

Algunas observaciones sobre inhibidores de la germinación

Por MICHAEL EVEN-ARI

En el siglo trece Albertus Magnus, famoso hombre de su época, describió un experimento según el cual las semillas de manzanas no germinan si no se les quita cuidadosamente la pulpa. En 1910, Mazé informó que semillas maduras de maíz y *Pisum sativum* se comportan en igual forma cuando contienen 50-60 % de agua y sólo germinan cuando se las seca. Este comportamiento no es causado por el agua, desde que se puede comprobar que si se añade el extracto de semillas inmaduras a semillas maduras, impide su germinación. Mazé ha demostrado que en este caso las semillas de maíz inmaduras contienen 0,1 mg. de aldehído acético, por cada 20 gm., compuesto que desaparece durante la maduración.

Oppenheimer en 1922 ha probado que en muchos otros casos semejantes, está en juego una sustancia inhibidora. Este autor trabajó principalmente con jugo de tomates. Preparando un extracto de la pulpa de esta fruta y añadiéndolo a cualquier clase de semillas, observó una inhibición de la germinación. A partir de estas experiencias, es un hecho indiscutible que las plantas contienen sustancias que en concentraciones naturales impiden la germinación, que llamamos inhibidores de la germinación. Huelga decir que las sustancias artificiales afines son incluidas en este grupo.

MÉTODOS DE PRUEBA

La comprobación de la presencia de tales sustancias es muy sencilla. Las semillas se colocan sobre papel de filtro, al que se añaden los extractos que se van a examinar. Al cabo de tres días se determina el porcentaje de semillas germinadas, que se denomina índice de germinación.

Si las sustancias son volátiles la prueba se modifica ligeramente: la cápsula de Petri con las semillas se coloca en otra más grande. Entre ambas se ubican las sustancias volátiles que han de ser examinadas y el conjunto se cubre con la tapa de la caja grande.

Existen otros métodos para probar el poder inhibitor, pero este es el más sencillo. Todos nuestros ensayos, en los cuales usamos granos de polen, desde que éstos son más sensibles que las semillas, no dieron resultado por tratarse de un material muy heterogéneo.

Para el experimento usamos semillas de trigo. Hay otras especies más sensibles, pero las de trigo son más útiles porque se pueden conseguir fácilmente de la misma calidad genética.

INFLUENCIA DEL VALOR OSMOTICO Y DEL pH

Antes de poder probar que se trata efectivamente de sustancias inhibitoras, tenemos que eliminar dos factores que a menudo están en juego: el valor osmótico y el pH.

El valor osmótico del jugo de tomate es de 8-10 atmósferas. El i.g. (índice de germinación) es de 0 %. En soluciones isotónicas de KNO₃, KCl, ClNa hemos observado un i.g. de 92-98 % en ciertos casos. Existe otra prueba que muestra igualmente que el valor osmótico no es la causa de la inhibición; en jugo diluido en la proporción de 1:5, en que el valor osmótico es de 1-2 atmósferas, el i.g. es de 2-10 %. Este valor osmótico no tiene ninguna influencia sobre la germinación, lo que indica que actúa otra causa.

Puesto que los azúcares elevan el valor osmótico en el jugo de tomate (3,6 % de glucosa), se puede demostrar también de otra forma que el valor osmótico no causa la inhibición. Añadiendo levaduras al jugo, el azúcar entra en fermentación y desaparece; el alcohol formado se destila. Por este procedimiento el valor osmótico queda reducido a 0,5 atm. pero el i.g. continúa siendo de 0 %. Es necesario hacer ensayos de control con una solución semejante de azúcar que es fermentada en la misma manera, para demostrar que las levaduras no forman sustancias inhibitoras por sí mismas.

No queremos decir que el valor osmótico no tenga ninguna influencia. En el jugo de uvas, donde es muy elevado (34-37 atm.) es el agente inhibitor predominante. Pero aún en este caso se puede demostrar que además está presente un inhibidor: 1) en una dilución de 1:16 con un valor osmótico de 2,1 atm. el i.g. era de 47 %; 2) después de la fermentación del azúcar en la manera descrita, el valor osmótico es menor de 1 atm. y la inhibición es completa, comparada con un i.g. de 60 % en el ensayo control.

En la mayoría de los casos el pH no tiene influencia. En el jugo de manzanas, por ejemplo, el i.g. es del 37 % con una concentración de iones hidrógenos natural y 45 % después de la neutralización.

En ciertos casos extremos, como en el jugo de limón, en que el pH es de 2,2-2,4, este factor tiene importancia como agente inhibitor, según lo demuestra el siguiente cuadro:

Diluciones	1:4	1:8	1:16	1:32
Jugo natural	0 %	7 %	32 %	85 %
Jugo neutralizado	1,5 %	22 %	—	—

Puede observarse en este cuadro, que además del pH, existe otro factor inhibitor. Este hecho se demuestra porque en las soluciones "buffer" de un pH 2,2 el i.g. fué de 8,2 %.

¿SON ESPECIFICOS LOS INHIBIDORES?

Los inhibidores no son específicos. Por ejemplo, el jugo de tomates inhibe la germinación de semillas de tomate, trigo, cebada, avena, *Lepidium*, maíz, *Sinapis*, *Trifolium*, lechuga, girasol, etc. Pero la sensibilidad de las semillas es muy diferente. El jugo de tomate inhibe la germinación de semillas de *Lepidium* en forma completa hasta una dilución de 1:25, mientras que las semillas de trigo son inhibidas completamente hasta una dilución de 1:4.

Las mismas semillas reaccionan en forma distinta a diferentes inhibidores. En jugo de *Solanum coagulans* la germinación de las semillas de trigo se inhibe completamente hasta una dilución de 1:64, y hasta 1:500 hay un i.g. anormal. Las cifras correspondientes para el jugo de tomate son de 1:4 y 1:10.

LA LOCALIZACION DE LOS INHIBIDORES

Los inhibidores se han determinado en todas las familias de plantas, aun en las criptógamas. Las propágulas de *Marchantia* no germinan dentro de sus conceptáculos y los esporos de *Funaria hygrometrica* tampoco lo hacen dentro de los esporangios. En cuanto a la existencia de los inhibidores en los distintos órganos de las plantas, podemos decir que fueron hallados en todos ellos:

a) Frutos:

- 1) Pulpa de frutos: peras, manzanas, *Poterium spinosum*, etc.
- 2) Jugo de frutos: tomate, *Lonicera*, uvas, etc.
- 3) Envoltura de frutos: trigo, girasol, *Fagopirum*, etc.

b) Semillas:

- 1) *Envolturas de semillas*: repollo, lechuga, etc.
- 2) *Embrión*: girasol. En este caso cualquier parte del embrión causa una fuerte inhibición cuando el medio se prepara con semillas secas. Cuando se prepara con semillas previamente embebidas en agua, los cotiledones inhiben normalmente, mientras que la radícula, que inhibe en los comienzos, tiene un efecto estimulante luego. La plumula nunca inhibe y, por el contrario, posee un efecto estimulante.
- 3) *Endosperma*: Iris.
- 4) *Savia de hojas*: Recientemente ha sido demostrado que la savia de muchas hojas tiene un poder inhibitor: *Phacelia*, *Pelargonium*, *Phragmites*, etc.

- c) *Savia de bulbos*: Cebollas, ajo, etc.
 d) *Savia de raíces*: Zanahoria, nabos, etc.

LA NATURALEZA QUIMICA DE LOS INHIBIDORES

A) *Acido cianhídrico* ($H-C \equiv N \leftarrow \text{---} \rightarrow H-N \equiv C$)

La amigdalina y otros glucósidos cianofóridos se encuentran en muchas semillas. La amigdalina es hidrolizada por la emulsina transformándose en aldehído benzoico, ácido cianhídrico y b-glucosa (1).

La amigdalina pura en condiciones estériles no inhibe, pero después de la hidrólisis el ácido cianhídrico lo hace fuertemente. Basta 0,1 % en volumen para que se produzca una inhibición completa de semillas de tomates. Dos semillas de almendras amargas que contienen 1-3 % de amigdalina, inhiben completamente la germinación de 20 semillas de trigo, lo que no logran 2 semillas de almendras dulces que contienen solamente vestigios de ácido cianhídrico. Diez semillas de almendras dulces bajan el i.g. sólo hasta 85 %. Cuando las semillas son trituradas se observa un efecto mucho más fuerte porque en este caso la emulsina y la amigdalina son liberadas completamente de las células especiales. Es fácil demostrar por ensayos químicos que en el caso de las almendras, el ácido cianhídrico es el inhibidor de la germinación.

El mismo inhibidor se ha observado en semillas de *Crategus* y de *Prunus*. La inhibición desaparece cuando se lavan en aguas las semillas de *Prunus* durante tres días. Este hecho puede explicar ciertas observaciones de agricultores que semillas que no germinan normalmente lo hacen después de lavadas por cierto tiempo.

E) *Amoniaco*.

El extracto acuoso de semilla de remolacha contiene un inhibidor volátil muy fuerte. Es el amoniaco, que se libera por acción de una enzima desconocida, de sustancias nitrogenadas contenidas en el extracto. De 1 cc. de extracto se liberan 0,3-0,4 mg. de amoniaco. Puede considerarse una concentración alta, desde que sabemos que concentraciones de 1:24.000 inhibe la germinación de semillas de *Vicia Faba*.

C) *Aceites de mostaza*.

Observaciones sobre la germinación en *Sinapis alba* nos han llevado a determinar que aceites de mostaza son inhibidores de la germinación. El fruto de *Sinapis* está compuesto de dos partes: una silicua y un "pico". El "pico" no se abre nunca, y la semilla que contiene permanece encerrada. Generalmente se encuentran muchos "picos" con sus semillas sin germinar debajo de las plantas de *Sinapis*. Las silicuas se abren y las 4-5 semillas que contienen germinan inmediatamente cuando las condiciones son favorables;

en caso que se encuentren semillas de "picos", también germinan. Cuando se añaden valvas de las silicuas o paredes del "pico", impiden la germinación de cualquier semilla, lo que indica que los tejidos de los frutos contienen un inhibidor. De acuerdo a experimentos realizados, pertenece al grupo químico de los aceites de mostaza, lo mismo que los inhibidores de los frutos de *Brassica nigra*, con 0,7 % de isotiocianato de alilo ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{N} = \text{C} = \text{S}$), que se extrae por destilación de agua y es vendido como "aceite de Sinapis" con una pureza de 92-95 % de isotiocianato de alilo.

En las semillas no se encuentra el aceite libre, sino el glucósido sinapina, que durante la germinación o en semillas trituradas libera el isotiocianato bajo la influencia de la miosina (2).

La savia de rábano y de *Kalvabi* contienen también un inhibidor muy fuerte y volátil que es un aceite de mostaza. Brotes de *Raphanus sativus*, *Brassica alba* y *Brassica oleracea* exhalan vapores de este aceite, que matan las plantas de papa cuando son puestos en conjunto bajo una campana de vidrio.

D) Ácidos orgánicos.

Los ácidos málico y cítrico son comunes en los jugos de frutas y en la savia. Estos ácidos actúan en parte como inhibidores cuando la proporción es la siguiente: 0,5 % para el málico; 1 % para el cítrico; 0,2 % para el tartárico; 0,1 % para el ácido crotonico, y 0,09 % para el ácido salicílico. El jugo de limón contiene el 5-6 % de estos ácidos.

Debido a que los jugos vegetales generalmente contienen una mezcla de estos ácidos, se observa un efecto sinérgico. Se ha demostrado experimentalmente que esta acción es bastante fuerte. Los ácidos málico y cítrico no inhiben en una concentración de 1:2.000, pero una mezcla de ambos en partes iguales da un i.g. del 65 %.

E) Lactonas no saturadas.

El fruto de *Sorbus aucuparia* contiene un fuerte inhibidor que ha sido identificado como ácido parasorbico (3).

Este ácido inhibe la germinación de semillas de *Lepidium* hasta una dilución de 1:10.000. Pertenecce al grupo químico de lactonas no saturadas. La anemonina pertenece también a este grupo, que se encuentra en muchas plantas de la familia de las Ranunculáceas y actúa también como un fuerte inhibidor (4).

Pero el inhibidor más interesante de este grupo es la cumarina, que se encuentra en muchas plantas de diferentes familias (5). A una concentración de 1:8.000 la cumarina inhibe completamente la germinación del trigo. Causa un estado de reposo en semillas de le-

chuga que es interrumpido por sustancias químicas, como la tiourea.

F) Aldehidos.

Como ya hemos expresado, Mazé informó que el aldehido acético es un inhibidor. En igual forma se comporta la mayoría de los aldehidos, como el benzoico, salicílico y el citral. Los vapores del aldehido benzoico son muy activos e inhiben completamente la germinación del trigo, hasta una concentración de 0,0006 % en volumen. Es indudable que este compuesto participa en la inhibición causada por la hidrólisis de la amigdalina.

Es posible demostrar que el grupo CHO es el activo en todos estos casos y funciona prácticamente sin ninguna influencia de grupos químicos vecinos.

El citral (6) se encuentra en la esencia de limón hasta una concentración de 1:1.000-1:2.000. El límite de su actividad inhibidora es 1:5.000.

Linaloe (7) de estructura química semejante, induce un i.g. de 62 % a una concentración de 1:500.

Aldehido cinámico (8) y anísico (9) son inhibidores mucho más fuertes, como así también el ácido cinámico (10) y ácido anísico (11).

El ácido crotónico a una concentración de 1/200 Mol da un i.g. de 98 %.

G) Acidos volátiles.

Cuando se toma el pericarpio de medio fruto de naranja o menos y se hace con éste un ensayo de volatibilidad, se encuentra que se halla en él, una sustancia inhibidora, que otros ensayos determinan como el aceite volátil contenido en las glándulas. Todos los aceites volátiles son inhibidores muy fuertes, como los aceites de pimienta, hinojo, anís, eucalipto, etc.

Basta sumergir una varilla de vidrio en uno de estos aceites y pasar con ella sobre la tapa de una caja de Petri, para obtener, en un ensayo de volatibilidad, una inhibición completa.

Es interesante recordar que el efecto inhibidor y tóxico de los aceites volátiles sobre el crecimiento, es conocido desde hace cuarenta años. Puesto que éstos son sustancias muy complejas desde un punto de vista químico, es importante saber cuál es el agente activo. Por medio de experimentos se ha demostrado que los hidrocarburos aromáticos y acíclicos, como el estireno, cimene, etc., y los alcoholes como borneol, linalol, etc., que se hallan en casi todos estos aceites, no son responsables del poder inhibidor. Los agentes activos son: aldehidos benzoico, salicílico, cinámico,

ánisico, citral, y fenoles (timol, carvacrol, apiol, safrol) y cetonas (carvone, alcanfor, eucaliptol).

H) *Alcaloides.*

Todos los frutos y semillas que contienen alcaloides inhiben la germinación. Cuando se ponen semillas de tabaco cerca de los pericarpios u hojas de esta misma planta, las semillas no germinan. Es posible en estos casos, probar que los alcaloides son responsables de la inhibición, de dos maneras: 1) extrayéndolos por métodos químicos conocidos, de los órganos que los contienen, los que pierden su poder inhibitor, y 2) los alcaloides puros inhiben la germinación en concentraciones semejantes a las que se encuentran en las plantas.

En ciertos casos una especie contiene alcaloides y posee poder inhibitor, mientras que otra especie muy afín no presenta esta característica. Las semillas de *Trigonella Foenum graecum* contienen alcaloides, y 20 de ellas bastan para inhibir completamente la germinación de 50 semillas de trigo. Cuando se usan 100 o más semillas de *T. Kotschy* o *T. mospeliaca*, dos especies relacionadas que no contienen alcaloides, puede observarse que no producen inhibición.

LA RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA QUIMICA Y LA ACTIVIDAD DE LOS INHIBIDORES

Los hechos más importantes son:

- 1) El grupo activo de los aceites de mostaza es $-S-C \equiv N$ o $-N=C=S$. Este grupo es mucho más activo como $C \equiv N$ o $-N=C$.
- 2) La introducción de un halógeno aumenta la actividad inhibitora de los aceites de mostaza.
- 3) La actividad inhibitora de los fenoles disminuye cuando el número de grupos $-OH$ aumenta (fenol, resarcinol, floroglucinol). Parece que hay también un efecto de posición de los grupos $-OH$ como lo demuestran los siguientes i.g.: catecol (ortodioxibenzol) 2,1 %; resarcinol (metadioxibenzol) 22 %; hidroquinona (paradioxibenzol) 96 %, con igual concentración en todos los casos (1/40 mol).
- 4) Con ácidos carboxílicos aromáticos, la actividad inhibitora disminuye al aumentar los grupos carboxílicos.

ACCION FISIOLOGICA DE LOS INHIBIDORES

a) *Inhibición y estímulo.*

Casi todos los autores que han trabajado sobre inhibidores concluyen en que la inhibición de la germinación va acompañada de un estímulo. Así, por ejemplo, semillas tratadas con extractos de

semillas de remolacha, cuya germinación es inhibida, muestran un estímulo de la germinación y del crecimiento, cuando son transferidas al agua.

Hay tres maneras de explicar este hecho;

- 1) La misma sustancia tiene un efecto inhibitor en grandes concentraciones, mientras que es estimulante en pequeñas concentraciones.
 - 2) La inhibición y el estímulo son causados por sustancias diferentes.
 - 3) El inhibidor es transformado en un estimulante durante la germinación debido a un ligero cambio de su estructura química. Aun faltan datos experimentales para resolver estas cuestiones.
- b) *Inhibición de la germinación y del crecimiento.*

Los inhibidores no sólo actúan sobre la germinación, sino también lo hacen sobre el crecimiento. Así, el crecimiento de los brotes es inhibido cuando éstos son transferidos del agua al jugo de tomate. El extracto de semillas de remolacha detiene el alargamiento de las células en la "Avena test", lo mismo que el jugo de tomate, el ácido parasorbico y la anemonina.

Hasta ahora es imposible decir si la inhibición de la germinación se produce solamente durante las primeras fases del crecimiento o si se trata de fenómenos diferentes.

c) *Inhibición y luz.*

En muchos casos se observa una influencia de la luz y de la oscuridad sobre la actividad de los inhibidores. Por ejemplo, la inhibición de granos de trigo causada por un extracto de los mismos, es más fuerte en la luz que en la oscuridad. En este caso el problema de la acción de la luz u oscuridad sobre los inhibidores se confunde con la influencia de estos factores sobre la germinación. Se ha demostrado que en el caso de *Chloris ciliata*, cuya semilla germina sólo en la luz, se forma un inhibidor durante la germinación. Este es destruido por la luz de determinada longitud de onda y por ciertas sustancias químicas. En este caso la influencia de la luz se explica por su acción sobre el inhibidor.

LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LOS INHIBIDORES

Una de las funciones biológicas es sin duda prevenir la germinación prematura dentro de los frutos. Si las semillas germinaran dentro de ellos, no podrían cumplir una de sus funciones biológicas, como es la dispersión de la especie sobre una extensa superficie.

En casos como el de *Sinapis*, parte de las semillas permanecen encerradas en los frutos y no germinan, mientras que las restantes, que caen, germinan inmediatamente.

Las semillas encerradas en el "pico" pueden germinar en forma natural sólo cuando los inhibidores contenidos en las paredes son lavados por las lluvias o destruidos por la acción de los microorganismos.

Algunos autores han demostrado que las semillas que contienen inhibidores también actúan sobre otras semillas cuando están juntas en un tiesto con tierra. Así por ejemplo, simientes de *Meladrium* y de Ray-grass no germinan cuando semillas de *Beta* se hallan con ellas en el mismo recipiente, lo que tiene mucha importancia fisiológica.

Los inhibidores no se encuentran solamente en los frutos y semillas, sino también en las hojas y raíces. Hojas de *Artemisia absinthium* exhalan aceites volátiles que inhiben el desarrollo de plántulas de *Foeniculum vulgare* y de otras especies hasta una distancia de 1 metro y llegan a matarlas en el caso de *Levisticum vulgare*. En esta forma los inhibidores se comportan como un medio de lucha por la existencia.

INHIBIDORES, SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS Y MUTIGENAS

Muchos jugos inhibidores y la mayoría de los grupos químicos a los cuales pertenecen son conocidos como antibióticos y mutígenos; por ejemplo, los aceites de mostaza. Beijerinck demostró en 1900 que el "Bengylsenfoil" inhibe el crecimiento del *Saccharomyces*.

Las semillas de *Brassica oleracea* contienen una sustancia antibiótica que pertenece al grupo químico de los aceites de mostaza. La resistencia de las crucíferas a la enfermedad causada por la *Plasmiodiophora brassicae* es atribuida al contenido de este aceite. Esta suposición está confirmada por el hecho de que son fungicidas en concentraciones muy bajas (10 p.p.m.).

El tiocianato de alilo produce mutaciones en *Drosophila* por cambios estructurales en los cromosomas.

Los vapores de diferentes aceites de mostaza naturales (cebolla, ajo, etc.) y artificiales, inhiben el crecimiento de cultivos de tejidos y de bacterias. Así, por ejemplo, las células de *Microglia* se mueren por una exposición de 2 minutos en los vapores emanados de una solución de tiocianato al 1:1.000. Los rusos han usado esta capacidad bactericida para desinfectar heridas durante la guerra.

En general, podemos decir que los inhibidores de la germinación son a la vez inhibidores de diferentes procesos biológicos en plantas y animales, y es probable que tengan un efecto semejante sobre alguna reacción básica común a todos los organismos vivos. Tenemos solamente teorías sobre lo que podría ser este proceso, posiblemente de una naturaleza condensatoria o de dilatación de la membrana citoplásmica, lo que cambiaría su permeabilidad. Tam-

bién podría afectar el proceso respiratorio, actividad que es sólo probable.

Sobre lo que existe seguridad, es que el problema de los inhibidores forma parte de una problema biológico fundamental de inhibición que será muy interesante estudiar.

BIBLIOGRAFIA

EVEN-ARI M. On germination inhibitors. Introduction. Palestine Journal of Botany. Jerusalem, 2:1940.

EVEN-ARI M. Germination inhibitors. Botanical Review (en imprenta).

En estas dos publicaciones se encuentra toda la literatura citada en este artículo.

