

NOTA SOBRE PRESENCIA
DE
UN INHIBIDOR DE LA GERMINACION Y DE SAPONINAS
EN LOS FRUTOS DE PARAISO ¹

Por ISIDORO MOGILNER ²

Al realizar un ensayo sobre poder germinativo de varias especies de forestales, entre las cuales estaba incluida el paraíso (*Melia Azedarach* Linn.), se tuvo la impresión de que los frutos maduros, bien amarillos de éste, tenían cierto poder inhibidor sobre la germinación de semillas de otras especies, por lo que se hicieron ensayos para observar más detenidamente este comportamiento. No se determinó si inhibían o no a la propia semilla de paraíso.

Previamente se realizó un ensayo de orientación para determinar en qué solventes se podría extraer la supuesta sustancia inhibidora. Los solventes utilizados fueron: agua destilada, alcohol etílico, acetona, éter de petróleo, éter sulfúrico, benzol y cloroformo. Realizados los ensayos de germinación se pudo constatar que la sustancia era soluble en agua y en alcohol etílico e insoluble en los demás solventes utilizados y que la extracción casi se agotaba con una maceración de 24 horas.

Todas las pruebas de germinación que se citan, se realizaron sobre trigo 38 M. A en estufa a 28°C. Los frutos de paraíso utilizados pertenecen a una misma planta, salvo que se indique lo contrario.

¹ Trabajo realizado en el laboratorio de la Cátedra de Botánica Agrícola (2ª parte) de la Facultad de Agronomía. Recibido para su publicación el 13 de agosto de 1952.

² Ingeniero Agrónomo.

INFLUENCIA DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

Se dejaron macerar durante 48 horas, en 40 cc de agua destilada, 30 frutos de paraíso con el epicarpio roto y el mesocarpio estrujado por presión con los dedos. El macerado tenía un pH de 4,9 y su presión osmótica, determinada por crioscopía, fué de 16,61 atmósferas.

El macerado de otros 10 frutos colocados en iguales condiciones y en la misma cantidad de agua destilada, acusó una presión osmótica de 7,22 atmósferas y un pH de 4,8.

Estos macerados se utilizaron para realizar los ensayos germinativos. Como testigos se utilizaron soluciones de glucosa con presiones osmóticas iguales a las de los macerados. La lectura de la germinación se realizó al 4º día de colocados los cariopses de trigo en sendas cajas de Petri (50 por caja) a los que se agregó 20 cc de la soluciones (datos en la tabla 1).

Para sacar los promedios y los índices germinativos se tomaron en cuenta los cariopses germinados y los que empezaban a germinar. « Por empezar a germinar » consideramos el estado en que el pericarpio del trigo es apenas desgarrado por el embrión.

INFLUENCIA DEL PH

Como en el ensayo anterior no se tuvo en cuenta el pH, se resolvió realizar otro en el que se considerase este factor. Con este objeto se preparó un macerado de 60 frutos en doble volumen de agua que el anterior. La presión osmótica de este macerado, determinada por el método crioscópico, fué de 17,5 atmósferas y se llevó por dilución a 15 atmósferas. Su pH dió un valor de 4,8.

Como testigo se utilizó una solución de glucosa de igual presión osmótica e igual pH. Los resultados obtenidos se dan en tabla II. (Lectura a los 4 días de colocarse las cajas de Petri en estufa a 25°C; cada una con 50 cariopses de trigo y 20 cc de solución).

TABLA I

	Semillas germinadas			Empezaban a germinar	Sin germinar	Promedio de germinación	Índice germinativo ¹
	Cantidad	Longitud media coleóptile	Longitud media raicillas				
<i>Testigo</i> : agua destilada.....	46	2,5 a 3 cm	4 a 4,5 cm	1	3	46,5	100 %
<i>Testigo</i> : agua destilada :.....	43	2,5 cm	4,5 cm	3	4		
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 16,61 atmósferas	—	—	—	25	25	32	68,8 %
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 16,61 atmósferas.....	—	—	—	39	11		
<i>Macerado</i> : 16,61 atmósferas de P. O. pH: 4, 87.....	—	—	—	2	48	—	4,3 %
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 7,22 atmósferas.....	44	3 a 4 mm	3 cm	—	6	44,5	95,69 %
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 7,22 atmósferas.....	39	6 mm	3 a 3,5 cm	6	5		
<i>Macerado</i> : P. O. 7,22 atmósferas pH: 4,8.....	—	—	—	16	34	—	34,49 %

¹ « Índice germinativo expresado en porcentaje, es la relación entre el número de semillas que germinan bajo la influencia de un inhibidor y el número de las que germinan en un control de agua pura ». Se considera el número de las germinadas en el agua pura como el 100 %. (EVEN-ARI, M., *Germination inhibitors*. — *Bot. Rev.*, Vol. 15, n° 3, March, 1949).

TABLA II

	Semillas germinadas			Empezaban a germinar	Sin germinar	Promedio de germinación	Índice de germinación
	Cantidad	Longitud media coleóptile	Longitud media raicillas				
<i>Testigo</i> : agua destilada.....	27	3 cm	4 cm	19	4	—	100 %
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 15 atmósferas pH: 4,8.....	15	2 mm	1,4 cm	21	14	37,5	81,52 %
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. O. 15 atmósferas pH: 4,8.....	10	2 mm	1 cm	29	10		
<i>Macerado</i> : P. O. 15 atmósferas pH: 4,8.....	—	—	—	7	41	6	13 %
<i>Macerado</i> : P. O. 15 atmósferas pH: 4,8.....	—	—	—	5	44		

Los cariopses no germinados en los macerados de la Tabla II, fueron lavados muy bien con agua y colocados en cajas de Petri en 20 cc. de agua destilada, puestos en estufa (25°C) y a los 4 días se hizo la lectura de la germinación obtenida (tabla III).

TABLA III

	Germinados	Empezaban a germinar	Sin germinar	% de germinación
41 cariopses	4	5	32	21,9 %
44 cariopses	3	6	35	20,45 %

Estos resultados indicarían que el efecto inhibitor persiste después de sacados los cariopses de trigo del macerado.

ENSAYO PARA DETERMINAR SI EL INHIBIDOR ES FOTOLÁBIL

Se empleó un macerado de 30 frutos en 45 cc. de agua destilada dejado durante 30 horas, que tenía una presión osmótica de 15 atmósferas.

Se hizo el ensayo de germinación a luz natural hasta la una pasado meridiano y a partir de esta hora se le suministró además luz eléctrica de un foco que daba 1,2 foot candle de iluminación. La lectura de la germinación se realizó a los 2 días y 17 horas de comenzado el ensayo. Este se efectuó con 50 cariopses de trigo por caja de Petri, a los que se agregó 20 cc. de solución. Se usaron 149 cariopses para ensayar el macerado y 99 para el testigo.

TABLA IV

	Germinados	Empezaban a germinar	Sin germinar	% de germinación
<i>Testigo</i> : Solución de glucosa. P. O. 15 atmósferas pH: 5.....	—	86	13	87 %
<i>Macerado</i> : P. O. 15 atmósferas pH: 5.....	—	5	144	3,35 %

Evidentemente estos resultados indican que el inhibidor es fotoestable.

ENSAYO PARA DETERMINAR SI EL INHIBIDOR ES TERMOLÁBIL

Un macerado de 30 frutos en 45 cc. de agua destilada, dejado 24 horas, se hizo hervir durante 3 minutos, se enfrió y se llevó a su volumen primitivo. La lectura se realizó a los 4 días de colocarse las cajas de Petri en estufa a 25°C (50 cariopses por caja, con 20 cc. de solución, utilizándose un total de 100 cariopses para cada variante).

Los resultados constan en la tabla V.

TABLA V

	Germinadas	Empezaban a germinar	Sin germinar	% de germinación
<i>Testigo</i> : solución glucosa. P. Ó. 15 atmósferas pH: 4,8.....	19	67	14	86 %
<i>Macerado</i> : hervido 3' P. Ó. 15 atmósferas pH: 4,8..	—	14	86	14 %

Estos resultados indican que el inhibidor no es termolábil.

PERSISTENCIA DE LA INHIBICIÓN

Con el objeto de analizar más detenidamente el efecto inhibitorio persistente, según se dedujo de los resultados de la tabla III, se realizó el siguiente ensayo. Todos los cariopses de trigo no germinados, de las cajas de Petri que tenían macerado de frutos de paraíso (ver tabla IV), se lavaron bien con agua y se colocaron en cajas de Petri con agua destilada. Lo mismo se hizo con los cariopses no germinados de las soluciones de glucosa, con los cariopses que empezaban a germinar, de las soluciones de glucosa y con los cariopses que empezaban a germinar de los macerados del mismo ensayo.

Por otra parte, para disponer de mayor número de cariopses, el mismo día que se realizó el ensayo cuyos datos se dan en la tabla IV, se pusieron 150 cariopses de trigo (50 por caja de Petri), expuestos a día natural, con macerado preparado en las mismas condiciones que el utilizado en aquella oportunidad (20 cc. por caja) y 100 cariopses en solución isotónica de glucosa (50 por caja con 20 cc. de solución). El contacto duró el mismo tiempo que el ensayo de tabla IV, es decir 2 días y 17 horas, transcurrido el cual se procedió de la misma manera que con los cariopses de tabla IV.

El objeto de este ensayo fué observar cuánto duraba el efecto inhibidor del macerado de frutos del paraíso después de haber estado en contacto con los cariopses de trigo un tiempo determinado; en este caso 2 días y 17 horas.

Ver resultados en las tablas VI y VII.

La primera lectura de los mismos se realizó a los 4 días. Luego se

volvieron a lavar los cariopses y se cambiaron los papeles de filtro y el agua destilada de las cajas de Petri. La segunda lectura se efectuó a los 4 días de la anterior; nuevamente se lavaron los cariopses y se renovaron los papeles de filtro y el agua destilada. Transcuridos otros 4 días se realizó la tercera y última lectura.

TABLA VI

	Semillas germinadas			Empezaban a germinar	Sin germinar	% de germinación	Lecturas
	Cantidad	Longitud media coleóptile	Longitud media raicillas				
27 cariopses que no habían germinado provenientes de la solución de glucosa	21	5,5 cm	7cm	4	2	92,6 ^o /o	1 ^a
306 cariopses que no habían germinado provenientes de los macerados (colocados en 4 cajas de Petri)	—	—	—	—	—	0 %	1 ^a
	—	—	—	—	—		2 ^a
	TODOS LOS CARIOPSES PODRIDOS						3 ^a

TABLA VII

	Plántulas que siguieron su crecimiento			N° de plántulas que detuvieron su crecimiento	% de plántulas que siguieron su crecimiento	Lecturas
	Cantidad	Longitud media coleóptile	Longitud media raicillas			
40 cariopses que empezaban a germinar provenientes de la solución de la glucosa.	18	4,5 cm	6 cm	22	47,5 ^o /o	1 ^a
	1	5,5 cm	2,5 cm	21		2 ^a
	—	—	—	21 (podr.)		3 ^a
12 cariopses que empezaban a germinar provenientes de los macerados.	Igual que cuando se pusieron			TODOS LOS CARIOPSES PODRIDOS	0 %	1 ^a
	Igual que cuando se pusieron					2 ^a
	TODOS LOS CARIOPSES PODRIDOS					3 ^a

Los resultados de estas tablas indican que el efecto inhibitorio no sólo es persistente, sino que produce la muerte del embrión al haber estado en contacto determinado tiempo, con el macerado.

Parecería que aún los embriones que empezaron a germinar en los macerados, son incapaces de continuar su crecimiento aunque se los coloque en agua destilada, y posteriormente mueren (aunque la cantidad, 12 cariopses, es pequeña para sacar conclusiones definitivas).

LOCALIZACIÓN DEL INHIBIDOR

Con el objeto de observar si alguna otra parte de la planta de paraíso fuera de los frutos, contenía el inhibidor, se hicieron macerados acuosos de hojas, corteza y pecíolos de una planta distinta de aquella cuyos macerados de frutos estudiamos hasta ahora, pero de la que se sabía que los frutos contenían sustancias inhibitorias.

Realizadas las pruebas de germinación, estos macerados dieron la impresión de no tener efecto inhibitorio, o ser éste muy escaso. Este ensayo se realizó el 13 de diciembre, época en que los frutos de paraíso son todavía verdes y pequeños y no producen efecto inhibitorio. No estaría descartado que en otras épocas del año, los macerados de hoja, corteza o pecíolo, tengan efecto inhibitorio.

ENSAYO CON OTROS EJEMPLARES DE PARAÍSO

Como hemos dicho, todos los ensayos hasta ahora detallados, salvo las excepciones que se especifican, se hicieron con frutos de una misma planta.

Como se disponía de frutos de otras dos plantas, se resolvió hacer con ellos macerados, en las mismas condiciones que los realizados con los de la primera, para observar si tenían efecto inhibitorio (datos en tabla VIII).

TABLA VIII

	Empezaban a germinar	Sin germinar	% de germinación
Macerado planta 1..	17	85	16,66 %
Macerado planta 2..	15	80	15,78 %

La lectura se realizó a los 4 días de haberse puesto los cariopses de trigo con 20 cc de macerado en cajas de Petri (50 por caja) en estufa a 25°C.

Evidentemente los frutos de estas dos plantas tienen también efecto inhibidor.

DISCUSIÓN

Los frutos maduros de paraíso contienen un inhibidor soluble en agua y en alcohol etílico. Esta sustancia es termo y fotoestable.

La inhibición que produce en la germinación del trigo el macerado acuoso de frutos de paraíso es debida a dos causas: 1) presión osmótica y 2) causas ajenas a la presión osmótica: sustancia inhibidora.

Si analizamos la tabla I, observamos que el índice germinativo de la solución de glucosa con una presión osmótica de 16,61 atmósferas, es de 68,8%. Esto significa que por cada 100 cariopses que germinan en el testigo (agua), en la solución de glucosa germinan sólo 68,8 cariopses, o sea que la germinación se deprime en 31,2%.

En cambio, el índice germinativo del macerado acuoso isotónico con esta solución de glucosa es de 4,3%, es decir que produce una depresión de la germinación (comparada con el testigo en agua) de 95,7%, de la cual 31,2% se debe a la presión osmótica de este macerado y el 64,5% a causas ajenas a la presión osmótica.

Analizando en la misma tabla la inhibición de la germinación producida por 10 frutos de paraíso macerados en 40 cc de agua destilada y cuya presión osmótica es de 7,22 atmósferas, deduciremos que deprime la germinación en 4,31% debido a la presión osmótica y en un 61,29% por causas ajenas a la presión osmótica.

La tabla II muestra que el macerado acuoso deprime la germinación debido a la presión osmótica en 18,48% y por causas ajenas a la misma en 68,52%.

Es decir, que con las presiones osmóticas con que se ha trabajado, la mayor parte de la inhibición producida (de 61,29% a 68,52%) es debida a causas ajenas a la misma: sustancia o sustancias inhibidoras.

No creemos de ninguna manera que este efecto inhibidor se circunscriba únicamente al trigo. Las sustancias inhibidoras presentan una selectividad en su acción, pero ésta no es tan restringida en general, como para limitarse a una sola especie.

Solamente ensayos germinativos que abarquen muchas familias, géneros y especies, podrían aclarar cuáles son sensibles y cuáles no a la acción inhibitoria de los frutos de paraíso.

La acción inhibitoria aparece con la madurez del fruto. Desde que el paraíso empezó a fructificar se hicieron varios ensayos, todos con resultado negativo, hasta que los frutos estuvieron bien amarillentos; recién entonces se puso en evidencia la acción inhibitoria.

¿Qué función ejercería este inhibidor en el paraíso? Si se demostrase la existencia del inhibidor en la mayoría de las plantas de la especie, como creemos que es el caso, se llegaría a la conclusión de que se ha desarrollado por selección natural y sus funciones podrían ser dos: *a*) impedir que los frutos germinen en épocas inapropiadas (cuando hay escasez de agua), y *b*) no debe descartarse la posibilidad de que se hayan desarrollado como un arma que le ayude a vencer en la lucha interespecífica a otras especies con las cuales compete en su habitat natural.

INVESTIGACIÓN DE SAPONINAS EN LOS MACERADOS ¹

Al preparar los macerados con los frutos de paraíso, se observó que al agitarlos se formaba una gran cantidad de espuma muy persistente, lo que indujo a pensar que se debiera a la presencia de saponinas. Por esto se decidió realizar un ensayo para determinar si efectivamente ésa era la causa.

Se aplicó con pequeñas variantes el método de Kofler, según se cita en *Elements de Chimie végétale* de Wathiez et Sternon, que a continuación reproducimos:

« Se hace absorber, por un papel de filtro, la parte superior de una solución que contiene la supuesta saponina. Por otra parte se pone en remojo gelatina, a razón de 6 a 10 % en una solución de ClNa al 9 por mil. Se calienta alrededor de 40°C hasta disolución completa. Eventualmente se clarifica con clara de huevo, se filtra en caliente sobre algodón y se neutraliza con carbonato de sodio. Previo enfriamiento a 35°C se agrega 3 % de sangre desfibrinada y se mezcla íntimamente. La gelatina licuada por el calor se vuelca sobre 2 placas de vidrio. Se la deja coagular. Se coloca el papel de filtro embebido por la solución de saponina entre las dos placas, adosadas

¹ La determinación de saponinas fué realizada por la doctora Raquel E. Feldman de Mogilner.

gelatina contra gelatina. Después de cierto tiempo se observa la formación de un campo hemolítico en el sitio en contacto con las saponinas ».

Nosotros preparamos la gelatina al 12 % en solución fisiológica isotónica al 8,5 por mil. La licuamos por ebullición y la clarificamos agregando mientras hervía una clara de huevo. La filtramos caliente por algodón, previamente mojado con solución fisiológica caliente. Todo el material de vidrio (embudo, Erlenmeyer) se calentó previamente con solución fisiológica muy caliente y se mantuvo cerca de los mecheros para que la filtración no se demorase.

El filtrado resultó perfectamente límpido y translúcido.

Tomado el pH, resultó ser alcalino, por lo que se llevó a neutralidad agregando HCl n/10.

Luego se midió el volumen resultante y a una temperatura inferior a 48°C se agregó sangre desfibrinada de oveja, en la proporción del 3 %, preparando de inmediato varias cajas de Petri que se dejaron solidificar bien.

Los trocitos de papel de filtro, empapados en los diferentes macerados y en los líquidos empleados como testigos, se colocaron sobre el medio gelatina-sangre.

Se probaron macerados de frutos de tres plantas de paraíso. La maceración se hizo en cada caso con 10 y 20 frutos en 30 cc. de agua destilada durante 24 horas. Se utilizaron como testigos: agua destilada, agua bidestilada y cloruro de sodio al 20 por mil.

Todos los testigos dieron resultado negativo: *no hubo hemolisis*. Todos los macerados dieron resultado positivo: *hubo hemolisis*.

Se manifestó una diferencia en la extensión de los campos hemolíticos producidos por los macerados de los frutos de las tres plantas, lo que demostraría una variación en contenido de saponina(s) en los distintos ejemplares. Además, en general, el aumento de la hemolisis correspondió a los macerados de mayor cantidad de frutos (20 frutos).

Creemos que con este método es factible la investigación cuantitativa de saponinas, lo que no pudimos realizar por falta de droga pura para preparar testigos de concentraciones conocidas.

Debemos mencionar además, que los macerados acuosos de corteza, hojas y pecíolos, dieron persistente espuma, aunque en menor cantidad que los de frutos, por lo que suponemos (ya que no se realizó la investigación) que podrían contener saponinas.

Resumen. — 1. Los frutos maduros de paraíso (*Melia Azedarach* Linn.) contienen un inhibidor de la germinación, que es soluble en agua y en alcohol etílico e insoluble en acetona, éter de petróleo, éter sulfúrico, benzol y cloroformo.

2. Este inhibidor es termo y foto estable.

3. En cariopses de trigo 38 M. A. produjo una inhibición de la germinación de 61,3-68,5 % no atribuible a la presión osmótica del macerado acuoso empleado, ni al pH del mismo.

4. Se constató, además, que los frutos maduros contienen saponinas.

Summary. — 1. The ripe fruits of *Melia Azedarach* Linn. contain an inhibitive substance which is soluble in water and ethylic alcohol and insoluble in acetone, ether, benzol and chloroform.

2. This inhibitive substance is thermo and photo stable.

3. In wheat caryopse 38 M. A. produced an inhibition of germination of 61.3-68.5 % which cannot be attributed to the osmotic pressure of the aqueous maceration employed nor to the pH of the same.

4. It was furthermore established that the ripe fruits contain saponin.