

ESTUDIO SOBRE LOS FACTORES QUE IMPIDEN LA PUTREFACCION DE LA SEMILLA CARNOSA DE GINKGO BILOBA L.

POR JUAN B. ROSSI Y JAIME R. JATIMLIANSKY ¹

RESUMEN

Las experiencias realizadas para determinar que factores impiden la putrefacción de la pulpa de las semillas de *Ginkgo biloba* L., permiten señalar la acción antibiótica de los compuestos químicos que contiene, la impermeabilidad de la epitesta y la presencia de ceras sobre la misma como barrera a la penetración de la microflora, el pH ácido (4,1) del jugo y la elevada presión osmótica (67 atm.) del mismo, como factores que en conjunto, principalmente los dos últimos, impiden el desarrollo bacteriano y en consecuencia la putrefacción de la semilla.

ABSTRACT

Several factors prevent rotting of the fleshy pulp in *Ginkgo biloba* L. seeds: antibiotic action of chemical compounds in the seed, impermeability of the epitesta, waxes covering seeds, pH (4,1) of juice and its high osmotic pressure (67 atm.).

INTRODUCCION

Es un hecho conocido que el árbol *Ginkgo biloba* L. es la única especie sobreviviente de la familia de las Ginkgoáceas, cuya edad se remonta al período Triásico o Jurásico, habiendo sido particularmente abundantes en el Jurásico medio; por causas desconocidas, probablemente glaciaciones, fueron destruidas las especies existentes al final de la era Terciaria o principio de la Cuaternaria, persistiendo hasta nuestros días únicamente la especie mencionada. Su supervivencia ha llamado

¹ División de Biología Vegetal.

siempre la atención de numerosos investigadores, siendo objeto de gran cantidad de trabajos botánicos y químicos, que nos permiten tener un conocimiento bastante completo de él.

Como característica notable se destaca su extraordinaria resistencia a pestes y enfermedades, habiéndose efectuado estudios en este sentido utilizando hojas, corteza del tallo y raíz, de los cuales se desprende una posible acción repelente y tóxica para algunos insectos, actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana (Major: 1967; Major y Tietz, 1962; Bevan, Birch y Casewell, 1961; Major, Marchini y Sproston, 1960).

Las semillas de *Ginkgo biloba* tienen la particularidad de desarrollar su exotesta en un tejido carnoso abundante con un fuerte olor desagradable, mientras que se esclerosa la mesotesta, presentando el conjunto un aspecto semejante a una drupa. Hemos observado que estos pseudofrutos no sufren ningún proceso de putrefacción, aún triturados y abandonados al aire libre. Hasta donde llegan nuestros conocimientos, no hemos encontrado ninguna referencia a esta propiedad de la semilla, habiendo sido estudiada sin embargo desde diversos puntos de vista: alimentario, farmacológico y químico; por lo que realizamos algunas experiencias para investigar las causas que impiden la putrefacción, resistiendo la acción de los agentes físicos y biológicos del aire y del suelo por un período de casi un año, al cabo del cual se la encuentra desecada formando una masa carbonizada.

La investigación realizada se presenta a continuación, resumiendo los métodos utilizados y generalizando los resultados que tratan de explicar las causas que impiden la putrefacción de las semillas de *Ginkgo*.

MATERIAL Y METODOS

En todas las experiencias realizadas se usaron semillas maduras, provenientes de los árboles que crecen en el Paseo del Bosque de la ciudad de La Plata. Se consideró que las semillas habían alcanzado plena madurez, cuando eran capaces de germinar sin ninguna dificultad.

Básicamente las experiencias consistían en la realización de antibiogramas con diversos extractos del jugo de la pulpa de la semilla, frente a varias especies de bacterias.

Se ensayaron extractos preparados con los siguientes solventes: agua destilada, acetona, éter sulfúrico, éter de petróleo (p. e. 60-80° C) y metanol a diversos pH. Se ensayó de la misma manera un aceite que

se separa de la pulpa al tratarla con solventes orgánicos. Dicho aceite no es bien conocido químicamente. Según Major (1967), el análisis en el infrarojo indica que se trata de un hidrocarburo no aromático conteniendo posiblemente un grupo carbonílico. También se ensayó la pulpa fresca directamente.

Las bacterias usadas en los primeros ensayos fueron dos cepas no identificadas de bacilos, uno Gram positivo y el otro Gram negativo, y un pool de bacterias del suelo; en los ensayos siguientes se usaron: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus prodigiosus*, *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*; en la última serie de ensayos se emplearon: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophyllus* y *L. termophyllus*.

Los antibiogramas se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro empleando unos 14 ml de agar nutritivo por placa, a pH 6,8. El medio nutriente se componía de extracto de carne 5 g, peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, bacto agar 18 g, agua destilada hasta 1000 ml.

El método consistía en embeber discos de papel secante estéril de 6 mm de diámetro, con los extractos obtenidos a partir de la pulpa de la semilla, se secaban y luego se colocaban sobre la superficie del agar en el cual se habían dispersado previamente los gérmenes. Estos provenían de un cultivo de 24 horas en caldo nutritivo; 0,2 ml de este cultivo se agregaba a unos 8 ml del agar nutriente fundido a 45° C volcándolo sobre una base de unos 6 ml de agar nutriente sobre la placa, colocándose luego la misma a 36° C durante 30 min para quitarle el exceso de agua. Para los lactobacilos el cultivo madre se efectuó sobre leche hasta su coagulación. La incubación de las placas tratadas se efectuó a 35-36° C, y para los lactobacilos, a 42° C. Todos los ensayos contaron con su correspondiente testigo y en la zona central de la placa se colocaba en todos los casos un disco de pulpa obtenido con sacabocados de 6 mm de diámetro en contacto con el agar.

RESULTADOS

En todos los antibiogramas ensayados con extractos acuosos a pH del jugo (4,1), se observó un pequeño halo de inhibición que medía de 0,5 a 2 mm, para todas las bacterias utilizadas con excepción de los lactobacilos. En los antibiogramas realizados con extractos obtenidos empleando solventes orgánicos, no se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano. El aceite presente en los extractos obtenidos con solventes orgánicos, tampoco fue inhibidor a las concentraciones usadas.

En los antibiogramas realizados con extractos acuosos 1 : 1 a distintos pH, se obtiene una débil inhibición como hemos señalado, siendo los resultados los siguientes:

| pH | Bacteria | Inhibición |
|----------------------|-----------------------|------------|
| 4,3 ; 6,2 y 8,0..... | <i>P. vulgaris</i> | débil |
| | <i>B. prodigiosus</i> | » |
| | <i>P. aeruginosa</i> | » |
| | <i>A. aerogenes</i> | » |
| 4,3 y 6,2. | <i>B. subtilis</i> | negativa |
| 4,3..... | <i>S. aureus</i> | débil |
| | <i>E. coli</i> | » |

Como se ha explicado se usó en todos los casos un disco de pulpa en contacto con el agar, sin quitar la epitesta. Estos discos frescos produjeron constantemente un marcado halo de inhibición para todas las bacterias excepto para las acidófilas.

Invariablemente, entre las 24 y 48 horas de incubación, la inhibición cedía paso a un efecto estimulante, observándose también pasado ese lapso la presencia de un hongo, proveniente en apariencia, de la epitesta, el cual se extendía favorablemente sobre la placa. Para averiguar si la procedencia de dicho hongo era endógena o exógena a la semilla y para descartar además la posible acción antibiótica del mismo, se esterilizaron dos lotes de semillas; uno con solución de Cl_2Hg al 1 % durante 20 min, previo lavado con una solución detergente para eliminar la cera de la epitesta, el otro con una solución al 3 /₀₀ de un compuesto de amonio cuaternario (cloruro de dodecil, tetradecil, hexadecil-dimetilbencilamonio) durante 30 minutos. En ambos casos las semillas tratadas se lavaron posteriormente con agua destilada estéril. En los antibiogramas realizados con la pulpa de estas semillas, no se observó hasta el sexto día la presencia del moho mencionado, pero se repitió la presencia de un halo franco de inhibición, semejante al mencionado para la pulpa sin esterilizar, para *P. aeruginosa* y para *B. prodigiosus* utilizados en esta oportunidad

Dado que el pH del jugo es francamente ácido (4,1) y que hace variar el pH del nutriente alrededor del disco por debajo de pH 5, se realizaron antibiogramas con bacterias acidófilas cultivándolas en medio de Rogosa; sobre la placa se colocaron discos de pulpa de la semilla, y no se observó inhibición del crecimiento para ninguna de las tres lactobacterias utilizadas.

En las experiencias realizadas para establecer si la pulpa y la epitesta poseían agentes contaminantes, incubando en caldo y en agar nutritivo trozos de pulpa y de epitesta o efectuando siembras a partir del jugo sobre agar nutritivo, se observó que solamente la epitesta alberga gran cantidad de bacterios, o mohos, resultando totalmente estéril la pulpa de semillas recogidas del suelo.

DISCUSION

Es evidente que la pulpa carnosa de la semilla de Ginkgo, resiste en forma indefinida la putrefacción. Las experiencias bacteriológicas realizadas, ponen en evidencia una ligera acción bacteriostática del extracto acuoso de la pulpa, no así los extractos preparados con solventes orgánicos. Esto demostraría que la fracción que produce la antibiosis es hidrosoluble y además lábil, puesto que se demostró que a partir de las 24 horas el extracto pierde su actividad inhibidora, pasando a predominar una acción estimulante, debida sin duda a la gran cantidad de azúcares reductores presentes en los extractos.

De los extractos de hojas y de otras partes del árbol, se han aislado varias hidroxilactonas y un aldehído, el 2-hexenal que se produce por contacto de tejidos lacerados con O_2 , este aldehído según Major y otros (1960), inhibe el crecimiento de *Monilia fructícola*. Por otra parte Fen-Yung y otros (1962) aislaron otro compuesto derivado del ácido hidroxibenzoico, que sería igual al bilobol extraído por Furukawa (1934). Kawamura (1928) aisló de frutos al hidroginkgol, que es una hidroxilactona y al bilobol. En total se han aislado varias hidroxilactonas y varios derivados benzoicos, además lactonas diterpenoides y el 2-hexenal, todos ellos pueden actuar como fungistáticos y bacteriostáticos.

Sin embargo, lo expuesto no explica suficientemente la no putrefacción de las semillas y la resistencia de otras partes del Ginkgo, como hojas y corteza, a las pestes. Puede asegurarse un papel importante a las ceras que recubren las hojas (Johnston y Sproston, 1965), como material que ofrece resistencia a la germinación de esporos. En las semillas la epitesta está abundantemente cubierta por ceras, pero eliminadas éstas con detergentes, no se modificó la resistencia, por lo que debe pensarse en la naturaleza impermeable de la epitesta como barrera contra la infección.

A nuestro juicio, en lo que respecta a la resistencia de las semillas a las infecciones, pueden señalarse como responsables de esa resistencia a dos factores: uno es el pH de la pulpa de 4,1, que es incompatible

con el desarrollo de las bacterias utilizadas en la experiencia, aunque no afecta el desarrollo de las bacterias acidófilas ni el de ciertos hongos del suelo y, a pesar de que éstos están siempre presentes en la epitesta, no penetran al interior, solamente pueden desarrollarse sobre la pulpa, cuando han perdido actividad los posibles agentes químicos bacteriostáticos y fungistáticos mencionados.

La pulpa de la semilla se presenta estéril, lo cual se comprobó con la no contaminación de las placas a partir del disco de pulpa, aun considerando que ésta provenía de semillas recogidas del suelo, almacenadas y utilizadas sin ninguna precaución.

El otro factor que juega un papel importante en el proceso que analizamos es la elevada presión osmótica del jugo de la pulpa, obtenido por presión de la pulpa de pseudofrutos recién recolectados. Previa centrifugación, el sobrenadante tenía una presión osmótica de 67 atmósferas valor obtenido con un osmómetro Fiske G. 66. Este elevado valor osmótico es incompatible con la vida de numerosas bacterias y mohos. El aumento progresivo de la presión osmótica que necesariamente debe producirse a medida que la pulpa pierde agua, asegura un medio hostil para la microflora contaminante.

Estas experiencias, permiten señalar a la acidez de la pulpa y a su elevada presión osmótica, antes que a la acción antibiótica de los componentes químicos de la misma, como los factores que impiden la putrefacción de las semillas de Ginkgo.

Agradecimiento

Agradecemos al Ing. Agr. Enrique M. Sívori por los consejos dados.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, P. B., T. SPROSTON, H. TIETZ y R. T. MAJOR, 1962. *Studies on the disease resistance of « Ginkgo biloba » L.* Phytopathology, 52, 3: 233-36.
- BEVAN, C. W., A. J. BIRCH y H. CASEWELL, 1961. *An insect repellent from Black Cocktail ants.* J. Chem. Soc., 1961, 1: 488.
- FURUKAWA, S., 1934. *Studies on the constituents of « Ginkgo biloba » L. fruits. I.* Sci. Papers. Inst. Phys. Chem. Research. Tokyo, 24, 304-313.
- FENG-YUNG, FU y otros, 1962. *Chemical study of hidroginkgolinic acid. New constituent of « Ginkgo biloba » L.* en Hua Hsueh Hsueh. Pao., 28, 1: 52-56. Cit por Chem. Abstr., 60 (1964).
- JOHNSTON, H. W. y T. SPROSTON Jr., 1965. *The inhibition of fungus infection Peggs in « Ginkgo biloba » L.* Phytopathology, 55, 2: 225-227.
- KAWAMURA, J., 1928. *Chemical constituents of the fruit of « Ginkgo biloba » L. I.* Japan. J. Chem., 3, 2: 89-108.

- MAJOR, R. T., P. MARCHINI y T. SPROSTON, 1990. *Isolation from « Ginkgo biloba » L. of an inhibitor of fungus growth.* J. Biol. Chem., 235, 3298.
- MAJOR, R. T. y H. J. TIETZ, 1962. *Modification of the resistance of « Ginkgo biloba » L. leaves to attack by Japanese Beetles.* J. Econ. Entomol., 55, 2 : 272.
- MAJOR, R. T., P. MARCHINI y A. J. BOULTON, 1963. *Observation on the production of 2-hexenal by leaves of certain plants.* J. Biol. Chem., 238, 5 : 1813-1816.
- MAJOR, R. T., 1967. *The « Ginkgo », the most ancient living tree.* Science, 157, 3794 : 1270-1273.