

# POTENCIAL CITOSTÁTICO DE UN EXUDADO DE SEMILLAS DE *CEDRELA FISSILIS* VELL. (MELIACEAE) EN GERMINACIÓN

Teresa Argüelles<sup>1\*</sup> y Graciela Fernández<sup>2</sup>

<sup>1</sup>LInQuiF, Facultad de Ciencias Forestales, Univ. Nac. de Misiones. Bertoni 124, (3380) Eldorado. Misiones. Correo electrónico: arguelles@facfor.unam.edu.ar

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Básicas. Univ. Nac. de Luján. Rutas 5 y 7, (6700) Luján. Pcia. de Bs. As.

\*Autor a quien dirigir la correspondencia.

## Resumen

Semillas de cedro misionero (*Cedrela fissilis* Vell. —Meliaceae—) se pusieron a germinar sobre un medio sintético compuesto por las sales minerales de la formulación de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración, y solidificado con agar. Se determinó que las semillas exudaban sustancias hacia el medio de cultivo que inhibía el crecimiento de los hongos contaminantes frecuentes en el cultivo *in vitro* de explantos vegetales. En este trabajo se determinó que esas sustancias son capaces de inhibir el crecimiento de hifas de *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., así como de levaduras. Por otro lado, los estudios realizados indican que también inhiben el crecimiento de estafilococos y estreptococos.

## CYTOSTATIC POTENTIAL OF A GERMINATING SEED EXUDATE FROM *CEDRELA FISSILIS* VELL., (MELIACEAE)

### Summary

Seeds from *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) were put to germinate on synthetic medium made out of the saline formulation of Murashige and Skoog diluted to half of its strength and solidified with agar. The seed exuded substances into the substrate, which inhibited the growth of fungi normally found as contaminant in tissue culture of explants. In this study it was determined that those substances can inhibit the growing of hyphae of *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., and yeast. Preliminary analysis indicate bacterial, staphylococcus and streptococcus growth inhibition.

---

**Palabras clave:** *Cedrela fissilis* - semillas - actividad antifúngica.

**Key words:** *Cedrela fissilis* - seed - antifungal activity.

## Introducción

*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) (ex *Cedrela tubiflora* Bertoni) es un árbol de la familia de las Meliáceas; su madera es muy apreciada ya que posee óptimas características fisicomecánicas y agradable fragancia (Dimitri y col., 1997). Es un componente importante de la Selva Paranaense Misionera, parte remanente de la gran Mata Atlántica, que desde el Océano Atlántico se adentra en el continente hasta la Provincia de Misiones y el este del Paraguay (Clayton Ferreira, 1992).

Debido a que el cultivo del árbol presenta serios problemas fitosanitarios (Brugnoni, 1980), se comenzó, en 1993, un experimento destinado a la inducción de mutaciones y a la propagación agámica del material transformado. Con el objetivo de obtener plantines se utilizó material vegetal joven. Sobre un medio de cultivo de alta molaridad, y en forma aséptica, se pusieron a germinar semillas sin los dos tegumentos y el endosperma, y solamente se dejó el embrión con los cotiledones.

Al cabo de tres semanas se observó que en el medio donde estaban los embriones, relativamente rico y complejo, no había contaminación; los embriones completos mantenían su coloración blanco-lechosa, efecto que hizo suponer la presencia de sustancias antioxidantes.

Así, en 1993, se inició el estudio de las propiedades antioxidantes de las sustancias que se encontraban en el embrión. En primer lugar, los medios donde habían permanecido los embriones fueron inoculados con los hongos contaminantes comunes de los medios de cultivo (*Penicillium* spp., *Aspegillus* spp., *Mucor* spp). La inoculación no progresó, ya que no se formaron las hifas de los hongos.

En 1994 y 1995 se repitió el experimento; se corrigieron las condiciones técnicas y la metodología.

## Materiales y métodos

Frutos de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) fueron recolectados durante junio y julio en los departamentos de Guaraní (54° 15' de longitud Oeste; 26° 56' latitud Sur) y de Eldorado (54° 40' de longitud Oeste; 26° 23' de latitud Sur) de la Provincia de Misiones.

Mapa 1.- Provincia de Misiones (Argentina). Zonas de recolección



● Departamento de Eldorado.

■ Departamento de Guaraní.

En el Departamento Guaraní se recogieron las semillas de árboles situados en el predio Reserva Forestal de Uso Múltiple Guaraní de la Universidad Nacional de Misiones y en el Departamento de Eldorado, se recogieron en la zona de influencia de la ciudad de Eldorado, a orillas del río Paraná.

Los frutos fueron mezclados sin distinguir su procedencia y fueron dejados a la sombra en un ambiente seco, a temperatura no mayor de los 30 °C. Cuando los frutos se abrieron, se extrajeron las semillas, eliminando las que se detectaban vacías al tacto. Luego, las semillas fueron almacenadas en una bolsa de polietileno a 12 °C hasta su utilización.

Para promover la germinación, las semillas fueron dispuestas sobre dos sustratos: a) y b);

- a) medio de cultivo preparado con la formulación de sales inorgánicas de Murashige y Skoog a la mitad de su concentración (Murashige y Skoog, 1962), pH 5,7, solidificado con 0,65 % de Difco-bacto agar;
- b) agua desionizada, ajustada al mismo pH, y solidificada con la misma concentración de agar.

Ambos medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Todas las semillas fueron sometidas a un flujo de agua corriente durante dos horas (Sauls, 1972); posteriormente las semillas fueron agrupadas en cuatro lotes, tres de ellos de 300 ejemplares cada uno y el cuarto, de 100 ejemplares.

En el primer lote las semillas fueron escarificadas (se les cortó el ala membranosa y se verificó que los tegumentos se hubieren perforado, para permitir el libre acceso de agua).

En el segundo lote los tegumentos y el endosperma fueron removidos completamente, quedando los embriones desnudos.

En el tercer lote las semillas fueron desmembradas con el fin de separar el endosperma y los cotiledones de los embriones, y los cotiledones y los embriones sin cotiledones fueron sembrados por separado. El cuarto lote, de 100 semillas enteras, fue sometido a un baño de agua a 100 °C durante 5 minutos. Durante todo el proceso las semillas estuvieron en contacto con el agua, pero se verificó que el tiempo total de lavado no superara las tres horas.

La cantidad total de semillas sembradas fue aproximadamente de 1.000.

En los sustratos a) y b) se sembraron:

1. Semillas enteras con tegumentos perforados.
2. Semillas enteras con tegumentos perforados, inactivadas por calor.
3. Embriones enteros, sin tegumentos ni endosperma.
4. Embriones sin cotiledones.
5. Cotiledones aislados.

**Cuadro 1.-** Esquema de la siembra en los sustratos a) y b)

<b>Sustrato a)</b>	<b>Sustrato b)</b>
<i>Semillas enteras escarificadas</i> 15 recipientes, 10 semillas c/u	<i>Semillas enteras escarificadas</i> 15 recipientes, 10 semillas c/u
<i>Semillas enteras escarificadas y en baño de agua 100 °C, 5 minutos</i> 12 recipientes, 10 semillas c/u	<i>Semillas enteras escarificadas y en baño de agua 100 °C, 5 minutos</i> 12 recipientes, 10 semillas c/u
<i>Embriones desnudos, sin tegumento ni endosperma</i> 12 recipientes, 10 semillas c/u	<i>Embriones desnudos, sin tegumento ni endosperma</i> 12 recipientes, 10 semillas c/u
<i>Embriones sin cotiledones</i> 12 recipientes, 10 embriones c/u	<i>Embriones sin cotiledones</i> 12 recipientes, 10 embriones c/u
<i>Cotiledones aislados</i> 12 recipientes, 20 cotiledones c/u	<i>Cotiledones aislados</i> 12 recipientes, 20 cotiledones c/u

Como controles se dejaron sin sembrar 5 recipientes de cada uno de los sustratos.

Los recipientes que contenían el material vegetal se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas luz de  $27 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a una temperatura que osciló entre los 25 y los 30 °C.

Al cabo de 30 días se comenzaron los ensayos de inoculación con hongos y bacterias.

Se preparó agar-papa glucosado y agua de peptona-agar, ambos fortificados 2X, a fin de obtener la concentración final adecuada (Becker y col., 1996) para el crecimiento de hongos y bacterias. Los medios fueron esterilizados a 121 °C, y cuando el medio agar-papa se enfrió a una temperatura de 45 °C, fue mezclado en partes iguales con el sustrato proveniente de las semillas mediante agitación rápida y enérgica; inmediatamente fue sometido a un enfriamiento rápido por inmersión del recipiente que contenía la mezcla, en agua helada. Se procedió de igual forma con el agua de peptona.

Los medios así preparados con agar-papa glucosado, y los tres recipientes con el sustrato original sin la adición del agar-papa, fueron inoculados con ansa de platino en estría, con cultivos puros de cada uno de los hongos: *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y *Saccaromices* spp. Los medios reelaborados con agua de peptona, y tres recipientes con el sustrato original fueron sembrados en los cuatro cuadrantes

con *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* y *Streptococcus piogenes*. Ambos cultivos fueron mantenidos en la oscuridad; los inoculados con hongos, a temperatura ambiente (24-30 °C), y los cultivos inoculados con bacterias, a 35 °C, en estufa.

En seis de los recipientes que habían contenido semillas enteras escarificadas, se eliminaron estas y se sembraron 10 semillas de citrus, extraídas de naranja dulce, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. (Rutáceas) "Calderón", de origen comercial.

Después de 72 horas se observaron los recipientes con bacterias para determinar si había desarrollo de colonias. Al cabo de 10 días se analizaron las inoculaciones con hongos.

Para la determinación de glúcidos y proteínas se tomó uno de los medios de cultivo preparados con agua desionizada y solidificados con agar, que habían contenido las semillas, y se centrifugó a 5.000 G durante 10 minutos, utilizando el sobrenadante de esta centrifugación. Para la determinación de hidratos de carbono se utilizó el método de Dubois (Dubois y col., 1965); las proteínas fueron determinadas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para el aislamiento y el ensayo de compuestos orgánicos se siguió el esquema de extracción de Kefeli (Kefeli, 1978).

## Resultados y discusión

La inoculación sobre el medio combinado formado por 20 ml de agar-papa glucosado 2X, más igual cantidad de sustrato a) o b), que había contenido las semillas enteras escarificadas, o los embriones, dio crecimiento negativo para todos los hongos y las bacterias ensayados. Sin embargo, en los controles donde nunca hubo semillas, el crecimiento de bacterias fue positivo y, en el caso de los hongos, fue notable (Tabla 1).

Así pues, la inhibición del crecimiento fue total en el medio que había contenido semillas completas; fue menor en el medio con embriones sin cotiledones; y menor aún, en aquel que había contenido solo cotiledones. En este aspecto no se registraron diferencias entre los medios.

En el caso de *Aspergillus* sp y *Phytophthora* sp, la inoculación sobre el medio que contenía semillas (con tegumentos o desnudas) fue negativa durante las primeras 5 semanas, en las que no se observó crecimiento. Después de este tiempo, se comenzó a ver en la parte superior de la cubierta seminal y en el cotiledón desnudo (la parte de la semilla que no estaba en contacto con el medio), conidióforos y esterigmas típicos de *Aspergillus* sp, e hifas de *Phytophthora* sp, en otros recipientes. Después de 45 días se observó en el 3 % de los recipientes una colonización del medio de cultivo en zonas muy restringidas alrededor de las semillas y con un patrón de crecimiento en forma de estrías circulares. En la observación microscópica de este crecimiento no se detectaron hifas, solo esporas de resistencia.

**Tabla 1.-** Crecimiento de las especies de hongos consignados según los diferentes tratamientos

Tratamientos Hongos	Control	Semillas con tratamiento térmico	Semillas enteras con tegumentos	Semillas enteras sin tegumento ni endosperma	Embriones aislados	Cotiledones aislados
<i>Aspergillus sp.</i>	+++	+++	—	—	+	—
<i>Rhizopus sp.</i>	+++	++	—	—	+	—
<i>Penicillium sp.</i>	++	+++	—	—	—	—
<i>Mucor sp.</i>	++	++	—	—	—	—
<i>Fusarium sp.</i>	+++	+++	—	—	+	+
<i>Phytophthora sp.</i>	+++	+++	—	—	+	+
<i>Saccaromices sp.</i>	+	++	—	—	++	+

Los datos fueron tomados diez días después de la inoculación en el medio agar-papa glucosado con el exudado de las semillas.

+++ Crecimiento óptimo, ++ Crecimiento bueno, + Crecimiento pobre, — Sin crecimiento.

En los medios que habían contenido las semillas tratadas con calor, el crecimiento de hongos y bacterias fue equivalente al de los controles.

Las semillas de citrus no germinaron sobre los medios que habían contenido semillas. En cambio, germinaron las 30 semillas sembradas sobre los controles.

Los ensayos se repitieron 3 años consecutivos, y aunque el procedimiento descrito corresponde solo al último año, donde se completó totalmente, los resultados de la inhibición del crecimiento han sido coherentes y se han repetido todos los años con la misma intensidad, independientemente de la proporción de semillas de cada localidad que pudieran integrar la muestra.

La hipótesis de que las semillas, antes de germinar, exudan sustancias al medio con poder antifúngico parece eficientemente probada con los experimentos descritos. Tenemos cierta reserva en cuanto al poder bactericida de las sustancias exudadas, ya que no se pudo establecer fehacientemente; algunas bacterias necesitan de sustratos que requieren medios específicos diferentes a los empleados con los hongos. El crecimiento sobre los controles bacterianos fue positivo, pero no tan notorio como con los hongos.

Las sustancias exudadas al medio poseen un carácter antifúngico, por lo menos para los hongos empleados en los experimentos realizados (Tabla 1).

En las pruebas efectuadas en los años anteriores (1993 y 1994) con hongos no caracterizados que normalmente infectan los cultivos *in vitro* también se detectó la propiedad antifúngica. De acuerdo con los resultados obtenidos, no se trata de principios activos presentes en el cotiledón, y tampoco en el embrión, sino que necesita de la presencia de ambos, embrión y cotiledón, para activarse, o sintetizarse *de novo*. Esas sustancias no permanecen en los cotiledones, sino que migran al medio, ya que los cotiledones se infectan mucho más fácilmente que el medio donde descansa la semilla. Acompaña al poder antifúngico un olor característico que se asemeja al de las sustancias azufradas.

En los extractos acuosos no se detectó la presencia de proteínas, y se descartó, por lo tanto, la naturaleza proteica de las sustancias. Se detectaron 20 mg/ml de glúcidos en esos extractos.

En los extractos metanólicos, con las pruebas del cloruro férrico y ester 2-aminoetil difenil bórico al 1 % en metanol (Wagner y col., 1984), se detectó la presencia de ácidos fenólicos. En la fracción clorofórmica alcalina dio resultado positivo la reacción con hexacloroplatinato de hidrógeno, lo que indicaría la presencia de compuestos heterocíclicos de nitrógeno y/o aminas cuaternarias.

## Conclusiones

La bibliografía consultada revela que *Cedrela fissilis* parece producir ciertos metabolitos secundarios con efectos de interés en el área biomédica y bioquímica. Los extractos acuosos de hojas presentan actividad antimalaria (Mackinnon y col., 1997), actividad sobre macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (Benencia y col., 1996) y actividad inmunomodulatoria (Benencia y col., 1995). En nuestros experimentos se han detectado sustancias específicas producidas en un órgano (la semilla) y durante la iniciación de un proceso (la germinación), con funciones importantes de preservación. Los trabajos anteriores sobre el estudio anatómico y sobre la germinación de estas semillas no lo informan (Berltrati y col., 1985; Corbineau y col., 1985). La semilla de cedro relativamente pequeña delimita un sustrato sobre el cual germinar y desarrollarse durante los primeros estadios de vida, y se asegura que este espacio no sea invadido por otros organismos mediante la exudación de sustancias que impedirán el crecimiento de organismos tan invasores como los hongos, o la germinación de otra semilla en el mismo lugar. Podría ser esta una adaptación química para la supervivencia, de la misma forma que la especie desarrolla adaptaciones morfológicas (Marques y col., 1996) cuando se encuentra en condiciones adversas.

## Referencias bibliográficas

- Becker, J.M.; Caldwell, G.A. y Zachgo, E.A. (1996). En: *Biotechnology: A laboratory course*. Academic Press. London-Sidney.
- Benencia, F.; Courreges, M.C.; Nores, M.M. y Coulombie, F.C. (1995). "Inmunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts". *Jour of Ethnopharmacology* 49 (3): 133-139.
- Benencia, F.; Courreges, M.C. y Coulombie, F.C. (1996). "In vitro activities of *Cedrela tubiflora* aqueous leaf extracts on murine macrophages". *Phytotherapy Research* 10 (1): 37-41.
- Berltrati, C.M.; Alves Júnior V.V. y Pagano, S.N. (1985). "Morpho-anatomical studies of the seeds and seedlings of *Cedrela fissilis*, Meliaceae". *Revista Brasileira de Biología* 45 (4): 499-506.
- Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* 72: 218-225 Brugnoli, H.C. (1980). En: *Plagas forestales*. Cap. II. Hemisferio Sur: 78-80.
- Clayton Ferreira L., (Ed.) (1992). Consorcio Mata Atlántica. Universidade Estadual de Campinhas. *Reserva da Biófera da Mata Atlántica* 1 (101).
- Corbineau, F.; Defresne, S. y Come D. (1985). "Some characteristics of seed germination and seedling growth of *Cedrela odorata*, Meliaceae". *Bois et forets des Tropiques* (207): 17-22.
- Dimitri, M.J.; Leonardis, R. y Biloni, J.S. (1997). En: *El Nuevo Libro del Árbol*, Tomo II (Dir. Francisco Erize) El Ateneo, Buenos Aires. Versión ampliada y actualizada de *El Libro del Árbol*, (Celulosa Argentina, 1977).
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. y Smith, F. (1965). *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Kefeli, V.I. (1978). En: *Natural Plant Growth Inhibitors and Phytohormone*. The Hague Publishers. Boston.
- Mackinnon, S.; Durst, T.; Arnason, J.T. y Angerhofer, C., (1997). "Antimalarial activity of tropical meliaceae extracts and genudin derivatives". *Jour of Nat. Products* 60 (4): 336-341.
- Marques, M.C.; Pimenta, J.A. y Colli, S. (1996). "Aspects of metabolism and morphology of *Cedrela fissilis* Vell., and *Anadenanthera colobrina* (Vell) Bren to different water regimes". *Arquivos de Biología e Tecnología* 39 (2): 385-392.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). "A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plantarum* (15): 473-497.
- Sauls, J.W. (1972). *Studies on seed dormancy*. Tesis Doctoral. Univ. of Florida. Gainesville (EE.UU.).
- Wagner, H.; Blajt, S. y Zgainski, E.M. (1984). En: *Plant Drug Analysis*. Cap. 1. Springer Verlag.