

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL EN LA TRANSPIRACION DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.), GERMINACION DE LENTEJILLA (Lepidium sativum L.) Y CRECIMIENTO RADICULAR DE TRIGO (Triticum aestivum L.)

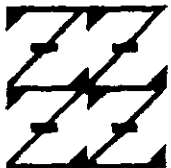
290985

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA :

JOSEFA ERNESTINA MARTINEZ GARCIA

UNAM FES ZARAGOZA



LO INDIAMO EN NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR: DR. ALFONSO LARQUE SAAVEDRA
ASESOR: DR. ELOY SOLANO CAMACHO

MEXICO, D.F., DICIEMBRE DEL AÑO 2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Profunda y sinceramente al Dr. Alfonso Larqué Saavedra por el inmerecido refinamiento con que invariablemente atendió a esta tesista, así como por el siempre firme, paciente y generoso apoyo que me brindó al dirigir este trabajo.

Al Dr. Eloy Solano Camacho por la atinada labor de asesoría que me dispensó.

A la M. en C. Estela Ortiz Medina (Especialidad de Botánica, Instituto de Recursos Naturales, C.P.), porque su brillante guía fue determinante en la realización de esta tesis.

A la M. en C. Susana Luna Rosales, Biól. Balbina Vázquez Benitez y M. en C. Amadeo Barba Álvarez, por las invaluable observaciones que aportaron para afinar este trabajo.

Al M. en C. Ramiro Ríos Gómez (FES-Z) porque, una vez más, me dió muestras de la importancia que para él tienen sus alumnos.

Al personal Académico y Administrativo del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Especialidad de Botánica, Instituto de Recursos Naturales, C. P., por el generoso y desinteresado apoyo con que siempre me favoreció.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 ANTITRANSPIRANTES.....	8
2.2 PENETRACIÓN FOLIAR DE LOS QUÍMICOS.....	11
2.3 ELABORACIÓN DE PAPEL.....	16
III HIPÓTESIS.....	20
IV OBJETIVOS.....	20
V MATERIAL Y MÉTODO.....	21
5.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PAPEL.....	21
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
5.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL	
5.3.1 TRANSPIRACIÓN DE PLÁNTULAS DE FRIJOL	
5.3.1.1 TRATAMIENTOS.....	22
5.3.1.2 VARIABLES EVALUADAS.....	23
5.3.1.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
5.3.2 GERMINACIÓN	
5.3.2.1 TRATAMIENTOS.....	26

5.3.2.2 VARIABLES EVALUADAS.....	26
5.3.2.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	26
5.3.3 CRECIMIENTO RADICULAR	
5.3.3.1 TRATAMIENTOS.....	28
5.3.3.2 VARIABLES EVALUADAS.....	28
5.3.3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
 VI RESULTADOS	
6.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL	
6.1.1 TRANSPIRACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA.....	30
6.1.1.1 CONTENIDO DE CLOROFILA EN LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA.....	36
6.1.2 GERMINACIÓN.....	40
6.1.3 CRECIMIENTO RADICULAR.....	44
 VII DISCUSIÓN	
7.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL	
7.1.1 TRANSPIRACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA.....	46
7.1.1.1 CONTENIDO DE CLOROFILA EN LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA.....	53
7.1.2 GERMINACIÓN.....	55
7.1.3 CRECIMIENTO RADICULAR.....	58

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Evapotranspiración media diaria de las plántulas de frijol durante el período de sequía. Aspersión de los extractos en una hoja simple.....	31
2. Evapotranspiración medida diaria de las plántulas de frijol durante el periodo de sequía. Aspersión de los extractos en ambas hojas simples.....	33
3. Clorofila total al término del periodo de sequía. Aspersión de los extractos en una hoja simple.....	37
4. Clorofila total al término del periodo de sequía. Aspersión de los extractos en ambas hojas simples.....	39
5. Cinética de germinación de <i>Lepidium sativum</i>	41
6. Germinación de <i>Lepidium sativum</i> a las 24 h del establecimiento del bioensayo	43
7. Longitud de radículas de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L. cv. "Lerma rojo") en respuesta a la aplicación de los extractos de papel.....	45

RESUMEN

Basados en el descubrimiento de que extractos acuosos de papel reducen el proceso de transpiración en explantes de frijol, el presente estudio se condujo para probar si estos extractos mantienen sus propiedades antitranspirantes cuando se asperjan a plántulas intactas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de estrés hídrico.

Los extractos que se prepararon durante el presente estudio fueron hechos a partir de papel comúnmente conocido como Bond y papel Kraft, así como de papel Filtro usado comúnmente en los laboratorios de química.

Los extractos acuosos también fueron evaluados para conocer si afectaban otros procesos fisiológicos como germinación y crecimiento radicular.

Los resultados indican que los extractos de papel no afectaron significativamente la transpiración de plántulas intactas de frijol; pero sí inhibieron la germinación de *Lepidium sativum* L. en el siguiente orden de intensidad: extracto de papel Filtro > extracto de papel Bond > extracto de papel Kraft. Este último estimuló significativamente el crecimiento de raíces de *Triticum aestivum* L. cv “Lerma rojo” mientras que los de papel Bond y Filtro no lo afectaron.

I INTRODUCCIÓN

Numerosos son los factores ambientales que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero sobre todo que reducen la producción. Entre estos factores la sequía es el que más limita la distribución y el rendimiento de las plantas cultivadas, particularmente si incide durante el estadio de mayor sensibilidad. Este último difiere entre especies, cultivares y aún entre etapas fenológicas de una misma planta (Saini y Aspinall, 1981).

En el país, 84.04 millones de ha -la zona árida y semiárida que representa el 42.7% del territorio nacional y es el asiento de 25.7% de la población- tienen permanente escasez de agua. De ellas se dedican a la agricultura 8 millones de ha -el 9.6% de toda la zona árida y semiárida-, que constituyen el 45% del total de la superficie agrícola nacional. Los cultivos dominantes en las áreas temporaleras de los diez principales estados de dicha zona, son los granos básicos (maíz, trigo y frijol), salvo Sonora y Tamaulipas en donde se cultivan ajonjolí y sorgo.

Aquí se localizan las principales áreas trigueras (el 67% de la superficie destinada a esta especie), algodón, ajonjolí, soya, uva, casi dos tercios de la alfalfa, un tercio de la cebada y una quinta parte de la avena cultivados en el país (Toledo *et al.*, 1989).

En este contexto, salta a la vista la importancia de desarrollar técnicas para el aprovechamiento máximo del recurso agua, entre las que se encuentra el uso de antitranspirantes. El problema básico en la elaboración de estas sustancias radica en que deben ser de bajo costo e inoocuos tanto para cultivos como para las propiedades del suelo.

Larqué-Saavedra y Soto (1986) observaron, durante un experimento en que utilizaron exudados de raíz de *Salix caprea*, que el testigo -agua destilada y filtrada- también produjo

efectos antitranspirantes sobre explantes de frijol. Supusieron entonces que posibles sustancias causantes de tal efecto se desprenden del papel filtro, y se disuelven en el agua destilada.

Para probar tal hipótesis, García (1991) realizó un estudio en el que observó el efecto de extractos acuosos de papel sobre la apertura estomatal de tiras de epidermis de *Commelina communis* y sobre la transpiración de explantes de *Phaseolus vulgaris* cv. "Cacahuete 72", así como de plantas intactas del híbrido H-28 de *Zea mays*. La autora encontró que la transpiración se redujo significativamente en un 30% en los explantes de *P. vulgaris* sumergidos en los extractos acuosos; además observó un cierre estomatal de 72% en tiras de epidermis desprendida de *C. communis*, también sumergidos en los extractos.

Sin embargo, en las aspersiones a plantas intactas de *Z. mays* obtuvo que la transpiración disminuyó durante las primeras 24 horas en un 28% y que a las 48 horas se incrementó en 3.82%.

En un segundo experimento con la misma especie y bajo las mismas condiciones, encontró que la transpiración se redujo en un 8.03%.

Con el presente trabajo preliminar se buscó determinar el efecto antitranspirante de extractos acuosos de papel, asperjándolos sobre plántulas de frijol en condiciones de sequía.

II REVISIÓN DE LITERATURA

La sequía empieza cuando la humedad del suelo disminuye conforme el nivel de aportaciones, a tal grado que las raíces de las plantas ya no pueden extraerla con facilidad (Castillo, 1988). Esta situación puede deberse también a niveles excesivos de sales y otros osmolitos en el agua edáfica (Neumann, 1995).

Existen numerosos ejemplos del avance en la lucha contra la sequía (algunos utilizados desde la antigüedad), entre los que puede mencionarse la utilización de cultivos mejor adaptados fisiológicamente a escasa precipitación, con buena o regular productividad potencial tales como el frijol tepari, girasol, sorgo escobero, jjoba, guayule, mezquite, calabacilla loca, o amaranto entre otros (Gomez, 1983). También se ha recurrido al desarrollo de plantas resistentes a sequía, caracterizadas por poseer un aplo y profundo desarrollo radical y/o buena capacidad de ajuste osmótico, paredes celulares rígidas, cierre estomatal durante buena parte del día como respuesta al estrés hídrico, baja conductancia cuticular y buena eficiencia de uso de agua (EUA).

La aplicación a las plantas de sustancias químicas que reducen la transpiración es de particular interés por el gran potencial que representan. Además de incrementar la reflexión lumínica, tales químicos pueden usarse para formar películas superficiales que reducen el escape de vapor de agua, o bien, para inducir el cierre estomatal. Un pequeño número de ellos pueden inducir el cierre estomatal parcial o completo, con al parecer reducidos efectos tóxicos, aunque las especies varían en su sensibilidad (Hounam, 1975).

La reducción del rendimiento a consecuencia de ambientes limitantes, particularmente por déficit de agua, genera un interés considerable por las estrategias involucradas en las respuestas al estrés hídrico, tanto a nivel celular como a nivel global de las plantas (Neumann, 1995).

Al disminuir el agua del suelo, la absorción por las raíces declina y los estomas pierden la capacidad de igualar la tasa de transpiración a la tasa de absorción; en consecuencia, éstos se cierran y la tasa de transpiración pasa a depender de la conductancia por la epidermis (Sinclair y Ludlow, 1985). Con el cierre estomatal desciende la captación de CO₂, decae la actividad fotosintética y finalmente el rendimiento. Sin embargo, los efectos del déficit hídrico dependen del estadio fisiológico (Villarreal, 1978) y de las condiciones de crecimiento, pero también de la especie (Davies, 1977; Gutiérrez, 1983).

El envejecimiento foliar puede alterar el umbral del potencial de agua que produce el cierre estomatal (Steinberg *et al.*, 1989), lo cual permite conservar el agua del suelo hasta la floración y asegurar la apertura estomatal a potenciales hídricos menores (Teare *et al.*, 1982).

Los estomas son unidades anatómicas que no se desarrollan todos simultáneamente, sino a lo largo del período de crecimiento foliar (Knecht y O'Leary, 1972). Funcionalmente son unidades independientes que responden al mismo estímulo ambiental pero en forma individual. En una sección de epidermis o de hoja, sometidas a los mismos tratamientos, muestran una amplia variedad de aperturas (Spence, 1987), lo que constituye el fenómeno hoy conocido como cierre en "parches" (Ekstein *et al.*, 1998).

Con respecto a la penetración de líquidos, los estomas pueden considerarse como estrechos capilares que tienen paredes inclinadas. Por ejemplo, los estomas de tipo *Amaryllis*

(Fig. 1) están formados por una zona externa, la llamada zona 1 de gran diámetro, que se encuentra delimitada por márgenes exteriores; le sigue la zona 2 de diámetro decreciente, la cual se aproxima a un mínimo dentro del poro, que luego aumenta nuevamente -en dirección hacia la cámara subestomática- en la llamada zona 3. Aquí el ángulo de la pared se aproxima a cero, en el límite entre la cavidad interior y la cámara subestomática.

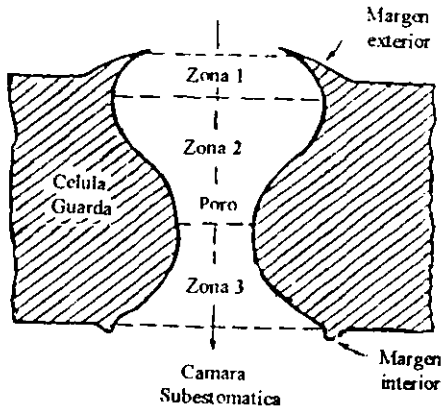


Fig. 1. Dibujo esquemático de un estoma del tipo *Amaryllis*. La flecha señala la dirección en que penetran los agroquímicos (Schönherr y Bukovac, 1972)

La geometría del estoma y en particular la presencia de márgenes exteriores e interiores, tienen significancia biológica: el repentino incremento en la apertura estomatal, a medida que se avanza de la zona 1 a la 3, forma ángulos de la pared extremadamente pequeños o prácticamente iguales a cero que limitan la penetración de los líquidos al estoma y cámara subestomática.

Los pequeños ángulos de las paredes estomatales y las pequeñas energías superficiales se combinan formando una barrera formidable en contra de la penetración de líquidos con

altas tensiones superficiales, tales como el agua o soluciones acuosas (Schönherr y Bukovac, 1972).

La humedad se adhiere en relación a la química y rugosidad de la superficie foliar. Las hojas pueden ser desde completamente humectables -si se forma una película de agua sobre ellas, lo que implica ángulos de contacto (\varnothing) menores de 110° -, hasta completamente repelentes a ésta o no humectables, en las cuales se presentan ángulos mayores a 130° (Fig 2.).

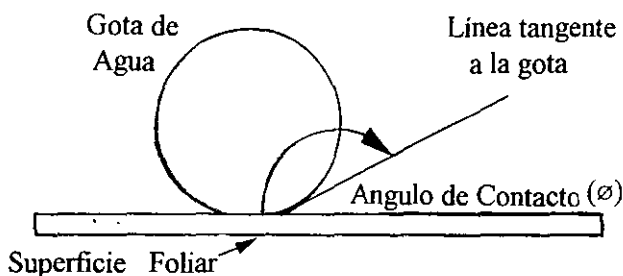


Fig. 2. El ángulo \varnothing es una medida del arco formado por una línea tangente y el punto de contacto entre una gota de agua y la superficie foliar (Brewer y Smith, 1997)

Las especies pilosas son difíciles de humedecer (Stock y Holloway, 1993); Smith y McClean (1989) encontraron que las especies de superficies foliares con el mayor número de estomas son las menos humectables. La misma situación ocurre con las superficies abaxiales.

En efecto, la retención de las gotas de humedad y el ángulo de contacto \varnothing así como éste con la densidad de los tricomas se correlacionan en forma negativa y positiva, respectivamente (Brewer y Smith, 1997). De acuerdo a Brewer *et al.* (1991), en general a bajas densidades de tricomas (menor a 30 mm^{-2}) mayor retención de humedad y menores valores de \varnothing ; a altas densidades (superiores a 40 mm^{-2}) menor retención y altos valores de \varnothing (Fig. 3).

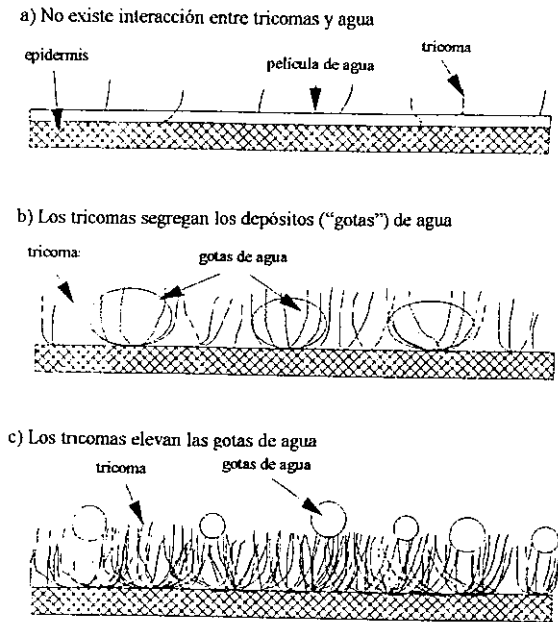


Fig. 3. Interacciones de los tricomas con el agua. a) Sin influencia aparente de los tricomas en la deposición de la humedad superficial, o en la formación o retención de las gotas. b) "Estrategia de segregación". Los tricomas circundan y retienen la humedad superficial hasta que se evapora. c) "Estrategia de elevación". Los densos tricomas impiden el humedecimiento de la epidermis foliar (Brewer y Smith, 1997)

Por otra parte, la mayor parte del agua consumida por los cultivos se utiliza en la transpiración y sólo el 10% es retenida por las plantas en los estadios primarios y un 3% en los últimos (Nelson y Hwang, 1975). La cantidad de agua eliminada por la planta está controlada por el tamaño del poro (es decir, por la resistencia estomatal) -determinado por mecanismos reguladores-, el cual varía con las condiciones ambientales (Brown y Rosenberg, 1970; Meyer y Green, 1981) y sustancias químicas que se apliquen a las hojas. En razón de que hay una mayor resistencia a la difusión del vapor de agua que a la difusión del CO_2 , un cambio en la resistencia estomatal tiene mayor impacto en la transpiración que en la fotosíntesis (Gaastra, 1959).

La resistencia de la hoja a la difusión parece estar relacionada con dos aspectos: el primero consiste en una resistencia externa que depende sólo de la ventilación -los movimientos del aire- y geometría de la hoja. El segundo consiste en una resistencia interna, la cual es una función de la interferencia o resistencia estomatal -resultado de la longitud y cierre del poro- y de la geometría del estoma.

También existen factores internos que determinan la apertura estomatal, tales como las variaciones de la concentración interna del CO_2 , así como el acoplamiento entre los cambios de pH, del potencial transmembranal de los cloroplastos y del plasmalema, todo lo cual modifica la presión osmótica de las células guarda (Coudret y Ferron, 1977).

El potencial transmembranal se encuentra modulado por el flujo iónico a través de la membrana plasmática y del tonoplasto, así como de la tasa de síntesis o degradación de solutos osmóticamente activos en el citoplasma (Gilroy *et al.*, 1991).

2.1 ANTITRANSPIRANTES

Existen dos tipos de antitranspirantes: a) los que forman una película sobre la superficie foliar, y b) aquellos que inhiben completamente la apertura estomatal (Davenport *et al.*, 1972). El efecto de los antitranspirantes varía en dirección e intensidad de acuerdo a las condiciones ambientales, es decir, es dependiente del suministro de agua.

La aplicación oportuna de un antitranspirante puede retrasar el desarrollo del déficit hídrico; en consecuencia, la evapotranspiración (E) y la fotosíntesis neta (P_n) se mantienen constantes e inclusive esta última aumenta. El retraso en el déficit hídrico posiblemente

incremente la superficie de la hoja y la P_n de la planta aunque ésta se reduzca por unidad de área foliar.

Por otra parte la diferencia en las respuestas entre especies y cultivares a la aplicación de antitranspirantes, depende también de su sensibilidad a los cambios en la conductancia de la epidermis (Solarova *et al.*, 1981). En una misma especie -bajo condiciones de sequía- no todos los individuos reducen simultáneamente su transpiración a un valor determinado, aunque se les haya suspendido el riego al mismo tiempo, se hayan sembrado el mismo día y pertenezcan al mismo cultivar; las variaciones que se observan se pueden atribuir a la plasticidad inherente a cada cultivar (Vasco, 1986).

Los efectos más notables de los antitranspirantes se registran usualmente 24 horas después de su aplicación, pero decrecen con el transcurso del tiempo. En ese lapso, sus efectos sobre E y P_n pueden no reducirse paralelamente, por lo cual también varía la EUA (Solarova *et al.*, 1981).

El beneficio de estas sustancias varía en función de que aumenten el potencial hídrico, justo cuando el crecimiento de una porción vegetal en particular depende más del estado hídrico, que de la fotosíntesis (Boyer, 1970). Por otro lado hay evidencias de que algunos antitranspirantes influyen en el transcurso de la ontogenia (Gale *et al.*, 1964).

De los numerosos antitranspirantes que a la fecha se conocen, se pueden mencionar al ABA (ácido abscísico) -sesquiterpeno derivado del ácido mevalónico o de la fractura de una xantofila (Walton y Li, 1995)-, el fitoregulador natural que ha mostrado repetidamente su habilidad para inducir el cierre estomatal. Al parecer inhibe reversiblemente la actividad de la fotofosforilación cíclica en los cloroplastos de las células guarda y bloquea en ellas la

formación de ácidos orgánicos. Su mayor ventaja es que las aplicaciones artificiales no parecen tener efectos secundarios. Desafortunadamente, es un antitranspirante no económico.

De entre las sustancias que fungen esencialmente como inhibidores metabólicos, se encuentran el CCC (cloruro de clorocolina) el cual incrementa la resistencia a la sequía gracias a que reduce la superficie foliar y, simultáneamente, aumenta el crecimiento radical de las plantas tratadas. Sin embargo, impide la apertura normal de los estomas porque disminuye la producción de ATP. El PMA (acetato de fenil mercurio) inhibe, al parecer, la fotofosforilización cíclica a nivel de la cadena de transporte de electrones en donde se sintetiza ATP. No obstante, altas concentraciones de este químico inhiben la fotosíntesis y pueden producir una deficiencia de fósforo en la planta; a nivel celular, dañan la integridad de las células guarda, reducen el contenido de clorofila en las hojas e inhiben la apertura estomatal mediante bloqueo de la fotosíntesis (Solarova *et al.*, 1981). Al inhibir la apertura estomatal, el PMA incrementa el potencial hídrico de la planta, pero frena el crecimiento y la producción de materia seca aunque en menor medida que la transpiración (Coudret y Ferron, 1977).

Por otra parte, las aplicaciones de farnesol sobre hojas intactas reducen la conductancia, pero también la E y P_n . Si se aplica a sistemas *in vitro* daña irreversiblemente las membranas externas de los cloroplastos (Fenton *et al.*, 1977).

En lo referente a la azida de sodio, bajas concentraciones inhiben la apertura inducida previamente por la luz; cantidades un poco mayores inducen el cierre, bajo iluminación. Concentraciones altas impiden el cierre en la oscuridad. Por otra parte, el alcohol cetílico reduce la E , pero inhibe la P_n y la acumulación de materia seca, además de que se dificulta la entrada de agua a las raíces.

El ASA (ácido acetilsalicílico) en concentraciones de entre 10^{-3} y 10^{-4} M tienen un efecto equivalente al de una solución 10^{-4} M de ABA en tiras de epidermis de *Commelina communis* L. (Larqué-Saavedra, 1979). Mezclado con los amortiguadores MES y PIPES a pH's menores o iguales de 5.5, el ASA 10^{-2} M disminuye la apertura estomatal con daño aparente de los estomas de esa misma especie, pero con pH's mayores de 5.5 no disminuyó la apertura estomatal ni afectó a las células oclusivas (Larqué-Saavedra y De León, 1979)

Otras sustancias como el DSA (ácido decenilsuccínico) y sus derivados, el ácido alkenilsuccínico, el ácido N-dimetilaminosuccinámico y algunos herbicidas (atrazine, amitrine, amitrole, 2,4-D, dalapón, DNBP, propazine, simazine, etc.) también reducen la *E* cuando se aplican en hojas o en raíces, aunque algunos de ellos también reducen la *Pn* (Solárova *et al.*, 1981).

2.2 PENETRACIÓN FOLIAR DE LOS QUÍMICOS

Las cutículas varían por el grosor y composición de sus ceras (Holmgren *et al.*, 1965). La permeabilidad de las mismas difiere ampliamente entre especies como entre estadios de desarrollo de las hojas, es decir, no hay una cutícula típica (Schonherr y Baur, 1994).

La deshidratación foliar afecta las propiedades de la cutícula y -aunque se desconocen las causas exactas- posee la capacidad, que varía con la edad y estado hídrico de la hoja (Boyer *et al.*, 1997), de discriminar los gases que la atraviesan.

El intercambio de gases también es afectado cuando las hojas se encogen a consecuencia de la deshidratación, ya que el estrechamiento de la cutícula refuerza la estructura de las ceras. La permeabilidad al agua líquida de cutículas aisladas depende de la temperatura y

de la humedad (Schönherr y Schmidt, 1979), pero se modifica en cierta medida por la composición o rearrreglo de las ceras (Schönherr *et al.*, 1980). De esta manera, la cutícula constituye una barrera dinámica al intercambio gaseoso, que depende de las condiciones hídricas de las células subyacentes, así como de la capa cerosa de la superficie foliar (Boyer *et al.*, 1997).

La absorción foliar es un proceso complejo del que no se pueden hacer fácilmente generalizaciones (Stevens *et al.*, 1988; Baker *et al.*, 1992). La naturaleza exacta de la penetración cuticular de los químicos a las hojas se desconoce (Coret y Chamel, 1993) pero se han sugerido algunas rutas preferenciales que incluyen a las células epidérmicas localizadas sobre las venas, los tricomas, las paredes anticlinales de las células epidérmicas, las paredes de las células guarda, perforaciones y rasgaduras (Dybing y Currier, 1961). Aunque las células guarda y accesorias, *per se*, pueden ser sitios de penetración favorecidos, es posible el movimiento masivo de una solución -a través del poro estomático- hacia la cámara subestomática.

La efectividad de cualquier sustancia aplicada a las plantas depende de numerosos factores además de su actividad intrínseca, tales como la tasa de absorción (Davies, 1995), su posterior metabolismo a compuestos más o menos activos, y la tasa de ingreso al compartimento celular apropiado (Walton y Li, 1995).

La naturaleza de la sustancia aplicada influye en la penetración foliar; las soluciones acuosas con una tensión superficial aproximada a la del agua pura no pasan a través del poro estomatal a menos que se aplique una presión externa; en cambio, algunos de los líquidos orgánicos penetran con facilidad (Schönherr y Bukovac, 1972).

Estos últimos autores plantearon la hipótesis que relaciona la baja tensión superficial con la infiltración estomatal, según la cual los líquidos que tienen una tensión superficial menor de 30 dinas/cm producen depósitos ("gotas") con ángulos de contacto (θ) igual a cero sobre la superficie foliar, e infiltran los estomas espontáneamente. A medida que se reduce la tensión superficial de una solución acuosa, el ángulo de contacto (θ) formado con la superficie foliar también disminuye; la infiltración por los estomas ocurrirá cuando la tensión superficial del líquido iguale la tensión superficial crítica, o cuando el ángulo de contacto formado sea menor que el ángulo de la pared del poro (Fox y Zisman, 1950).

La tensión superficial de las soluciones acuosas no es el único factor de la penetración estomatal: también pueden ser igualmente importantes el ángulo de contacto (humectabilidad) formado por la solución con la superficie foliar -ángulos grandes impiden la penetración estomatal a pesar de que los estomas se encuentren abiertos (Schreiber y Schönherr, 1992)-, la morfología de la pared del poro (Greene y Bukovac, 1974), la viscosidad de la solución, el diámetro de la apertura estomatal, así como la altura final y velocidad inicial del avance capilar (Schönherr y Bukovac, 1972). Además influyen el tipo de "acarreadores" y coadyuvantes utilizados, los cuales pueden interactuar con el ingrediente activo (i. a.), el grado de atomización, volatilidad y retención del líquido asperjado (Schönherr y Baur, 1994), la composición y concentración del surfactante utilizado en el momento y en el lugar correctos (Stock y Holloway, 1993) el efecto de las condiciones ambientales, la naturaleza y composición de la cutícula y de la cera epicuticular asociada (Field y Bishop, 1988), es decir la especie (Stock *et al.*, 1993), el periodo del tratamiento, la forma física de los depósitos "secos" remanentes sobre la superficie foliar (Baker *et al.*, 1992), el punto de fusión, la concentración,

tamaño y forma molecular, velocidad de absorción y la solubilidad del i. a. (Stevens *et al.*, 1988; Stock *et al.*, 1993), la adición de dispersantes y/o humectantes, así como el pH de la mezcla asperjada (Stevens, 1993).

Por otra parte el hecho de que una sustancia no penetre hacia los estomas puede significar también que las características químicas de la superficie de la cutícula en el interior de la abertura estomatal son similares a las de la superficie foliar, pues se sabe que la tensión superficial crítica está determinada casi completamente por la naturaleza de los grupos químicos que forman la superficie de un sólido (Schönherr y Bukovac, 1972). En ocasiones la cutícula que reviste al poro estomático es más polar que el de la existente sobre las células guarda, lo cual obviamente limita la absorción de soluciones polares a través de él.

La tensión superficial de la mayoría de las superficies cuticulares es de unas 30 dinas/cm. Las soluciones que forman ángulos de contacto pequeños (menores de 30°) requieren presiones muy pequeñas para afectar la penetración a la cámara subestomática, de manera que se requiere cautela en la interpretación de resultados obtenidos por inmersión de hojas en las soluciones cuando se estudia la penetración estomatal (Dybing y Currier, 1961)

La absorción foliar puede mejorarse con la utilización de coadyuvantes; existen evidencias de que la penetración estomatal de agroquímicos -incluidos los anti-transpirantes- se efectúa principalmente cuando se emplea un surfactante eficiente (Dybing y Currier, 1961; Stock *et al.*, 1993), a la concentración adecuada, pues al parecer debe excederse una concentración crítica que permita una absorción significativa (Stock *et al.*, 1993).

Los coadyuvantes son sustancias químicas, en su mayoría agentes tensoactivos (Caux *et al.* 1992) que se clasifican en modificadores y activadores (Stevens, 1993); se utilizan como

humectantes, emulsificantes o dispersantes, detergentes (surfactantes), agentes dispersores, agentes antiespuma, solubilizantes y penetrantes. Todos ellos optimizan las propiedades físicas del i. a. en las formulaciones de agroquímicos, ya sea porque reducen el ángulo de contacto (θ) o bien, porque aumentan la permeabilidad de la cutícula (Busotti *et al.*, 1997). Los surfactantes en particular mejoran la humectabilidad, inhiben la cristalización del i. a., y modifican la interacción entre este último y la cutícula (Coret y Chamel, 1993).

No obstante sus bondades, los coadyuvantes han mostrado fitotoxicidad a las concentraciones usadas en el campo -40 μM -, más aún porque con frecuencia se utilizan a concentraciones que exceden lo necesario para reducir convenientemente la tensión superficial (Parr y Norman, 1965; Caux *et al.* 1992). Por ejemplo, tratamientos con surfactantes del tipo Triton, inducen perturbación química de las membranas (intra y extracelulares) la cual consiste principalmente en el decremento de la saturación de los lípidos que las componen. Investigaciones con marca radioactiva demostraron que tanto los coadyuvantes hidrofílicos (el Tritón X-100, por ejemplo) como los hidrofóbicos (el caso del Tritón X-35) se incorporan a las membranas de los cloroplastos.

Bajas concentraciones de coadyuvantes pueden activar o desactivar las desaturasas de ácidos grasos, que provocan cambios en la fluidez de las membranas; esta última determina un eficiente metabolismo celular. Los surfactantes también tendrían capacidad de interactuar con otros sistemas enzimáticos, como los que regulan la síntesis de novo de glicerofosfolípidos y glicolípidos, o el intercambio de cadenas *-acyl* (Caux *et al.*, 1992).

Por otra parte, el Tween 80 (monooleato poli-oxy-etileno de sorbitan) es un ester clasificado como surfactante de tipo no-iónico (Parr y Norman, 1965), es higroscópico y se

considera un penetrante pobre (Stock y Holloway, 1993), capaz de formar agregados moleculares o micelas cuando su concentración excede el nivel crítico en un sistema acuoso. La cantidad de micelas formadas se asocia con cambios abruptos en muchas de las propiedades del surfactante y, por consiguiente, puede cambiar también su comportamiento en un sistema biológico; por ejemplo, se incrementa su habilidad para disolver materiales insolubles en agua, como la cutina. Las micelas aparentemente disuelven grasas y ceras con lo que remueven grandes áreas de las ceras cuticulares. De este modo, favorecen la penetración del surfactante, con el resultado de un extenso efecto fitotóxico.

Se ha observado que la utilización del Tween 80 como surfactante redujo en 90% la absorción y traslocación de P^{32} ; aspersiones que contenían 0.1% de Tween 80 redujeron significativamente el rendimiento en soya; concentraciones de 0.01%, reducen la absorción de K en raíces aisladas de cebada. Por otra parte, se ha reportado que se requieren concentraciones mínimas del orden de 0.2% a 0.5% de un surfactante no-iónico para causar muerte de plantas; las raíces de plántulas de pepino son más sensibles que las hojas a la toxicidad de surfactantes no-iónicos (Parr y Norman, 1965).

2.3 ELABORACIÓN DE PAPEL

El descubrimiento del efecto antitranspirante de los extractos de papel en explantes no es reciente (Larqué-Saavedra y Soto, 1986), pero aún se desconoce su composición total. Por ello se ignora cual(es) sustancia(s) constituye(n) en sí el **ingrediente activo**. Sin embargo, es posible que el conocimiento de los químicos utilizados en la

elaboración del papel, proporcione una idea de cuáles serían los residuos que, diluidos durante la preparación de los extractos acuosos, tienen el mencionado efecto.

La elaboración del papel inicia con la obtención de celulosa a partir del tratamiento químico de astillas de madera, el cual consiste en la separación de las fibras de celulosa de los cementantes (incrustantes) por adición de NaOH -proceso a la sosa- o de NaSO₃ -conocido como proceso al sulfato-; las astillas de madera mezcladas con el reactivo ("licor blanco") se hierven siguiendo alguno de los dos procesos. Al término de la "hervida" resulta una mezcla de la celulosa con el llamado "licor negro" o "lejías sulfáticas residuales".

La composición del licor negro varía considerablemente, por la composición misma del licor blanco y del método específico utilizados durante la hervida. Sin embargo, la mayoría del álcali está presente como carbonato de sodio o como compuestos orgánicos de sodio. La mayor parte de la materia orgánica removida de la madera durante la "hervida", se combina químicamente con el NaOH en la forma de sales de sodio, de resina y otros ácidos orgánicos. El licor negro incluye también sulfuros orgánicos en combinación con sulfuro de sodio y con algo de mercaptanos; el resto del álcali está presente como sosa y sulfuro de sodio. Hay también pequeñas cantidades de sulfato de sodio, cloruro de sodio, sílice y pequeñas cantidades de otras impurezas como cal, óxido de hierro, aluminio y potasa (Carpy, 1941).

De acuerdo a Guzmán (1939), la lejía bruta, sin dilución contiene materia orgánica (12%) constituida por lignina -en forma de ácidos lignosulfónicos-, hidratos de carbono -en lo fundamental azúcares fermentescibles en un 75%-, agua y materia inorgánica (6%) formada por azufre, sales de calcio, magnesio, hierro y algunas veces manganeso y aluminio, en proporciones variables.

También en la lejía se han encontrado los ácidos acético y fórmico (2 a 9 g/l), aceites -cimeno, 1-borneol y terpenos-, derivados del azufre -sales de calcio, ácidos lignosulfónicos, SO_2 , SO_3 y azufre libre-, furfural libre, alcohol metílico y otros compuestos. Durante la "hervida" también se liberan alcohol etílico, acetona, aldehído acético y trazas de ácidos acético y fórmico. Asimismo, se pueden hallar en las lejías sustancias secundarias como compuestos pécticos, proteínas y taninos. Las sales de calcio se forman porque las bases que existen en el licor neutralizan los ácidos lignosulfónicos, a medida que éstos aparecen (Graf, 1934).

Para seguir con el proceso, la celulosa es separada del licor negro, sometida a un lavado y finalmente a un blanqueado. En éste último se utilizan agentes oxidantes o reductores como sustancias blanqueadoras. Entre los agentes oxidantes se encuentran los hipocloritos, cloro, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno y otros. Entre los agentes reductores están el bióxido de azufre y sus compuestos, como el sulfito de sodio y bisulfito de calcio, principalmente.

Ya depurada, la pulpa se blanquea tratándola con cloro, hipoclorito de calcio, dióxido y peróxido de hidrógeno, en esa secuencia, si se trata de pulpa kraft. Si la celulosa kraft (de alta resistencia y fibras largas) va a ser "refinada" se lleva al área de preparación de pastas, donde se realiza un repulpeo (agregando agua) que se aprovecha para añadir a la celulosa las llamadas cargas (polvos minerales) y para realizar el encolado de las fibras -excepto en el papel absorbente-, que consiste en adicionarle breas de colofonia saponificadas y alumbre (sulfato doble de potasio y aluminio hidratado).

Entre los encolantes más utilizados están las breas de colofonia, "almidones modificados", carboximetilcelulosa y resinas sintéticas de ure-formaldehído o de melaminaformaldehído. Las cargas más utilizadas son silicatos -caolin, talco, asbestinas-, carbonatos de Ca y Mg, dióxido de titanio, tierras de diatomeas, sulfuro de zinc y latopón (CONCAMIN, 1995). Montaña (1963) reporta el uso como encolantes de ceras vegetales y minerales, parafinas y compuestos químicos como el alcohol polivinílico, fenol formaldehído, derivados del ácido estéarico, de la caseína, etc.; entre las cargas minerales utilizadas, menciona además, al silicato de calcio, sulfito de zinc, sulfato de calcio, sulfato de bario y al silicato de magnesio.

Con la adición de las cargas se realiza el relleno del papel que tiene por objetivos mejorar la calidad de impresión, proporcionar opacidad, blancura, o bien, regular la porosidad del papel como en el caso del papel filtro utilizado en los laboratorios.

Con la pasta procesada se forman las hojas de papel, las cuales reciben un tratamiento de "calandreado" para ajustar su calibre y lisura, y en el que también puede añadirse un recubrimiento de pintura por una o ambas caras (García, 1995).

Por último, cabe mencionar que en 1996 se registró el procesamiento de 3,756,300 tons. de materia fibrosa, 78.6% de las cuales fueron fibras secundarias (fibras recicladas). En 1997 se reportó una producción de 442,121 tons. de celulosa y 3,501,083 tons. de papel (Cámara Nacional de la Industria de la Celulosa y el Papel, 1998)

En la producción de cada tonelada de papel a partir de fibra primaria se utilizan unos 20,000 l de agua limpia (CONCAMIN, 1997). Las aguas residuales del proceso, son descargadas en su mayoría al desagüe.

III HIPÓTESIS

Si los extractos acuosos de papel indujeron cierre estomatal en explantes, entonces al asperjarlos sobre plántulas de frijol cultivadas en condiciones de sequía se observará una disminución en los volúmenes de agua que transpiren por efecto de un cierre estomatal prematuro.

Si además los extractos de papel contienen algún inhibidor fisiológico, entonces perturbarán la germinación y el crecimiento radicular.

IV OBJETIVOS

Determinar:

1. Si los extractos acuosos de papel Bond, Filtro y Kraft reducen la transpiración de plántulas de frijol *in vivo*.
2. Si los extractos de papel del punto anterior contienen ABA o algún sucedáneo, para lo cual se desarrollarán bioensayos en lentejilla y trigo rojo.

V MATERIAL Y MÉTODO¹

5.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL

Se probaron 3 tipos de extractos acuosos de papel (EAP): 1) papel Bond (EAP-B), Kimberly Clark, 36 Kg; 2) papel Filtro (EAP-F), pliegos de poro mediano; y 3) papel Kraft (EAP-K), 125 g y 1 m de ancho.

Los extractos se elaboraron en una proporción 1:10 (P/V) conforme al procedimiento descrito por García (1991). Este consistió en el picado del papel, y posterior remojo con agua deionizada durante 7 días a 4 °C. Transcurrido este lapso, los extractos obtenidos se filtraron al vacío utilizando papel filtro Whatman del No. 1.

Se determinó el pH de cada extracto acuoso y se almacenó en frascos de color ámbar, a 4 °C. Los extractos así preparados también se utilizaron en los bioensayos de lentejilla y trigo rojo.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Para probar el efecto antitranspirante de los extractos de papel se utilizaron plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. "Cacahuete 72").

El efecto de los mismos sobre la germinación y crecimiento radicular, se determinó en semillas de lentejilla (*Lepidium sativum* L.) y de trigo rojo (*Triticum sativum* cv "Lerma rojo"), respectivamente.

¹ El presente trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del Laboratorio de Fisiología Vegetal, del Centro de Botánica del Colegio de Postgraduados en Chapingo, Méx.

5.3 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL

5.3.1 TRANSPIRACIÓN DE PLÁNTULAS DE FRIJOL

5.3.1.1 TRATAMIENTOS

Se realizaron dos experimentos independientes en que los extractos de papel (soluciones problema) fueron asperjados sobre las hojas simples de plántulas sometidas a sequía; se siguieron los tratamientos señalados en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Experimento I. Los extractos se aplicaron en una hoja simple.

TRATAMIENTO	SUSTANCIA APLICADA	
	HOJA SIMPLE No. 1	HOJA SIMPLE No. 2
I	Extracto de Papel Bond	Sin aplicación
II	Extracto de Papel Filtro	Sin aplicación
III	Extracto de Papel Kraft	Sin aplicación
IV	Extracto de Papel Bond	Agua deionizada
V	Extracto de Papel Filtro	Agua deionizada
VI	Extracto de Papel Kraft	Agua deionizada
VII	ABA ($10^{-4}M$)	Sin aplicación

En este caso, las hojas asperjadas con agua deionizada constituyeron el testigo; las hojas sin aplicación, así como las asperjadas con la solución de ABA se incluyeron con propósitos de comparación.

Cuadro 2. Experimento II. Los extractos se aplicaron en ambas hojas simples.

TRATAMIENTO	SUSTANCIA APLICADA
I	Sin aplicación
II	Testigo
III	Extracto de Papel Bond
IV	Extracto de Papel Filtro
V	Extracto de Papel Kraft
VI	ABA ($10^{-4}M$)

Las plántulas del testigo fueron asperjadas con agua deionizada. En este experimento las plántulas a las que no se aplicó ningún líquido así como las asperjadas con la solución de ABA, se incluyeron con fines comparativos.

Ambos experimentos se llevaron a cabo dos veces consecutivas, y se realizaron bajo un diseño completamente al azar, cada uno con diez repeticiones y una planta por repetición.

5.3.1.2 VARIABLES EVALUADAS

Los volúmenes de agua transpirados por las plántulas se determinaron gravimétricamente para lo cual se midió día con día, en balanza granataria de 2.61 kg., el peso de las macetas. Además el efecto de las sustancias aplicadas se evaluaría determinando en forma cualitativa la condición (marchita o turgente) de las hojas entre los diferentes tratamientos.

Con el objeto de conocer el nivel de daño sufrido por las plántulas al término del estrés hídrico, se determinó la cantidad de clorofila en muestras tomadas inmediatamente antes de concluir el experimento.

5.3.1.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las semillas de frijol se sembraron en macetas de unicel de 300 ml de capacidad, llenas con 300 g de una mezcla de tierra de monte y suelo arcilloso (1:1); inmediatamente después se les aplicó un riego hasta la saturación del sustrato.

Doce a catorce días a partir de la siembra, se hizo un aclareo, a fin de conservar la plántula más robusta y sana en cada maceta. Se monitoreó el tamaño de las hojas simples para determinar el momento de su maduración.

Tanto los extractos de papel (soluciones problema) como la solución de ABA y el agua deionizada (testigo) fueron adicionadas con el surfactante Tween 80 -una gota/50 ml≈ 0.1ml/100ml de solución- inmediatamente antes de aplicarlos.

Los tratamientos se aplicaron en ambas superficies foliares, con un atomizador manual. Se hicieron 5 y 4 aspersiones (experimento I y II, respectivamente) por las mañanas (9:30 a 11:00 a.m.).

Una vez maduras las hojas simples, -lo cual sucede antes de la expansión de la primera hoja trifoliolada-, se aplicó el último riego. Finalmente se asperjaron las soluciones problema y testigo de acuerdo a los tratamientos descritos anteriormente y se tomó el peso inicial de las macetas. A partir de este día se suspendió el riego.

El peso de las plántulas en sus macetas se determinó cada 24 h; la aplicación de los tratamientos se hizo cada 48 h. El período de sequía al cual fueron sometidas las plántulas duró de 8 a 10 días.

Las temperaturas registradas en el interior del invernadero fueron: mínimas de 10.8 a 13.9 °C y máximas de 23.6 a 31.6 °C en el primer experimento, y de 12.8 a 18.4 y 28.1 a 36.7 °C durante el segundo.

Para concluir el experimento se tomaron muestras de hojas -tres de las diez repeticiones en cada tratamiento-, con el objeto de cuantificar el contenido de clorofila siguiendo la técnica

5.3.2 GERMINACIÓN

5.3.2.1 TRATAMIENTOS

Como testigo se utilizó agua deionizada, ajustada al pH de cada uno de los extractos de papel. Debido a que éstos presentaron pH's diferentes, se manejaron en total tres testigos, cada uno para su correspondiente extracto. Los tratamientos, fueron los siguientes:

Cuadro 3. Tratamientos aplicados en el bioensayo con lentejilla (*Lepidium sativum* L.)

TRATAMIENTO	TESTIGO	SOLUCION PROBLEMA
1	agua a pH del Extracto de Papel Bond	Extracto de Papel Bond
2	agua a pH del Extracto de Papel Filtro	Extracto de Papel Filtro
3	agua a pH del Extracto de Papel Kraft	Extracto de Papel Kraft

Cada tratamiento incluyó cinco repeticiones; cada repetición quedó integrada de 20 semillas.

5.3.2.2 VARIABLES EVALUADAS

Se determinó el número de semillas germinadas (aquellas que presentaron radícula expuesta por fuera de la testa) cada 2 h después de un período de 12 h de incubación.

5.3.2.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El bioensayo se repitió ocho veces -independientes unas de otras-, y se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Larqué-Saavedra y Rodríguez (1993) con la variante de que no se utilizó soporte para colocar las semillas.

Se utilizaron cajas Petri con cuatro divisiones, para añadir a cada una de dos divisiones 1.1 ml de agua deionizada con el mismo pH del extracto correspondiente; en las restantes se agregaron -a cada una- 1.1 ml de la solución problema en cuestión.

Las cajas Petri se taparon e incubaron a 25 °C, en la oscuridad y por un lapso de 24 h. Transcurridas 12 h se registró el número de semillas germinadas, bajo luz verde. Con este dato se calcularon porcentajes de germinación.

Los porcentajes calculados se llevaron finalmente a un análisis de varianza y se sometieron a la Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

5.3.3 EN EL CRECIMIENTO RADICULAR

5.3.3.1 TRATAMIENTOS

Los tratamientos consistieron en lotes de diez semillas -con radículas de 1 a 2 mm de longitud-, que fueron incubados con los diferentes extractos de papel. Las semillas del testigo se incubaron con agua deionizada únicamente.

Cada tratamiento incluyó cinco repeticiones. Una repetición se integró con diez semillas pregerminadas, cuyas radículas presentaron una longitud de 1 a 2 mm.

5.3.3.2 VARIABLES EVALUADAS

La longitud de las radículas se midió con regla graduada en mm, 24 h después de aplicar los tratamientos.

5.3.3.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los bioensayos con el cv. "Lerma rojo" se realizaron tres veces de manera independiente; en todos los casos se siguió la técnica descrita por Larqué-Saavedra y Rodríguez (1993), con la variante de que se utilizó arena de cuarzo, previamente lavada, como soporte.

Las semillas de trigo fueron remojadas durante 6 h a 30 °C. Posteriormente se colocaron 100 de ellas en una charola, en cuyo fondo se colocó previamente una capa de arena de cuarzo de unos 3 mm de espesor. Una vez dispuestas las semillas se cubrieron con otra capa de arena

del mismo espesor; todo fue humedecido con agua deionizada, para después llevarlo a incubación por un lapso de 48 h, en la oscuridad.

Transcurrido el plazo y bajo luz verde, se eligieron aquellas semillas cuya radícula presentó una longitud de 1 a 2 mm; se colocaron diez de ellas por cada caja Petri. A cada una de éstas se le adicionaron 10 ml de una de las sustancias (agua deionizada o extracto de papel), se taparon e incubaron durante 24 h a 25 °C, y se mantuvieron en la oscuridad. Al término de este lapso se procedió a medir las radículas.

Las longitudes medidas se sometieron a un análisis de varianza y Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

VI RESULTADOS

6.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL

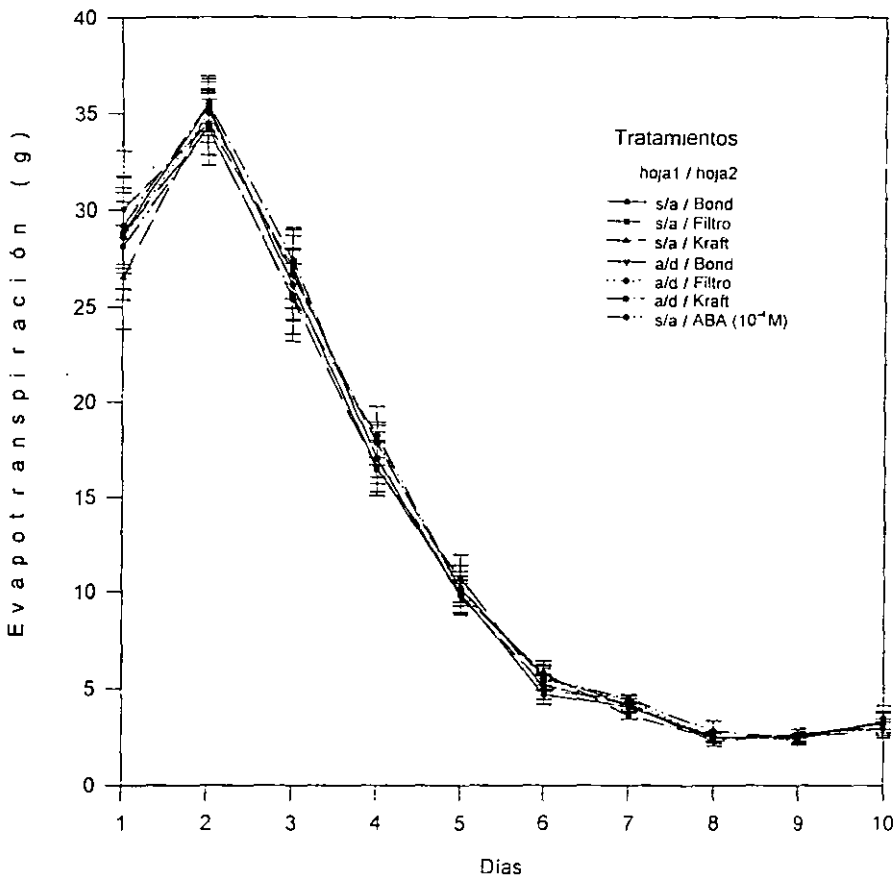
6.1.1 TRANSPIRACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA

En general, la evapotranspiración de las plántulas (gráficas 1 y 2) se incrementó durante las primeras 48 h del período experimental, para después descender progresivamente hasta alcanzar un mínimo entre los días siete a ocho. Esto se observó en ambos experimentos a pesar de que en el primero se aplicaron los tratamientos a una sola hoja.

Las curvas se caracterizan en los dos experimentos por la gran proximidad entre ellas a tal grado que los intervalos de los errores estándar se traslapan.

Aspersión de los Extractos de Papel en una Hoja Simple. Las plántulas perdieron prácticamente toda el agua de que disponían en el sustrato durante los primeros tres días del experimento. La gráfica 1 muestra que todos los tratamientos presentaron una evapotranspiración creciente durante el primer día del período de sequía, con pérdidas de agua de 28.15 ± 8.78 a 28.85 ± 9.20 g entre los tratamientos I a III (una hoja intacta y la segunda asperjada con un extracto de papel), y de 26.55 ± 8.46 a 30.05 ± 9.58 entre los tratamientos IV a VI (una hoja asperjada con agua deionizada, la otra con un extracto). En el tratamiento VII (una hoja sin aspersión, la otra asperjada con ABA 10^{-4} M), las pérdidas de agua alcanzaron 29.2 ± 8.82 g. En las siguientes 24 h los volúmenes de agua evapotranspirados oscilaron de 34.3 ± 4.52 a 35.4 ± 4.95 g en los tratamientos I a III; de 34.5 ± 5.30 a 35.15 ± 5.25 g entre los tratamientos IV a VI; en el tratamiento VII fueron de 35.55 ± 4.87 g.

A lo largo del tercer día del período de sequía se produjo una evapotranspiración de —



Gráfica 1. Evapotranspiración media diaria de las plántulas de frijol por tratamiento durante el periodo de sequía. Valor promedio de dos experimentos independientes, con diez repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. Los extractos de papel se aplicaron en una sola hoja (hoja2). s/a= hojas sin aspersión; a/d hojas asperjadas con agua deionizada (Testigo); Bond, Filtro, Kraft y ABA ($10^{-4}M$)= hojas asperjadas con las soluciones respectivas.

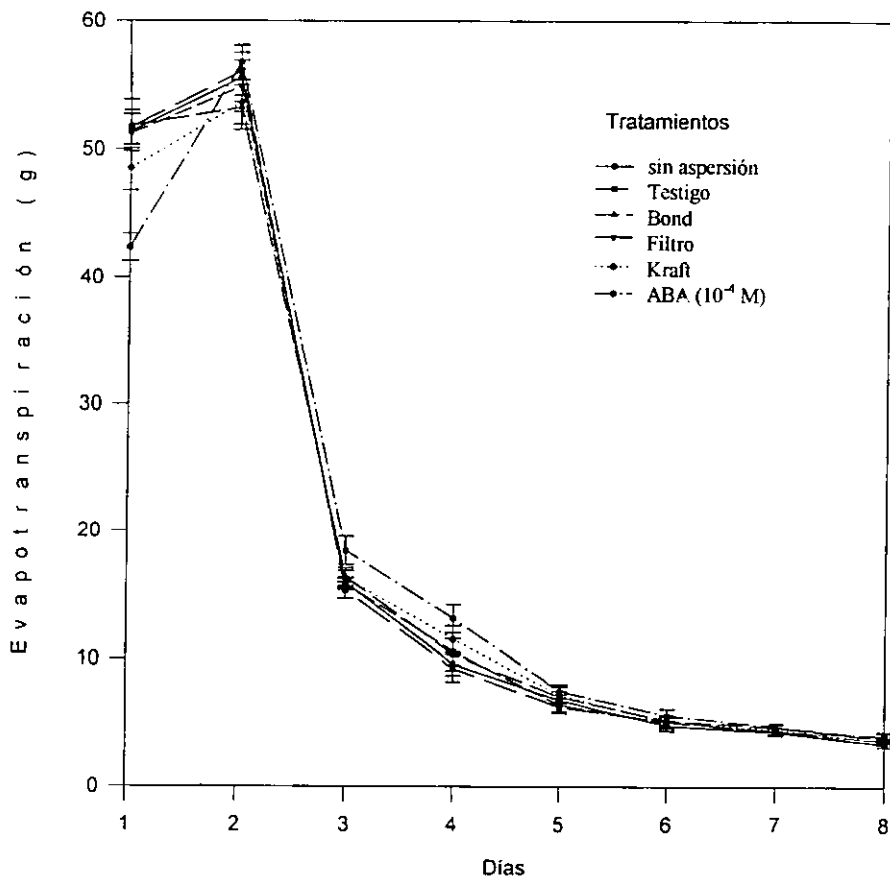
25.45±5.76 a 26.15±5.90 g en los tratamientos I a III, de 26.7±7.32 a 27.05±6.57 entre las plántulas del tratamiento IV a VI, y de 27.45±5.65 g entre las plántulas del tratamiento VII.

A partir del cuarto día del período de sequía el volumen de agua perdida descendió apreciablemente en el tratamiento VII con 17.05±4.35 g, y 17.38 g en promedio en el resto de los tratamientos; al finalizar el período de sequía (diez días en este experimento) la evapotranspiración fue de 3.24 g, promedio, entre todos los tratamientos.

Cabe hacer hincapié en que resultó sorprendente el comportamiento del tratamiento VII (una hoja sin aplicación, la otra asperjada con ABA) pues, contrariamente a lo esperado, mostró los mismos volúmenes de evapotranspiración, aunque con pequeñas fluctuaciones -no significativas- de 0.63 por debajo a 1.17 g mayores al promedio, que en tratamientos con los extractos acuosos de papel a lo largo del período de estrés hídrico.

Por otra parte, no se encontraron diferencias visibles y consistentes en las condiciones -turgentes o marchitas- de las hojas ni en una misma plántula, ni entre tratamientos a lo largo del experimento.

Aspersión de los Extractos de Papel en Ambas Hojas Simples. En la gráfica 2 se observa que durante los dos primeros días del experimento, todos los tratamientos agotaron la mayor cantidad de agua de que se disponía en las macetas: el primer día perdieron 51.85±9.04, 51.25±6.31 y 48.55±7.95 g en las plántulas asperjadas con los extractos de papel Bond, Filtro y Kraft, respectivamente. El testigo (plántulas asperjadas con agua deionizada) por su parte evapotranspiró 51.7±5.82 g de agua. Durante el segundo día las pérdidas de agua fueron de 53.25±7.72, 54.9±9.01 y 53.65±7.71 g en las plántulas tratadas con el extracto de



Gráfica 2. Evapotranspiración media diaria de las plántulas durante el periodo de sequía. Las soluciones acuosas se aplicaron sobre ambas hojas simples. Valor promedio de dos experimentos independientes, con 10 repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. Bond, Filtro, Kraft y ABA= plántulas asperjadas con las soluciones respectivas. Testigo= plántulas asperjadas con agua deionizada.

papel Bond, Filtro y Kraft, en ese orden, mientras que el testigo consumió 56.1 ± 8.68 g de agua.

Para el tercer día del período de sequía la evapotranspiración se redujo pronunciadamente, ya que se registraron volúmenes de 16.35 ± 3.2 g entre las plántulas asperjadas con el extracto de papel Bond, 15.8 ± 1.91 g en el tratamiento con papel Filtro y 16.25 ± 2.61 g en el de papel Kraft; en esta ocasión el testigo evapotranspiró un volumen de 15.3 ± 2.87 g de agua. A partir del cuarto día las pérdidas de agua disminuyeron progresivamente, hasta llegar a 3.8 ± 1.28 , 3.65 ± 1.27 y 3.6 ± 1.05 en los tratamientos con papel Bond, Filtro y Kraft, respectivamente. El testigo presentó una evapotranspiración de 4.05 ± 1.50 g.

Por otro lado, durante todo el período de sequía los tratamientos que se incluyeron con propósitos de comparación presentaron volúmenes de evapotranspiración similares: las plántulas asperjadas con ABA tuvieron pérdidas de agua de 42.35 ± 4.74 , 56.8 ± 6.04 , 18.42 ± 4.98 y 3.95 ± 1.23 en el primero a tercer y último día del experimento. Entre las plántulas que no recibieron aspersión alguna, la evapotranspiración alcanzó volúmenes de 51.4 ± 5.99 , 55.6 ± 8.57 , 15.9 ± 1.89 y 3.4 ± 1.05 en los mismos días.

Los datos señalan que en general las plántulas asperjadas con los extractos de papel presentaron evapotranspiraciones menores -pero no significativas- que el testigo: hasta 3.15 g con respecto a las plántulas tratadas con el extracto de papel Kraft, y hasta 2.85 g con respecto a las asperjadas con el extracto de papel Bond, -durante el primero y segundo días del experimento, respectivamente-, pero mayores, sin significancia, desde el tercero (por 0.5 a 1.05 g), hasta el séptimo día del período experimental en que la diferencia fue de solo 0.05 a 0.3 g.

Sin embargo, en el octavo día la evapotranspiración entre las plántulas asperjadas con los extractos de papel se diferenció del testigo por 0.25 a 0.45 g.

A pesar de las pequeñas variaciones en los volúmenes de agua consumidos por los distintos tratamientos en la primera mitad del experimento, finalmente todas las plántulas perdieron en términos prácticos la misma cantidad de agua en los días seis a ocho: desde 4.8 ± 1.77 a 5.6 ± 2.35 , en las plántulas sin aspersión y asperjadas con ABA $10^{-4}M$, y 3.4 ± 1.05 a 4.05 ± 1.50 en las plántulas sin aspersión y asperjadas con agua deionizada (el testigo), respectivamente; el resto de los tratamientos presentaron valores intermedios.

Por otra parte en la misma gráfica destaca el hecho de que las plántulas continuaron perdiendo agua en volúmenes mayores con respecto al primer experimento (las soluciones problema asperjadas en una hoja simple). De esta manera, la pérdida de agua llevó el peso de las macetas hasta los 257 g promedio, en contraste con el primer experimento en que el peso mínimo de las macetas se mantuvo en los 275 g promedio. Es decir, se registró una transpiración media de 49.52 a 3.74 g del primero al último día del período de estrés hídrico. Sin duda, aquí es claro el efecto de las temperaturas registradas durante el desarrollo de uno y otro experimento (mínimas de 10.8 a 13.9 °C y máximas de 23.6 a 31.6 °C; 12.8 a 18.4 y 28.1 a 36.7 °C, respectivamente).

Como se mencionó anteriormente, la proximidad entre las curvas correspondientes a los tratamientos así como la sobreposición de los intervalos del error estándar, permiten plantear que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, a pesar de que las plántulas recibieron la misma aplicación en ambas hojas simples.

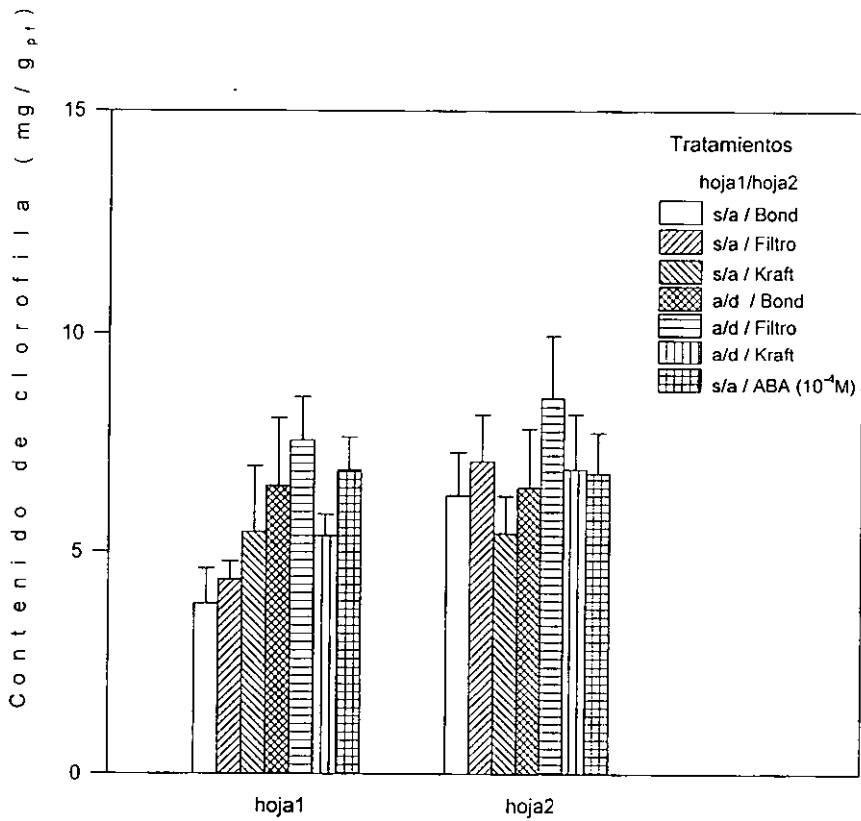
Por otra parte, cabe mencionar que el tratamiento con ABA presentó las pérdidas de agua más bajas en los tres primeros días; sin embargo y contrariamente a lo esperado, la diferencia con relación al resto de los tratamientos fue mínima, sin significancia, y no se sostuvo a todo lo largo del período de sequía.

6.1.1.1 CONTENIDO DE CLOROFILA EN LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA

Aspersión de los Extractos de Papel en una Hoja Simple. La gráfica 3 muestra el contenido de clorofila total para este experimento. En los tratamientos I a III, las hojas sin aspersión presentaron contenidos de clorofila desde 3.83 ± 0.79 a 5.46 ± 1.51 mg/g_{pf}, con un promedio de 4.56 mg/g_{pf}; las hojas asperjadas con los extractos acuosos de papel presentaron 5.43 ± 0.87 , 6.30 ± 0.98 y 7.08 ± 1.07 mg/g_{pf} en las plántulas tratadas con los extractos de papel Kraft, Bond y Filtro, respectivamente.

Entre los tratamientos IV a VI, en las hojas asperjadas con agua deionizada (el testigo) se hallaron valores de 5.37 ± 0.50 a 7.56 ± 0.99 mg/g_{pf}, que arrojaron un promedio 6.48 mg/g_{pf}; las hojas tratadas con los extractos tuvieron 6.48 ± 1.34 , 6.90 ± 1.26 y 8.53 ± 1.42 mg/g_{pf}. El contenido de clorofila total entre las plántulas del tratamiento VII fue de 6.89 ± 0.75 y 6.80 ± 0.93 mg/g_{pf} en las hojas asperjadas con ABA. El análisis de varianza indica que no existen entre todos ellos diferencias significativas en el contenido de clorofila.

Aspersión de los Extractos de Papel en Ambas Hojas Simples. En la gráfica 4 se _____

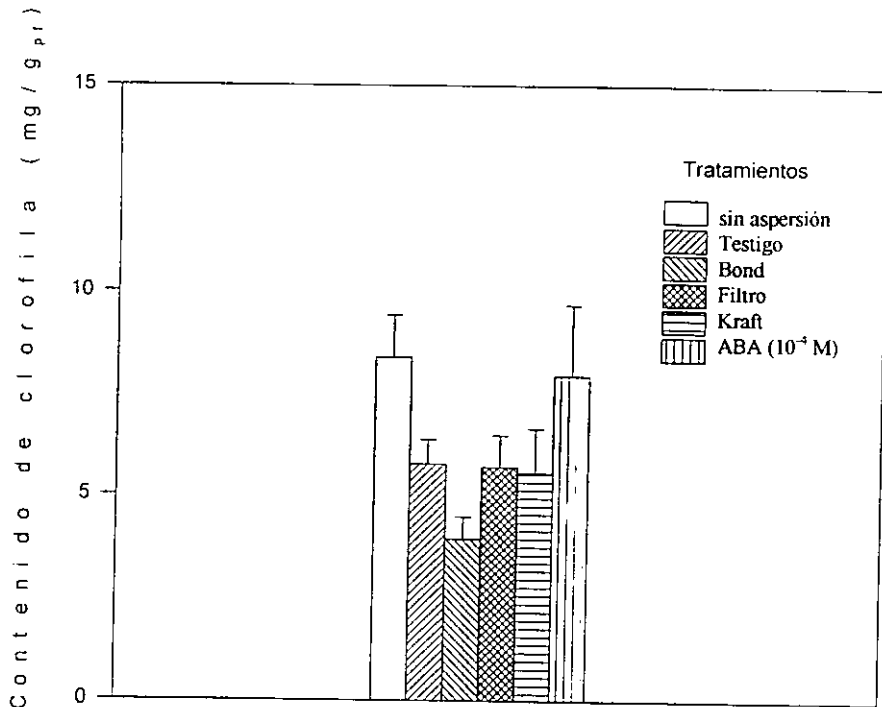


Gráfica 3. Clorofila total al término del período de sequía. Los extractos acuosos de papel fueron aplicadas a una sola hoja (hoja2). Promedios de dos experimentos independientes, con tres repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. s/a= hojas sin aspersión; a/d= hojas asperjadas con agua deionizada (Testigo); Bond, Filtro, Kraft y ABA ($10^{-4}M$) = hojas asperjadas con las soluciones respectivas.

observa que las plántulas asperjadas con agua deionizada (el testigo) contenían 5.79 ± 0.60 mg/g_{pr} de clorofila total y las plántulas sin aspersión 8.40 ± 1.02 mg/g_{pr}. El contenido de clorofila en las plántulas tratadas con ABA, 7.98 ± 1.72 mg/g_{pr}, resultó aparentemente menor al observado en las plántulas sin aspersión, pero superior a cualquiera otro de los tratamientos.

En general, los tratamientos con los extractos presentaron contenidos de clorofila total aparentemente menores a los de plántulas sin aplicación y asperjadas con ABA, pero similares al del testigo.

En las plántulas humedecidas con el extracto de papel Bond se observó el contenido más bajo de clorofila (3.95 ± 0.54 mg/g_{pr}), seguidas por las tratadas con los extractos de papel Kraft (5.58 ± 1.10 mg/g_{pr}) y Filtro (5.72 ± 0.77 mg/g_{pr}). Sin embargo, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre ellos.



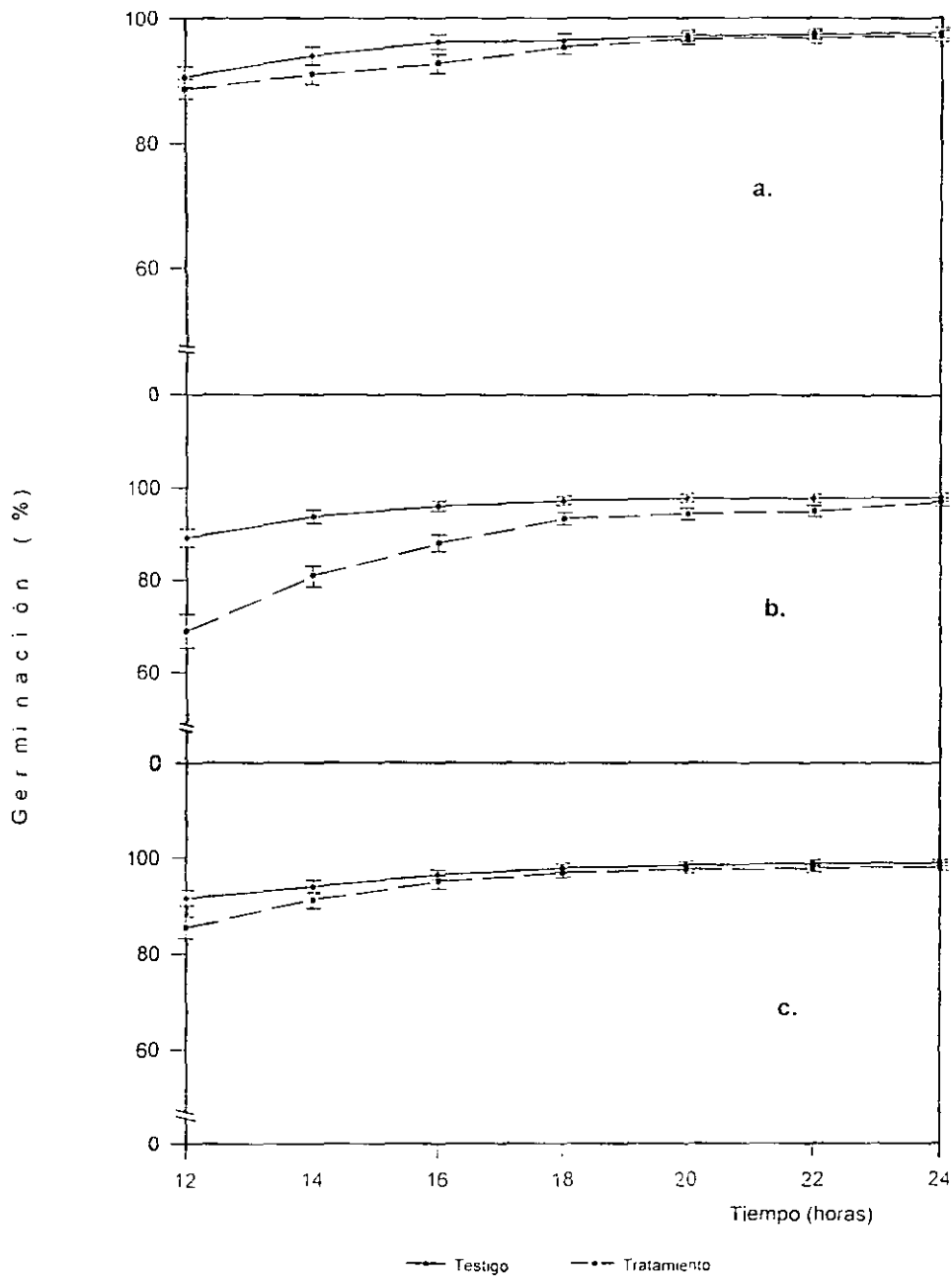
Gráfica 4. Clorofila total al término del periodo de sequia. Las soluciones fueron aplicadas en ambas hojas simples. Promedio de dos experimentos independientes, con tres repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. Bond, Filtro, Kraft y ABA (10^{-4} M) = plántulas asperjadas con las soluciones respectivas. Testigo= plántulas asperjadas con agua deionizada.

6.1.2. GERMINACIÓN

Con base en el examen de la cinética de germinación de *Lepidium sativum* ilustrado en la gráfica 5, se observa que el testigo correspondiente al extracto de papel Filtro produjo porcentajes de germinación menores (89.2 ± 1.94) a las 12 h, que el de papel Kraft y Bond ($91.8\pm 1.68\%$ y $90.8\pm 1.66\%$, respectivamente). A las 14 h los porcentajes de germinación se diferenciaron mínimamente con 0.2%, y a las 16 h la diferencia fue de 0.2 a 0.5% entre el testigo del papel Filtro y el del papel Bond y Kraft, en ese orden.

A partir de las 18 h la germinación del testigo correspondiente al extracto de papel Bond fue menor ($96.5\pm 1.11\%$) -aunque por pequeña diferencia- que en los otros testigos ($97.2\pm 0.95\%$ y $98.0\pm 0.82\%$, del papel Filtro y Kraft, respectivamente). Ninguno de ellos alcanzó el 100% de germinación a las 24 h de incubación; sin embargo, el testigo del tratamiento con extracto de papel Kraft tuvo la mejor respuesta con $99.0\pm 0.60\%$, seguido por los testigos del extracto de papel Filtro ($98.0\pm 0.89\%$) y Bond ($97.8\pm 0.84\%$).

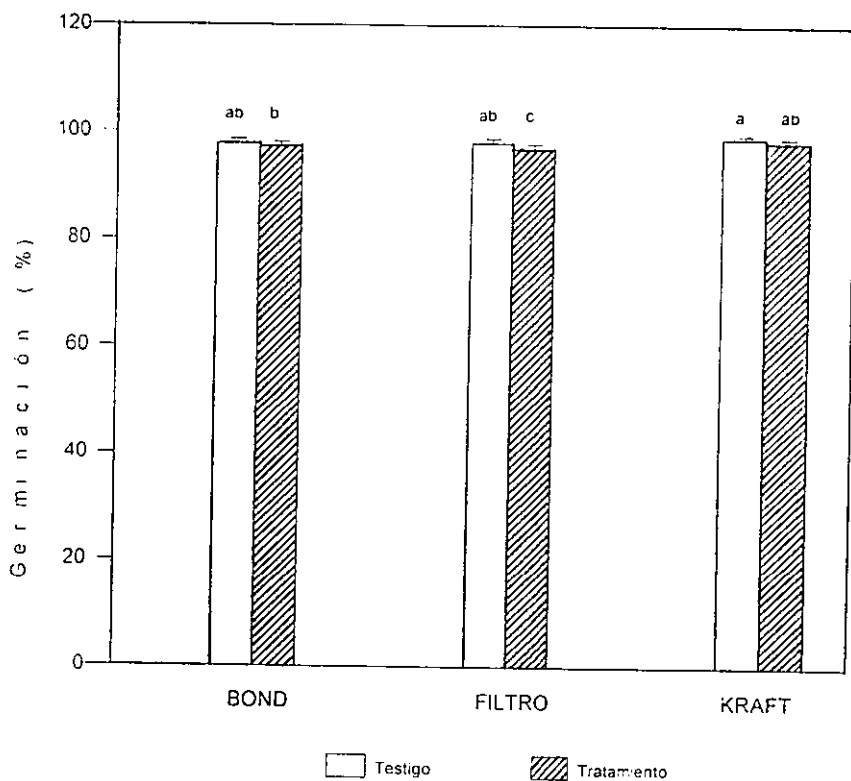
Con relación a la respuesta generada por la aplicación de los extractos, se tiene que en las primeras 12 h de incubación, la germinación en las semillas tratadas con el extracto de papel Filtro fue menor ($69.0\pm 3.65\%$) con respecto a las de Bond y Kraft (88.8 ± 1.61 y $85.5\pm 2.35\%$, respectivamente). La diferencia se redujo paulatinamente, hasta alcanzar 80.8 ± 2.28 , 91.0 ± 1.59 y $91.2\pm 1.76\%$, para cada uno de ellos en ese orden, a las 14 h y finalizó en 97.0 ± 0.89 , 97.2 ± 0.88 y $98.2\pm 0.79\%$ respectivamente, a las 24 h. Por otra parte, las semillas tratadas con el extracto de papel Kraft mostraron los valores más altos de germinación de los tres tratamientos: $95.0\pm 1.39\%$, $97.0\pm 1.02\%$, $97.8\pm 0.91\%$, $98.0\pm 0.82\%$ y $98.2\pm 0.79\%$ de germinación, a las 16, 18, 20, 22 y 24 h, respectivamente.



Gráfica 5. Cinética de germinación de *Lepidium sativum*. Cada punto es el promedio de ocho ensayos independientes, con cinco repeticiones por tratamiento, \pm el error estándar. En los tratamientos, las semillas fueron humedecidas con el extracto de papel Bond (a.), Filtro (b.) y Kraft (c.). Testigo= semillas humedecidas con agua deionizada.

En cuanto al comportamiento de cada tratamiento en comparación con su testigo, se observó menor porcentaje de germinación de las semillas tratadas con el extracto de papel Bond y su testigo, desde $88.8 \pm 1.61\%$ y $90.8 \pm 1.66\%$ a las 12 h, hasta 97.2 ± 0.88 y $97.8 \pm 0.84\%$ respectivamente, a las 24 h de incubación. Las semillas tratadas con el de papel Kraft presentaron germinaciones menores en relación a su correspondiente testigo, con magnitudes que fluctuaron desde el $85.5 \pm 2.35\%$ y $91.8 \pm 1.68\%$, respectivamente, a las 12 h, hasta el $98.2 \pm 0.79\%$ y $99.0 \pm 0.60\%$, respectivamente, a las 24 h de incubación. Finalmente las semillas tratadas con el extracto de papel Filtro presentaron $69.0 \pm 3.65\%$ de germinación, magnitud menor a su correspondiente testigo ($89.2 \pm 1.94\%$), a las 12 h, y $97.0 \pm 0.89\%$ ($98.0 \pm 0.89\%$ para el testigo) a las 24 h de incubación.

De acuerdo al análisis de varianza aplicado a los porcentajes de germinación observados a las 24 h de incubación, los valores de todos los testigos resultaron significativamente mayores a los de las semillas tratadas con los extractos de papel. Entre estos últimos, la prueba de Tukey -gráfica 6- indica que el de papel Kraft presentó el mismo nivel de significancia (*ab*) que los testigos para los extractos de papel Bond y Filtro, pero inferior al de su propio testigo (*a*). Finalmente, los tratamientos con los extractos de papel Bond y Filtro presentaron los niveles de significancia más bajos (*b* y *c*, respectivamente) de todo el conjunto. En otras palabras, los extractos del papel Kraft, Bond y Filtro inhibieron de manera creciente y significativa, en ese orden, la germinación de *Lepidium*.

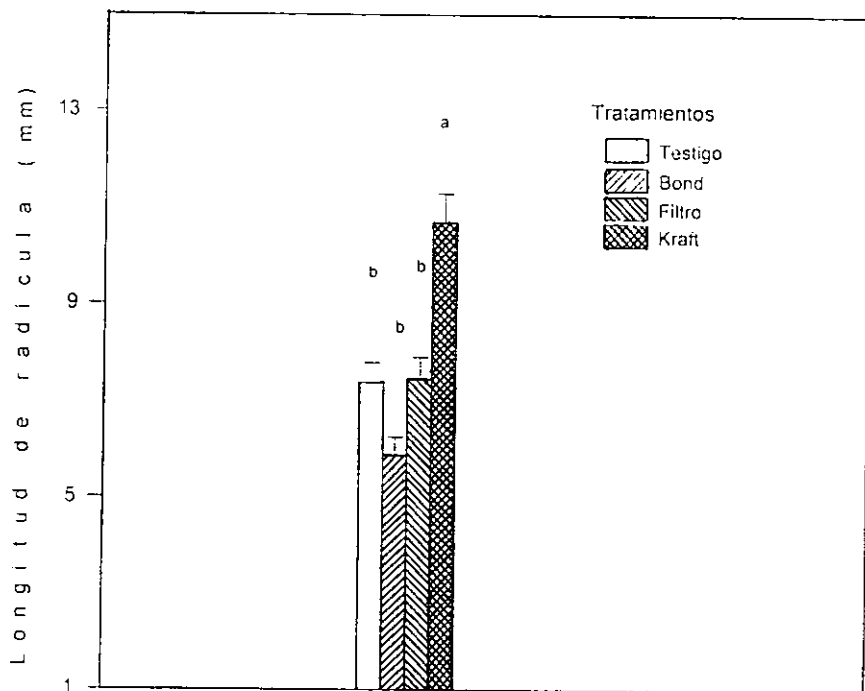


Gráfica 6. Germinación de *Lepidium sativum* a las 24 h del establecimiento del bioensayo. Valores promedio de ocho ensayos independientes, con cinco repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. Las letras indican los niveles de significancia obtenidos mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

6.1.3 CRECIMIENTO RADICULAR

En la gráfica 7 se muestra que el tratamiento con el extracto de papel Bond tuvo menor crecimiento radicular (5.87 ± 0.39 mm) en relación al testigo (7.37 ± 0.43 mm). Las radículas tratadas con el de papel Filtro presentaron la misma respuesta (7.44 ± 0.49 mm) que este último.

Es notorio el crecimiento radicular en las semillas tratadas con el extracto de papel Kraft ya que se registró una longitud de 10.68 ± 0.61 mm, claramente mayor a la del testigo (en 3.31 mm), y que resultó inesperada pero significativamente superior al resto de los tratamientos.



Gráfica 7. Longitud de radículas de trigo (*Triticum aestivum* L. "cv. Lerma rojo"), en respuesta a la aplicación de los extractos de papel. Promedio de tres experimentos independientes, con cinco repeticiones por tratamiento \pm el error estándar. Las letras indican los niveles de significancia de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

VII DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE PAPEL

7.1.1 TRANSPIRACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA

Aspersión de los Extractos de Papel en una Hoja Simple. La proximidad entre las curvas de pérdida de agua observada en la gráfica 1, y más aún el traslape de los intervalos del error, indican claramente que no existen diferencias significativas con respecto al volumen de agua transpirado entre las plántulas asperjadas con los extractos de papel, bajo las condiciones llevadas en este trabajo.

Esto resulta desconcertante si se consideran, por un lado las evidencias halladas por García (1991) y por el otro, que sólo una de las dos hojas simples fue asperjada con algún extracto de papel o con el ABA y que la otra no tratada supuestamente se encontraba en condiciones normales para transpirar. Si alguno de los extractos acuosos de papel hubiera ejercido efectos antitranspirantes como se esperaba (aunque la mitad de la superficie foliar transpirara normalmente), entonces el comportamiento -principalmente en la velocidad de caída-, de alguna de las curvas de evapotranspiración hubiera sido, sin duda, significativamente diferente.

Sin embargo, es importante señalar que cuando el antitranspirante cubre sólo una parte de los estomas de la superficie foliar, los de la porción no cubierta se encuentran más abiertos que en una hoja no tratada por químicos formadores de películas (Davenport *et al.*, 1972); posiblemente ocurre lo mismo en el caso de los antitranspirantes inhibidores de la apertura estomatal tales como el mismo ABA o el PMA, y aún en el caso de los extractos de

papel. Además, se tienen evidencias de que el intercambio gaseoso se intensifica en las porciones no cubiertas, de manera que el abatimiento de la transpiración producido por un antitranspirante se ve afectado también por la razón entre la superficie foliar cubierta y la no cubierta (Solárova *et al.*, 1981).

Llama la atención el comportamiento descrito por el tratamiento VII (una hoja simple sin aspersión, la segunda asperjada con ABA 10^{-4} M) porque se esperaba que ahí la pérdida de agua fuera significativamente menor. Sin embargo resultó aparentemente mayor -aunque por una diferencia de 0.7 a 1.17 g- al volumen de evapotranspiración del resto de los tratamientos hasta el cuarto día del período experimental, a partir del cual las fluctuaciones fueron todavía de menor magnitud (de 0.04 a 0.63 g por debajo, y de 0.2 a 0.52 superior a ellos). El hecho podría explicarse porque, a pesar de la adición del surfactante no hubo penetración estomatal por tratarse de una solución acuosa (Fox y Zisman, 1950; Schönherr y Bukovac, 1972), cuya humectabilidad no fue la apropiada (Greene y Bukovac, 1974; Schreiber y Schönherr, 1992); o bien por algún error en la preparación o manejo en el invernadero de la solución de ABA. Este último puede relacionarse al efecto de las condiciones ambientales mencionado por Field y Bishop (1988); cabe mencionar que durante el período experimental dominaron los días cálidos y muy soleados.

Con relación a la forma de las curvas descritas por todos los tratamientos es claro que el incremento de la transpiración se produjo mientras hubo suficiente disponibilidad de agua. En cuanto ésta comenzó a escasear se indujo el cierre estomatal independientemente de las soluciones aplicadas -hecho que se confirmó en las hojas asperjadas con agua deionizada, es decir el testigo, y en las que no se aplicó ninguna sustancia -, y con él la apreciable disminución

de los volúmenes de agua transpirados; dicha disminución corresponde, sin duda, a la caída de las curvas a partir del segundo día del período de sequía. La continua reducción observada en los volúmenes de evapotranspiración indican que -como normalmente ocurre- el cierre estomatal no fue completo, de tal manera que el consumo de agua por las plántulas siguió hasta agotarla en el sustrato, tanto en las asperjadas con los extractos de papel como en las tratadas con ABA. El desempeño de una sustancia con efectos antitranspirantes debe ser crucial en las primeras 24 a 48 h siguientes al inicio de un período de sequía, ya que es allí donde se produciría el ahorro de agua o, en palabras de Solárova *et al.* (1981), donde podría retrasarse el desarrollo del déficit hídrico.

Es necesario aclarar que con el presente trabajo se esperaba obtener evidencias de un efecto antitranspirante significativo -de impacto comercial- de los extractos acuosos de papel sobre plantas *in vivo*. Es decir, se esperaba un abatimiento en la transpiración de tal magnitud que permitiera prever una compensación efectiva en el ahorro de agua por el esfuerzo económico que pueda representar la aplicación de los extractos en una explotación agrícola. Sin embargo, no se observó ningún ahorro de agua o por lo menos un retraso en el desarrollo del déficit hídrico; es evidente que se requerirá corregir y/o modificar las condicionantes de la aplicación de los extractos y aún de la solución de ABA.

Vale la pena considerar, por otra parte, que la falta de respuesta hallada, a diferencia de lo observado por García (1991), pudo deberse a que el procedimiento seguido aquí: 1) no facilitó la penetración ni de los extractos ni del ABA a la cámara subestomática, y/ o 2) a que se evitó en lo más posible el daño mecánico a las hojas de manera que no hubo penetración de los extractos directamente al interior de los tejidos foliares a través de heridas (Dybing y

Currier, 1961) o de los márgenes de un corte, como en el caso de los explantes, para que de allí difundiera hasta los estomas. La diferencia existente entre los resultados aquí observados y el cierre estomatal que García (1991) halló al aplicar aspersiones en plantas de maíz *in vivo*, pudo deberse a diversas razones adicionales:

1) en el presente trabajo se utilizaron plántulas cultivadas en condiciones de invernadero y no en cámara de crecimiento; se ha demostrado que el comportamiento estomatal varía en uno u otro caso, en razón de que las relaciones hídricas de la planta pueden ser significativamente influenciadas por las condiciones ambientales (Davies, 1977); 2) las hojas no fueron sumergidas en las soluciones, de manera que nunca se ejerció una presión externa que favoreciera la entrada de la solución a través del poro estomatal (Dybing y Currier, 1961); 3) el número de estomas en la superficie adaxial del frijol, un promedio de 51.35 estomas/mm² (Sevilla, 1983), es menor que en el maíz, la especie utilizada por García; 4) la forma, composición y disposición de los estomas varía en una y otra especie, todo lo cual podría implicar diferencias en la penetración de líquidos por vía estomatal; 5) la naturaleza y composición de la cutícula y de la cera epicuticular (alcoholes primarios en el maíz, Stevens *et al.*, 1988), así como de las condiciones ambientales que influyen en la tasa de penetración cuticular (Field y Bishop, 1988), al igual que el grosor de la cutícula son distintos en una y otra especie, lo cual también implica diferencias en la penetración de líquidos a través de la epidermis (Field y Bishop, 1988, Stock *et al.*, 1993; Schönherr y Bukovac, 1972); 6) hay diferencias entre ambas especies en cuanto a la densidad y otras características de los tricomas -una de las rutas preferenciales de la penetración de químicos (Dybing y Currier, 1961)- existentes en sus superficies foliares; Flores *et al.* (1977) reportan que la superficie adaxial del

frijol es menos pilosa que el envés y exhibe menor variedad de tricomas. Los tricomas tienen una profunda influencia en la formación, repulsión y localización del agua superficial. A mayor densidad de tricomas, menor retención de la humedad y menor humectabilidad de la superficie (Brewer y Smith, 1997); 7) una dicotiledónea, como el frijol, responde fisiológicamente al déficit hídrico -en forma global y en particular del aparato estomático- de manera distinta a una monocotiledónea, como el maíz; un estrés hídrico moderado incrementa por 3 o 4 veces el contenido de ABA en el xilema de *Phaseolus vulgaris* comparado con el aumento por 20, 30 o 50 veces en maíz (Trejo y Davies, 1991). En este último caso, el aparato estomatal podría ser mucho más sensible a la aplicación de una sustancia con efectos antitranspirantes (Hounam, 1975), por lo menos bajo las condiciones de cámara de crecimiento que utilizó García (1991), puesto que las diferentes respuestas entre especies y cultivares a la aplicación de antitranspirantes, depende también de su sensibilidad a los cambios en la conductancia de la epidermis (Solarova *et al.*, 1981). Por otra parte, Stevens *et al.* (1988) afirman que no se pueden extrapolar los resultados obtenidos en una especie, a otra.

8) También es posible plantear que la ausencia de una respuesta significativa en los tratamientos con los extractos acuosos de papel probados en el presente trabajo, se debió a que el surfactante y/o la proporción en que se aplicó pudo(pudieron) no ser el(los) conveniente(s), puesto que la penetración estomatal es una función muy importante del surfactante utilizado (Dybing y Currier, 1961; Stock y Holloway, 1993).

Cabe señalar que a pesar de que la aspersión de los extractos adicionados con Tween 80 formó gotas muy pequeñas sobre la superficie foliar, quedando en apariencia uniformemente humedecida, ello no necesariamente es condición suficiente para propiciar su penetración a

través de los estomas (Greene y Bukovac, 1974; Schönherr y Bukovac, 1972) y/o también de la cutícula (Field y Bishop, 1988). Hasta hoy la penetración vía estomas se consigue únicamente con la adición de surfactantes altamente activos como los organosilicones (Stock y Holloway, 1993). Debe considerarse como posible que además de que el surfactante no favoreció la penetración estomatal, pudo tener efectos fitotóxicos (Parr y Norman, 1965; Caux *et al.*, 1992) los cuales resultan difíciles de distinguir porque quedan enmascarados por los síntomas del estrés hídrico.

Finalmente, no podría pasarse por alto que los extractos acuosos de papel sean de naturaleza termo o fotolábil, de tal manera que pierdan sus propiedades antitranspirantes al aplicarse a las plántulas bajo condiciones de invernadero (Larqué-Saavedra, comunicación personal), a pesar de que sólo queden expuestas a los rayos solares y relativamente altas temperaturas -las registradas en el interior del invernadero entre 9:30 y 11.00 a.m., que es el horario en que se aplicaron las soluciones- por un muy breve lapso de tiempo (1 a 2 min, como máximo mientras se mezclaban con el Tween 80) antes de aplicarlos.

Por otra parte, para reducir las pérdidas por volatilización o fotodegradación -o las debidas al lavado por lluvia en el caso de las aplicaciones al aire libre-, de un agroquímico aplicado a las hojas, es importante que sea rápidamente absorbido (Stevens *et al.*, 1988; Stock *et al.* 1993). La infiltración via estomas ocurre únicamente mientras los depósitos del agroquímico aplicado permanezcan líquidos (Stevens *et al.*, 1991).

Aspersión de los Extractos de Papel en Ambas Hojas Simples. Pueden hacerse en general los mismos planteamientos que en el caso anterior, puesto que el comportamiento de las curvas es semejante. Sin embargo, aquí se observó una pérdida de agua menor -6.2, 8.9 y

9.5 g con respecto a las plántulas tratadas con el extracto de papel Kraft, Filtro y Bond, respectivamente- en el tratamiento con la solución de ABA durante el primer día del período de déficit hídrico, la cual no representó mayor ventaja pues las plántulas evapotranspiraron al final de dicho período la misma cantidad de agua que el resto de los tratamientos.

Con todo, la curva descrita por las plántulas asperjadas con ABA también es atípica en este experimento, de lo cual se deduce que la solución no penetró a las cámaras subestomáticas o bien, o que pudo haber error en la preparación o manejo de la solución.

Por otra parte, llama la atención que la evapotranspiración de los tratamientos con los extractos de papel haya sido aparentemente menor (en promedio de 50.55 y 53.93 g/día en el primero y segundo día del período de sequía, respectivamente) que en las plántulas sin aspersión (51.4 ± 5.99 g y 55.6 ± 8.57 g) y que en el testigo, es decir, las asperjadas con agua deionizada (51.7 ± 5.82 y 56.1 ± 8.68 g, en el primero y segundo día, respectivamente). No obstante las diferencias halladas en el consumo de agua en esos días, parecieron no tener un impacto mayor puesto que todos los tratamientos concluyeron el período experimental transpirando la misma cantidad de agua.

Por otra parte, las altas temperaturas registradas en el interior del invernadero (mínimas de 12.8 a 18.4 °C y máximas de 28.1 a 36.7 °C) con el avance de la estación de crecimiento, explican la excesiva pérdida de agua que llevó a las macetas de todos los tratamientos a pesos de 257 g, en un período de tiempo más corto.

7.1.1.1 CONTENIDO DE CLOROFILA EN LAS PLÁNTULAS DE FRIJOL BAJO CONDICIONES DE SEQUÍA

Aspersión de los Extractos en una Hoja Simple. El promedio de los contenidos de clorofila entre los tratamientos, muestra que aparentemente las hojas asperjadas con el extracto de papel Filtro presentaron el mayor valor ($7.81 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), seguido por las tratadas con la solución de ABA ($6.80 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), el testigo, es decir, las hojas asperjadas con agua deionizada ($6.48 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$ en promedio), con los extractos de papel Bond ($6.39 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$) y Kraft ($6.17 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), y finalmente por las que no recibieron ninguna aspersión ($5.14 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$). Sin embargo, el análisis de varianza indica que no hubo diferencias significativas de los tratamientos. Esto confirma entonces que las plántulas resultaron afectadas de la misma forma por el estrés hídrico, independientemente de la solución con la que fueron asperjadas.

Aspersión de los Extractos en Ambas Hojas Simples. En este caso también se encontraron diferencias aparentes en el contenido de clorofila, pero las hojas sin aplicación presentaron $8.40 \pm 1.02 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$, el mayor valor, seguidas por las asperjadas con la solución de ABA ($7.98 \pm 1.72 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), con el agua deionizada, es decir el testigo ($5.79 \pm 0.60 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), así como los extractos de papel Filtro ($5.72 \pm 0.77 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), Kraft ($5.58 \pm 1.10 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$) y Bond ($3.95 \pm 0.54 \text{ mg/g}_{\text{pr}}$), repitiendo las tendencias observadas en el primer experimento y no obstante las inconsistencias halladas en los tratamientos sin aspersión y ABA. El análisis de varianza, sin embargo, indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos; es decir, en uno y otro caso las plántulas fueron afectadas de la misma forma por el estrés hídrico y a pesar de las soluciones que se les aplicaron.

Por otra parte los menores contenidos de clorofila -no significativos- encontrados entre los tratamientos de este experimento pudieron deberse a la rápida e intensa pérdida de agua, por causa de las altas temperaturas registradas en el invernadero, que a su vez generaron posiblemente una mayor degradación de los cloroplastos y consecuentemente, de la clorofila. El daño provocado por el estrés hídrico sobre estos organelos básicamente consiste en la formación de vesículas en el citoplasma de células de la vaina de maíz e hinchamiento de la membrana exterior de los cloroplastos a -13.5 bars; a -19 bars se intensifica el hinchamiento, se degrada la estructura y finalmente, se produce la ruptura de los cloroplastos (Giles *et al.*, 1974).

7.1.2 GERMINACIÓN

Los bajos valores hallados en el testigo del extracto de papel Filtro hasta las 16 h, así como en el de éste y del papel Bond a partir de las 18 h, pueden explicarse únicamente por efecto del pH. En el primer caso, los bajos porcentajes de germinación pudieron deberse a que el pH interfiere con las etapas iniciales del proceso, mientras que en el segundo caso, interfiere en etapas avanzadas, o bien a que el efecto del pH durante todo el proceso es el mismo pero la respuesta de las semillas en el tiempo es distinta.

La diferencia observada entre los porcentajes de germinación del extracto de papel Filtro y su correspondiente testigo, aunque disminuyen paulatinamente con el paso del tiempo (69.0 ± 3.65 y $89.2 \pm 1.94\%$ a las 12 h, 97.0 ± 0.89 y $98.0 \pm 0.89\%$ a las 24 h de incubación, respectivamente), fueron superiores que en el caso de los otros dos tratamientos. Hasta las 16 h también se halló una mayor diferencia entre los porcentajes de germinación del extracto de papel Kraft y su testigo (95.0 ± 1.39 y $96.5 \pm 1.05\%$, respectivamente), comparado con el caso del extracto de papel Bond, la cual se redujo -con algunas fluctuaciones-, a partir de las 18 h (97.0 ± 1.02 y $98.0 \pm 0.82\%$).

La diferencia entre los extractos y sus testigos sugiere claramente que el pH de aquéllos, y en especial el del papel Filtro, es sólo una de las propiedades que abate la germinación en *Lepidium*. Es decir, posiblemente poseen uno o más componentes inhibidores del proceso, de efectos sinérgicos o adicionales al del pH, y que pueden ser de tipo mineral por tratarse de las sustancias más importantes, en número y cantidad, utilizadas en la elaboración y acabado del papel (Graf, 1934; Guzmán, 1939; Carpy, 1941; Montaña, 1963; García, 1995; CONCAMIN,

1995). Aunque no se podría descartar la presencia de ABA en los extractos, ya que el bioensayo en sí está diseñado para detectar la presencia de ese inhibidor vegetal.

En lo que al desempeño de los extractos se refiere, se observó que desde las 12 h de incubación el extracto de papel Filtro produjo gran efecto en la germinación (9.9% menor al de los otros dos, en promedio de las 12 a las 24 h de incubación), aunque la magnitud del mismo se redujo paulatinamente hasta llegar al $97.0 \pm 0.89\%$, inferior a la respuesta del tratamiento con el extracto de papel Kraft ($98.2 \pm 0.79\%$), a las 24 h.

A partir de las 14 h se encuentra en las semillas tratadas con el extracto de papel Kraft un aparente e importante incremento en la germinación (que la lleva hasta el $91.2 \pm 1.76\%$ comparado con el $85.5 \pm 2.35\%$ a las 12 h), superior al de los otros dos tratamientos en 5.3 a 1.1% en promedio, este último a las 24 h. En otras palabras, este extracto resultó el más inocuo para el proceso de germinación en *Lepidium* dentro de un período de 24 h de incubación.

De los tres tratamientos probados, el del papel Bond produjo efectos que pueden considerarse intermedios, no obstante que al término del período experimental rindió prácticamente el mismo porcentaje de germinación que el de papel Filtro (97.2 ± 0.88 y $97.0 \pm 0.89\%$, respectivamente).

Con base en el resultado del análisis de varianza y de la prueba de Tukey se concluye que todos los tratamientos dieron un porcentaje de germinación menor (*b*) que los testigos (*a*) y entre aquéllos, el abatimiento se intensificó en el tratamiento con EAP-Kraft (*ab*), EAP-Bond (*b*) y EAP-Filtro (*c*), en ese orden.

Por los efectos hallados en esta semilla, podría plantearse que los extractos contienen una o varias sustancias, muy posiblemente de naturaleza mineral -por ejemplo residuos de blanqueadores como el permanganato de potasio, de peróxido, de Na_2SO_3 , de las breas o alumbre (CONCAMIN, 1995)-, que disminuyen la germinación ya sea por inhibición directa o por alteración del proceso. Es muy aventurado plantear que este efecto se deba a la presencia de ABA en los extractos acuosos -aunque no podría descartarse de manera tajante la presencia del inhibidor-, particularmente si se considera difícil que una sustancia lábil como ésta pueda persistir al proceso químico de la elaboración de celulosa (CONCAMIN, 1995) y/o a la acción de los blanqueadores usados en la preparación del papel Bond y Filtro.

7.1.3 CRECIMIENTO RADICULAR

La gráfica 7 muestra claramente que el extracto de papel Filtro no tuvo efecto sobre la longitud de la radícula, ya que presentó un promedio (7.44 ± 0.49 mm) semejante al del testigo (7.37 ± 0.43 mm), en tanto que el de papel Bond produjo una importante reducción -no significativa- sobre su crecimiento, pues generó en promedio radículas de 5.87 ± 0.39 mm. En contraste con lo anterior, el extracto de papel Kraft pareció haber estimulado el crecimiento radicular ya que produjo radículas de 10.68 ± 0.61 mm en promedio, superiores estadísticamente al testigo y a los demás tratamientos.

Por cierto, resultó sorprendente la respuesta de las radículas para el tratamiento con extracto de papel Kraft, particularmente al comparar con el efecto producido por los demás extractos. En consecuencia, si no se encontró inhibición del crecimiento radicular en esta especie, entonces se puede afirmar que en los extractos de papel no hay ABA o un sucedáneo.

Por otra parte, si se toman en cuenta las condiciones químicas del procesamiento de la celulosa, parece inconsistente sugerir la existencia de algún fitorregulador -estimulante del crecimiento radicular- en el extracto del papel Kraft. Pero sí se plantearía que de entre los muchos minerales utilizados en la elaboración y acabado del papel, algunos de los remanentes -sulfatos, cloruros, óxidos de Fe, Al y K (Carpy, 1941), azufre, sales de calcio, magnesio o manganeso (Guzmán, 1939), u otros- pasaron a formar parte de este extracto y fueron aprovechados por las radículas en crecimiento. Cabe recordar que el papel Kraft no es sometido a un proceso de blanqueado.

En lo referente al papel Filtro, se supone que los fabricantes se interesan en obtener un producto "neutro" -es decir, químicamente inerte-, para uso en laboratorios. Aunque las evidencias logradas por García (1991) demuestran que esto no se consigue al 100%, sí podría esperarse un producto con el mínimo de residuos. Esto es posiblemente la razón de que en el tratamiento con el extracto de papel Filtro el crecimiento radicular presentó prácticamente la misma respuesta que el testigo.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

VIII CONCLUSIONES

1. Los extractos de papel no redujeron la transpiración de las plántulas de frijol, pero
2. inhibieron la germinación de semillas de *Lepidium sativum*, en el siguiente orden de magnitud: Extracto de Papel Filtro > Extracto de Papel Bond > Extracto de Papel Kraft. El retraso observado en la germinación pudo deberse a la presencia de algún residuo químico (posiblemente de naturaleza mineral) en los extractos, de naturaleza diferente al ABA.
3. El extracto de papel Kraft estimuló significativamente el crecimiento radicular de trigo cv. "Lerma rojo"; los de papel Bond y Filtro no lo afectaron.

IX BIBLIOGRAFÍA

Arnon, .1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxi in *Beta vulgaris*. *Pl. Physiol.* **24**: 1-15

Baker, E. A., A. L. Hayes y R. C. Butler. 1992. Physicochemical properties of agrochemicals: their effects on foliar penetration. *Pestic. Sci.* **34**: 167-182

Boyer, J. S. 1970. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. *Pl. Physiol.* **46**: 233-235

Boyer, J. S., S. C. Wong y G. D. Farquhar. 1997. CO₂ and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Pl. Physiol.* **114**: 185-191

Brewer, C. A. y W. K. Smith. 1997. Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. *Pl. Cell and Environ.* **20**: 1-11

Brewer, C. A., W. K. Smith y T. C. Vogelmann. 1991. Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Pl. Cell and Environ.* **14**: 955-962

Brown, K. W. y N. J. Rosenberg. 1970. Influence of leaf age, illumination and upper and lower surface differences on stomatal resistance of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Agron. J.* **62**: 20-24

Bussotti, F., A. Bottacci, P. Grossoni, B. Mori y C. Tani. 1997. Cytological and structural changes in *Pinus pinea* L. needles following the application of an anionic surfactant. *Pl. Cell and Environ.* **20**: 513-520

Cámara Nacional de las Industrias de la Celulosa y del Papel. 1998. Memoria estadística. México, pp. 22, 35

Carpy C., H. 1941. Obtención de la celulosa por el procedimiento al sulfato e importancia térmica de la recuperación de las lejas negras. Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de Química Méx.

Castillo Ramírez, D. 1988. Definición, clasificación y análisis de las sequías. UACH, Chapingo, Méx.

Caux, P. Y., P. Weinberger y A. Szabo. 1992. Effects of pesticide adyuvants on membrane lipid composition and fluidity in *Lemna minor*. *Canad. J. Bot.* **71**: 1291-1297

CONCAMIN (Confederación de Cámaras de la Industria). 1995. La celulosa y el papel, una industria con papel de protagonista. *Industria* **2**: 10-22

CONCAMIN (Confederación de Cámaras de la industria). 1997. Papel: el punto de encuentro entre el hombre y la naturaleza. *Industria* **9**: 9-14

Coret, J. M. y A. R. Chamel. 1993. Influence of some nonionic surfactants on water sorption by isolated tomato fruit cuticles in relation to cuticular penetration of glyphosate. *Pestic. Sci.* **38**: 27-32

Coudret, A. y F. Ferron. 1977. La transpiration végétale. Modes d'action des antitranspirants. *Ann. Amélior. Pl.* **27**: 613-638

Davenport, D. C., M. A. Fisher y R. M. Hagan. 1972. Some counteractive effects of antitranspirants. *Pl. Physiol.* **49**: 722-724.

Davies, P. J. 1995. The plant hormone concept: concentration, sensitivity and transport. En: *Plant Hormones*. Kluwer Academic Pub., Nether.

Davies, W. J. 1977. Stomatal responses of water stress and light in plants grown in controlled environments and in the field. *Crop Sci.* **17**: 735-740

Dybing, C. D. y H. B. Currier. 1961. Foliar penetrations by chemicals. *Pl. Physiol.* **36**: 169-174.

Ekstein, J., O. Artsaenko, U. Conrad, M. Peisker y W. Beyschlag. 1998. Abscisic acid is not necessarily required for the induction of patchy stomatal closure. *J. Exp. Bot.* **49**: 611-616

Fenton, R., W. J. Davies y T. A. Mansfield. 1977. The role of farnesol as a regulator of stomatal opening in *Sorghum*. *J. Exp. Bot.* **28**: 1043-1053

Field, R. J. y N. G. Bishop. 1988. Promotion of stomatal infiltration of glyphosate by an organosilicone surfactant reduces the critical rainfall period. *Pestic. Sci.* **24**: 55-62

Flores, E. M., A. M. Espinoza y Y. Kozuka. 1977. Estudio ultra estructural de la epidermis foliar de *Phaseolus vulgaris* L. *Turrialba* **27**: 117-124

Fox, H. W. y W. A. Zisman. 1950. The spreading of liquids on low energy surfaces. I. Polytetrafluoroethylene. *J. Colloid Interface Sci.* **5**: 514-531

Gaastra, P. 1959. Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature and stomatal diffusion resistance. *Meded. Landbouwhogeschool* 59: 1-68

Gale, J., A. Poljakoff-Mayber, L. Nir, y L. Kahane. 1964. Essais préliminaires d'application au champ d'antitranspirants sur vignes et bananiers. *Austral. J. Agric. Res.* 15: 929-936

García M., F. 1995. La elaboración del papel: una historia de tradición y tecnología. *Industria* 2: 42-47

García M., L. P. 1991. Resistencia a la sequía XXX: alteración de apertura estomatal y transpiración producidas por extractos acuosos de papel. Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias, Méx.

Giles, K. L., M. F. Beardsell y D. Cohen. 1974. Cellular and ultrastructural changes in mesophyll and bundle sheath cells of maize in response to water stress. *Pl. Physiol.* 54: 208-212

Gilroy, S., M. D. Fricker, N. D. Read y A. J. Trewavas. 1991. Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *Pl. Cell* 3: 333-344

Gómez L., F. 1983. Cultivos adaptados a baja precipitación. En: Simposium: La sequía y su impacto en la agricultura. UACH Depto. de Fitotecnia, Chapingo, Méx.

Graf C., G. 1934. Estudio de la fabricación de la celulosa; proceso al sulfito. Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de química, Méx.

Green, D. W. y M. J. Bukovac. 1974. Stomatal penetration: effect of surfactants and role in foliar absorption. *Amer. J. Bot.* 61: 100-106.

Gutiérrez D., F. 1983. Patrones de comportamiento estomatal en cuatro cultivares de frijol, *Phaseolus vulgaris* L. Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias, Méx.

Guzmán M., J. F. 1939. Lejías residuales de la celulosa al sulfito. Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de Química, Méx.

Holmgren, P. P. G. Jarvis y M. S. Jarvis. 1965. Resistance to carbon dioxide and water vapour transfer in leaves of different plant species. *Physiol. Pl.* 18: 557-573

Hounam, C.E. 1975. Drought and agriculture. World Meteorological Organization. Geneva, Switzer.

Knecht, G. N y J. W. O'Leary. 1972. The effect of light intensity on stomate number and density of *Phaseolus vulgaris* L. leaves. *Bot. Gaz.* 133: 132-134

Larqué-Saavedra, A. 1979. Stomatal closure in response to acetyl salicylic acid treatment. *Z. Pfl.-physiol.* **93**: 371-375

Larqué-Saavedra, A. y F. de León G. 1979. Cierre estomatal inducido por aspirina y su dependencia del pH. *Agrociencia* **37**: 67-75

Larqué-Saavedra, A. y M. T. Rodríguez G. 1993. Fisiología vegetal experimental: aislamiento y cuantificación de los reguladores del crecimiento vegetal. Trillas-C. P., Méx.

Larqué-Saavedra, A. y M. Soto. 1986. Effect of root exudates of *Salix caprea* on transpiration of bean plants and stomatal aperture of *Commelina communis*. *Phyton* **42**: 139-144

Meyer, W. S. y G. C. Green. 1981. Comparison of stomatal action of orange, soybean and wheat under field conditions. *Austral. J. Pl. Physiol.* **8**: 65-76

Montaño C., J. L. 1963. Influencia del aluminato de sodio en la fabricación de papel bond. Universidad Iberoamericana, Facultad de Química, Méx.

Nelson, S. H. y K. E. Hwang. 1975. Water usage by potato plants at different stages of growth. *Amer. Potato J.* **52**: 331-339

Newmann, P. M. 1995. The role of cell wall adjustment in plant resistance to water deficits. *Crop Sci.* **35**: 1258-1266

Parr, J. F. y A. G. Norman. 1965. Considerations in the use of surfactants in plant systems: a review. *Bot. Gaz.* **126**: 86-96

Saini, H. S. y D. Aspinall. 1981. Effect of water deficit on sporogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Amer. Bot.* **48**: 623-633

Schönherr, J y P. Baur. 1994. Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rate of penetration. *Pestic. Sci.* **42**: 185-208

Schönherr, J. y M. J. Bukovac. 1972. Penetration of stomata by liquids. Dependence on surface tension, wettability and stomatal morphology. *Pl. Physiol.* **49**: 813-819

Schönherr, J., K. Eckl y H. Gruler. 1980. Water permeability of plant cuticles: the effect of temperature on diffusion water. *Planta* **147**: 21-26

Schönherr, J. K y H. W. Schmidt. 1979. Water permeability of plant cuticles. *Planta* **144**: 391-400

Schreiber, L. y J. Schönherr. 1992. Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: role of epicuticular waxes and compartmentation. *Pestic. Sci.* **36**: 213-221

Sevilla R., L. 1983. El índice estomático, forma, tamaño y distribución de estomas en cuatro cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis Licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias, Méx.

Sinclair, T. R. y M. M. Ludlow. 1985. Who taught plants thermodynamics? The unfulfilled potential of plant water potential. *Austral. J. Pl. Physiol.* **12**: 213-217.

Smith, W. K. y T. M. McClean. 1989. Adaptive relationship between leaf repellency, stomatal distribution, and gas exchange. *Amer. J. Bot.* **76**: 465-469

Solarova, J., J. Pospisilova y B. Slavik. 1981. Gas exchange regulation by changing of epidermal conductance with antitranspirants. *Photosynthetica* **15**: 365-400.

Spence, R. D. 1987. The problem an variability in stomatal responses, particularly aperture variance to enviromental and experimental conditions. *Phytologist* **107**: 303-315

Steinberg, S. L., M. J. McFarland y J. C. Miller. 1989. Effect of water stress on stomatal conductance and leaf water relations of leaves along current-year brances of peach. *Austral. J. Pl. Physiol.* **16**: 549-560

Stevens, P. J. G. 1993. Organosilicone surfactants as adjuvants for agrochemicals. *Pestic. Sci.* **38**: 103-122

Stevens, P. J. G., E. A. Bakers y N. H. Anderson. 1988. Factor afecting the foliar absorption and redistribution of pesticides. 2. Physicochemical properties of the active ingredient and the role of surfactant. *Pestic. Sci.* **24**: 31-53

Stock, D. y P. J. Holloway. 1993. Possible mechanisms for surfactant-induced foliar uptake of agrochemicals. *Pestic. Sci.* **38**: 165-177

Stock D., P. J. Holloway, B. T. Grayson y P. Whitehouse. 1993. Development of a predictive uptakemodel to rationalise selection of polyoxyethylene surfactant adjuvants for foliage-applied agrochemicals. *Pestic. Sci.* **37**: 233-245

Teare, I. D., N. Sionit y P. J. Kramer. 1982. Changes in water status during water stress at different stages of development in wheat. *Physiol. Pl.* **55**: 296-300

Toledo, V. M., J. Carabias, C. Toledo y C. González-Pacheco. 1989. La producción rural en México: alternativas ecológicas. Fundación Universo XXI-Prensas de Ciencias, Méx.

Trejo, C. L. y W. J. Davies. 1991. Drought-induced closure of *Phaseolus vulgaris* L. stomata precedes leaf water deficit and any increase in xylem ABA concentration. *J. Exp. Bot.* 42: 1507-1515

Vasco M., N. L. 1986. Evidencias experimentales para determinar sequía en dos variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis licenciatura. UNAM, Facultad de Ciencias, Méx.

Villarreal M., A. 1978. Determinaciones del momento de riego en base al potencial de agua de la planta. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Guadalajara, Méx.

Walton, D. C. y Y. Li. 1995. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. En: Plant Hormones. Kluwer Academic Pub., Nether.