

## EXTRACTOS DE *HORDEUM VULGARE* Y *CEDRUS ATLANTICA* QUE AFECTAN AL ENVEJECIMIENTO DE HOJAS

por

M.<sup>a</sup> T. RODRIGUEZ, F. TEIXIDO Y B. SABATER

### INTRODUCCIÓN

Los estudios de los efectos hormonales sobre el envejecimiento parten del descubrimiento por RICHMOD y LANG (1957) de que la cinetina retrasa la pérdida de clorofila y proteínas que acompaña al envejecimiento de cortes de hojas. En general todas las citocininas tienen efectos retardantes sobre el envejecimiento.

Las giberelinas también retrasan el envejecimiento en ciertos casos (FLETCHER y OSBORNE, 1965; BEEVERS, 1966; BACK y RICHMOND, 1969; BATA y NESKOVIC, 1974).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron, por una parte, que la estabilidad de las clorofilas en cortes de hojas de cebada, era menor al ir aumentando el desarrollo de la planta, y, por otra parte, que la cinetina apenas tenía efecto sobre la estabilidad de clorofilas de acículas de cedro, y que esta estabilidad era menor en acículas cortadas en invierno que en acículas de verano. Todos estos datos nos llevaron a realizar una serie de pruebas sobre la presencia de sustancias naturales en cebada y cedro que pudieran afectar la estabilidad de clorofilas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) se crecían en «Perlita» con medio Cron (BOND, 1951) durante distintos tiempos, según se indica más adelante. Las semillas de cebada utilizadas en la siembra procedían de la cosecha de 1974, de Mozonzillo (Segovia).

Las acículas de cedro (*Cedrus atlantica*) se tomaron de las existentes en la Ciudad Universitaria de Madrid, hacia finales de diciembre de 1974.

Los extractos de las sustancias fenólicas, previa hidrólisis ácidas, se realizaron según HARBONE (1973 a) y en los extratos metanólicos con una variedad mayor de posibles sustancias como: isoprénicas y heterocíclicas, también según HARBONE (1973 b). Al final, las preparaciones de extratos ácidos, quedan como un residuo sólido que suspendido en agua no altera su pH neutro. Los extratos metanólicos, quedan finalmente en agua pH 7.

Las incubaciones para ensayos de degradación de clorofilas, se hacían en la oscuridad a 37° C con 0,5 g. de cortes de hojas de cebada, de aproximadamente 1 × 1 cm., en placas Petri que contienen 20 ml. de volumen final de agua y en casos con cantidad de extractos o cinetina, según se indican en Resultados. A tiempos determinados se extraen las clorofilas con acetona al 80 por 100 y se miden espectrofotométricamente (HARBONE 1973 c).

La cinetina utilizada procedía de la casa Sigma. El resto de los productos utilizados eran comerciales y químicamente puros.

## RESULTADOS

En la figura 1 se representa el efecto de los extractos de cebada crecida durante cuatro semanas sobre la estabilidad de las clorofilas a y b, de cortes de hojas de cebada, crecida durante dos semanas. Se incluye también en dicha figura el efecto de la cinetina comercial sobre la estabilidad de las clorofilas. Como puede observarse, los extractos procedentes de hidrólisis ácida, no afectan apreciablemente la estabilidad de las clorofilas a o b. En cambio, se encuentra una gran protección de las clorofilas por los extractos metanólicos, sin que haya una diferencia apreciable entre protección a clorofila a y protección a clorofila b. Esta protección es incluso mucho más acusada que la pro-

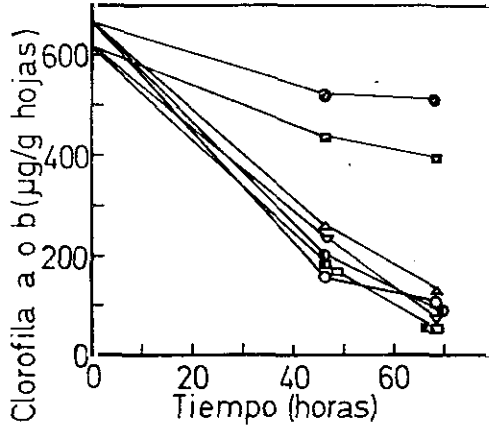


Fig. 1.—Efecto de la cinetina y de los extractos de cebada sobre la estabilidad de las clorofilas de cebada. Los cortes de hojas de cebada donde se estudia la estabilidad de las clorofilas, proceden de cebada crecida durante dos semanas. Los extractos se hacen de hojas de cebada crecida durante cuatro semanas, tal como se indica en «Materiales y Métodos». En las incubaciones, la cinetina se usa a una concentración final de 30  $\mu\text{g./ml.}$ , los extractos ácidos a 0.5  $\text{mg./ml.}$  y de los extractos metanólicos, se usan 4 ml. de la fracción acuosa final en los 20 ml. de incubación. Para hojas mantenidas en agua:  $\square$  clorofila a,  $\circ$  clorofila b; para hojas mantenidas en extracto ácido:  $\square$  clorofila a,  $\circ$  clorofila b; para hojas en extracto metanólico:  $\blacksquare$  clorofila a,  $\bullet$  clorofila b; para hojas en cinetina:  $\nabla$  clorofila a,  $\triangle$  clorofila b.

tección por cinetina, la cual se usa a una concentración saturante para su efecto protector sobre clorofilas.

En la figura 2 se representa el efecto de los extractos de acícula de cedro sobre la estabilidad de clorofilas de cortes de hojas de cebada crecida durante nueve días. Como puede apreciarse, en las primeras sesenta y dos horas, el efecto protector de los extractos metanólicos sobre la estabilidad de clorofilas, es absoluto, no disminuyendo apreciablemente la cantidad de clorofila total. Resulta sorprendente la pequeña, pero sensible subida en la cantidad de clorofila b, compensada por la disminución de clorofila a.

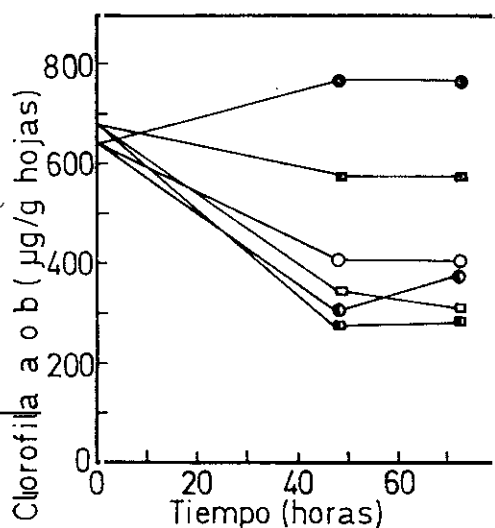


Fig. 2.—Efectos de los extractos de cedro sobre la estabilidad de clorofilas de cebada. Los detalles experimentales y signos son como en la figura 1, excepto que se usan extractos de acículas de cedro en lugar de los de hojas de cebada, y los cortes de hojas de cebada para las incubaciones proceden de cebada crecida durante nueve días.

Los extractos procedentes de la hidrólisis ácida muestran, en cambio, un efecto claro de aceleración de la pérdida de clorofilas, tanto de a como de b, cuando se comparan con la pérdida por cortes de hojas mantenidas en agua.

## DISCUSIÓN

Los resultados que se presentan, demuestran la existencia en cebada de sustancias con un fuerte efecto protector sobre la estabilidad de clorofilas. Por su extracción metanólica y fraccionamiento posterior con éter etílico, resulta probable que se trate de giberelinas o compuestos heterocíclicos con actividad citocinina; su presencia en cebada crecida durante cuatro semanas, en las que las clorofilas son muy poco estables, apunta a un enmascaramiento *in vivo* de su actividad por otras sustancias aún no detectadas.

La presencia de sustancias en acículas de cedro que aceleran la pérdida de clorofilas, es, en cambio, bastante evidente, así como su probable naturaleza fenólica. La casi nula respuesta de acículas de cedro a cinetina en el ensayo de estabilidad de clorofilas puede ser debida a la presencia de estas sustancias que aceleran dicha pérdida de clorofilas.

Los extractos metanólicos de cedro, en principio pueden contener como los de cebada, giberelinas o compuestos heterocíclicos, su efecto protector del envejecimiento es palpable, y teniendo en cuenta que los ensayos se realizan en la oscuridad, parece lógico suponer que el aumento que provocan en la cantidad de clorofila b, es debido a su formación a partir de clorofila a por acción del enzima clorofila deshidrogenasa.

Resulta relevante la presencia de sustancias fenólicas en cedro que aceleran un proceso de envejecimiento, como es la pérdida de clorofilas.

Los componentes fenólicos son conocidos inhibidores de distintos procesos en las plantas (SALISBURY & ROSS, 1969).; VIEITEZ & BALLESTER, 1972), su posible papel en el envejecimiento, resultaría de la identificación de los componentes activos y su evolución a lo largo del desarrollo de la planta. Este último trabajo, así como la identificación de las sustancias protectoras se realiza actualmente en nuestro laboratorio.

## RESUMEN

El envejecimiento, medido como pérdida de clorofilas a y b por cortes de hojas de cebada, se retrasa fuertemente por extractos metanólicos de cortes de hojas de cebada y acículas de cedro fraccionados con éter etílico. En cambio, los extractos de componentes fenólicos de acículas de cedro, determinan una aceleración del envejecimiento.

En la protección por extractos metanólicos de cedro, se detecta una conversión de clorofila a en clorofila b.

Los resultados se discuten en función de la baja estabilidad de clorofilas en hojas de cebada y acículas de cedro en determinadas etapas del desarrollo.

## BIBLIOGRAFÍA

- BACK, A. & RICHMOND, A. E.: 1969. «Physiol. Plant.», 22: 1207-1216.  
BATA, J. & NESKOVIC, M.: 1974. «Zeit. Planz. Physiol.», 73: 86-94.  
BEEVERS, L.: 1966. «Plant Physiol.», 41: 1074-1076.  
BOND, G.: 1951. «Annls. Bot.», 15: 446-459.  
FLETCHER, R. A. & OSBORNE, D. J. 1965. «Nature», 207: 1176-1177.  
HARBORNE, J. B. 1973 a. «Phytochemical Methods». Chapman & Hall, Londres, páginas 33-88.  
— — : 1973 b. «Phytochemical Methods». Chapman & Hall, Londres, pp. 89-131 y 198-204.  
— — : 1973 c. «Phytochemical Methods». Chapman & Hall, Londres, pp. 204-209.  
RICHMOND, A. E. & LANG, A.: 1957. «Science», 125: 650-651.  
SALISBURY, F. B. & ROSS, C.: 1969. «Plant Physiology». Wadsworth Publ. Co. Belmont, California, pp. 567-569.  
VIEITEZ, E. & BALESTER, A.: 1972. «Anal. Inst. Bot. A. J. Cavanilles». XXIX: 129-142.