

DETECCION DE INHIBIDORES DE LA GERMINACION EN LAS CUBIERTAS SEMINALES DE MANDARINO "CLEOPATRA" (*Citrus reshni* HORT. EX TAN.)

Rodríguez, N.N.*; H. Lima **; L. Pozo* y Mario Alvarez*

* Estación Nacional de Frutales.

** Instituto de Investigaciones de Cítricos y otros Frutales.

MINAGRIC.

RESUMEN

Debido a los problemas relacionados con el proceso germinativo en mandarino "Cleopatra" (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) se realizó un estudio bioquímico a semillas de esta especie.

Mediante cromatografías de papel y los espectros de absorción ultravioleta se determinó la presencia de compuestos de naturaleza fenólica en las cubiertas seminales, solubles en agua, los cuales de acuerdo a bioensayos realizados mostraron actividad inhibitoria.

ABSTRACT

It was made a biochemical study in "Cleopatra" mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seeds because of problems detected in its germinative process.

Using paper chromatography and ultraviolet absorption spectra it was determined the nature of phenolic compounds contained on seed coats, water soluble, and with inhibitory activity as it was shown by biotests.

INTRODUCCIÓN

Se ha señalado que el proceso de germinación en las distintas especies del género *Citrus* comprende un período de tiempo relativamente largo (Peña y col., 1978), y que además, en algunas existe poca homogeneidad en la emergencia de las plántulas (Rodríguez y col. 1988 a). Esto trae aparejado un crecimiento heterogéneo en los viveros de cítricos, dificultando la secuencia de operaciones que deben realizarse, y sobre todo, en el momento de practicar la injertación.

Los inhibidores naturales de la germinación se encuentran difundidos ampliamente en el reino vegetal, pudiéndose encontrar en las hojas, tallos, vainas, partes florales, raíces o semillas (Ponce y col., 1980). Debido a que algunos autores sugieren la presencia de inhibidores de la germinación en las semillas de algunas especies de *Citrus* (Moselice, 1953; Cohen, 1956; Peña y col., 1978; Demni y Bouzid, 1979; King y Roberts, 1980; Rodríguez y col., 1988b), se realizó al presente estudio, que contempla el aislamiento y determinación de estas sustancias en las cubiertas seminales de mandarino "Cleopatra" (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.).

MATERIALES y METODOS

Se extrajeron y seleccionaron semillas de mandarino "Cleopatra", y se emplearon 200 para la extracción de inhibidores de la germinación siguiendo la técnica sugerida por Yahiro y Hoyashi (1982) con algunas modificaciones realizadas por Pérez y col. (1984) y Rodríguez y col. (1986) para la extracción de extractos crudos a partir de material vegetal. (Fig. 1).

Se empleó papel FN-1 para realizar las cromatografías a las fracciones ácida y neutra, usando como sistema de solventes isopropanol-agua en la relación 4:1 (Rodríguez y col., 1985). Se realizaron cinco cromatogramas de cada fracción (ácida y neutra), y para la detección de compuestos de naturaleza fenólica se utilizaron de los propuestos por Merck (1974) (Tab.1).

En cada cromatograma se calcularon los R_f de las manchas obtenidas, estableciéndose además la coloración de cada una de ellas.

Por otra parte se tomaron dos cromatogramas de cada fracción y se seccionaron en bandas de papel de 2,0cm, las que se sumergieron por separado en agua destilada

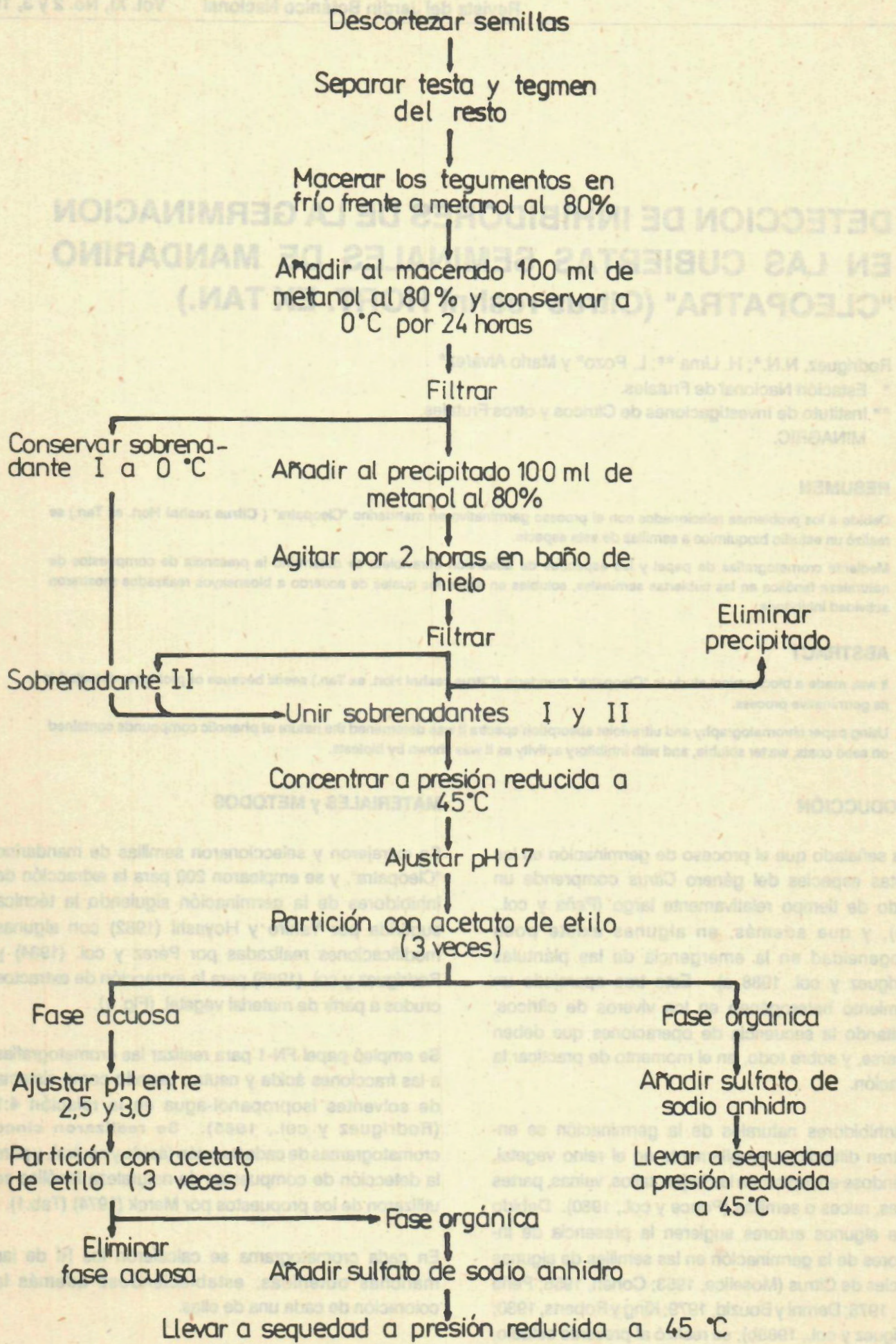


Figura 1. Técnica para la extracción de inhibidores de la germinación en semillas de dos especies de cítricos (según Yahiro y Hayashi, 1982; modificada por Pérez y col., 1984 y Rodríguez y col., 1986).

y metanol para realizar la lectura de los espectros de absorción ultravioleta a longitudes de onda comprendidas entre 220nm y 300nm.

Además, un cromatograma de cada fracción se seccionó de igual manera que en el caso anterior, y cada banda de papel se sometió a bioensayo de arroz de crecimiento normal (cultivar "Cuba 65") para la detección de inhibidores del crecimiento.

RESULTADOS y DISCUSION

Con el empleo de los diferentes reveladores para detectar compuestos de naturaleza fenólica, al considerar la extracción neutra, obtenida a partir de testa y tegmen de semillas de mandarina "Cleopatra", se observó la aparición de dos manchas con todas las soluciones cuando se consideró la fracción neutra (Tab.2). Por otra parte, se obtuvieron cuatro manchas al emplearse los reveladores 34 y 61 al tener en cuenta la fracción ácida, mientras que solamente dos con los demás reveladores según puede apreciarse en la misma tabla.

En los espectros de acción ultravioleta observados empleando agua y metanol como solventes, se obtuvieron picos de absorción a 280 nm en las zonas de aparición de las manchas, ya sea para la fracción neutra como para la ácida (Fig. 2,3,4, y 5).

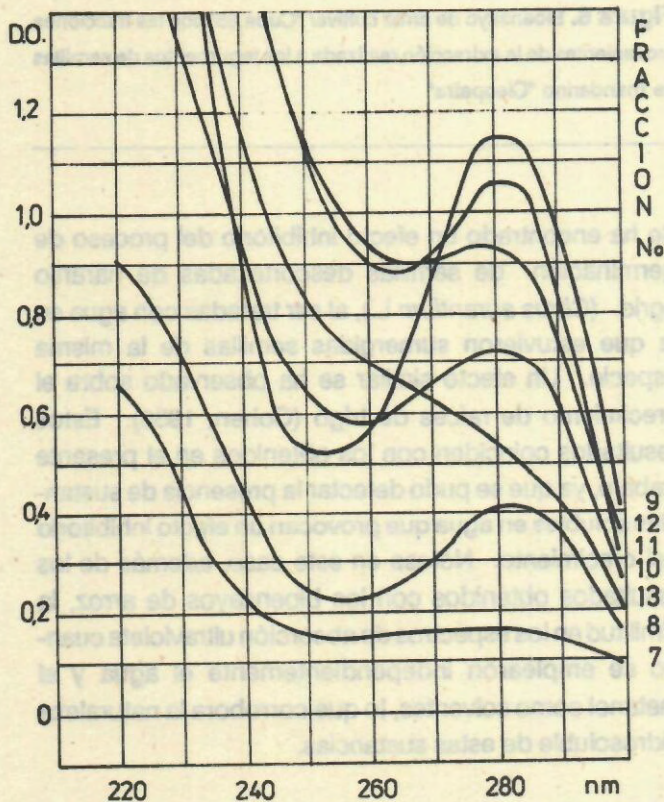


Figura 2. Espectros UV realizados a los compuestos extraídos con metanol a partir de las bandas de papel cromatográfico al considerar la extracción a PH neutro en cubiertas seminales de mandarina "Cleopatra"

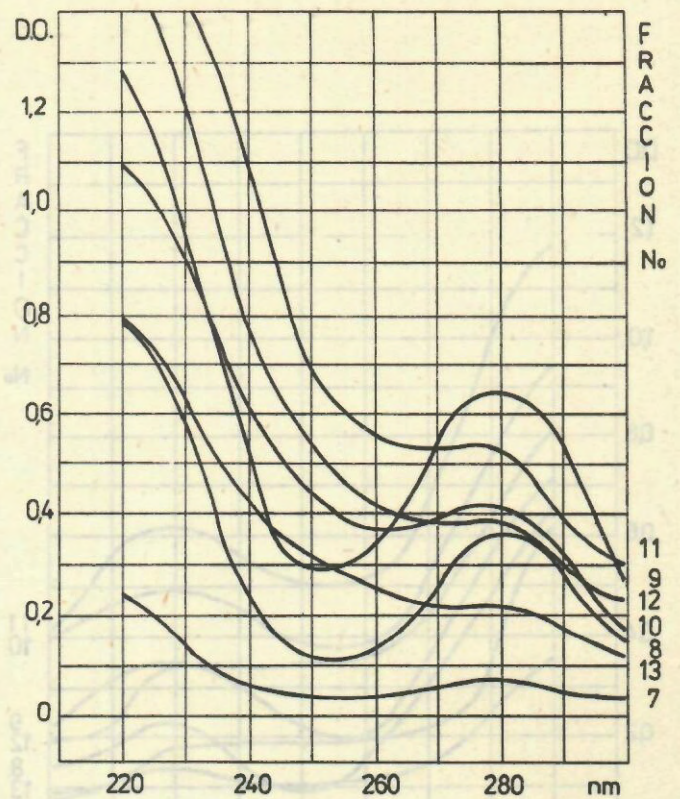


Figura 3. Espectros UV realizados a los compuestos extraídos con agua a partir de las bandas de papel cromatográfico al considerar la extracción a PH neutro en cubiertas seminales de mandarina "Cleopatra"

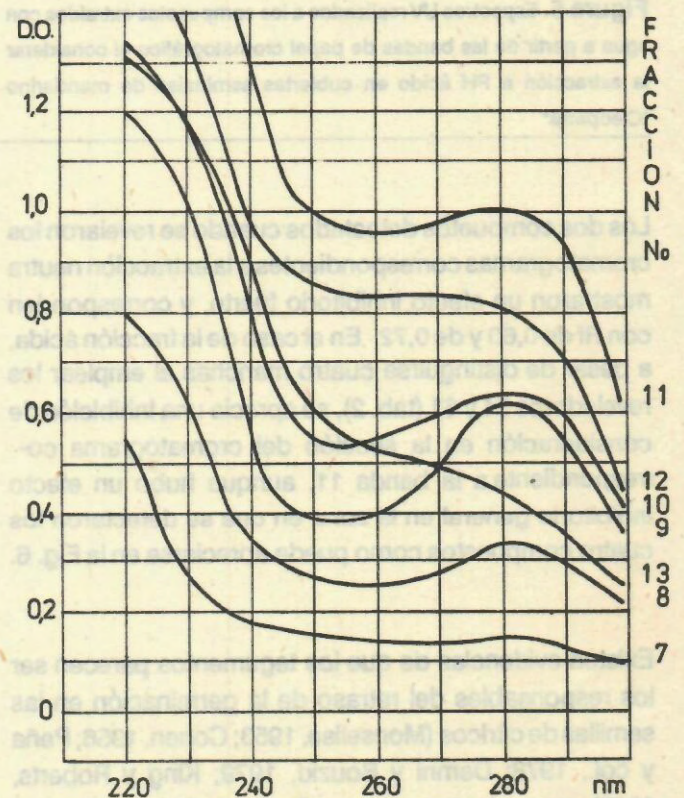


Figura 4. Espectros UV realizados a los compuestos extraídos con metanol a partir de las bandas de papel cromatográficos al considerar la extracción a PH ácido en cubiertas seminales de mandarina "Cleopatra"

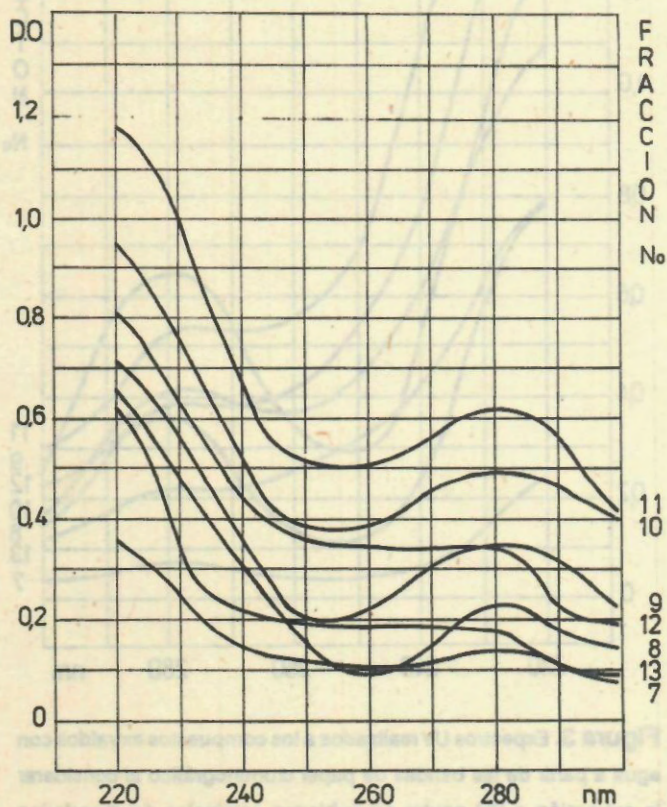


Figura 5. Espectros UV realizados a los compuestos extraídos con agua a partir de las bandas de papel cromatográfico al considerar la extracción a PH ácido en cubiertas seminales de mandarina "Cleopatra"

Los dos compuestos detectados cuando se revelaron los cromatogramas correspondientes a la extracción neutra mostraron un efecto inhibitorio fuerte, y corresponden con Rf de 0,60 y de 0,72. En el caso de la fracción ácida, a pesar de distinguirse cuatro manchas al emplear los reveladores 34 y 61 (tab. 2), se aprecia una inhibición de consideración en la sección del cromatograma correspondiente a la banda 11, aunque hubo un efecto inhibitorio general en la zona en que se detectaron los cuatro compuestos como puede apreciarse en la Fig. 6.

Existen evidencias de que los tegumentos parecen ser los responsables del retraso de la germinación en las semillas de cítricos (Monselise, 1953; Cohen, 1956; Peña y col., 1978; Demni y Bouzid, 1979; King y Roberts, 1980), y se plantea que pueden constituir barreras al intercambio gaseoso, presentar impermeabilidad al agua, ofrecer resistencia mecánica al crecimiento de la raíz y contener sustancias inhibitorias (Peña y col., 1978).

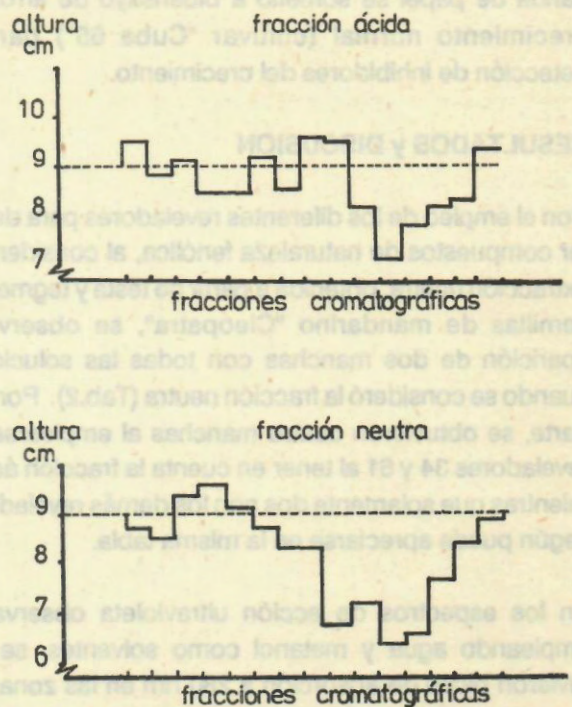


Figura 6. Bioensayo de arroz cultivar "Cuba 65" con las fracciones provenientes de la extracción realizada a los tegumentos de semillas de mandarina "Cleopatra"

Se ha encontrado un efecto inhibitorio del proceso de germinación de semillas descortezadas de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), al ser tratadas con agua en la que estuvieron sumergidas semillas de la misma especie. Un efecto similar se ha observado sobre el crecimiento de raíces de trigo (Cohen, 1956). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, ya que se pudo detectar la presencia de sustancias solubles en agua que provocan un efecto inhibitorio del crecimiento. Nótese en este caso, además de los resultados obtenidos con los bioensayos de arroz, la similitud en los espectros de absorción ultravioleta cuando se emplearon independientemente el agua y el metanol como solventes, lo que corrobora la naturaleza hidrosoluble de estas sustancias.

Además de hormonas vegetales que provocan retardo del crecimiento, existen otros metabolitos secundarios que se acumulan en las plantas y que actúan como inhibidores, entre los cuales se encuentran los ácidos y lactonos fenólicos (Kefeli y Kadinov, 1971; Mayer y Pol-

jakoff-Mayber, 1975; Devlin, 1982), cuyo mecanismo de acción se ha planteado sea por un aumento en la actividad de la indolacético oxidasa, aunque es probable que exista alguna interferencia con la fosfonilación oxidativa (Mayer y Poljakoff-Mayber, 1975).

La reacción de coloración provocada al revelar los cromatogramas con soluciones específicas para compuestos de naturaleza fenólica (tabla 1), tanto en el caso de la extracción a pH neutro como a pH ácido, así como la presencia de picos de absorción a 280nm (Figuras 2,3,4 y 5), indican la presencia de fenoles que producen un efecto inhibitorio del crecimiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Munford y Panggabean (1982), al detectar compuestos de naturaleza fenólica en tegumentos de semillas de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), limón (*Citrus limon* (L) Burm f.) y lima (*Citrus aurantifolia* Sw.) y con los de Rodríguez y col. (1988 b) cuando consideraron las cubiertas seminales de naranjo agrio.

CONCLUSIONES

1. En las cubiertas de semillas de mandarina "Cleopatra" existen sustancias de carácter ácido y neutro y estructura fenólica, con un marcado efecto inhibitorio sobre el proceso de germinación.
2. La naturaleza hidrosoluble de estas sustancias permite su eliminación mediante el lavado de las semillas e incidir en la uniformidad del proceso de germinación.

BIBLIOGRAFÍA

Cohen, A.

Estudies on the viability of Citrus seeds and certain properties of their coats. Bull. Res. Coun. Israel. 50:200-209, 1956.

Demni, S. et S. Bouzid.

Premieres informations sur la germination des graines de bigaradier (*Citrus aurantium* L.). Fruits 34 (4): 283-287, 1979.

Devlin, R.M.

El reposo. En R.M. Devlin Ed. Fisiología Vegetal. La Habana, Cuba. 22: 426-446, 1982.

Iglesias, R.; M. Margarita Díaz y Marta L. Fernández.

Determinación de giberelinas e inhibidores en flores normales y deformadas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivar "Bolivar". Resúmenes del Primer Simposio de Botánica. La Habana, Cuba. p: 225, 1985.

Kefeli, V. I. and C. S. Kadirov.

Natural growth inhibitors, their chemical and physiological properties Ann. Rev. Plant Physiol. 32: 185-196, 1971.

King, M.W. and E.H. Roberts.

The desiccation response of seeds in Citrus limon L. Annals of Botany 45: 489-492, 1980.

Mayer, A.M. and A. Poljakoff-Mayber.

The effect of germination inhibitors and stimulators on metabolism and their possible regulatory role. In Pergamon Press Inc. Second Ed. The germination of Seeds. New York, U.S.A. Chapter: 6, p: 126-151, 1975.

Merck, E.

Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel. En. E. Merck Ed. Reactivos Merck. R. F. Alemania p: 122, 1974.

Monselise, S.P.

Viability test with citrus seeds. Palestine Journal of Botany. Rehovot Series, 8: 152-157, 1953.

Munford, P.M. and G. Panggabean.

The inhibitory effects of seed coats in citrus seeds germination. Annals Bugoriensis 7 (4): 167-176, 1982.

Peña, Esperanza; J.M. Plasencia y A. Alfonso.

El papel de los tegumentos en la germinación de Citrus aurantium Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros Frutales 1 (2): 35-58, 1978.

Pérez, María del C.; S. Talón; L. Pozo; H. Oliva; E. Primo y R. Millán.

Efecto de la evolución del contenido de giberelinas libres en árboles de naranjo "Valencia" en las condiciones de Cuba. Cuarta Jornada Científica. Estación Nacional de Frutales. Resúmenes, 1984.

Ponce, N.; A.C. Ruíz y D.E. Marambio.

Inhibición de germinación en semillas de toronja. Memoria del simposio "La investigación, el Desarrollo y la Docencia en CONAFRUT durante 1979" CONAFRUT, México, 4: 1274-1334, 1980.

Rodríguez, N.N.; L. Pozo; L. Pérez, V. Fuentes y M. Alvarez.

Aislamiento y determinación de inhibidores de la germinación en semillas de Carica papaya. Memorias Primer Simposio de Botánica, La Habana, Cuba. V: 292-302, 1985.

Rodríguez, N.N.; L. Pozo; Caridad Noriega; M. Alvarez; M. Ortíz; Bárbara Velázquez y Ana M. Sotolongo.

Estudio de algunos aspectos bioquímicos del proceso de germinación en cuatro patrones cítricos. Memorias Simposio Internacional sobre Citricultura Tropical. La Habana, Cuba. II: 115-122, 1986.

Rodríguez, N.N.; M. Alvarez y María C. Rivero.

Estudio del proceso de germinación de semillas intactas de dos patrones cítricos: naranjo agrio y mandarino "Cleopatra". Ciencia y Técnica en la Agricultura. Cítricos y otros Frutales, 1988 (en prensa).

Rodríguez, N.N.; Caridad Noriega; L. Pozo; M. Alvarez y María C. Rivero.

Reguladores del crecimiento y control de la germinación de dos patrones cítricos: naranjo agrio y mandarino "Cleopatra". Resúmenes Conferencia Científica X Aniversario ISACA. p. 66, 14-15 oct., 1988.

Yahiro, M. and Y. Hoyashi.

Growth inhibitors in papaya (*Carica papaya* L.) seeds. Japanese Journal of Tropical Agriculture 26 (2): 63-67, 1982.

Tabla 1. Soluciones empleadas para la determinación de compuestos de naturaleza fenólica. (Merck, 1974).

REVELADOR No.	SOLUCIONES	ESPECIALIDAD
34	Reactivo de Pauly	Fenoles, aminas copulables y heterocilos.
61	Azul de bromofenol rojo de metilo-reactivo de pauly.	Fenoles
69	Bencidina diazotada	Fenoles
105	Cloruro de hierro (III)	Fenoles y ácidos hidroxámicos.
227	Nitrato de plata	Fenoles.

Tabla 2: Coloración de las manchas y cálculo de los Rf, considerando las extracciones a Ph ácido y a Ph neutro realizadas a partir de tegumentos de semillas de mandarino "CLEOPATRA".

REVELADOR No.	EXTRACCION A PH ACIDO		EXTRACCION DEL PH NEUTRO	
	Rf	Col. de la mancha	Rf	Col. de la mancha
34	0,60	Amarillo-naranja	0,61	Naranja
	0,72	Naranjado	0,72	Amarillo-naranja
			0,77	Rosado
			0,83	Amarillo-tenue
61	0,61	Naranjado	0,62	Carmelitosa
	0,72	Naranjado	0,68	Naranjado
			0,74	Naranjado
			0,81	Naranjado
69	0,61	Naranjado	0,68	Naranjado
	0,73	Naranjado	0,81	Naranjado
105	0,60	Verde mate	0,70	Verde mate
	0,73	Verde mate	0,82	Verde mate
227	0,60	Malva	0,71	Malva
	0,72	Malva	0,82	Malva