

Posible papel de la histamina endógena en la germinación de *Pisum sativum*, L.

M. González-Alonso y A. Fraile

Instituto de Botánica Aplicada del C.S.I.C.
y Cátedra de Fisiología General
Facultad de Ciencias
Madrid - 3

(Recibido el 10 de febrero de 1973)

M. GONZALEZ-ALONSO and A. FRAILE. *Role of Endogenous Histamine in the Germination of Pisum sativum, L.* Rev. esp. Fisiol., 29, 115-120. 1973.

The effects of aminoguanidine (diamine-oxidase inhibitor) and semicarbazide (histidine-decarboxylase inhibitor) on germinating *Pisum sativum* are studied in order to find any possible correlation between histamine metabolism and plant growth. It is known that germinating peas are rich in diamine-oxidase.

Aminoguanidine strongly stimulated the growth of pea seedlings when its concentration in the bathing liquid was about 10^{-4} M. At higher level (10^{-3} M) an increase followed by a delay in the rate of growth was observed. The highest concentration tested (10^{-2} M) showed up its great toxicity. The histamine content in plants treated with aminoguanidine is higher than the content in control plants.

Semicarbazide 10^{-4} M, 10^{-3} M and 10^{-2} M inhibited the growth of the pea seedlings, the stronger the concentration the bigger the effect. The histamine content of plants treated with the smaller concentrations showed no significant difference with controls.

These facts are compared with former data gathered by us for wheat seedlings, and with those quoted by other workers.

La dinámica de la histamina en los vegetales no ha sido tan ampliamente estudiada como en los animales, y el papel de esta sustancia en los procesos fisiológicos de las plantas apenas ha despertado el interés de los investigadores (7). WERLE y RAUB (10) demostraron que se forma histamina por descarboxilación de la histidina en las plántulas de espinaca, hecho que fue posteriormente confirmado por HAARTMANN *et al.* (5). Las semillas de trigo, que carecen de histamina, la forman durante el proceso de germinación (4).

También el guisante forma histamina al germinar (3). No parece lógico considerar a la histamina como un producto de desecho, puesto que se produce a expensas de un aminoácido durante un período del crecimiento de la planta en el que la síntesis proteica es particularmente intensa.

En cuanto al catabolismo de la histamina, sólo la vía oxidativa ha sido considerada en los vegetales. La presencia de aminoxidasas fue dada a conocer por CROMWELL (2) en la *Atropa belladonna*. WERLE y RAUB (10) encontraron estas en-

zimas muy dispersas en varias familias de plantas, y especialmente en las leguminosas. Posteriormente, WERLE y PECHMANN (9) llegaron a la conclusión de que la aminoxidasa extraída por ellos de las plantas superiores podía estar estrechamente relacionada con la diaminoxidasa de los tejidos animales, pues se muestra activa frente al 1,4-diaminobutano, al 1,5-diaminopentano y a la histamina. Esta correspondencia fue reforzada por las investigaciones de KENTEN y MANN (8), quienes trabajaron con extractos de plántulas de *Pisum sativum* y vieron que catalizaban la oxidación de las diaminas alifáticas y las fenilalquilaminas, acción que era inhibida por el cianuro y por la semicarbazida, al igual que la diaminoxidasa animal. Por otra parte, WERLE y ROEWER (11) encontraron diversas monoaminoxidases vegetales que, como la monoaminoxidasa animal, no son inhibidas por el cianuro ni por la semicarbazida. Según WERLE y PECHMANN (9), las semillas de guisante no contienen diaminoxidasa preformada, sino que aparece durante la germinación.

En trabajos anteriores se ha tratado de relacionar el desarrollo vegetativo de las plantas con la dinámica de la histamina. En el trigo, la histamina exógena y la aminoguanidina (un inhibidor de la diaminoxidasa) estimulan ligeramente el crecimiento, mientras que la semicarbazida (inhibidor de la histidindescarboxilasa) detiene el desarrollo de la planta (4). Pareció pertinente ampliar estos estudios al guisante, dado que se forma diaminoxidasa durante la germinación, y observamos que también aquí la histamina exógena produce un ligero estímulo del crecimiento (3). El presente trabajo recoge los resultados obtenidos con la aminoguanidina y con la semicarbazida en esta leguminosa.

Material y métodos

Semillas. — *Pisum sativum*, L., var. Freezer 37 (amablemente suministradas

por el Dr. Montoya, del I.N.I.A. de Madrid).

Productos químicos. — Clorhidrato de semicarbazida, Merck. Sulfato de aminoguanidina, BDH.

Imbibición de las semillas. — Se dispusieron lotes de 50 semillas en vasos de precipitado con 100 ml de la solución problema, durante 24 horas a temperatura ambiente. Ambas sustancias se ensayaron por separado a concentraciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} M. Para las pruebas en blanco se procedió de la misma manera, pero con 100 ml de agua destilada.

Mediante un ensayo previo se comprobó que las sustancias disueltas en el agua de imbibición penetran en las semillas, para lo cual se homogeneizaron al final del período de imbibición, después de haber sido bien lavadas, se defecó con subacetato de plomo y se trató el filtrado con reactivo Nessler, que dio reacción positiva.

Germinación. — Las semillas de cada lote fueron distribuidas en 4 cajas Petri de 95 mm de diámetro, provistas de un lecho de papel de filtro, con 20 ml de la solución correspondiente. De este modo, quedaron dispuestos, para cada sustancia, 4 lotes de 4 cajas Petri cada uno, con 15, 12, 10 y 8 semillas para germinar durante 3, 6, 10 y 14 días, respectivamente. Se taparon las cajas y se dejaron en la oscuridad a 21-22° C hasta la aparición del tallo, momento en que se expusieron a la luz difusa. Cuando las plántulas, en su crecimiento, llegaban a tocar la tapadera, se descubrían. El líquido evaporado se reponía con agua destilada según las exigencias.

Desarrollo. — La estimación del desarrollo se hizo: a) por medida de la longitud de las raíces y de los tallos, b) por el peso fresco de los mismos tras ligero lavado y secado en papel de filtro, y c) por determinación del peso seco a partir de

una parte alícuota de los homogenados, que era secada en estufa a 105° C hasta peso constante.

Los homogenados fueron preparados, independientemente, de raíces y de tallos, con agua destilada que contenía 2 mg de aminoguanidina por cada 250 ml a fin de proteger a la histamina presente.

Valoración de la histamina. — Los homogenados eran acidulados y concentrados por evaporación hasta reducir su volumen a 1/5 aproximadamente. Después se neutralizaban y se ensayaban directamente sobre ileon de cobaya aislado, según el método de CODE (1). La sustancia activa fue identificada como histamina, comprobando la anulación de su actividad mediante pequeñas dosis de 2-fenil-becilamina-metil-imidazolina (antistina).

Resultados y discusión

Aminoguanidina. — La solución 10⁻² M de aminoguanidina se mostró muy tóxica; las raíces se desarrollaron con gran lenti-

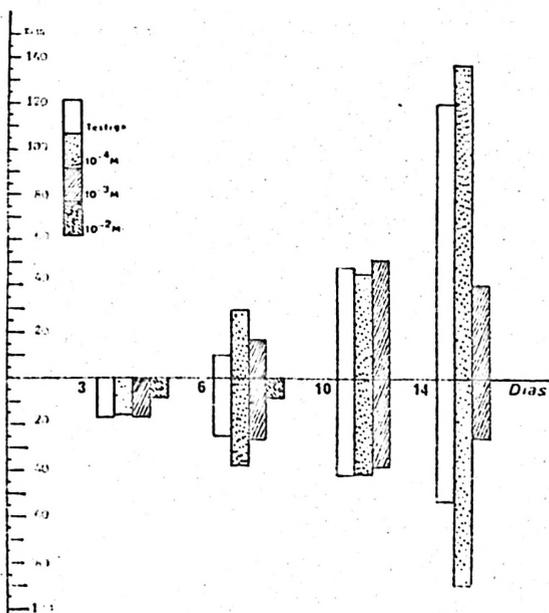


Fig. 1. Longitud media de raíces y tallos de plántulas de guisante. Semillas tratadas con aminoguanidina.

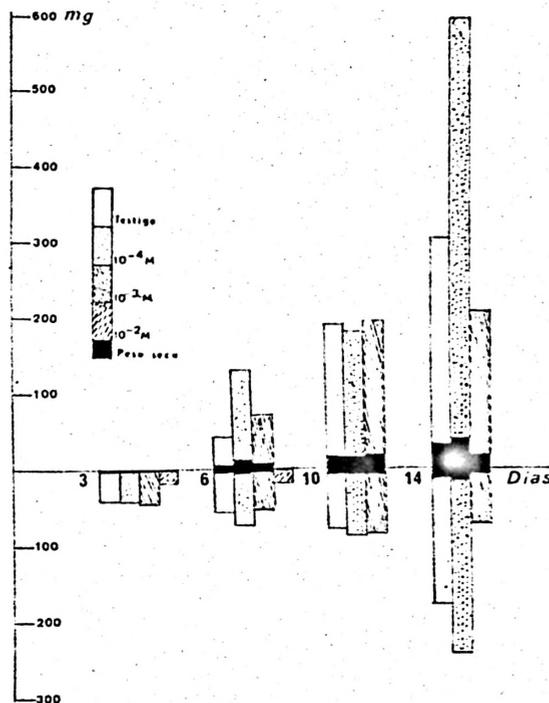


Fig. 2. Peso fresco y peso seco de raíces y tallos de plántulas de guisante. Semillas tratadas con aminoguanidina.

tud hasta los 4 días de la germinación, y las plántulas mueren antes de iniciarse el desarrollo del tallo. La solución 10⁻³ M resultó ser ligeramente estimulante durante los 10 primeros días, pero después se detiene el crecimiento y se necrosan las raíces. La solución 10⁻⁴ M produce un fuerte estímulo del desarrollo durante prácticamente todo el período de observación (figs. 1 y 2).

Trabajando con una metodología diferente, y con un período de observación más corto, se había observado ya que la aminoguanidina 10⁻⁴ M ejerce un efecto estimulante ligero sobre el desarrollo de las plántulas de trigo (4). El resultado actual, con semillas de guisante, es mucho más demostrativo, y se hace más patente con el transcurso del tiempo. También aquí aparece con mayor claridad la acción inhibidora a largo plazo de la aminoguanidina.

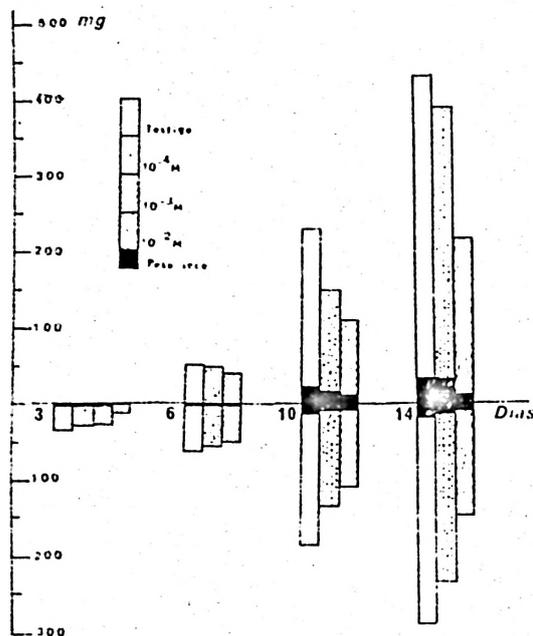


Fig. 3. *Peso fresco y peso seco de raíces y tallos de plántulas de guisante. Semillas tratadas con semicarbazida.*

dina 10^{-3} M, si bien resulta estimulante al principio.

Parece haber una concentración crítica de aminoguanidina para el estímulo del desarrollo, que podría resultar del compromiso entre su capacidad protectora de la histamina que se forma y su toxicidad general.

El contenido en histamina de las raíces, a los 3 días de la germinación, fue superior en las plántulas tratadas con aminoguanidina que en los testigos, como era de esperar. Las cifras halladas fueron del orden de $4,8 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ en la experimental 10^{-2} M; $3,4 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ en la 10^{-3} M y $2,8 \mu\text{g}/100 \text{ mg}$ en el testigo. También los tallos de las plántulas experimentales contienen mayor cantidad de histamina que los testigos, a los 10 días de la germinación.

Semicarbazida. — Las tres dosis de semicarbazida ensayadas actuaron como in-

hibidores del desarrollo de las plántulas de guisante, y este efecto fue tanto mayor cuanto mayor era la concentración de la sustancia (fig. 3). La solución 10^{-2} M se mostró tan tóxica que, a los 3 días, las raíces apenas habían alcanzado una longitud mitad que las del testigo, y el crecimiento se paralizó en esta situación. La inhibición provocada por las soluciones 10^{-3} M y 10^{-4} M afecta por igual a las raíces y a las partes aéreas, y persiste durante los 14 días que duró el experimento, aunque con la dosis menor se aprecia una tendencia a la normalización del crecimiento al final del ensayo.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por nosotros para las semillas de trigo (4), y con los publicados por KAHLSON y ROSENGREN (6) referentes a la germinación del guisante. Trabajando con semillas de espinaca, HAARTMANN *et al.* (5) encuentran que la α -metilhistidina, inhibidor específico de la histidind Descarboxilasa, también retrasa el desarrollo de las plántulas.

Dado el carácter inhibitorio de la semicarbazida sobre la histidind Descarboxilasa, parecía lógico esperar que las plantas tratadas tuvieran niveles de histamina más bajos que las testigo. Esto ocurrió solamente con la concentración 10^{-2} M en las raíces, al tercer día del ensayo, coincidiendo con la detención del crecimiento. En todos los demás casos, las concentraciones de histamina en las plantas experimentales y en los testigos no eran significativamente diferentes. La explicación de este hecho podría encontrarse teniendo en cuenta que la semicarbazida también inhibe las diaminoxidasas, y que se desconoce la distribución de la sustancia en los tejidos de la planta en crecimiento y, por tanto, su concentración local.

Conclusiones

La aminoguanidina, inhibidor de la diaminoxidasa, estimula la germinación de las

semillas de guisante a concentraciones de 10^{-4} M. Las soluciones más concentradas retardan el crecimiento o se muestran muy tóxicas.

El contenido en histamina de las plántulas tratadas con aminoguanidina es superior al de las normales.

La semicarbazida, inhibidor de la histidindescarboxilasa, retrasa el desarrollo de las plántulas de guisante, y este efecto es proporcional a la dosis. La solución 10^{-2} M resulta fuertemente tóxica.

Las plántulas tratadas con semicarbazida tienen un nivel de histamina similar al de los controles, excepto en el caso de concentraciones tóxicas, en que era mucho menor.

Resumen

Se estudia la influencia de la aminoguanidina (inhibidor de la diamino-oxidasa) y de la semicarbazida (inhibidor de la histidin-descarboxilasa) sobre la germinación del *Pisum sativum*, tratando de relacionar la dinámica de la histamina en los vegetales con el desarrollo vegetativo. Es sabido que el guisante forma considerables cantidades de diaminoxidasa en la germinación.

La aminoguanidina 10^{-4} M produce un fuerte estímulo del desarrollo. La solución 10^{-3} M estimula primero y retarda después el crecimiento de las plántulas. A concentraciones de 10^{-2} M se muestra muy tóxica. El contenido en histamina de las plantas tratadas con aminoguanidina es superior al normal.

La semicarbazida 10^{-4} M, 10^{-3} M y 10^{-2} M inhibe el desarrollo de las plántulas de guisante, siendo este efecto tanto mayor cuanto mayor es la dosis. El contenido de histamina de las plantas tratadas con las dosis menores no experimenta cambios significativos.

Se comparan estos resultados con los hallados previamente en la germinación del trigo y con los publicados por otros autores.

Bibliografía

1. CODE, C. F.: *J. Physiol.*, **89**, 257, 1937.
2. CROMWELL, B. T.: *Biochem. J.*, **37**, 722, 1943.
3. FRAILE, A. y GONZÁLEZ-ALONSO, M.: *Phyton.*, **29**, 12, 1972.
4. FRAILE, A. y SERRANO, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, **23**, 51, 1967.
5. HAARTMANN, U., KAHLSON, G. y STEINHARDT, C.: *Life Sci.*, **5**, 1, 1966.
6. KAHLSON, G. y ROSENGREN, E.: *J. Physiol.*, **154**, 2, 1960.
7. KAHLSON, G. y ROSENGREN, E.: Histamine Metabolism in germinating seeds. En «Biogenesis and Physiology of Histamine». Edward Arnold Ltd., Londres, 1971, 210-214 pp.
8. KENTEN, R. H. y MANN, P. J. G.: *Biochem. J.*, **50**, 360, 1952.
9. WERLE, E. y PECHMANN, E.: *Justus Liebig's annln. Chem.*, **562**, 44, 1949.
10. WERLE, E. y RAUB, A.: *Biochem. Z.*, **318**, 538, 1948.
11. WERLE, E. y ROEWER, F.: *Biochem. Z.*, **320**, 298, 1950.

