (Coudret y Ferron, 1977). La mayoría de estos compuestos son generalmente derivados cetílicos u oxietilénicos de polialcoholes con una composición cercana a la de la cutícula (Slatyer y Bierhuizen, 1964). Por otro lado, Pallas et al (1962) reporta que se tiene la idea de utilizar películas plásticas vínilicas, que se supone son más permeables al  $CO_2$  que al vapor de agua, no obstante todos los ensayos que han sido realizados, han resultado frecuentemente contradictorios.

En general los estudios con este tipo de sustancias si bien, la mayoría no producen resultados negativos, no resultan convincentes (Mansfield, 1978). Cabe aclarar aquí que,

de recientes investigaciones sobre estos compuestos, se ha --  
propuesto su utilización sobre otro tipo de procesos relacio-  
nados con la transpiración, tales como: transplante, toleran-  
cia a heladas y sequía, producción de frutos, conservación de  
órganos cortados, conservación de frutos, defensa contra ata-  
que de patógenos e insectos, e incluso como protector de los  
vegetales de sustancias contaminantes de la atmósfera (Coudret  
y Ferron, 1977).

#### 4.- Los antitranspirantes químicos naturales.

Las investigaciones sobre antitranspirantes se di-  
rigen en la actualidad hacia el conocimiento del papel que de  
sempañan las sustancias naturales en los mecanismos estomata-  
les. De la abundante literatura sobre la materia (Coudret y -  
Ferron, 1977), destaca la referente al ácido abscísico (ABA),  
sustancia que definitivamente parece tener un papel determi--  
nante en el funcionamiento de los estomas, por consiguiente -  
las investigaciones más relevantes sobre este compuesto serán  
expuestas principalmente en este apartado.

Uno de los primeros trabajos fué el realizado por -  
Wright y Hiron (1969), donde se reporta que, en plantas de --  
trigo los niveles endógenos de ABA aumentaban considerablemen-  
te cuando se sometían las plantas a un periodo de sequía. Pog-  
teriormente fué probado que el ABA aplicado exógenamente (so-

bre las hojas) provocaba cierre estomático (Jones y Mansfield, 1970). De la misma forma, el tratamiento con ABA a epidermis desprendida de Commelina communis inhibe la apertura estomática, impidiendo la entrada de ión potasio en las células --- guardianas (Tucker y Mansfield, 1971; Coudret y Ferron, 1977).

Un trabajo que viene a confirmar lo dicho anteriormente, con relación a la acción antitranspirante del ABA, es el de Tal e Imber (1970), en donde se reporta una variedad mutante de jitomate, el cual tiende a marchitarse rápidamente debido a que no tiene la facultad de producir ABA y por consi--- quiente, no puede cerrar sus estomas.

Otro ejemplo interesante es la observación realizada por Larqué-Saabedra y Wain (1976), sobre la relación existente entre la resistencia a la sequia de algunos cultivares de maíz y sorgo, y la producción de ABA.

En otras investigaciones sobre antitranspirantes naturales se ha postulado que el trans-farnesol (Ogunkanmi, Wellburn y Mansfield, 1974) y compuestos relacionados (Wilson y Davies, 1979) pueden afectar la liberación del ABA (almacenado en los cloroplastos) hacia el citoplasma de las células guardianas. Con esto, se sugiere que existen otras sustancias implicadas en los procesos estomatales, además del ABA.

Todo lo anteriormente anotado parece indicar que el ABA puede tener amplias posibilidades de ser utilizado como -

antitranspirante a nivel de cultivos. Sin embargo, Mansfield (1978) señala que el tiempo de duración de su efecto es pequeño (9-10 días), pero que se debe mantener la búsqueda de antitranspirantes químicos naturales, procurando que estos compuestos provoquen un cierre estomatal sin daño celular, y basandose sobre todo en el estudio de las respuestas normales del estoma.

5.- El ácido salicílico. Un inhibidor natural en las plantas.

Junto con el ABA en la actualidad un gran número de sustancias, con estructuras químicas diversas, han sido identificadas como inhibidores del crecimiento de las plantas. Dentro de estos compuestos, destaca el ácido orto-hidroxibenzoico ó ácido salicílico, clasificado dentro del grupo denominado ácidos fenólicos (Kefeli, 1978).

El grupo de compuestos derivados del radical orto-hidroxibenzoato (ión del ácido salicílico) ha recibido el término de "salicilatos" (Smith y Smith, 1966). Este conjunto engloba varios fármacos de gran antigüedad obtenidos de diferentes plantas, dentro de ellos destaca el compuesto universalmente conocido como aspirina (ácido acetilsalicílico). La presencia de salicilatos dentro de las plantas, se conoce

desde hace tiempo (Larqué-Saavedra, 1978), pero se tienen --- pocos datos acerca del papel fisiológico que desarrollan en estas.

Ha sido reportado que el ácido salicílico (AS) altera la permeabilidad de la membrana de neuronas de molusco, incrementando el paso de cationes (principalmente  $K^+$ ) y reduciendo el de aniones (Barker y Leviton, 1971). También se ha observado que el AS reduce significativamente la absorción de  $K^+$  y otros iones en raíces cortadas de Hordeum vulgare (Glass, 1974) y, al mismo tiempo (Glass y Dunlop, 1974), se comprobó su efecto en células de raíz de la misma planta, despolarizando rápidamente los potenciales de membrana. Los autores de estos últimos trabajos además consideran aspectos sobre la participación de este, y otros compuestos relacionados, en fenómenos alelopáticos. Por otra parte, el AS fué encontrado en un exudado de Xanthium (inducido a florear) y fué a su vez capaz de inducir floración en Lemna gibba cultivada bajo días cortos, sin embargo, al AS aplicado solo o en combinación con ácido giberélico y/o cinetina no indujo floración en Xanthium bajo -- días largos, por lo que se desconoce el papel de este compuesto en la floración de Xanthium (Cleland y Ajami, 1974). En -- otros trabajos (Kimura et al, 1976), el AS fué aislado de hojas de cacahuate y se probó que inhibió la elongación de plántulas de arroz causada por ácido giberélico, así como el cre-

cimiento de coleoptilos de avena en presencia de ácido Indol Acético (AIA). Por otro lado, Wri<sup>g</sup>th (1978) también menciona una serie de trabajos en donde se encuentra la participación del AS en cultivos de tejidos vegetales, donde promueve la -- formación de brotes e inhibe la de callos, en medios con AIA y cinetina. Este autor menciona que el AS probablemente ac-- túe sobre los sistemas enzimáticos que inactivan el AIA.

Larqué-Saavedra (1976) menciona que altas concentra-- ciones de un compuesto análogo del AS, el ácido acetilsalicí-- lico (ASA) son capaces de inhibir crecimiento de raíz y de -- coleoptilo de avena. También reporta (1978) que el ASA, admi-- nistrado a través del peciolo en plántulas de frijol, reduce la tasa transpiratoria. En estos experimentos se encontró que ASA  $10^{-3}M$  reduce la velocidad de transpiración en un 43%, re-- ducción equivalente al  $5 \times 10^{-5}M$  de ABA. El posible mecanismo de acción del ASA sobre este vegetal, lo explica el mismo au-- tor como la posibilidad de que afecte la permeabilidad de la membrana, aunque también sugiere que este salicilato actúe -- de manera análoga a como actúa en tejidos animales, interfi-- riendo con la fosforilación oxidativa, favoreciendo de esta -- manera, la respiración celular y aumentando los niveles de --  $CO_2$  dentro de la hoja, dando por consecuencia un cierre de es-- tomas.

En otro trabajo, Larqué-Saavedra (1979) encuentra - que el ASA cierra estomas en tiras de epidermis aisladas de - Commelina communis y, en un trabajo posterior, De León y Larqué-Saavedra (1971), reportan que el pH influye para que el - ASA cierre los estomas; de tal forma que, valores de pH entre 4 y 5.5 inducen al cierre, mientras que valores de pH superiores a 5.5 no lo hacen.

Por último, en el trabajo desarrollado por García - en 1979, se observa que el AS y el ASA promovieron la maduración fisiológica de frutos de jitomate, en forma similar a la provocada por etefón, encontrándose también que estos compuestos produjeron alteraciones en la permeabilidad de la membrana.

## MATERIALES Y METODOS.

Con el fin de cumplir nuestros objetivos el trabajo fue dividido en cuatro etapas experimentales:

1) Ensayos preliminares.- en esta etapa se trabajó con diferentes valores de pH, con el fin de probar su efecto sobre la transpiración en los explantes de frijol, debido a que es bien conocida la importancia del pH, no solamente en diversos procesos fisiológicos vegetales, sino también en la disolución y la consecuente actividad de diferentes sustancias. Además con el fin de conocer el valor de pH a ser empleado en los experimentos subsecuentes. Es interesante anotar que el pH influyó notablemente en la actividad antitranspirante del ácido acetil salicílico en el cierre estomatal de Commelina communis (De León, 1979).

2) Ensayos con las sustancias análogas del ácido salicílico.- estos experimentos fueron realizados con el fin de determinar cuales sustancias disminuyeron la tasa transpiratoria sin provocar ningún efecto fitotóxico sobre los explantes, y de esta forma utilizarlas en las dos etapas siguientes.

3) Ensayos con las sustancias con actividad sobresaliente.- en esta etapa se probaron los compuestos derivados análogos escogidos en la etapa dos, con el fin de determinar

la relación entre el efecto sobre la velocidad de transpiración y las concentraciones molares de las sustancias escogidas.

4) Ensayos para determinar la relación entre pH y actividad antitranspirante de los compuestos sobresalientes.

#### I. Bioensayo con explantes de frijol.

##### a) Descripción general.

El presente bioensayo fué desarrollado por Larqué-Saavedra (1978), y la ventaja del mismo reside en que se puede conocer en forma rápida el efecto directo de sustancias químicas sobre la transpiración, suministradas en forma endógena a través del tallo cortado.

El bioensayo consiste en obtener explantes de plantas de frijol, cortando los tallos de las plantas de frijol de una determinada edad y trabajando con la parte aérea de la misma.

Estos explantes se colocan en soluciones con un determinado tratamiento a probar y son colocados en condiciones de ambiente controlado durante un determinado intervalo de tiempo. La transpiración es estimada por pérdidas de peso de todo el sistema (la solución, el recipiente y el explante). Posteriormente el área foliar es medida y la transpiración es

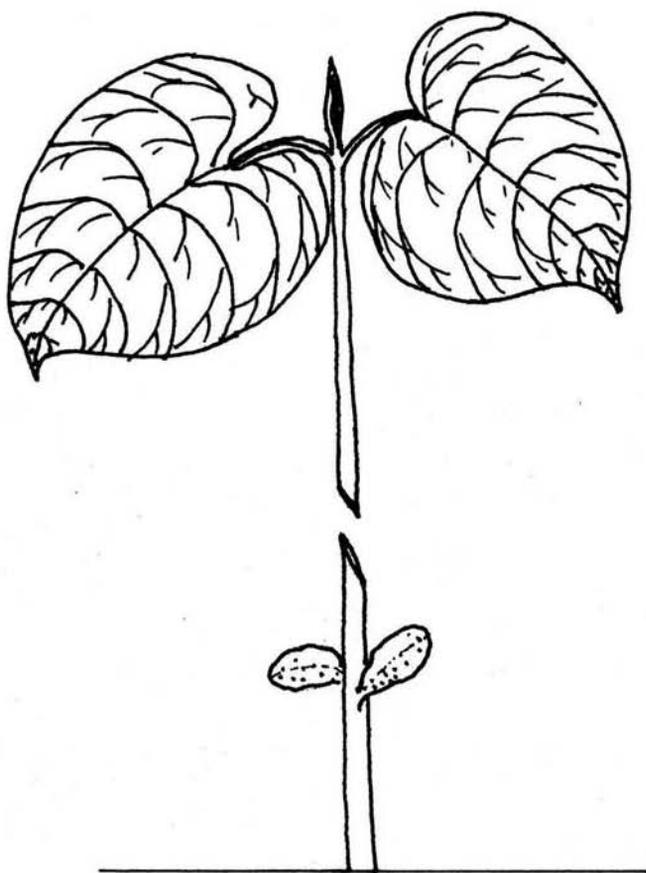
expresada como mg. de  $H_2O$  pérdida por  $cm^2$  de hoja por unidad de tiempo.

b) Condiciones del bioensayo con explantes de frijol.

Fueron utilizadas plantas jóvenes de Phaseolus vulgaris cultivar cacahuete (15-16 días después de la siembra) y con una altura aproximada de 15 cm. y cuando habían expuesto el primer par de hojas opuestas. Las semillas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados.

Las plántulas fueron cultivadas en el invernadero en charolas con vermiculita y 24 hrs. antes de iniciar el bioensayo fueron transferidas a una cámara de ambiente controlado -- con 12 hrs. de fotoperiodo, con luz proporcionada por tubos fluorescentes y lámparas incandescentes de 40 W General Electric, con una intensidad de  $150 \mu E, m^{-2}, seg^{-1}$ . La temperatura fué de  $23^{\circ}C$  en ambos fotoperiodos.

El corte de los tallos para la obtención de los explantes se realizó bajo el agua (con la finalidad de no romper la columna de agua de los vasos en el xilema) aproximadamente 1 cm. arriba de los cotiledones y en forma tangencial (fig. 1). La hora en que se iniciaron los experimentos fué cuando comenzaba el periodo de luz de las cámaras de crecimiento (8.00 -- hrs. A.M.). Posteriormente cada uno de los explantes se colo-



**FIGURA 1.** Corte de las plántulas de frijol para la obtención de explantes. 1 cm arriba de los cotiledones y en forma tangencial.

caron en frascos de vidrio de 100 ml. con las soluciones a probar. Los frascos permanecieron destapados debido a que fué -- comprobado que la evaporación en estas condiciones era despreciable (Larqué-Saavedra, 1978).

El sistema entero fué pesado (peso inicial) en una balanza de platillo superior Sartorius 2 354 (1000 0.01 gr.) y colocado en la cámara de ambiente controlado con las condiciones de luz y temperatura señaladas anteriormente en un arreglo completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento.

Todos los experimentos fueron colocados en el tratamiento durante un periodo de 24 hrs., al final de las cuales se procedió a obtener el peso final y posteriormente el área foliar de todos los explantes en un medidor de área foliar -- Todio (HAYASHI DENKO CO) Tipo AAM-5. La transpiración fué calculada de la forma siguiente: (peso inicial-peso final/área foliar), y expresada en mg. de agua pérdida por  $\text{cm}^2$  de hoja - por 24 horas.

## II. Ensayos preliminares con pH.

Antes de la realización de los estudios propios de la presente investigación, se desarrollaron una serie de experimentos con el fin de establecer el efecto del pH inicial sobre la tasa de transpiración de los explantes de frijol.

Las soluciones fueron preparadas y ajustadas al pH correspondiente con ácido clorhídrico 1 M ó hidróxido de potasio 1 M. El pH de las soluciones se corroboró antes y después de los experimentos con un potenciómetro TCA Modelo HM 5B.

El número de experimentos, los valores de pH empleados y el número de repeticiones de cada tratamiento se muestran en el cuadro 1.

### III. Experimentos con las sustancias análogas del ácido salicílico.\*

Estos experimentos consistieron en probar 16 sustancias derivadas del ác. salicílico a una sola concentración -- ( $10^{-3}$  M) y pH de 4.5. Las 16 sustancias probadas las podemos ordenar de la manera siguiente:

A) Derivados donde se ha bloqueado el grupo funcional hidroxilo de la molécula de ác. salicílico, con otro grupo de átomos (Fig. 2a.).

B) Derivados obtenidos a partir de un bloqueo en -- ambos grupos funcionales (hidroxilo y carboxilo). (Fig. 2b).

C) Derivados obtenidos a partir de un bloqueo en el grupo carboxilo de la molécula de ác. salicílico (Fig. 2c.).

D) Derivados obtenidos a partir de la introducción de nuevos grupos funcionales a la molécula de ác. salicílico (Fig. 2d.).

\* Se agradece a los doctores Carlos Ríos y Jorge Reyes de la División de Estudios Superiores de la Facultad de -- ciencias Químicas el habernos proporcionado algunos de los análogos utilizados en la presente investigación

	Número de experimentos.	Compuesto (Ver Fig. 2)	Concentración.	Número de repeticiones.	pH inicial
ETAPA 1	2	-	-	6	3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5
ETAPA 2	2	11	$10^{-3}M$	6	4.5
	2	1	$5 \times 10^{-4}M$	6	4.5
	2	1	$10^{-4}M$	6	4.5
	2	10	$10^{-3}M$	6	4.5
	2	4*	$10^{-3}M$	6	9.5
	2	4*	$10^{-4}M$	6	9.5
	2	4*	$10^{-5}$ y $10^{-6}$	6	4.5
	2	14	$10^{-3}M$	6	4.5
	1	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13	$10^{-3}M$	6	4.5

CUADRO 1. Clasificación de los experimentos realizados en la Etapa preliminar y en la etapa 2. \* Algunas plantas dañadas (fitotoxicidad).

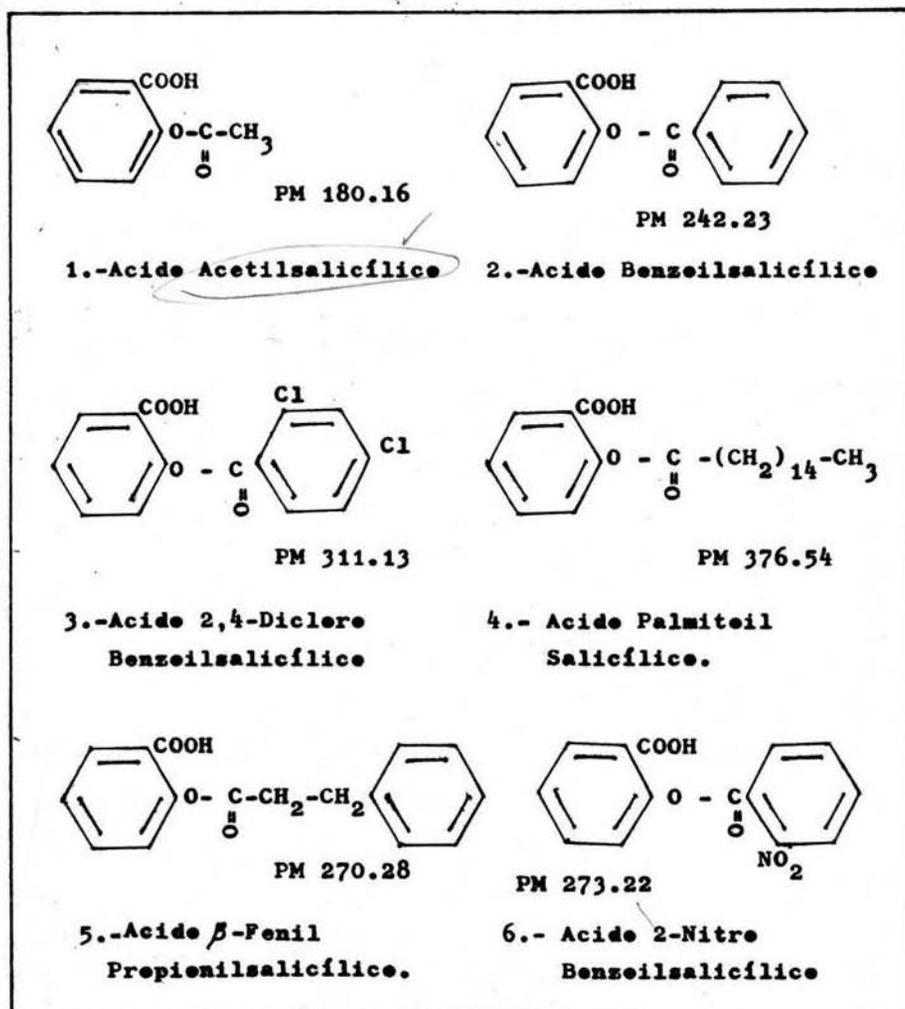
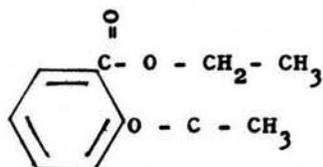


FIGURA 2a. Análogos del Acide Salicilice. Derivados donde se ha bloqueado el grupo funcional hidroxilo, con otro grupo de átomos.

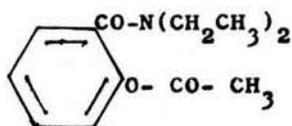
7.- Etil Salicilate de Metile.

PM 208.21



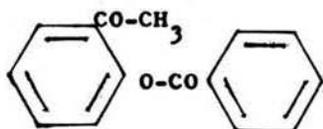
8.- N,N-Dietil Salicilate de metile.

PM 235.28



9.- Benzil Salicilate de metile.

PM 168.15



10.- Salicina. ✓

PM 286.3

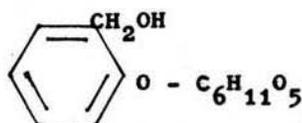


FIGURA 2b. Análogos del Acide Salicilico. Derivados con ambos grupos funcionales (hidroxilo y carboxilo) bloqueados.

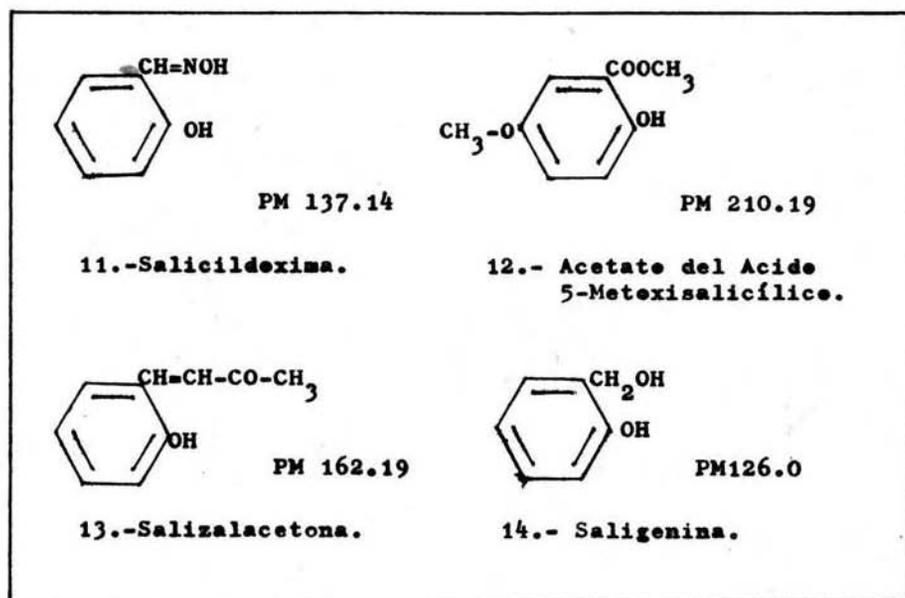


FIGURA 2c. Análogos del Acide Salicílico. Derivados con un bloque en el grupo carboxilo.

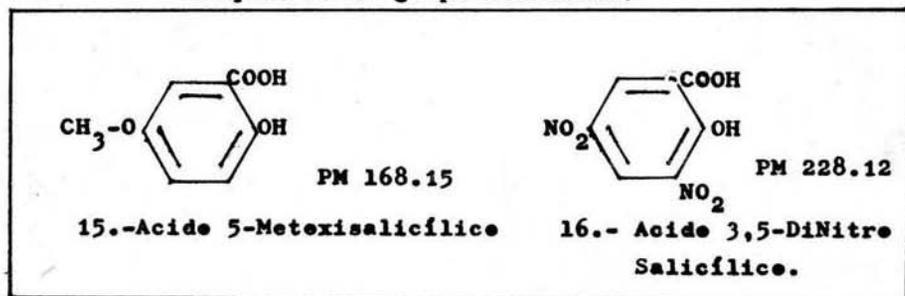


FIGURA 2d. Análogos del Acide Salicílico. Derivados con uno o más grupos funcionales nuevos.

En los primeros experimentos se utilizó un testigo adicional con  $\text{ác. acetilsalicílico } 5 \times 10^{-4}\text{M}$ . El número de experimentos en esta etapa y el número de repeticiones se encuentran ordenados en el cuadro 1.

#### IV. Experimentos con diferentes concentraciones molares.

En esta etapa experimental se probaron algunas sustancias análogas del  $\text{ác. salicílico}$  que resultaron tener un efecto notable sobre la transpiración de los explantes en la etapa anterior. Las concentraciones variaron desde  $10^{-3}$  a  $10^{-8}\text{M}$  (Cuadro 2).

#### V. Experimentos con diferentes valores de pH.

En esta etapa fueron probadas las mismas sustancias escogidas a diferentes valores de pH de las soluciones, desde 3.5 hasta 8.5. El pH del tratamiento testigo fué de 4.5.

Compuesto	Concentraciones molares	pH inicial	Número de experimentos
Salicildoxima	$10^{-6}$ , $10^{-5}$ , $10^{-4}$ , $10^{-3}$ M.	4.5	2
Acido Palmítico y salicílico	$10^{-8}$ , $10^{-7}$ , $10^{-6}$ , $10^{-5}$ , $10^{-4}$ M.	9.5	2
Saligenina	$10^{-7}$ , $10^{-6}$ , $10^{-5}$ , $10^{-4}$ , $10^{-3}$ M.	4.5	2

Cuadro 2. Clasificación de los experimentos realizados en la etapa experimental 3.

## R E S U L T A D O S

## A) Resultados de los ensayos preliminares.

Con respecto al bioensayo con explantes, conviene mencionar que, la duración, el corte del tallo, la hora de inicio y el número de repeticiones por tratamiento de los experimentos, fueron obtenidos de investigaciones anteriores, y con estas condiciones se obtuvieron buenas respuestas de velocidades de transpiración de los explantes de frijol (Larqué-Saavedra, comunicación personal).

En el cuadro 3 aparecen los datos de los dos experimentos preliminares con diferentes valores de pH y en la figura 3 se observa el comportamiento de la tasa transpiratoria, con respecto a diferentes valores de pH. Por tanto se observa que no existe diferencia entre los tratamientos con pH en el rango experimentado (3.5 - 8.5).

A partir de estos resultados se sugirió continuar los experimentos con un pH de 4.5, debido a que se ha demostrado que a este pH se observan buenos resultados en trabajos con tiras de epidermis, provocando buenas respuestas de apertura estomatal (Larqué-Saavedra, 1978).

B) Resultados de los experimentos con las sustancias análogas del ácido salicílico.

CUADRO 3. Efecto del pH sobre la transpiración de explantes de frijol. Promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estandar. Transpiración( $\text{mgH}_2\text{O cm}^{-2}24 \text{ hr}$ ).

pH	3.5	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5
Experimento 1	252 $\pm$ 12	248 $\pm$ 7	272 $\pm$ 17	248 $\pm$ 8	244 $\pm$ 3	241 $\pm$ 6
Experimento 2	229 $\pm$ 6	226 $\pm$ 24	218 $\pm$ 20	212 $\pm$ 12	221 $\pm$ 16	245 $\pm$ 7

CUADRO 4. Efecto de análogos del ácido salicílico sobre transpiración de frijol. Promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estandar ( $\text{mgH}_2\text{O cm}^{-2}24 \text{ hr}$ ).

Experimento:	1	2	3	4	5	6
Testigo	267 $\pm$ 10	205 $\pm$ 12	233 $\pm$ 11	228 $\pm$ 6	216 $\pm$ 11	206 $\pm$ 7
SO* ( $10^{-3}\text{M}$ )	156 $\pm$ 5	135 $\pm$ 6	-	-	-	-
ASA* ( $10^{-4}\text{M}$ )	-	-	-	199 $\pm$ 5	-	-
" ( $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ )	215 $\pm$ 9	-	-	-	-	-
Sc* ( $10^{-3}\text{M}$ )	-	181 $\pm$ 4	184 $\pm$ 4	-	-	-
APS* ( $10^{-3}\text{M}$ )	-	-	86 $\pm$ 10	-	-	-
" ( $10^{-4}\text{M}$ )	-	-	-	71 $\pm$ 3	-	-
" ( $10^{-5}\text{M}$ )	-	-	-	-	115 $\pm$ 10	-
Sg* ( $10^{-3}\text{M}$ )	-	-	-	-	155 $\pm$ 8	189 $\pm$ 8

\* SO.-salicildoxima; ASA.-ácido acetilsalicílico; SC.-salicina; APS.-ácido palmitoilsalicílico; Sg.-saligenina.

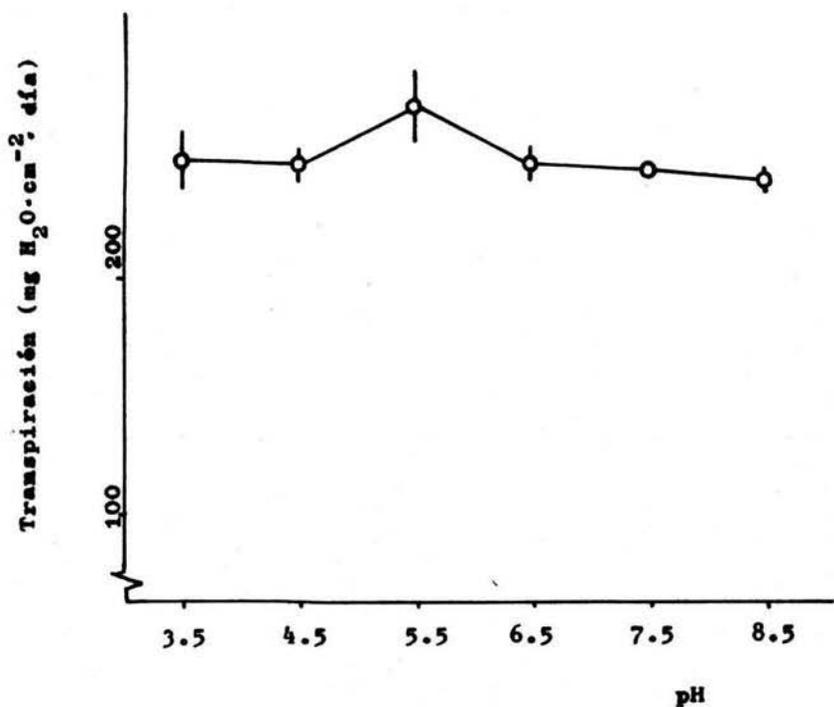


FIGURA 3. Efecto de diferentes valores de pH sobre transpiración en explantes de frijol. Valores promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estandar.

En el cuadro 4 se muestran los datos con respecto a esta etapa experimental, observandose efecto antitranspirante de cuatro compuestos: el ácido acetilsalicílico (ASA), cuyo efecto antitranspirante es bien conocido (Larqué-Saavedra, -- 1978); Salicildoxima  $10^{-3}$  M; ácido palmitoil salicílico; y Saligenina  $10^{-3}$  M.

En la figura 4 se muestra en forma gráfica el efecto sobre la tasa transpiratoria de salicildoxima  $10^{-3}$  M, en comparación al del ASA  $5 \times 10^{-4}$  M. Se observa una reducción notable de la transpiración (41%), con respecto al tratamiento testigo.

En la figura 5 se observa un efecto antitranspirante mucho mayor que el ocasionado por salicildoxima. Se trata en este caso del ácido palmitoilsalicílico  $10^{-3}$  M. Cabe agregar que debido a su alto peso molecular y sus propiedades hidrofóbicas (fig. 2a), la solubilización de este compuesto solo pudo realizarse en medio alcalino y el pH final fué de 9.5. Al final del experimento, algunos de los explantes mostraron signos de marchitez en las hojas, no observándose esto en el tratamiento testigo (agua destilada al mismo pH).

Otros experimentos con este compuesto son mostrados en la figura 6. En estos se utilizan concentraciones menores de ácido palmitoil salicílico ( $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M), a un pH menor también (4.5), observándose aún un efecto antitranspirante --

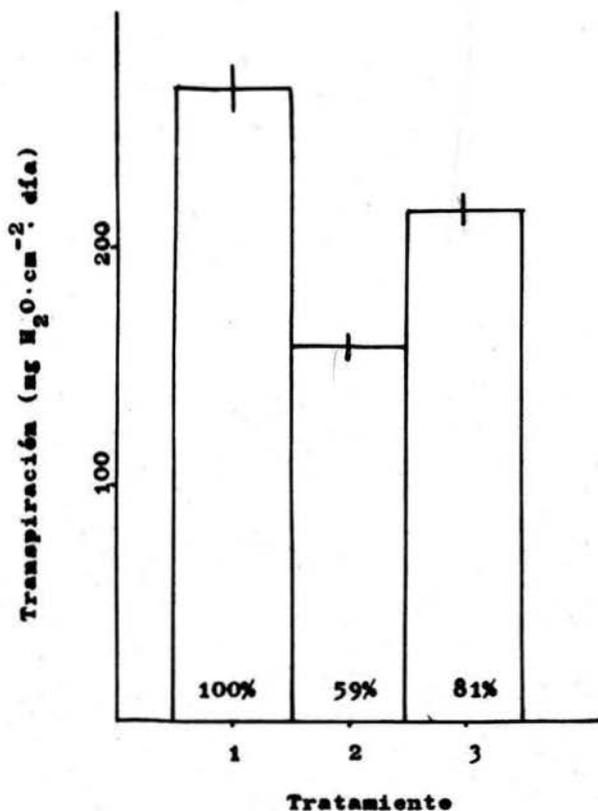


FIGURA 4. Efecto de análogos del Acido Salicílico sobre transpiración de frijol. 1.- Testigo; 2.- Salicildexima  $10^{-3}$ M; 3.- Acido Acetilsalicílico  $5 \times 10^{-4}$ M. Valores promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estándar.

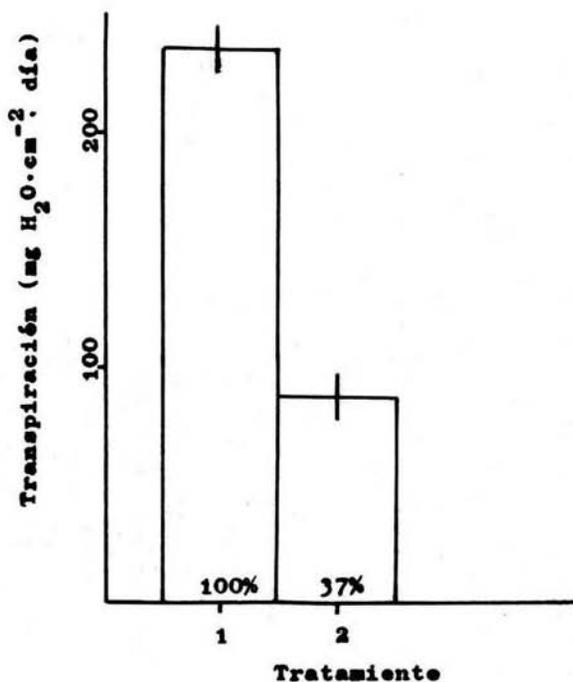


FIGURA 5. Efecto de análogos del Acido Salicilico sobre transpiración de frijol. 1.- Testigo; 2.- Acido Palmitoil Salicilico  $10^{-3}$  M. pH 9.5. Valores promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estandar.

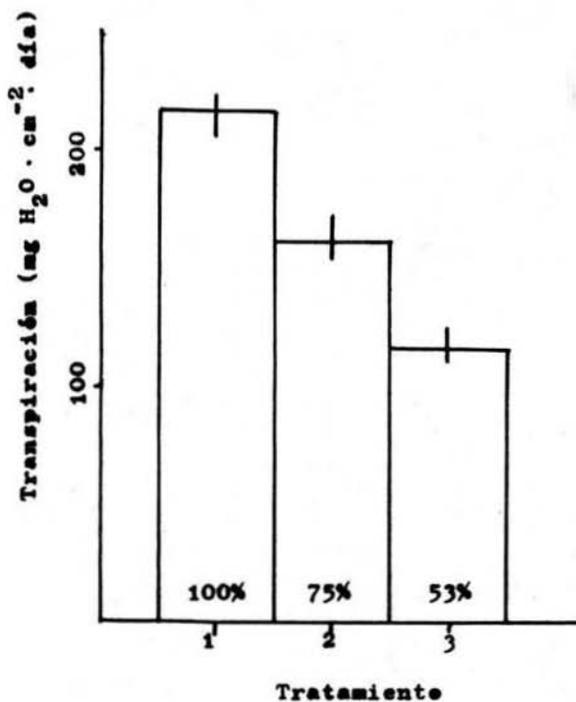


FIGURA 6. Efecto de análogos del Acido Salicilico sobre transpiración de frijol. 1.- Testigo; 2.- Acido Palmiteil Salicilico  $10^{-6}$ M; 3.- Acido Palmiteil Salicilico  $10^{-5}$ M. pH 4.5. Valores promedio de 6 repeticiones  $\pm$  error estandar.

significativo. No obstante, algunos de los explantes también se mostraron dañados.

En lo que respecta al último compuesto con actividad biológica sobresaliente, en la figura 7 se muestra el efecto sobre la transpiración de saligenina  $10^{-3}$  M (fig. 2c), - la cual muestra una reducción de 44%, similar a la observada con salicildoxima.

Por último, conviene mencionar que la mayoría de -- los compuestos análogos del AS, produjeron síntomas de toxicidad a los explantes de frijol, sobre todo los que presentaban la función ácida (grupo carboxilo). La fitotoxicidad se mostraba en forma de necrosis y marchitamiento de las hojas.

Hubo, sin embargo algunos compuestos que no produjeron ningún efecto aparente sobre los explantes (salizalacetona, entre otros.)

Debido a esto último, los experimentos subsiguientes solo continuaron con las sustancias con actividad sobresaliente (redujeron transpiración pero no produjeron fitotoxicidad) a excepción del ASA, el cual solo fué utilizado como testigo en los experimentos anteriores.

C) Resultados de los experimentos de salicilatos suministrados en diferentes concentraciones molares.

En el cuadro 2 se muestra la clasificación de los -

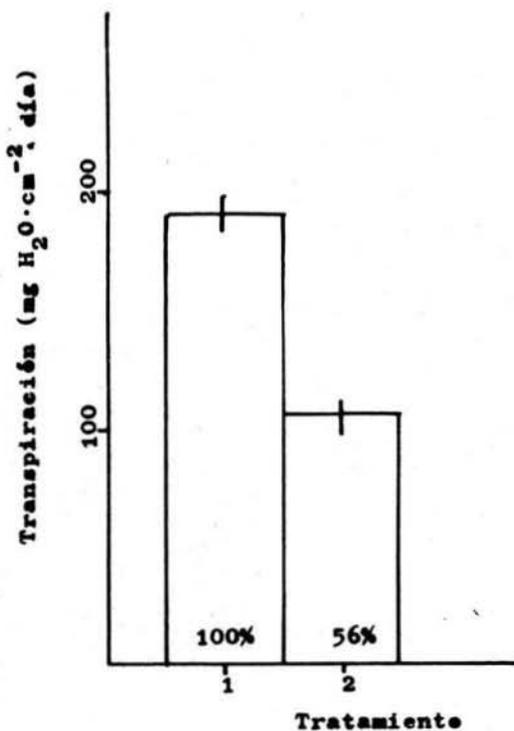


FIGURA 7. Efecto de análogos del Acido Salicílico sobre transpiración de frijol. 1.- Testigo; 2.- Salicilato  $10^{-3}$ M. Valores promedio de 6 repeticiones ± error estandar.

experimentos que se realizaron en esta etapa experimental. En el se observan además, las diferentes concentraciones molares probadas y en el cuadro 5 se muestran los datos obtenidos de los diferentes experimentos. Se muestra que el pH probado para el ácido palmitoil salicílico fué de 9.5, el cual, como ya ha sido mencionado, corresponde al valor de pH donde existe - mejor solubilidad del compuesto.

En la figura 8 se presentan las tres curvas de tasa transpiratoria, con respecto a la concentración molar. En ella se puede apreciar la reducción drástica de la transpiración - debida al ácido palmitoil salicílico en las concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$ M. Sin embargo, en concentraciones menores ( $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ M), por el contrario, la velocidad de transpiración aumenta.

Las curvas que corresponden a salicildoxima y a saligenina muestran una tendencia semejante. No obstante, salicildoxima reduce la transpiración a partir de una concentración  $10^{-4}$ M, en cambio saligenina solo reduce la transpiración a la concentración de  $10^{-3}$ M.

D) Resultados de los experimentos obtenidos a diferentes valores de pH.

En esta etapa experimental (cuadro 6) los datos muestran que el pH afecta poco el comportamiento antitranspirante

	Salicildoxima		Acido Palmitoico salicilico		Saligenina	
	1	2	1	2	1	2
testigo	177 <sup>±</sup> 10	169 <sup>±</sup> 10	138 <sup>±</sup> 8	134 <sup>±</sup> 8	162 <sup>±</sup> 4	174 <sup>±</sup> 4
10 <sup>-8</sup> M	-	-	181 <sup>±</sup> 32	183 <sup>±</sup> 20	-	-
10 <sup>-7</sup> M	-	-	152 <sup>±</sup> 12	180 <sup>±</sup> 4	165 <sup>±</sup> 3	164 <sup>±</sup> 4
10 <sup>-6</sup> M	170 <sup>±</sup> 2	167 <sup>±</sup> 4	82 <sup>±</sup> 9	169 <sup>±</sup> 20	169 <sup>±</sup> 10	168 <sup>±</sup> 6
10 <sup>-5</sup> M	178 <sup>±</sup> 8	173 <sup>±</sup> 9	81 <sup>±</sup> 6	94 <sup>±</sup> 6	165 <sup>±</sup> 5	167 <sup>±</sup> 6
10 <sup>-4</sup> M	155 <sup>±</sup> 5	164 <sup>±</sup> 9	52 <sup>±</sup> 9	116 <sup>±</sup> 13	160 <sup>±</sup> 6	167 <sup>±</sup> 6
10 <sup>-3</sup> M	117 <sup>±</sup> 2	121 <sup>±</sup> 6	-	-	157 <sup>±</sup> 10	134 <sup>±</sup> 7

CUADRO 5. Efecto de diferentes concentraciones de salicilatos sobre la transpiración de frijol. Promedio de 6 repeticiones <sup>±</sup> error estandar. Transpiración (mgH<sub>2</sub>O cm<sup>-2</sup>24 hr).

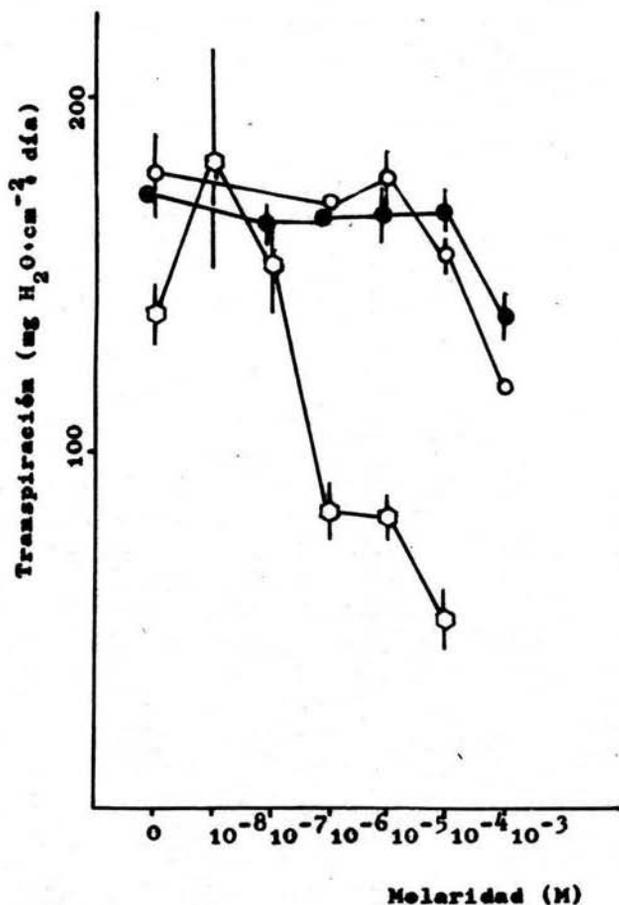


FIGURA 8. Efecto de diferentes concentraciones molares de análogos del Acido Salicílico. Experimentos independientes, valores promedio  $\pm$  error estándar.  $\circ$  Salicildexima;  $\square$  Acide Palmiteil Salicilico;  $\bullet$  Saligemina.

CUADRO 6. Efecto de diferentes valores de pH de los salicilatos sobre transpiración de frijol. Promedio de 6 repeticiones<sup>±</sup> error estandar<sup>±</sup>.

pH	Salicildoxima		Acido palmitoil salicilico		Saligenina	
	1	2	1	2	1	2
2.5	178 <sup>±</sup> 7	180 <sup>±</sup> 7	180 <sup>±</sup> 6	-	160 <sup>±</sup> 9	181 <sup>±</sup> 12
3.5	124 <sup>±</sup> 15	115 <sup>±</sup> 7	96 <sup>±</sup> 8	-	117 <sup>±</sup> 3	163 <sup>±</sup> 22
4.5	130 <sup>±</sup> 8	127 <sup>±</sup> 17	86 <sup>±</sup> 7	-	107 <sup>±</sup> 3	128 <sup>±</sup> 17
5.5	125 <sup>±</sup> 4	118 <sup>±</sup> 8	89 <sup>±</sup> 3	-	105 <sup>±</sup> 6	135 <sup>±</sup> 17
6.5	129 <sup>±</sup> 6	115 <sup>±</sup> 4	95 <sup>±</sup> 8	-	103 <sup>±</sup> 6	121 <sup>±</sup> 15
7.5	123 <sup>±</sup> 5	117 <sup>±</sup> 7	111 <sup>±</sup> 13	-	83 <sup>±</sup> 6	88 <sup>±</sup> 5

\*Transpiración (mgH<sub>2</sub>O cm<sup>-2</sup> 24 hr).

de los tres compuestos. El ácido palmitoil salicílico fué empleado a concentraciones de  $10^{-6}$ M.

Puede observarse, sin embargo, la tendencia del ácido palmitoil salicílico, el cual a pH alcalino (mayor solubilidad) reduce su efecto antitranspirante. Por el contrario, -saligenina aumenta su efecto sobre la transpiración en el pH de 7.5 (fig. 9).

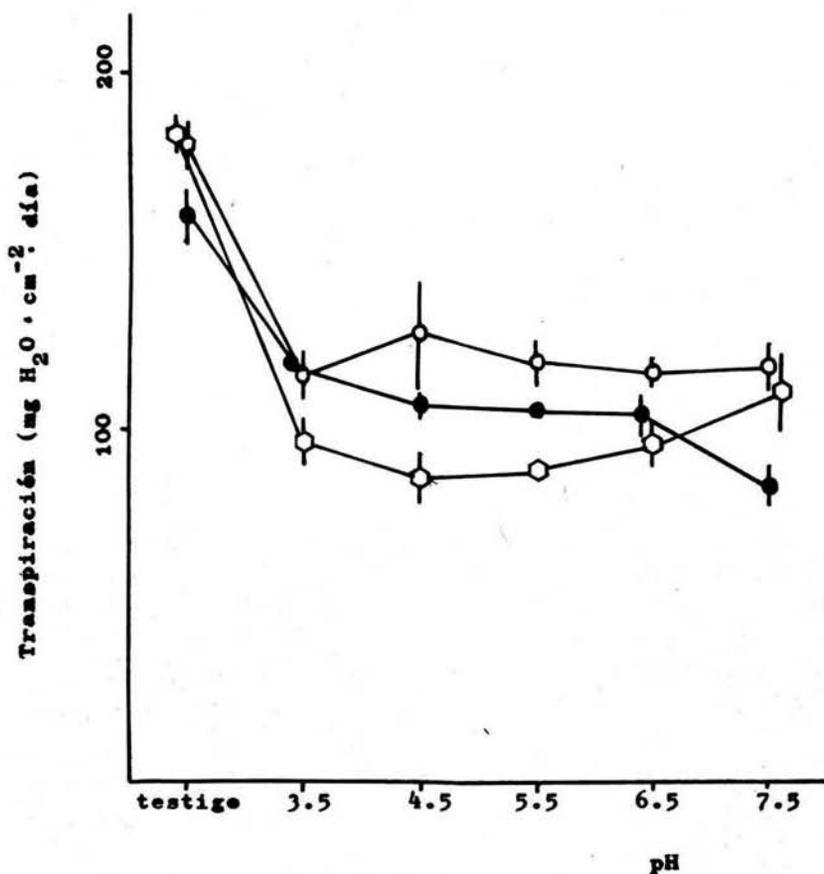


FIGURA 9. Efecto de diferentes valores de pH de los análogos de ácido salicílico sobre la transpiración de frijol. ○ Salicildexima  $10^{-3}$  M; ◻ Acide Palmiteil Saliciflice  $10^{-6}$  M; ● Saligemina  $10^{-3}$  M.

## DISCUSION

## 1.- Ensayos preliminares.

Los resultados de los experimentos en esta primera etapa, señalan que el pH se afecta en forma significativa a la tasa transpiratoria en este bioensayo con explantes de frijol. No obstante en otros tipos de bioensayos, como en el caso del que utiliza epidermis desprendida de Commelina communis, se ha demostrado que varían las respuestas de apertura estomatal a diferentes valores de pH (Larqué-Saavedra, 1978).

Por otro lado, en estudios realizados para estudiar la acción de diversas sustancias sobre la apertura estomática en el bioensayo de epidermis desprendida, arrojan resultados que varían con el pH del medio en donde se incuban estas tiras (Ogunkanmi et al, 1974; Larqué-Saavedra, 1979).

De León (1979) reporta que el ASA  $10^{-2}M$  provocó dos clases de respuestas en relación al medio en que se incubaron las tiras de epidermis:

a) Con valores de pH por arriba de 5.5 no provocó reducción de apertura estomatal.

b) Con valores de pH iguales o menores a 5.5, si disminuye la apertura estomatal.

Esto último, y de acuerdo con De León (1979), nos -

lleva a pensar que el pH puede llegar a afectar la actividad de las sustancias a probar en los bioensayos, principalmente incrementando o disminuyendo la solubilidad por cambios en su estructura química.

Debido a todo esto, se consideró la última etapa, - en la cual se probó el efecto del pH en las respuestas de velocidad de transpiración, con los salicilatos que mostraron efecto antitranspirante sobresaliente.

2.- Efecto de los análogos del ácido salicílico sobre la transpiración de frijol.

En esta etapa nos encontramos con tres tipos de respuestas causadas por los salicilatos:

a) Ningún efecto aparente sobre la tasa transpiratoria de los explantes de frijol.

b) Fitotoxicidad, la cual incluye necrosis y marchitamiento de las hojas de los explantes.

c) Reducción significativa de la velocidad de transpiración de los explantes de frijol.

Si bien en los resultados solo se incluyen los datos de los salicilatos que afectaron en forma sobresaliente la --

transpiración, conviene mencionar algunas cuestiones relevantes acerca de los resultados mostrados por la mayoría de los compuestos probados.

Entre los análogos que mostraron el primer tipo de respuesta, se encontró que ninguno de ellos tenía grupo carboxilo. Entre ellos destaca Salicina, que se encuentra en forma natural en las plantas, principalmente en especies del género Salix (Morrison, 1976; Soto, comunicación personal). A pesar de esto y su gran solubilidad no mostró ningún efecto significativo sobre la transpiración.

El segundo tipo de respuesta lo produjeron la mayoría de los compuestos probados, entre los cuales sobresalen los que mantienen el grupo funcional ácido ó carboxilo, en su molécula. Estos últimos compuestos fueron los que ocasionaron los daños más severos en los explantes en las concentraciones probadas.

Cabe mencionar, que el ácido salicílico probado en estos bioensayos en similar concentración provoca también -- daños a los explantes, y que el cierre causado por ASA  $10^{-2}M$  en los valores de pH entre 4 y 5.5 estuvo mediado por daño a las células estomáticas (De León, 1979.)

Con respecto al último tipo de respuesta de reduc--

ción notable de la transpiración, salicildoxima y saligenina parecen mostrar un comportamiento muy semejante. En primer -- lugar ambos compuestos fueron clasificados en un mismo grupo (Fig. 2c.), es decir, ambos muestran ausencia del grupo fun-- cional carboxilo. En cambio, como se verá mas adelante, presen-- tan otro grupo menos polar, que sustituye el grupo carboxilo original, con propiedades tambien menos activantes para el -- anillo bencénico.

Por otro lado, en las pruebas con diferentes concen-- traciones de salicilatos, salicildoxima mostró efecto anti--- transpirante a concentraciones de  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ M y saligenina -  $10^{-3}$ M redujo la tasa de transpiración en forma más acentuada a pH de 7.5, en todos los experimentos.

Con respecto a esto último, se sugiere que hacen -- falta trabajos enfocados al estudio del comportamiento químico de estos compuestos en solución y a diferentes valores de pH, no solo en experimentos con explantes, sino tambien en un tipo de bioensayo más directo, tal como el de tiras de epider-- mis de Commelina communis, para conocer su efecto directamen-- te sobre los estomas.

Por lo que respecta al tercer compuesto con caracte-- rísticas antitranspirantes, el ácido palmitoil salicílico, -- los resultados de su efecto aparentemente excepcionales, pare

cen estar mediados por daño a los vegetales.

Primeramente sus características físicas indican -- que la solubilidad en agua es virtualmente nula. La parcial solubilización se obtiene alcalinizando el medio, con la formación de la sal del ácido palmitoil salicílico. No obstante, el comportamiento anfipático de estas moléculas no tiende a formar soluciones verdaderas, sino grupos dispersos llamados micelas, las cuales se dispersan independientemente en el medio acuoso (Morrison, 1976).

Por otra parte las plántulas tratadas con el ácido palmitoil salicílico, se mostraron dañadas, y si bien no tenían señales de necrosis, mostraban signos de marchitamiento de las hojas.

Esto hace pensar que debido a la poca solubilidad del compuesto, había una depositación del mismo en los vasos del xilema impidiendo de esta forma la conducción normal del tallo hacia las hojas. Apoyando esto último, se encuentra el hecho de que los tallos de los explantes mostraban taponamiento de los vasos conductores, al término del experimento.

Todo lo anteriormente señalado, sugiere que la reducción de la transpiración debida al ácido palmitoil salicílico se debió a dos tipos de efectos:

a) La reducción de la tensión superficial de los vasos del xilema, por la formación de micelas y con la consigui

ente ruptura de la continuidad de los vasos.

b) Efecto mecánico por obstrucción de los vasos del xilema por la depositación del compuesto en las paredes de -- los mismos. Sobre esto último es interesante observar que a -- concentraciones bajas del compuesto ( $10^{-6}M$ ) y a un valor de pH de 7.5 la acción antitranspirante de este compuesto disminuye (Fig. 9).

3.- Posible mecanismo de acción de los salicilatos sobre la tasa de transpiración. Relación entre estructura qu mica y la actividad biológica.

Ya se mencionó que los estudios sobre la función de los salicilatos en las plantas están en sus comienzos, por lo que resulta difícil tratar de explicar el posible mecanismo -- de acción de estos compuestos.

Larqué-Saavedra (1978) propone que la reducción de la tasa transpiratoria de P. vulgaris, causada por ASA, es de bida a que este compuesto puede actuar como lo hace en tejidos animales, interfiriendo sobre la fosforilación oxidativa y es timulando la respiración. Todo esto trae por concecuencia un incremento en los niveles internos de  $CO_2$  de la hoja, lo que provocaría la salida de  $K^+$  de las células oclusivas y el co-- rrespondiente cierre estomatal.

De León (1979) comenta al respecto, que la inducción del 30% en el cierre estomatal en el bioensayo de epidermis no desprendida de Commelina, tratada con ASA, puede ser producido indirectamente y propone que este mecanismo de cierre estomatal, por modulación del  $CO_2$  interno de la hoja, resulta novedoso y conviene estudiar el efecto del ASA sobre el punto de compensación de  $CO_2$ , apoyando de esta forma lo discutido por Larqué-Saavedra (1978).

Otra hipótesis acerca del modo de acción de los salicilatos en las plantas es la que relaciona estos compuestos con el cambio en la permeabilidad de la membrana. Ha sido reportado en algunos trabajos que el AS altera definitivamente la permeabilidad de la membrana (Barker y Leviton, 1971; Glass y Dunlop, 1974; García 1979).

La manera posible de acción del AS y sus análogos - podría ser la presencia de cargas, lo que haría a estos compuestos semejantes con los aminoácidos, los cuales son capaces de atravesar la membrana y llegar a los organelos (García 1979; Lehninger, 1978). Esto último nos hace pensar nuevamente en lo sugerido por Wilson y Davies (1979) de que ciertos compuestos, tales como el transfarnesol, son capaces de influir en la liberación de ABA almacenado en cloroplastos; posiblemente los salicilatos actúan a este nivel, interfiriendo

de forma indirecta en la apertura estomatal.

Por otra parte, es conveniente explicar las características de la estructura molecular del AS y sus análogos.

En primera, el AS es una molécula muy peculiar, ya que actúa como fenol y como ácido. Además el grupo hidroxilo ( $^{-}\text{OH}$ ) de la molécula actúa como activante del anillo bencénico, mientras que el carboxilo ( $^{-}\text{COOH}$ ) lo hace como fuerte desactivador (Morrison, 1976). En segundo lugar la solubilidad del AS (0.22 g/100g de  $\text{H}_2\text{O}$ ) es mucho menor que la de las moléculas con solo uno de los sustituyentes. Así tenemos que la solubilidad del ácido benzoico es de 0.34 g/100g de  $\text{H}_2\text{O}$  y la del fenol de 9.3 g/100 de  $\text{H}_2\text{O}$ . Esto es debido a que por la posición orto de los grupos funcionales, hace que ambas interacciones entre sí, y de esta manera forman puentes de hidrógeno entre ellos antes que con el agua (Morrison, 1976).

En cuanto a la relación existente entre la estructura molecular de los salicilatos y su actividad biológica, en particular sobre este bioensayo de explantes, nos sugiere a pensar en tres puntos fundamentales:

a) La posición orto es fundamental en la molécula para actuar como inhibidor. Esto se apoya en el hecho de que el AS provoca mayor efecto inhibitorio y de despolarización de la membrana que otros compuestos isómeros, tales como el ácido p-hidroxibenzoico (Glass, 1974; Glass y Dunlop, 1974).

b) El grupo carboxilo no es esencial en la molécula para su acción antitranspirante, ya que los compuestos con actividad sobresaliente sobre la transpiración, saligenina y salicidoxima carecen de él.

c) La molécula debe poseer en lugar del grupo funcional carboxilo, un grupo menos polar y acción desactivadora más débil, tal como sucede con saligenina y salicildoxima --- ( $-\text{CH}_2\text{OH}$  y  $-\text{CHNOH}$  respectivamente).

Por último resta considerar que los resultados obtenidos en este trabajo, si bien no proporcionan suficiente información sobre el papel fisiológico que puedan desarrollar los análogos del AS, en cambio, amplían las perspectivas de que estos compuestos sean inhibidores naturales en las plantas.

## C O N C L U S I O N E S

1.- Los compuestos análogos del AS, saligenina y -- salicildoxima en concentraciones de  $10^{-3}M$  reducen la transpiración de los explantes de frijol en un 40% aproximadamente - sin daño aparente de las plantas.

2.- La reducción de transpiración debida al ácido - palmitoil salicílico estuvo mediada por daño a las plantas, debido a la obstrucción de la conducción a través del xilema.

3.- Aparentemente el pH no influye en la acción antitranspirante de salicildoxima  $10^{-3}M$ . En cambio saligenina -  $10^{-3}M$  aumenta su efecto antitranspirante a un pH alcalino --- (7.5).

4.- Se sugiere (en base a la estructura química) -- que el posible mecanismo de acción de estos compuestos es, como en el caso del AS, a nivel de alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular y de organelos.

5.- Con respecto a la relación estructura química - actividad biológica se sugiere que:

a) La posición orto de los grupos funcionales de la molécula es fundamental en la acción inhibitoria de los compuestos.

b) El grupo carboxilo no es esencial, sino que por el contrario, resulta dañino a los explantes.

c) Es necesaria la sustitución del grupo funcional carboxilo de la molécula de AS por un grupo desactivador más débil.

## B I B L I O G R A F I A

- Barker, J. L. y H. Levitan. 1971. Salicylate: effect on membrane permeability of molluscan neurons. Science -- 172: 1245-1247.
- Begg, J. E. y N. C. Turner. 1976. Crop water deficits. Advan. Agron. 28: 161-217.
- Bierhuizen, J. F. 1976. Irrigation and water use efficiency. In: Water and Plant Life. Ed. by O. L. Lange, L. Kappen y D. Schulz, Springer-Verlag, Berlin.
- Bowling, D. J. F. 1976. Malate-switch hypothesis to explain the action of stomata. Nature. 262: 393-394.
- Cleland, C. F. y A. Ajami. 1974. Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. Plant Physiol. 54: 904-906.
- Clements, H. F. 1934. Transpiration significance. Plant Physiol. 9: 165-172.
- Coudret, A. y F. Ferron. 1977. La transpiration végétale. Modes d'action des antitranspirants. Ann. Amélior. Plantes. 27(6): 613-638.

- Davenport, D. C. 1966. Effects of phenylmercuric acetate on -  
transpiration and growth of small plots of grass. -  
Nature. 212: 81-82.
- Davenport, D. C. 1967. Effects of chemical antitranspirants on  
transpiration and growth of grass. J. Exp. Bot. 18-  
(55): 332-347.
- Davenport, D. C., M. A. Fischer y R. M. Hagan. 1971. Retarded  
stomatal closure by phenylmercuric acetate. Physiol.  
Plant. 24(2): 330-336.
- Davies, W. J., T. A. Mansfield y P. J. Orton. 1978. Strategies  
employed by plants to conserve water: can we improve  
on them? In: "Opportunities for chemical Plant Growth  
Regulation". Proceedin BCPC & BPGRG Symposium, 45-54
- De León G., F. 1979. Efecto del ácido acetilsalicílico (aspi-  
rina) sobre algunos aspectos de la fisiología esto-  
matal de Commelina communis L. Tesis de Maestría. Co  
legio de Postgraduados, Chapingo, México.
- De León G. F. y A. Larqué-Saavedra. 1979. Cierre estomatal --  
inducción por aspirina y su dependencia del pH. Agro  
ciencia 37: 67-75.
- Doyle, W. T. 1970. The Biology of Higher Cryptogams. Collier-  
MacMillan, London.

- Dittrich, P. y K. Raschke. 1977. Malate metabolism in isolated epidermis of Commelina communis L. in relation to stomatal functioning. Planta. 134: 77-81.
- Fischer, R. A. 1968. Stomatal opening in isolated epidermal strips of Vicia faba. I. Responses to light and to CO<sub>2</sub> free air. Plant. Physiol. 43: 1947-1952.
- Fischer, R. A. y T. C. Hsiao. 1968. Stomatal opening in isolated epidermal strips of Vicia faba. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. Plant. Physiol. 43: 1953-1958.
- Fischer, R. A. 1970. Role of potassium in stomatal opening. Plant Physiol. 47: 555-558.
- Fujino, M. 1967. Role of adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in stomatal movement. Sci. Bull. Fac. Educ. Nagasaki Univ. 18: 1-47.
- Gale, J. y R. M. Hagan. 1966. Plant Antitranspirants. Ann. -- Rev. Plant Physiol. 17: 269-282.
- García, P., R. 1979. El Acido Acetilsalicílico (aspirina) y el Acido Salicílico en la maduración fisiológica -- del fruto del jitomate Lycopersicum esculentum Mill. cv. Royal Ace. Tesis de Maestría, Chapingo, México.

- Glass, A. D. M. 1974. Influence of phenolic acids upon ion -- uptake. III. Inhibition of Potassium Absortion. J. Exp. Bot. 25 (89): 1104-1113.
- Glass, A. D. M. y J. Dunlop. 1974. Influence of Phenolic acids upon ion uptake. IV. Depolarization of membrane potentials. Plant Physiol. 54: 855-858.
- Humble, G. D. y T. Hsiao. 1969. Specific requeriment of potassium for light actived opening of stomata in epidermal strips. Plant Physiol. 44: 230-234.
- Jones, F. J. y T. A. Mansfield. 1970. Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid. J. -- Exp. Bot. 21: 714-719.
- Kefeli, V. I. 1978. Natural Plant Growth Inhibitors and Phi--tohormones. Dr. W. Junk Publishers, Amsterdam.
- Kimura, Y., K. Takesake, Y. Takahashi y S. Tamura. 1976. Isolation, Identification and biological activites of - growth inhibitors in peanut. Agr. Biol. Chem. 40(6):
- Kramer, P. J. 1974. Relaciones hídricas de suelos y plantas. EDUTEX, México.
- Larqué-Saavedra, A. 1978. The antitranspirant effect of acetyl salicylic acid on Phaseolus vulgaris. Physiol. Plant. 43: 126-128.

- Larqué-Saavedra, A. (1979). Stomatal closure in response to - acetyl salicylic acid treatment. Z. Pflanzenphysiol. 93: 371-375.
- Larqué-Saavedra, A. y R. L. Wain 1976. Studies on plant gro-- wth regulating substances XLIII. Abscisic Acid as a genetic character related to drought tolerance. --- Annals App. Biol. 83: 291-297.
- Lehninger, A. L. 1978. Biochemistry. Worth Publishers, Inc. - New York.
- Levitt, J. 1967. The mechanism of stomatal action, Planta --- 74: 101-118
- Levitt, J. 1974. The mecanism of stomatal movement. Once more. Protoplasma. 82: 1-17.
- ~~✶~~ Mansfield, T. A. 1978. Are chemical "antitranspirants" a lest cause? New Bull. British Plant Regulators Group.
- Moure, T. C. 1979. Biochemistry & Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag, New York.
- Morrison, R. T. y R. N. Boyd. 1976. Química Orgánica. Fondo - Educativo Interamericano, México.

- Ogunkanmi, A. B., A. R. Wellburn y T. A. Mansfield. 1974. ---  
Detection and preliminary identification of endoge-  
nous antitranspirants in water-stressed Sorghum ---  
plants. Plants. 117: 293-302.
- Pallas, J. E., A. R. Bertrand, D. G. Harris, C. B. Elkins y -  
C. L. Parks. 1962. Research in plant transpiration.  
USDA, Prod. Res. Rep. 87: 56p.
- Pearson, C. J. y F. L. Milthorpe. 1974. Structure, carbon dio-  
xido fixation and metabolism of stomata. Aust. J. -  
Plant Physiol. 1: 221-236.
- Raschke, K. 1960. Heat transfer between the plant and the en-  
vironment. Ann. Rev. Plant Physiol. 11: 111-126.
- Raschke, K. 1975. Stomatal action. Ann. Rev. Plant Physiol. -  
26: 309-340.
- Salisbury, F. B. y C. W. Ross. 1978. Plant Physiology. Wadsworth  
Publishing Co., Belmont, California.
- Slatyer, R. O. y J. F. Bierhuizen. 1964. Transpiration from -  
cotton leaves under a range of experimental condi-  
tions in relation to internal and external diffusi-  
ve resistance. Aust. J. Biol. Sci. 17: 115-130.

- Tal, M. y D. Imber. 1970. Abnormal stomatal behaviour and --- hormonal imbalance flacca, a wilted mutant of tomato. II. Auxin and Absciscic acid like activity. Plant -- Physiol. 46: 373-376.
- Tucker, D. J. y T. A. Mansfield. 1971. A simple bioassay for detecting "antitranspirant" activity of naturally - occurring compounds such as absciscic acid. Planta. - 18: 157-163.
- Willmer, C. M. y J. E. Pallas 1973. A survey of stomatal mo-- vements and associated potassium fluxes in the plant Kingdom. Can. J. Bot. 51: 37-42.
- Wilson, J. A. y W. J. Davies. 1979. Farnesol-like antitranspi rant activity and stomatal behaviour in maize and - Sorghum lines of different drought tolerance. Plant, Cell & Environ. 2: 49-57.
- Wright, S. T. C. y R. W. P. Hiron. 1969. Absciscic acid, the - growth inhibitor induced in detached wheat leaves - following a period of wilting. Nature. 224: 719-720.
- Wright, S. T. C. 1978. Phytormones & Stress Phomena. In: "Phytormones & related compounds: A comprehensi- ve tratise" Vol. II. Phytormones & The Development of Higher Plants. Ed. by Letham, Goodwinn and Higgins. Esevier/North Holland, Amsterdam.