

Laboratorios de Fisiología Animal y Fisiología Vegetal  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

## Influencia de la histamina en la germinación de semillas\*

por

A. Fraile y M. Serrano

(Recibido para publicar el 20 de diciembre de 1966)

Muchos tejidos en vías de crecimiento intenso o de reparación forman histamina en grandes cantidades (6). Es particularmente marcada esta propiedad en el embrión de rata durante las últimas fases de la gestación (7). Por otra parte, la administración de inhibidores de la histidindescarboxilasa a ratas gestantes interrumpe el desarrollo fetal (5). Estos y otros hechos han llevado a pensar a los autores suecos en una relación causal entre la *histamina naciente* y la multiplicación celular (4). No obstante, sería peligroso generalizar estos resultados, ya que no siempre la multiplicación celular va acompañada de formación de histamina, e incluso se da el caso de que los fetos de diversas especies animales (ratón, hamster, gato, cerdo, etc.) carecen de capacidad para descarboxilar la histidina (9). Respecto a la acción de los inhibidores de la histidindescarboxilasa sobre el desarrollo fetal es necesario tener en cuenta que la semicarbazida, que es el generalmente ensayado en las experiencias citadas, in-

hibe también otros diversos encimas. Frente a la hipótesis de KAHLSON, consideran KAMESWARAN y col. (8) la posibilidad de que el papel de la histamina formada en el feto esté relacionado con el control del flujo de sangre a través de la placenta. La misma base causal podría tener la formación de histamina en otros tejidos u órganos.

Con estos antecedentes, hemos creído interesante trasladar el problema al reino vegetal, donde la posible correlación entre histamina y desarrollo tendría menos dificultades de interpretación.

### Material y métodos

Las pruebas de germinación se hicieron siempre con semillas de trigo. En los primeros ensayos se disponían directamente las semillas en recipientes apropiados con cantidades iguales de arena

\* Este trabajo ha sido realizado con ayuda del I. I. U., del Ministerio de Educación y Ciencia.

lavada y el mismo volumen de líquido (agua destilada o solución problema). Posteriormente preferimos someter a tratamiento las semillas después de iniciada la germinación sobre papel de filtro humedecido con agua, seleccionando las que habían alcanzado un grado de desarrollo normal a las 48 horas. En cada recipiente se colocan 15 semillas germinadas, que permanecen en estufa de germinación a 20-22° C durante seis días. (En algunos casos fue menor la duración de la experiencia.) Transcurrido este período, se anotan los resultados de la simple estimación visual, o se fotografían los lotes de plántulas; se lavan abundantemente con agua, se dejan secar al aire sobre papel de filtro unas cuatro horas, se miden y se pesan independientemente raíces y tallos de cada lote, prescindiendo del endospermo, y se homogeneizan diluyendo hasta 50 ml. Una masa fibrosa, tenaz que no se incorpora al homogenado, se pesa aparte. Del homogenado se toman muestras apropiadas para las distintas determinaciones.

El peso seco se calcula a partir de una muestra del homogenado, que se evapora y seca en estufa hasta peso constante, sumando el peso seco de la parte fibrosa correspondiente.

Para la valoración del DNA y del RNA seguimos las técnicas de MAYER y POLJAKOFF-MAYBER (10) y de BURTON (1).

El nitrógeno total y el proteico se determinan después de realizar la digestión de la muestra por el procedimiento de CALVI (2).

Las valoraciones de histamina se hacen por el método de CODE (3) sobre ileon aislado de cobayo.

### Resultados y discusión

En las primeras experiencias de tanteo apreciamos un discreto aumento del

crecimiento a los 3 días de la siembra, en los cultivos tratados con histamina  $10^{-3}$  M (clorhidrato de histamina Schuchardt), aumento que era más patente en las raíces. No obstante, ni el contenido en DNA ni el RNA eran superiores al de los testigos. El nitrógeno total estaba ligeramente aumentado. Concentraciones menores de histamina ( $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M) apenas afectaron al desarrollo de las plantas.

Un primer ensayo con semicarbazida (clorhidrato de semicarbazida Merck), conocido inhibidor de la histidindescarboxilasa, dio como resultados la casi total inhibición de la germinación de las semillas, con soluciones  $10^{-2}$  M, y un marcado retraso del desarrollo con la solución  $10^{-3}$  M.

La aminoguanidina (sulfato de aminoguanidina B.D.H.)  $10^{-4}$  M ejerce un claro efecto estimulante sobre el crecimiento de las plántulas de trigo, a pesar de lo cual es menor su contenido en RNA.

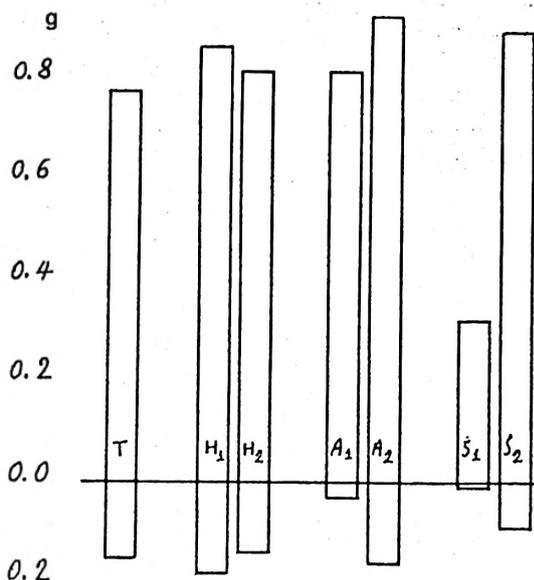


FIG. 1. Plántulas de trigo de 8 días. Peso fresco, T, Testigo; H<sub>1</sub>, Histamina  $10^{-3}$  M; H<sub>2</sub>, Histamina  $10^{-4}$  M; A<sub>1</sub>, Aminoguanidina  $10^{-3}$  M; A<sub>2</sub>, Aminoguanidina  $10^{-4}$  M; S<sub>1</sub>, Semicarbazida  $10^{-3}$  M; S<sub>2</sub>, Semicarbazida  $10^{-4}$  M.

TABLA I  
Pesos de las plántulas (15) de trigo a los 8 días de germinación.

Lote	Tratamiento	Peso fresco (gr)			Peso seco (gr)		
		Rafz	Tallo	Total	Masa fibrosa	Homogenado	Total
T	Agua	0,154	0,782	0,926	0,105	0,126	0,231
H <sub>1</sub>	H · 10 <sup>-3</sup> M	0,185	0,868	1,052	0,111	0,124	0,235
H <sub>2</sub>	H · 10 <sup>-4</sup> M	0,140	0,815	0,955	0,092	0,124	0,216
A <sub>1</sub>	A · 10 <sup>-3</sup> M	0,033	0,817	0,850	0,058	0,110	0,168
A <sub>2</sub>	A · 10 <sup>-4</sup> M	0,162	0,932	1,094	0,105	0,136	0,241
S <sub>1</sub>	S · 10 <sup>-3</sup> M	0,014	0,324	0,338	0,004	0,072	0,076
S <sub>2</sub>	S · 10 <sup>-4</sup> M	0,087	0,900	0,987	0,082	0,124	0,206

\* H = histamina ; A = aminoguanidina ; S = semicarbazida.

TABLA II  
Contenido en DNA, RNA y nitrógeno total y proteico, a los 8 días de germinación.

Lote *	DNA		RNA		N total		N proteico	
	Por plántula $\mu\text{g}$	Por peso fresco $\mu\text{g/gr}$	Por plántula $\mu\text{g}$	Por peso fresco $\mu\text{g/gr}$	Por plántula $\mu\text{g}$	Por peso fresco $\mu\text{g/gr}$	Por plántula $\mu\text{g}$	Por peso fresco $\mu\text{g/gr}$
T	291	4,37	533	8,00	600	9,00	330	5,00 mg/g
H <sub>1</sub>	236	3,37	488	6,98	670	9,52	400	5,71
H <sub>2</sub>	277	4,38	500	7,89	600	9,47	330	5,26
A <sub>1</sub>	201	3,55	304	5,37	630	11,17	430	7,64
A <sub>2</sub>	239	3,28	323	4,45	740	10,09	470	6,42
S <sub>1</sub>	166	7,35	277	12,24	330	14,70	170	7,35
S <sub>2</sub>	208	3,18	287	4,40	670	10,20	400	6,12

\* T = control (agua) ; H = histamina ; A = aminoguanidina ; S = semicarbazida.

Como es sabido, la aminoguanidina es un inhibidor de las diaminoxidasas y, en particular, de la histaminasa.

A la vista de estos resultados previos, se planteó una experiencia para estudiar

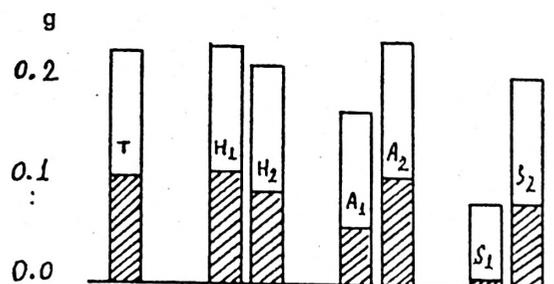


FIG. 2. Plántulas de trigo de 8 días. Peso seco. Las partes rayadas corresponden a la materia fibrosa.

el efecto de las soluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M de histamina, de aminoguanidina y de semicarbazida, sobre lotes de semillas una vez iniciada la germinación, en condiciones rigurosamente homogéneas. Los resultados se recogen en las tablas I y II y en las figuras 1-4. De su análisis se deduce que el crecimiento aparente de las plantas aumenta en presencia de histamina  $10^{-3}$  M y de aminoguanidina  $10^{-4}$  molar. Se observa también un desarrollo ligeramente mayor con la solución  $10^{-4}$  M de semicarbazida. Por el contrario, la semicarbazida  $10^{-3}$  M ocasiona una intensa inhibición del desarrollo, que con la solución más diluida afecta a la raíz pero no a las partes aéreas. También la aminoguanidina inhibe el creci-

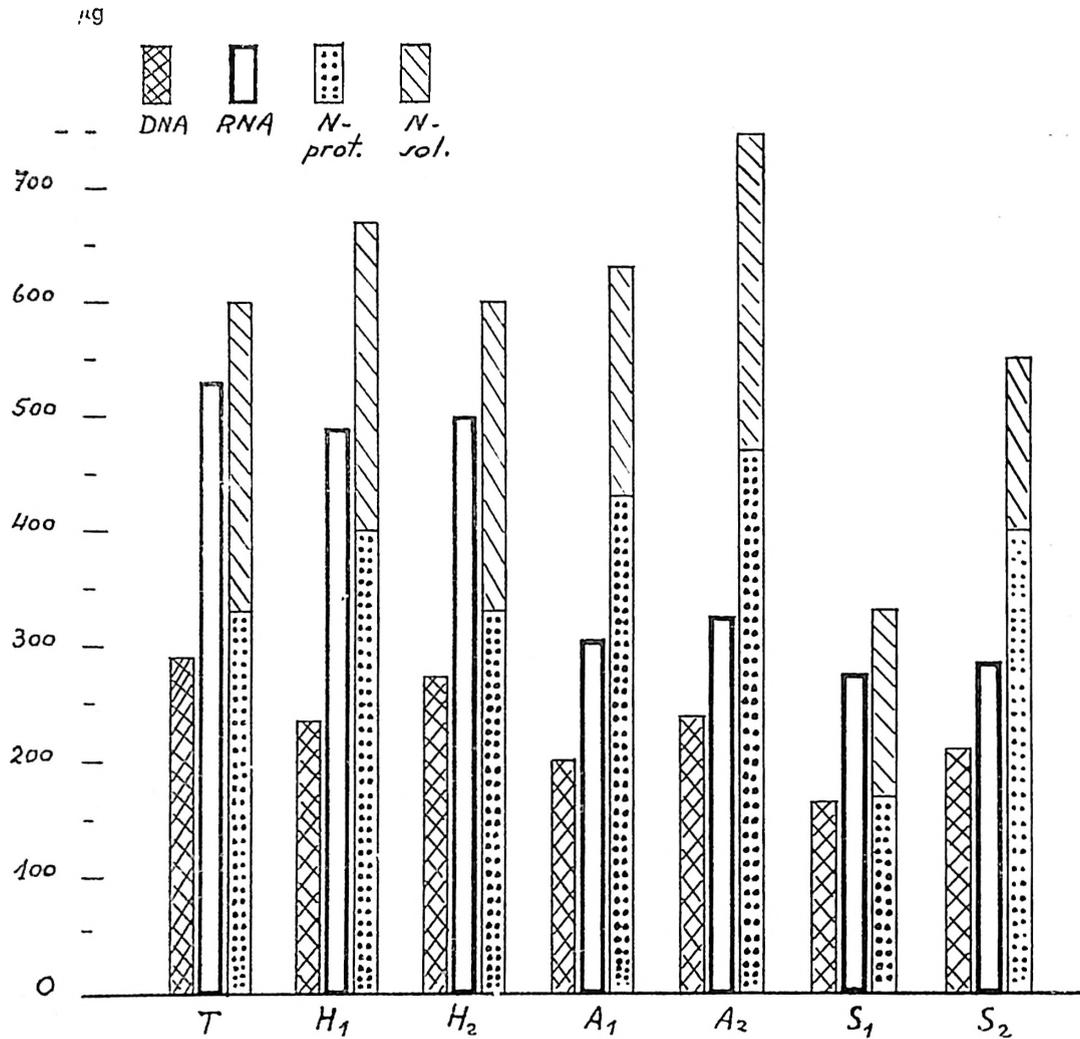


FIG. 3. Plántulas de trigo de 8 días. Valores medios en  $\mu\text{g/plántula}$ .

miento de la raíz a la concentración  $10^{-3}$  molar. Conviene insistir en el hecho de que son las raíces las partes de la planta que más acusan las diferencias de desarrollo, y que se observa un paralelismo muy marcado entre el peso de la raíz y el de la materia fibrosa no homogeneizada.

El DNA y el RNA de las plántulas experimentales son siempre inferiores a las correspondientes cifras de los controles. Las diferencias son pequeñas en el

caso de la histamina, pero se manifiestan muy acusadas con la aminoguanidina y con la semicarbazida, sobre todo para el RNA. Las dosis más fuertes causan un efecto mayor. Esta inhibición de la síntesis de DNA y RNA en el lote S<sub>1</sub> no es, sin embargo, tan intensa como la inhibición del crecimiento vegetativo, por lo que si se expresan los resultados refiriéndolos al peso de las plantas se obtienen cifras muy altas.

El nitrógeno total está aumentado en

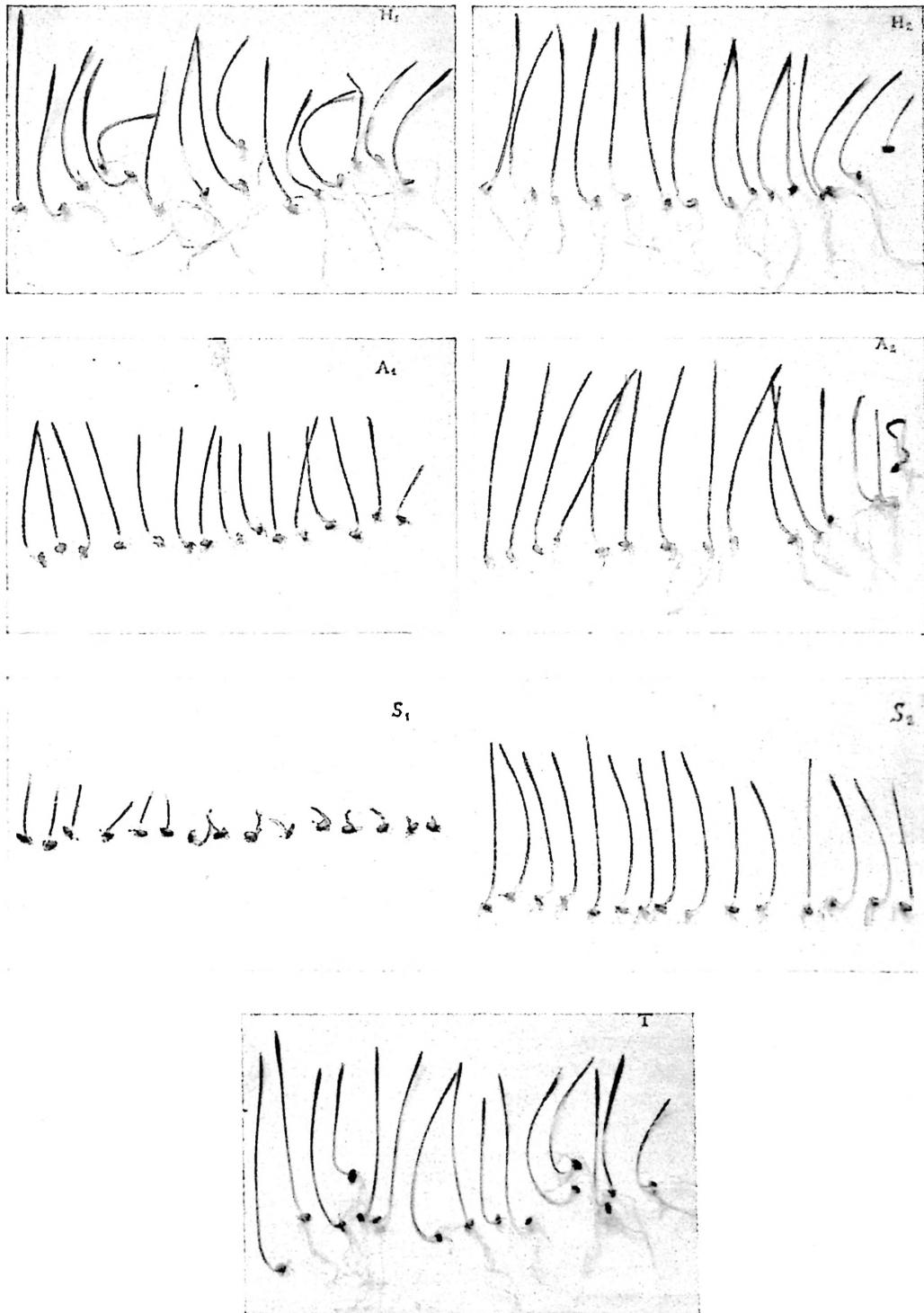


FIG. 4. Plántulas de trigo de 8 días.  $H_1, H_2$ , tratadas con histamina;  $A_1, A_2$ , tratadas con aminoguanidina;  $S_1, S_2$ , tratadas con semicarbazida; T, testigos.

un 23 % sobre el control, en las plantas del lote A<sub>2</sub>. También las dosis pequeñas de aminoguanidina y de semicarbazida, y la dosis mayor de histamina, aumentan la cantidad de nitrógeno que es movilizado del endospermo; mientras que la solución 10<sup>-3</sup> M de semicarbazida reduce a casi la mitad la cantidad de nitrógeno que pasa a la planta. Estas diferencias en el nitrógeno total se deben principalmente a la fracción proteica: el nitrógeno soluble es constante, excepto en A<sub>1</sub> y S<sub>1</sub> donde está disminuido.

La valoración de histamina en los extractos preparados a partir de semillas de trigo sin germinar, de plántulas de 4 días y de plántulas de 8 días dio, respectivamente, resultados de 0,2 y 14 µg de histamina base por gramo de peso fresco. Hemos de consignar que WERLE y RAMB (11) señalan que se forma histamina durante el proceso de germinación, si bien dicen que las plántulas de trigo no contienen ni histamina ni histidind Descarboxilasa. Las plántulas crecidas en la solución 10<sup>-4</sup> M de histamina contienen 40 µg de HB/g, y las de la solución 10<sup>-3</sup> M 366 µg/g. No es posible que se trate de la histamina del medio que haya quedado adherida a las plantas, pues éstas fueron lavadas intensamente con agua y, por otra parte, las cantidades halladas corresponderían a más de 3 ml de las soluciones empleadas en los cultivos. Parece lógico pensar, a la vista de estos resultados, que la histamina difunde hacia el interior de la planta y que la intensidad del proceso depende de la concentración de la sustancia en el medio exterior. Las plántulas tratadas con semicarbazida carecen de histamina, como era de esperar. Pero las que crecieron en aminoguanidina tampoco tienen histamina, o tienen muy poca (8 µg HB/g en A<sub>2</sub>), y este hecho es de difícil interpretación. Se hace necesario confirmar estos resultados antes de aventurar una hipótesis al respecto.

## Conclusiones

La histamina, a la concentración de 10<sup>-4</sup> M, no modifica sensiblemente el desarrollo de las plántulas de trigo. La solución 10<sup>-3</sup> M estimula discretamente el crecimiento y aumenta el contenido en nitrógeno de las plántulas; el DNA y el RNA son ligeramente menores que en los testigos. La histamina del medio penetra en los tejidos del vegetal.

La aminoguanidina 10<sup>-4</sup> M estimula más claramente el desarrollo de las partes aéreas de la planta, sin afectar apenas a la raíz; el nitrógeno proteico aumenta notablemente; el DNA y el RNA están notablemente disminuidos. La solución 10<sup>-3</sup> M ocasiona una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz, a pesar de lo cual el desarrollo de las partes aéreas es casi normal; está también aumentado el nitrógeno proteico y disminuidos el DNA y el RNA.

La semicarbazida a dosis de 10<sup>-3</sup> M inhibe intensamente el desarrollo total de las semillas; sin embargo, el contenido en DNA y RNA de los tejidos formados no es muy inferior al de las plántulas del lote S<sub>2</sub>, que manifiestan un crecimiento vegetativo sensiblemente normal. El nitrógeno total está muy reducido en S<sub>1</sub> y es, en cambio, superior al de los testigos en las plantas tratadas con semicarbazida 10<sup>-4</sup> M. Las raíces de estas últimas están también muy poco desarrolladas.

## Resumen

Se estudia la influencia de la histamina, de la aminoguanidina (un inhibidor de la histaminasa) y de la semicarbazida (inhibidor de la histidind Descarboxilasa) sobre el desarrollo vegetativo de las plántulas de trigo y sobre su contenido en DNA, RNA y nitrógeno proteico total.

La histamina 10<sup>-3</sup> M y la aminoguanidina 10<sup>-4</sup> M estimulan ligeramente el crecimiento; el efecto de la histamina se manifiesta princi-

palmente en la raíz. La semicarbazida y las concentraciones superiores de aminoguanidina inhibe fuertemente el desarrollo total de la planta.

Las cantidades de DNA y RNA están algo disminuidas en las plantas tratadas con histamina, y son marcadamente inferiores en las que fueron sometidas a la acción de la aminoguanidina o de la semicarbazida, a pesar de que el desarrollo vegetativo era supranormal en algunos lotes. Las diferencias respecto del control son más patentes para el RNA.

Ni el nitrógeno proteico ni el total son afectados por la histamina  $10^{-4}$  M. Aumenta el proteico con dosis superiores, y aún más con las dos concentraciones de aminoguanidina ensayadas. La semicarbazida  $10^{-3}$  M inhibe intensamente la movilización del nitrógeno del endospermo, mientras que la solución  $10^{-4}$  M parece ejercer un discreto efecto estimulante.

Las semillas de trigo, que carecen de histamina, la forman durante el proceso de germinación. La histamina presente en el medio de cultivo penetra en las plántulas, y parece haber una relación lineal entre la cantidad tomada por los tejidos y la concentración de histamina en el medio exterior.

### Summary

#### Histamine and germination of the seed

A causal relation between the histamine-forming capacity and cell multiplication in some animal tissues has been observed by different authors. In the present work we study the influence of the histamine, aminoguanidine (an histaminase inhibitor) and semicarbazide (an histidindecaboxilase inhibitor) on the germinating seeds of wheat; growth-rate and DNA, RNA and nitrogen (protein and total) content of the seedlings were determined after six days of treatment.

Histamine  $10^{-3}$  M and aminoguanidine  $10^{-4}$  M caused a slight stimulus of growth; aminoguanidine  $10^{-3}$  M and semicarbazide  $10^{-3}$  M and  $10^{-4}$  M pro-

duced a strong inhibition of root growth, the effect of semicarbazide  $10^{-3}$  M being particularly pronounced on the whole plant.

DNA and RNA content in both aminoguanidine-treated and semicarbazide-treated groups of plants was clearly inferior than that of controls, even in cases when vegetative development were greater than the normal. The effect of histamine on DNA and RNA content was slight.

Histamine  $10^{-3}$  M and aminoguanidine  $10^{-4}$  M and  $10^{-3}$  M caused a significant increase of the nitrogen mobilization from the endosperm, as reflected in the greater nitrogen content of the germinated plants. Semicarbazide  $10^{-3}$  M strongly inhibited nitrogen mobilization.

There is formation of histamine during the process of germination. Histamine added to the culture medium is taken into the plant tissues, and it appears to be a lineal relationship between the amount taken and the concentration in the medium.

### Bibliografía

1. BURTON, K. : *Biochem. J.*, **62**, 315, 1956.
2. CALVI, A. L. : *Analit. Chem.*, **30**, 1692, 1959.
3. CODE, C. F. : *J. Physiol.*, **87**, 257, 1937.
4. KAHLSON, G. : *Perspect. Biol. Med.*, **5**, 179, 1962.
5. KAHLSON, G., y ROSENGREN, E. : *Nature*, **184**, 1238, 1959.
6. KAHLSON, G., ROSENGREN, E., y STEINHARDT, G. : *J. Physiol.*, **169**, 487, 1963.
7. KAHLSON, G., ROSENGREN, E., y WHITE, T. : *J. Physiol.*, **151**, 131, 1960.
8. KAMESWARAN, L., y WEST, G. B. : *J. Physiol.*, **164**, 138, 1962.
9. KAMESWARAN, L., y WEST, G. B. : *J. Physiol.*, **160**, 564, 1962.
10. MAYER, A. M., y POLJAKOFF-MAYER, A. : *Physiol. Plant*, **15**, 283, 1962.
11. WERLE, E., y RAUB, A. : *Biochem. Z.*, **318**, 538, 1948.

