

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Biología Vegetal I



**ASPECTOS DEL METABOLISMO Y TRANSPORTE DE POLIAMINAS EN
EVERNIA PRUNASTRI (L.) ACH.**

María Isabel Escribano Garaizábal

Madrid, 1990

Maria Isabel Escribano Garaizabal

ASPECTOS DEL METABOLISMO Y TRANSPORTE DE POLIAMINAS EN
EVERNIA PRUNASTRI (L.) ACH.

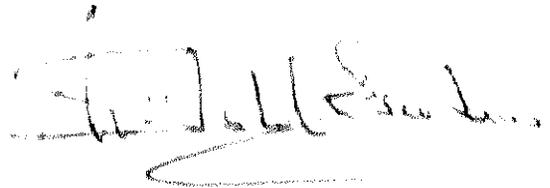
Directora: Prof. Dra. Dña. Maria Estrella Legaz González
Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad
de Ciencias Biológicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Biología Vegetal I

1990

Trabajo realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, que presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Madrid, noviembre de 1990



Fdo.: María Isabel Escribano Garaizabal

Conforme, la directora de la Tesis



Fdo.: Prof. María Estrella Legaz González

Poco después de que muriera el rabino Mokshe, preguntó a uno de los discípulos de éste al rabino Mendel de Kotyk: «¿Que era a lo que tu maestro concedía mayor importancia?»

El discípulo, tras reflexionar durante unos momentos, respondió: «A lo que estuviera haciendo en ese momento».

(A. de Mello)

*A mi familia y a Antonio,
por su constante apoyo,
paciencia y comprensión.*

Al dar por terminada esta Memoria de Doctorado debo recordar a todos aquellos que contribuyeron directa o indirectamente a su realización.

Deseo agradecer especialmente a la Dra. Maria Estrella Legaz González, Prof. Titular de Fisiología Vegetal, la oportunidad brindada para la realización de esta Memoria de Doctorado y la introducción a tan apasionante tema, su dedicación, sus enseñanzas y su inapreciable orientación. Deseo que en esta Memoria se hallan visto cumplidas las ilusiones y objetivos iniciales y que este periodo haya sido tan enriquecedor como a mí.

Quiero agradecer al Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba, Catedrático de Fisiología Vegetal, la interesante discusión aportada en la presente Memoria. Hago extensible mi agradecimiento al resto de los Profesores y al personal de la Cátedra.

El estudio sobre el transporte de poliaminas ha sido llevado a cabo en colaboración con los Departamentos de Patología Animal I y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, agradeciendo su acogida y cooperación. En especial, agradezco al Dr. Rafael Balaña Fouce, Prof. Titular de Toxicología, la valiosa ayuda prestada, su orientación en los trabajos sobre el transporte de poliaminas con material radiactivo y sobre todo su apoyo moral y demostrada amistad.

Quiero recordar a todos aquellos compañeros que he tenido la gran suerte de conocer y trabajar estrechamente a lo largo de estos años; gracias por vuestro compañerismo, por los ratos de discusión sobre el tema, por los ánimos en las épocas difíciles y por los gratos recuerdos que me habéis proporcionado.

Por último, y no por ello menos importante, deseo también llevar mi gratitud a todas aquellas personas que me han brindado gran parte de su tiempo y me han ofrecido su esfuerzo.

ABREVIATURAS

AAH	agmatina amidino hidrolasa
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADC	arginina descarboxilasa
AIH	agmatina imino hidrolasa
AMO 1618	carboxilato de 2'-isopropil-4'-cloruro de trimetilamonio-5' metilpiperidina
AMPc	adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
ARNasa	ribonucleasa
ClDns	cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo)
ClTs	cloruro de p-toluensulfonilo
2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
DAO	diamino oxidasa
DCHA	diciclohexilamina
DFMA	DL- α -difluorometilarginina
DFMO	DL- α -difluorometilornitina
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol
DO	densidad óptica
%c	eficacia del conteo
FR	luz rojo lejano
GABA	ácido γ -aminobutírico
HPLC	high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
MGBG	metil-glioxal-bis-guanilhidrazona
Mr	masa molecular
ODC	ornitina descarboxilasa
PALP	piridoxal-5'-fosfato
PAO	poliamino oxidasa
paraquat	N-N'-dimetil-4-4'-bipiridilium
R	luz roja
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
TCA	ácido tricloroacético

TLC	thin layer chromatography (cromatografía en capa fina)
Tris	tris-hidroximetil-aminometano
UAFE	unidades de absorbancia a fondo de escala
UV	luz ultravioleta

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I.1. DEFINICION DE POLIAMINAS	1
I.2. METABOLISMO DE POLIAMINAS	4
I.2.1. Biosíntesis	4
I.2.2. Inhibidores de la biosíntesis	13
I.2.3. Catabolismo	19
I.2.4. Metabolismo secundario	22
I.2.5. Compartimentación subcelular	27
I.3. TRANSPORTE DE POLIAMINAS	29
I.3.1. Transporte celular	29
I.3.2. Translocación	32
I.4. FUNCION MOLECULAR DE LAS POLIAMINAS	34
I.5. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LAS POLIAMINAS....	41
I.5.1. En el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación	41
I.5.2. En la senescencia y el envejecimiento ...	50
I.5.3. En las condiciones de tensión	53
I.6. RELACION ENTRE LAS HORMONAS VEGETALES, LAS POLIAMINAS Y LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN SU SÍNTESIS	59
I.7. RELACION ENTRE FITOCROMO Y POLIAMINAS	67
I.8. POLIAMINAS EN LIQUENES	70
I.8.1. Antecedentes	70
I.8.2. Catabolismo de L-arginina dirigido hacia síntesis de poliaminas en <i>Evernia prunastri</i>	71
I.8.3. Localización celular de las enzimas de síntesis de putrescina en <i>Evernia prunastri</i>	75
I.9. MOVILIZACIÓN DE NUTRIENTES ENTRE SIMBIOTES LIQUENICOS	77
I.10. RELACION ENTRE EL LIQUEN Y SU SUSTRATO	81
I.11. SIMBIOSIS LIQUENICA	83
II. MATERIAL Y METODOS	88
II.1. MATERIAL BIOLÓGICO	89

II.2. VALORACION DEL PESO SECO	89
II.3. ESTIMACION DEL CONTENIDO EN AGUA	89
II.4. CONDICIONES DE INCUBACION	89
II.5. SEPARACION DEL FOTOBIONTE Y EL MICOBIONTE	90
II.6. VALORACION DEL CONTENIDO DE ARN	91
II.7. VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS	92
II.7.1. Actividad Ribonucleasa	92
II.7.2. Actividad Diamino oxidasa	96
II.8. VALORACION DE PROTEINAS	97
II.9. VALORACION DE PUTRESCINA LIBRE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA (UV) ...	97
II.9.1. Extracción de putrescina	97
II.9.2. Derivatización de putrescina (tosilación)	98
II.9.3. Separación y cuantificación de putrescina	99
II.10. VALORACION DE POLIAMINAS LIBRES Y CONJUGADAS POR HPLC Y DETECCION POR FLUORESCENCIA	100
II.10.1. Extracción de poliaminas libres y conjugadas	100
II.10.2. Derivatización de poliaminas (dansilación)	101
II.10.3. Separación y cuantificación de poliaminas	103
II.11. TRANSPORTE Y ADSORCION DE PUTRESCINA	105
II.11.1. Tratamiento de las muestras	105
II.11.2. Medida del transporte y la adsorción ..	106
II.11.3. Medida del transporte y la adsorción de putrescina en función del pH	107
II.11.4. Determinación de las constantes cinéticas del transporte	107
II.11.4.1. Estimación de la K_s y V_{max}	107
II.11.4.2. Estimación de la concentración I_{50} y K_i	108
II.11.5. Transformación de putrescina	109
II.11.6. Fraccionamiento celular	110
II.12. ANALISIS ESTADISTICO Y PROCESO DE DATOS	113
III. RESULTADOS	114

III.1.	EFFECTO FISIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE PUTRESCINA	115
III.1.1.	Sobre el peso seco	115
III.1.2.	Sobre el contenido y la secreción de proteínas	118
III.1.3.	Sobre el contenido de ARN y la actividad ARNasa	118
III.2.	CAPTACION DE PUTRESCINA LIBRE POR EL TALO LIQUÉNICO.....	125
III.2.1.	Identificación y cuantificación de putrescina	125
III.2.2.	Captación de putrescina dependiente del pH extracelular	128
III.2.3.	Catabolismo de putrescina	132
III.3.	DETERMINACION DE POLIAMINAS LIBRES Y CONJUGADAS.....	135
III.3.1.	Identificación y cuantificación de poliaminas libres y conjugadas	135
III.3.2.	Captación de putrescina por el fotobionte a pH alcalino	136
III.3.3.	Producción de diferentes formas de poliaminas dependientes del pH extracelular	145
III.4.	TRANSPORTE Y ADSORCION DE PUTRESCINA	161
III.4.1.	Transporte y adsorción en función del peso seco del talo	168
III.4.2.	Transporte y adsorción en función del tiempo de incubación	168
III.4.3.	Transporte y adsorción en función del pH extracelular	173
III.4.4.	Transporte y adsorción en función de la temperatura	182
III.4.5.	Efecto de inhibidores metabólicos	182
III.4.6.	Cinética del transporte	186
III.4.6.1.	K_m y V_{max}	186
III.4.6.2.	I_{50} para espermidina y espermina.	189
III.4.6.3.	K_i de espermidina y espermina. Transporte de espermina	193
III.4.7.	Estimación de la concentración de poliaminas endógenas	204
III.4.8.	Efectores del transporte y la adsorción.	207
III.4.8.1.	Análogos estructurales y aminoácidos	207
III.4.8.2.	Cationes	212
III.4.8.3.	Fenoles liquénicos	212
III.4.9.	Estudio de la transformación de putrescina	217
III.4.10.	Localización celular de putrescina	220

III.4.11. Captación de putrescina por el fotobionte y el micobionte	222
IV. DISCUSION	224
V. CONCLUSIONES	248
VI BIBLIOGRAFIA	251

I. - INTRODUCCION

1.1.- DEFINICION DE POLIAMINAS

Con el nombre genérico de poliaminas se conoce un grupo de compuestos cuyas características comunes son: poseer una estructura simple alifática de bajo peso molecular y estar dotados de grupos amino que se encuentran protonados a pH fisiológico (Morris y Harada, 1980), actuando, por tanto, como "policationes orgánicas".

Las poliaminas son sustancias ubicuas, sintetizadas tanto por organismos procariotas como eucariotas (Smith, 1982). Las más comunes son: putrescina, espermidina y espermina. Aunque están presentes en todos los materiales biológicos estudiados, su cantidad relativa difiere. En general, los organismos procariotas contienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y falta la espermina. En los eucariotas, normalmente, se hallan bajas concentraciones de putrescina y contienen espermidina y espermina (Tabor y Tabor, 1976).

Estas moléculas han sido rigurosamente conservada a través de la evolución, lo que les confiere una función celular esencial.

A continuación se detalla la estructura de las poliaminas más comunes (tomado de Smith, 1985c):

1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	- plantas superiores, algas
putrescina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$	- ubicua
cadaverina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$	- leguminosas, algas
espermidina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$	- ubicua
espermina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	- ubicua
agmatina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\underset{\text{NH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$	- ubicua

Fue Antonie van Leeuwenhoek, en 1677, el primero en observar cristales de una poliamina en semen humano. Pero hasta tres siglos más tarde, no fueron identificados estos cristales como una base orgánica fosfatada, a la que se le dió el nombre de "espermina", siendo elucidada su estructura por Dudley, Rosenheim y Staling en 1926 (Tabor y Tabor, 1976). A pesar de su identificación, hasta el año 1948 no se estableció la importancia de estas sustancias. Fue entonces cuando Herbest y Snell observaron que el jugo de naranja contenía un factor (putrescina), que era esencial para el crecimiento de *Haemophilus parainfluenzae* Riv.

A raíz de aquellos resultados se han llevado a cabo numerosas investigaciones, indicando una estrecha relación entre la concentración de poliaminas y los distintos estados de crecimiento. Los primeros estudios fueron realizados con animales y microorganismos, pero ya en el año 1966 Bagni demostró que estas sustancias estimulan el crecimiento de explantos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. en estado de letargo.

Los estudios desarrollados en los últimos años indican que las poliaminas ejercen un papel regulador fundamental en el crecimiento y el desarrollo vegetal: se observa relación entre altos niveles de putrescina y espermidina con el activo crecimiento de células en división de tumores (Speranza y Bagni, 1977), así como en los procesos de diferenciación de células embrionarias de *Daucus carota* L. (Montagne et al., 1979) en los que no sólo aumentan los niveles de putrescina, sino también la actividad de sus enzimas de biosíntesis.

Las poliaminas ejercen un importante papel regulador en células y tejidos sometidos a condiciones de tensión, tales como: senescencia, salinidad, tensión hídrica, pH...; retrasan la pérdida de clorofilas y previenen el aumento de la actividad ribonucleasa (ARNasa) y proteasa en hojas cortadas a determinadas plantas (Kaur-Sawhney y Galston, 1979).

Las poliaminas interaccionan de forma directa o indirecta con los procesos de replicación, transcripción y traducción, estimulando la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

Su ubicua distribución en diferentes organismos vegetales, órganos y orgánulos celulares, así como su rápida síntesis en células proliferantes, refuerza su importancia como sustancias clave en el crecimiento vegetal, con un amplio rango de actuación.

Su mecanismo de acción está relacionado con su carácter policationico, permitiéndoles uniones a ácidos nucleicos y a componentes aniónicos de las membranas, regulando, así, la actividad y síntesis de ácidos nucleicos, en el primer caso, y estabilizando las funciones propias de las membranas en el segundo caso. Los niveles de poliaminas pueden ser regulados a través del control de su síntesis y mediante su oxidación, acetilación o conjugación. No obstante, su específica función molecular *in vivo* aún nos es desconocida.

1.2.- METABOLISMO DE POLIAMINAS

1.2.1.- Biosíntesis

Las poliaminas putrescina, espermidina, espermina y agmatina proceden de tres aminoácidos: L-arginina y L-ornitina proporcionan la mayor parte del esqueleto carbonado, mientras que L-metionina aporta grupos "aminopropilo" a la putrescina, para formar sucesivamente espermidina y espermina. La cadaverina resulta de la descarboxilación de L-lisina (por la enzima lisina descarboxilasa EC 4.1.1.18) a través de una ruta metabólica independiente (Fig. 1).

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de poliaminas se llevaron a cabo en animales, microorganismos y hongos, estableciéndose que procedían del aminoácido L-ornitina

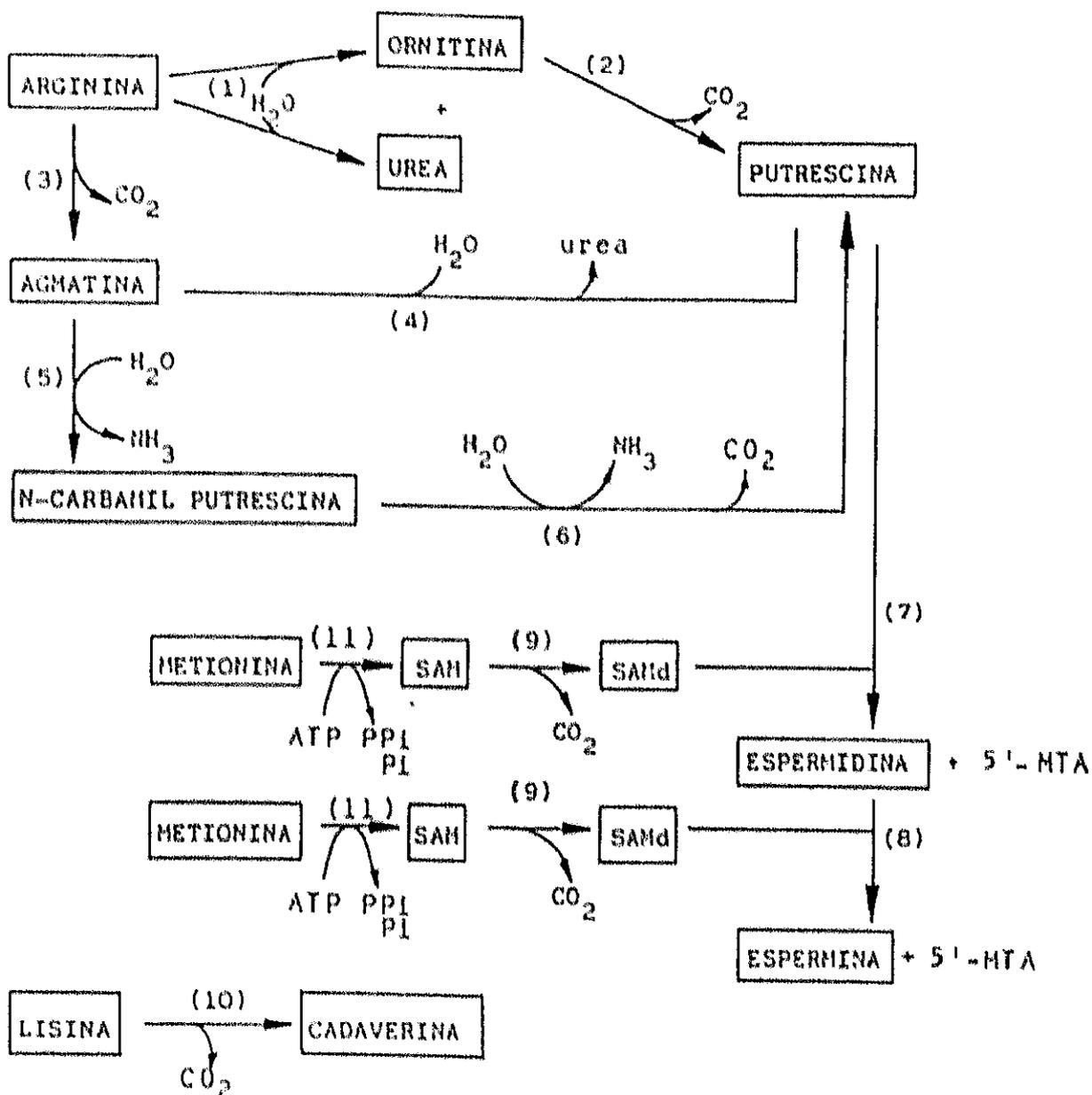


FIGURA 1.- Ruta de biosíntesis de poliaminas:

- (1)- arginasas
- (2)- ornitina descarboxilasa
- (3)- arginina descarboxilasa
- (4)- agmatina amidinohidrolasa
- (5)- agmatina iminohidrolasa
- (6)- N-carbamilputrescina amidohidrolasa
- (7)- espermidina sintasa
- (8)- espermina sintasa
- (9)- S-adenosilmetionina descarboxilasa
- (10)- lisina descarboxilasa
- (11)- metionina sintasa

por descarboxilación, mediante la acción de una ornitina descarboxilasa EC 4.1.1.17 (ODC). Posteriormente, cuando dicho estudio se centró en plantas y bacterias, se determinó que la biosíntesis de poliaminas era más complicada al existir dos rutas constitutivas y alternativas que rindían putrescina. Esta diamina puede ser sintetizada directamente por descarboxilación de L-ornitina, mediante una ODC o indirectamente a través de una serie de intermediarios posteriores a la descarboxilación de L-arginina.

La descarboxilación de L-arginina produce agmatina, reacción que es catalizada por una enzima dependiente de piridoxal-5'-fosfato (PALP), la L-arginina descarboxilasa EC 4.1.1.19 (ADC). La agmatina es hidrolizada a N-carbamilputrescina, por acción de una agmatina iminohidrolasa EC 3.5.3.12 (AIH). Este producto puede ser metabolizado a CO₂ y amonio por una N-carbamilputrescina amidohidrolasa, rindiendo directamente putrescina.

En *Lathyrus sativus* L. (Srivenugopal y Adiga, 1981) se ha descrito la existencia de un mecanismo alternativo para la síntesis de putrescina, llevado a cabo por una enzima multifuncional llamada putrescina sintasa (Fig. 2), que contiene las actividades: AIH, putrescina transcarbamilasa (A) y ornitina transcarbamilasa (B).

agmatina -----> N-carbamilputrescina

(A)
N-carbamilputrescina + P_i ----> putrescina + fosfato de carbamilo

(B)
fosfato de carbamilo + ornitina -----> citrulina + P_i

Siendo el esquema de la reacción completa el siguiente:

P_i
agmatina + ornitina + H₂O -----> putrescina + citrulina + NH₃

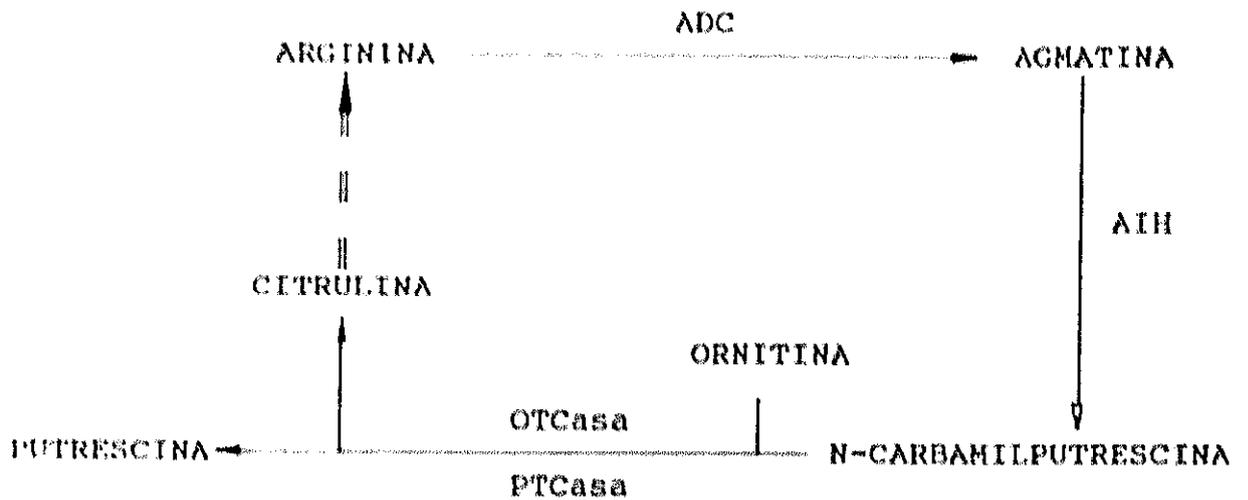


FIGURA 2.- Sistema multienzimático: Putrescina sintasa (Adiga y Prasad, 1985)

ADC- arginina descarboxilasa
 AIH- agmatina inimohidrolasa
 OTCasa- ornitina transcarbamilasa
 PTCasa- putrescina transcarbamilasa

En bacterias, la putrescina se sintetiza vía ODC y ADC. En esta última ruta, la diamina procede directamente de la agmatina por la actividad de la enzima agmatina amidinohidrolasa EC 3.5.3.11 (AAH) (Tabor y Tabor, 1976).

Como se ha comentado, las poliaminas espermidina y espermina son sintetizadas a partir de putrescina por adición de sucesivos grupos "aminopropilo", procedentes de una molécula de S-adenosilmetionina descarboxilada. Esta procede de L-metionina, por acción de una S-adenosilmetionina sintasa y una S-adenosilmetionina descarboxilasa EC 4.1.1.50 (SAMDC).

La adición de los grupos aminopropilos es catalizada por dos enzimas aminopropiltransferasas, llamadas espermidina y espermina sintasa (EC 2.5.1.16, EC 2.5.1.22, respectivamente).

A partir de los primeros estudios, se han realizado significativos avances en la comprensión de este proceso con la purificación y caracterización de gran parte de las principales enzimas de la biosíntesis de poliaminas en plantas. En la revisión publicada por Smith en 1985a se discute ampliamente este tema.

Las enzimas claves en la biosíntesis de poliaminas son: ADC, ODC y SAMDC. Están presentes en bajas cantidades y su actividad está estrechamente regulada por determinadas hormonas y otros estímulos; poseen, además, una corta vida media, lo que supone bajos niveles de la enzima en la célula, estado idóneo para poder responder rápidamente alterando los niveles de poliaminas, después de la aplicación de un determinado estímulo. La actividad del resto de las enzimas depende exclusivamente de la disponibilidad de su sustrato.

Se han realizado numerosos estudios a fin de esclarecer el mecanismo de regulación de la actividad ODC, siendo las propias poliaminas los efectores de la enzima. Así, en *Neurospora crassa* Shear y Dodge (Davis, 1985) la diamina putrescina promueve la inactivación de la enzima, mientras que

la espermidina bloquea la formación de la enzima (posiblemente a nivel transcripcional). En *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, cuando los medios de cultivo son suplementados con espermidina y espermina, se pierde totalmente la actividad ODC, sin destrucción de la enzima ni cambio en su peso molecular; todo ello parece implicar una modificación post-transduccional, aún desconocida, que anula totalmente la actividad enzimática, en presencia de estas aminas, no existiendo evidencias de una unión covalente de éstas a la proteína enzimática (Tabor et al., 1983). Cuando *Physarum polycephalum* Schw. se desarrolla en un medio conteniendo aminas, decrece la actividad ODC. Debido a una modificación post-traducción de la proteína, según la cual la enzima cambia de la forma "A", con una baja K_m para PALP, a la forma "B", que presenta un alto valor de K_m requiriendo altas concentraciones de cofactor que no son fisiológicas. Esta pérdida de actividad es inducida por el crecimiento, en presencia de espermidina y espermina, por inhibición de la síntesis proteica o por alta osmolaridad del medio de crecimiento (Mitchell y Wilson, 1983).

En células de mamíferos y en *Escherichia coli* (Mig.) Cast., Chal., la ODC puede ser inhibida no competitivamente, a través de un control post-transcripcional, por proteínas llamadas "antienzimas" (poseen una alta afinidad por la enzima y su unión es no covalente). Estas son inducidas por di- y poliaminas, e incluso se ha descrito una proteína llamada "anti-antienzima", la cual se une específicamente al antienzima del complejo antienzima-ODC y libera esta enzima activa (Canellakis et al., 1985).

La primera demostración sobre la existencia de proteínas inhibitoras y activadoras de la enzima ODC en plantas, fue descrita en semillas en germinación de *Hordeum vulgare* L. Estas proteínas fueron purificadas y presentan un M_r de 16.000 y 6.000 Da, respectivamente. El antienzima forma un complejo muy estable, siendo disociado en tratamientos con

sulfato de amonio al 10%. El complejo está presente en el citosol y en la cromatina, siendo extraído de ésta con cloruro sódico 2,0 M. Estudiando su forma de interacción se demostró que la adición del activador a la ODC o al complejo enzima-antienzima, activa la ODC de igual forma, mientras que no es efectiva la adición del antienzima a la ODC ya activada (Kyriakidis, 1983).

Un hecho a destacar es la existencia, en plantas, de dos rutas constitutivas y alternativas, que conducen a la síntesis de putrescina, a partir de los aminoácidos L-arginina y L-ornitina. En un principio se pensó que la ruta mayoritaria era vía ADC. Sin embargo, estudios posteriores confirman que ambas enzimas, ADC y ODC, son activas en tejidos vegetales.

Estas dos rutas están a su vez relacionadas, ya que los dos aminoácidos son interconvertibles; no solo la L-arginina es convertida a L-ornitina, con liberación hidrolítica de urea por la enzima arginasa EC 3.5.3.1, sino que a su vez la L-ornitina puede ser metabolizada de nuevo a L-arginina, al ser carbamylada para formar sucesivamente citrulina y L-arginina, a través del ciclo de la urea o de Krebs y Henseleit (Fig. 3) (Schuber y Lambert, 1974; Bagni, 1986). Incluso se ha sugerido otra vía de síntesis de putrescina: por la enzima citrulina descarboxilasa, que es la que cataliza la formación de N-carbamylputrescina a partir de citrulina (Fig. 4) (Crocomo y Basso, 1974; Slocum et al., 1984).

Numerosos trabajos han sido realizados a fin de establecer la importancia de cada una de las rutas metabólicas en la biosíntesis de putrescina. La razón ADC/ ODC varía considerablemente de acuerdo con la especie, el tejido y el estado fisiológico en que se hallen. En plantas de *Vigna radiata* L., son simultáneas ambas descarboxilasas, pero su actividad depende del tejido, así, la actividad ADC es alta en raíces, mientras que la actividad ODC aumenta en respuesta a diferentes estímulos, tales como la escisión (Altman et al., 1982).

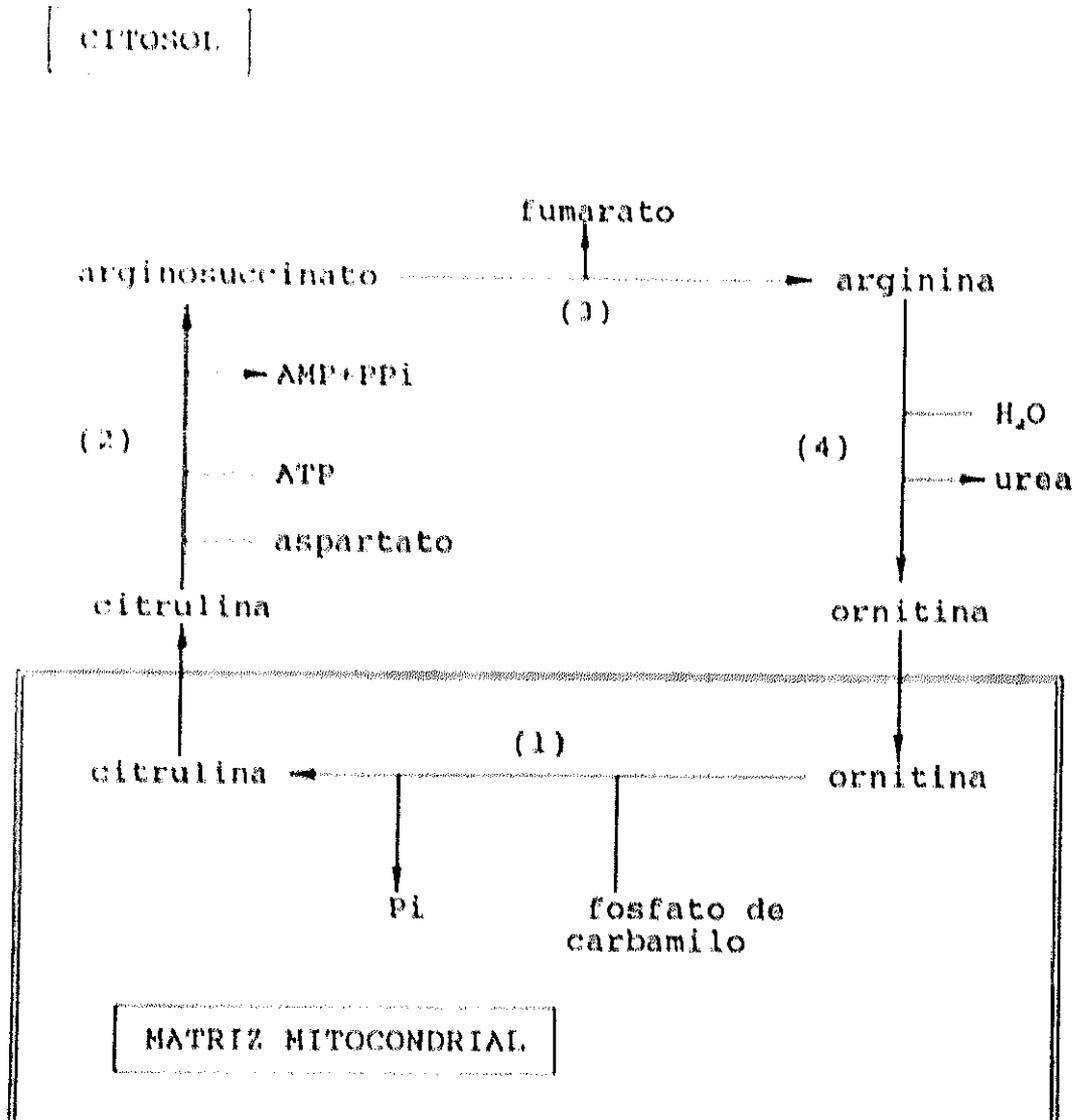


FIGURA 1.- Ciclo de la urea (Slocum et al., 1984)

- (1)- ornitina transcarbamilasa
- (2)- arginosuccinato sintasa
- (3)- arginosuccinato liasa
- (4)- arginasa

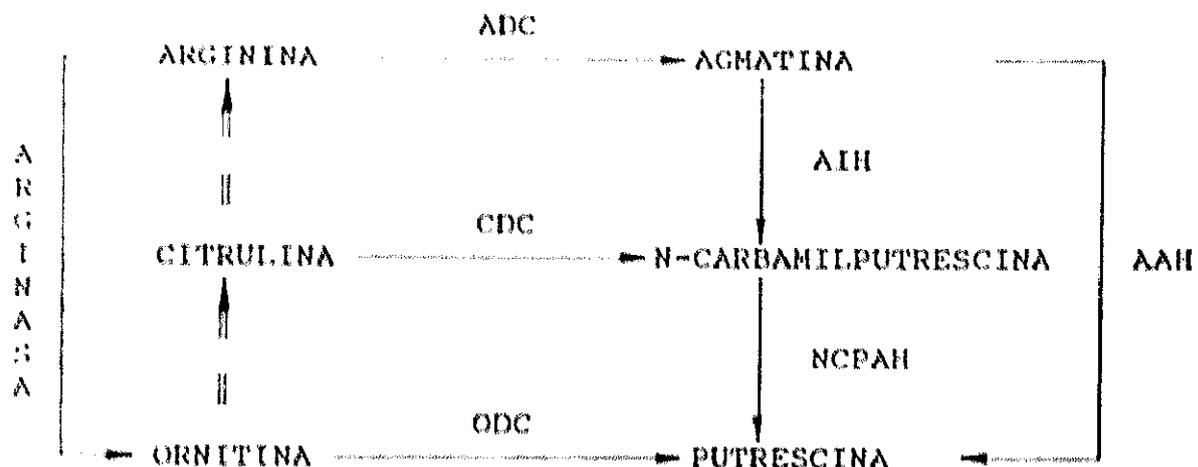


FIGURA 4.- Citrulina descarboxilasa: biosíntesis de putrescina en plantas (Bagni, 1986):

ADC- arginina descarboxilasa
 AIH- agmatina iminohidrolasa
 NCPAH- N-carbamilputrescina amidohidrolasa
 ODC- ornitina descarboxilasa
 CDC- citrulina descarboxilasa
 AAH- agmatina amidinohidrolasa

En general, y hasta el presente, existen evidencias de que en tejidos en crecimiento sin división, tales como la expansión foliar de hojas de *H. vulgare*, la ADC parece ser la principal enzima reguladora de los niveles de poliaminas (Smith, 1981). Esta enzima, a su vez, es inducida por varios tipos de tensión (especialmente por deficiencia en K⁺, bajos valores de pH y tensión osmótica), por hormonas vegetales y por la luz (absorbida por el pigmento fitocromo) en tejidos diferenciados (Galston et al., 1983).

Durante el estado de rápido crecimiento celular, con alta velocidad de división celular, principalmente en tejidos meristemáticos o reproductores, la biosíntesis de poliaminas tiende a estar relacionada con cambios en la actividad ODC (Cohen et al., 1982).

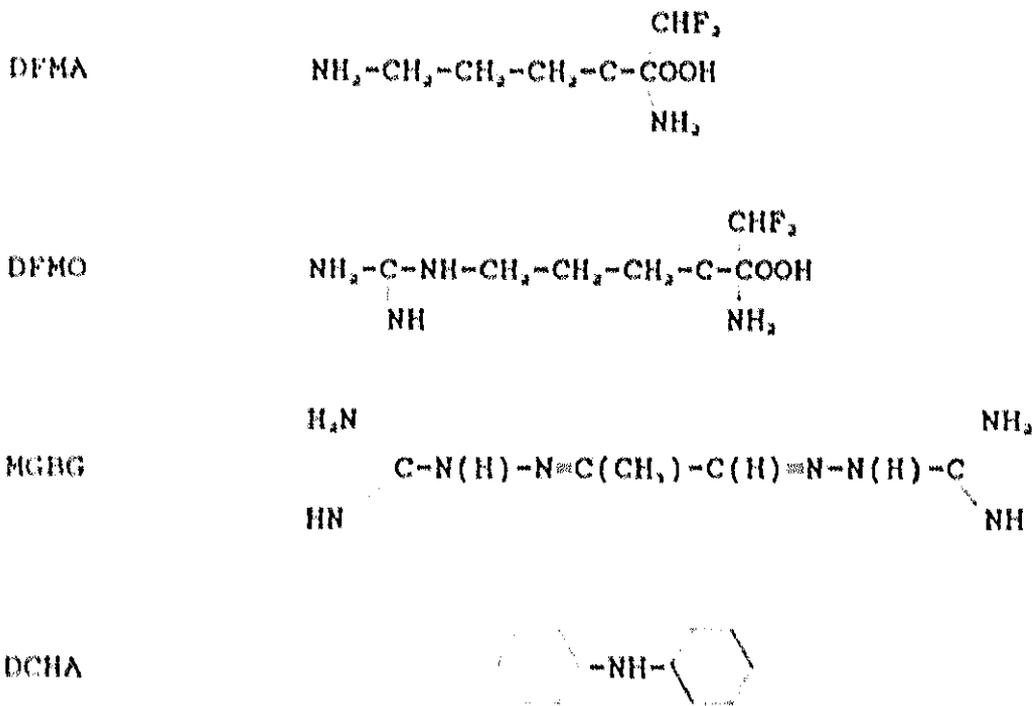
Ambas rutas biosintéticas alternativas, pueden significar un mecanismo de "compensación" para mantener constantes o controlar los niveles de putrescina (y poliaminas) y sus efectos en plantas. La regulación de las actividades ADC y ODC es esencial para la selección de cada una de las rutas metabólicas, pudiendo depender de la disponibilidad de sus sustratos, de la interconversión entre L-arginina y L-ornitina, de la activación o concentración de inactivadores específicos, de la diferente compartimentación de cada enzima, de la síntesis de novo o en fin, de la inducción en respuesta a determinados estímulos hormonales y fisiológicos.

I.2.2.- Inhibidores de la biosíntesis

Recientemente se han sintetizado y ensayado un determinado número de compuestos que inhiben específicamente la actividad de los enzimas de la biosíntesis de poliaminas, por unión covalente. Entre ellos, los más utilizados han sido: DL- α -difluorometilarginina (DFMA) inhibidor específico e irreversible de ADC (Kallio et al., 1981),

DL- α -difluorometilornitina (DFMO) inhibidor específico e irreversible de ODC (Metcalf et al., 1978), metil-glioxal-bis-quanilhidrazona (MGBG) inhibidor reversible y no completamente específico de SAMDC (Williams-Ashman y Schenone, 1972) y dicitclohexilamina (DCHA) inhibidor específico de espermidina sintasa (Hibasami et al., 1980), no conociéndose un específico inhibidor de espermina sintasa.

A continuación se muestra la estructura de tales inhibidores:



El papel fundamental de las poliaminas en el crecimiento ha sido constatado gracias a la disponibilidad de mutantes auxotróficos de *E. coli* y *S. cerevisiae* (Tabor y Tabor, 1985).

Dado que en plantas, y hasta la fecha, sólo se ha aislado un mutante con reducida capacidad para la síntesis de

poliaminas (Malmberg, 1979), la vía disponible para el bloqueo de dicha ruta metabólica sería mediante la utilización de inhibidores específicos de sus enzimas biosintéticas. Estos compuestos se están utilizando como potentes herramientas en la investigación sobre la función de las poliaminas en plantas.

En general, la inhibición del crecimiento que producen estos análogos de sustrato, es revertida por la aplicación exógena de poliaminas, probándose la necesidad de dichas sustancias en los procesos de crecimiento y desarrollo.

Los inhibidores DFMA y DFMO han sido empleados en estudios sobre la regulación de la biosíntesis de poliaminas, demostrando que ADC, ODC o ambas son esenciales.

El inhibidor DFMA bloquea *in vitro* la embriogénesis de *D. carota* por inhibición de la actividad ADC, reduciéndose drásticamente los niveles de putrescina y espermidina en la célula. El desarrollo del embrión es restaurado, en cultivos tratados con DFMA, por la adición de putrescina, espermidina o espermina al medio. La adición de putrescina incrementa los niveles intracelulares de espermidina más que los de la diamina, sugiriéndose que la recuperación de los niveles de la triamina, cercanos a los del cultivo control, son los responsables de la restauración de la embriogénesis (Feirer et al., 1984). En cultivos de *D. carota* la adición de DFMO no inhibe el crecimiento, pero sí incrementa el área celular, observándose, así mismo, que el inhibidor se acumula en células tratadas, captando éstas DFMO incluso en contra de gradiente. El inhibidor podría almacenarse en la vacuola, no existiendo pues degradación del mismo en la célula (Mengoli et al., 1987).

Un alargamiento celular anormal ocurre, así mismo, en cultivos en suspensión de células de *Nicotiana tabacum* L. tratadas con DFMO, pero en este caso sí se inhibe la división celular, siendo letal para el cultivo. El tratamiento con DFMA es solamente letal durante la iniciación del crecimiento en el cultivo en suspensión, quizás debido al incremento en la

actividad ADC como respuesta a la tensión (Berlin y Forche, 1981; Hiatt et al., 1986).

La adición *in vivo* de DFMO a tejidos de ovario de *Lycopersicon esculentum* Mill. inhibe la actividad ODC, implicando un significativo descenso en los niveles de poliaminas, así como en peso fresco y en contenido proteico. Como resultado del tratamiento, cesa el crecimiento en los tejidos del ovario. En este órgano, el tratamiento con DFMA produce un efecto similar, pero no como consecuencia de la inhibición de la actividad ADC, sino por inactivación de ODC (Slocum y Galston, 1985b).

El inhibidor DFMA, presenta un alto grado de especificidad y no parece ser metabolizado en plantas, como ocurre con DFMO, excepto en aquellos tejidos que presentan una alta actividad arginasa. Se ha confirmado, gracias a estudios realizados *in vitro*, que dicha enzima cataliza la hidrólisis de DFMA a urea y DFMO, resultando una parcial inactivación de la enzima ODC (Slocum y Galston, 1985a). Dicha reacción ha sido confirmada *in vivo* mediante la adición de DFMA marcado a tejidos de ovario de *N. tabacum*, recuperándose en las células DFMO marcado. Por ello, se cuestiona su especificidad en plantas (Slocum et al., 1988).

Recientemente, se ha desarrollado un grupo de potentes inhibidores, análogos de agmatina, que actúan selectivamente sobre ADC, incluso en células vegetales, conteniendo alta actividad arginasa, ya que la agmatina no parece actuar como sustrato de tal enzima. Dentro de ellos, podría citarse el DL- α -monofluorometilagmatina, que inhibe el 95% de la actividad ADC en extractos foliares de *Avena sativa* L. y *H. vulgare*, a una concentración 0,1 mM (Bitonti et al., 1987). Sin embargo, hasta ahora, no se ha confirmado si actuaría como sustrato de la enzima AIIH.

Uno de los campos en los que más se ha investigado el efecto inhibitor del DFMO, es en el estudio sobre la prevención

de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos. Como ya hemos comentado, en hongos la biosíntesis de putrescina se realiza exclusivamente vía ODC (como en animales). Sin embargo, y dado que en la planta huésped existen dos rutas alternativas para la síntesis de la diamina, se pensó en la posibilidad de inhibir el crecimiento del hongo mediante la aplicación de DFMO, sin que ésto afectara al normal desarrollo de la planta huésped.

Se ha confirmado que el DFMO es un potente inhibidor del crecimiento micelar de hongos fitopatógenos, y que dicha inhibición es revertida por la aplicación exógena de putrescina o espermidina. La inclusión de DFMO entre 0,5 y 2,0 mM en los medios, inhibe significativamente el crecimiento micelar y especialmente la esporulación de *Helminthosporium maydis* Nisik. en oscuridad y tal efecto se incrementa bajo condiciones de luz. La inclusión en los medios, de putrescina 0,25 mM, previene totalmente el efecto inhibitor de DFMO, posiblemente por estar limitada la síntesis de espermidina y espermina. No tiene efecto la adición de cadaverina o Ca^{2+} . La aplicación de DFMA ejerce un efecto inhibitor débil, que no es revertido por la aplicación de putrescina exógena, siendo este efecto inespecífico y no existiendo conversión a DFMO, ya que no se detecta actividad arginasa en el hongo (Birecka et al., 1986).

El crecimiento micelar de *Verticillium dahliae* se ve retrasado por DFMO a una concentración tan baja como 5,0 μ M, y es revertido por putrescina. En este caso, la aplicación de DFMA también inhibe el crecimiento, comprobándose que no existe actividad ADC en el hongo, pero sí actividad arginasa, que sería responsable de la conversión de DFMA en DFMO (Mussell et al., 1987).

En las investigaciones sobre el desarrollo de la enfermedad en plantas huésped, se confirmó que la aplicación de DFMO protege a la planta contra la infección.

Rajam et al. (1985) muestran que una aplicación en

"spray" de 400 μ l por hoja de una concentración 0,5 mM de DFMO, protege completamente a plantas de *Phaseolus vulgaris* L. contra la infección por uredosporas de *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint., siendo más efectivo el tratamiento de DFMO tras la inoculación. Este inhibidor, un metabolito del mismo o un compuesto inducido, serían translocables ya que se confiere protección a partes de la planta donde no se ha aplicado DFMO. Quizas lo más interesante de estos estudios es la persistencia del efecto inhibidor del DFMO, hojas infectadas, una semana después de la aplicación del inhibidor, son aún parcialmente protegidas contra la infección. La aplicación de DFMA, por el contrario, resulta inefectiva, incluso a una concentración 5 mM.

También es efectivo el tratamiento posterior a la inoculación con DFMO a plantas de *Vicia faba* L. frente a la infección por *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schr., confirmando-se que dicho tratamiento no afecta al crecimiento de la planta, ni a la concentración endógena de poliaminas, tanto en hojas de plantas infectadas como en las no inoculadas (Walters, 1986).

Como indicamos, la biosíntesis de espermidina y espermina puede ser inhibida por DCHA y MGBG a nivel de espermidina sintasa y SAMDC, respectivamente. Greenberg y Cohen (1985) demostraron que la inhibición *in vivo* de espermidina sintasa por DCHA, en protoplastos aislados de *Brassica chinensis* L., causa un rápido descenso en los niveles de espermidina. Este efecto está acompañado por el incremento de los niveles de S-adenosilmetionina descarboxilada (hasta 10 veces) y espermina, sugiriendo que S-adenosilmetionina descarboxilada es un factor limitante para la síntesis de espermina. Esto podría explicar, así mismo, lo observado por Biondi et al. (1986), quienes encontraron que la captación de DCHA y la inhibición de la síntesis de espermidina no tienen un efecto sobre el crecimiento de cotiledones, en cultivo, de *Pinus radiata* D. Don, ya que el incremento en la síntesis de

espermina puede compensar la pérdida de espermidina.

De forma similar, DCHA ejerce un suave efecto inhibitor sobre el ciclo celular de *H. tuberosus*, debido en parte a su degradación en el tejido. Sin embargo, los autores proponen que la putrescina podría sustituir la función de espermidina, puesto que se observa una acumulación de la diamina por inhibición de la síntesis de espermidina con DCHA (Torrigiani et al., 1987). Por otro lado, este mecanismo de compensación no siempre existe: en cultivos celulares de *D. carota*, el tratamiento con DCHA disminuye los niveles de espermidina con un incremento paralelo de los niveles de putrescina, causando una reducción dramática en el crecimiento y la embriogénesis. En este caso, es la triamina la que ejerce un papel clave en dichos procesos, y no es sustituida por el incremento en los niveles de putrescina (Feirer et al., 1985).

El inhibidor MGBG, no sólo afecta a la actividad SAMDC, sino también a la conversión de putrescina en espermidina (Hirasawa y Suzuki, 1983). La reducción de los niveles de espermidina por MGBG ha sido demostrada en semillas de *H. vulgare* durante la germinación (Serafini-Fracassini, 1984). El inhibidor MGBG puede ser usado en estudios sobre la función de poliaminas en plantas, debido a su habilidad para reducir los niveles intracelulares de espermidina y espermina. Sin embargo, se debe tener precaución al interpretar los resultados puesto que su efecto puede ser inespecífico, ya que puede, también, inhibir el catabolismo o degradación de putrescina por diamino oxidasas (Lin, 1985).

I.2.3.- Catabolismo

La degradación de poliaminas en plantas se lleva a cabo por la vía oxidativa, siendo catalizada por diamino oxidasas EC 1.4.3.6 (DAO) y poliamino oxidasas EC 1.4.3.4 (PAO). Estas enzimas, capaces de oxidar poliaminas, fueron

halladas, respectivamente, en dos familias de plantas: *Fabaceae* y *Poaceae*.

La enzima DAO es particularmente activa en leguminosas. En un principio fue caracterizada en extractos de plántulas de *Pisum sativum* L. (Hill, 1971) y posteriormente en otras especies vegetales (Rinaldi et al., 1985). Dicha enzima ataca exclusivamente grupos amino primarios, siendo particularmente activa con putrescina como sustrato, oxidándola directamente a 1-pirrolina, H_2O , y NH_3 . Sin embargo la enzima DAO exhibe un amplio rango de especificidad de sustrato, oxidando otras diaminas, así como espermidina y espermina (Smith et al., 1974). La enzima ha sido purificada y caracterizada en leguminosas y *Euphorbia* sp., contiene cobre en su molécula y es de naturaleza dimerica (Rinaldi et al., 1985).

En *Lens culinaris* Medicus y *P. sativum* la actividad DAO aparece tempranamente durante la germinación (Federico et al., 1985). La enzima, cuya síntesis es controlada por hormonas, es inducida por sus sustratos (Srivastava et al., 1977) y su actividad se ve afectada por las condiciones de luz bajo las cuales crece la planta (Macholan y Minar, 1974).

La actividad DAO incrementa durante la rápida proliferación y crecimiento de los tejidos, decreciendo durante la senescencia y madurez. En tubérculos de *H. tuberosus*, en el periodo previo a la división celular, incrementa la actividad DAO en paralelo al incremento en la actividad de los enzimas biosintéticos de putrescina, precediendo la máxima acumulación de la diamina al máximo de actividad DAO. Durante la formación del tubérculo, estado que se caracteriza por un alargamiento celular e intenso metabolismo biosintético existe, así mismo, una correlación directa entre la biosíntesis (aumento del contenido de putrescina debido a la actividad ADC) y la oxidación (actividad DAO) de putrescina (Torrigiani et al., 1988). Es probable que la DAO, por reciclar el nitrógeno y el carbono de la diamina, regule los niveles celulares de putres-

cina y por tanto el de poliaminas en la célula.

La actividad DAO es más alta en epicotilos etiolados de *L. culinaris* y *P. sativum* que en los desarrollados en luz. En ambas especies existe un paralelismo entre la actividad DAO y los niveles de diaminas (putrescina y cadaverina) a lo largo de todo el epicotilo y la raíz, no ocurriendo así con espermidina y espermina (Federico y Angelini, 1988).

La enzima PAO es una flavoproteína monomérica, que oxida específicamente grupos amino secundarios de espermidina y espermina a 1-pirrolina y 1-(3-aminopropil)-pirrolina, respectivamente, más los coproductos 1,3-diaminopropano y H_2O_2 (Smith, 1985b; Smith et al., 1986).

Esta enzima, que está presente mayoritariamente en Poaceae, ha sido parcialmente caracterizada en hojas de *H. vulgare*; purificada de *A. sativa* (Smith, 1976; Federico et al., 1989) y de *Zea mays* L. (Suzuki y Yangijawa, 1980). Recientemente ha sido caracterizada en hojas de *Eichhornia crassipes* Solms (Yanagisawa et al., 1987).

La enzima PAO presenta muy baja actividad en semillas no germinadas de *Z. mays*, pero aumenta continuamente durante la germinación, especialmente en brotes etiolados, indicando su posible papel en la elongación celular (Torrighiani et al., 1988).

Estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos, realizados en leguminosas y gramíneas, indican la localización preferente de las enzimas DAO y PAO en la pared celular (Kaur-Sawhney et al., 1981; Federico et al., 1985). Incluso se ha purificado una PAO de extractos de pared celular en plántulas de *Z. mays*, conteniendo ésta un 2,5% de azúcares, mayoritariamente arabinosa (Federico et al., 1989).

Dada esta localización, se ha propuesto que tales enzimas fueran responsables de la producción de peróxido de hidrógeno necesaria en determinadas reacciones que catalizan peroxidases, y ocurren en la pared celular, como las relaciona-

das con la biosíntesis de polisacáridos y lignina (Federico y Angelini, 1986). En este sentido, Angelini et al. (1987) determinaron que la adición de peróxido de hidrógeno o espermina a secciones del mesocótilo y del coleoptilo de *Z. mays*, favorecen notablemente la actividad de isoperoxidasas extracelulares, en paralelo a la actividad PAO.

Estas enzimas implicadas en el catabolismo de poliaminas, pueden ejercer una función crucial en los procesos de crecimiento, pero tal función puede no estar relacionada, exclusivamente, con la regulación de los niveles de poliaminas.

Los productos resultantes de la oxidación de poliaminas, son posteriormente reciclados en el metabolismo. Así, el 1,1-diaminopropano es degradado a β -alanina en *Z. mays* (Terrano y Suzuki, 1978a), mientras que 1-pirrolina es metabolizada a succinato, vía ácido γ -aminobutírico (GABA) como intermediario (Terrano y Suzuki, 1978b) (Fig. 5). En 1985, Flores y Filner caracterizaron, por primera vez, la enzima pirrolina deshidrogenasa en plantas de *P. sativum* y *A. sativa*, siendo dependiente de NAD⁺ y específica de 1-pirrolina como sustrato, oxidándolo a GABA; encontrándose localizada en el protoplasto.

1.2.4.- Metabolismo secundario

En comparación con la biosíntesis y degradación de poliaminas, poco se conoce acerca de su posterior metabolismo, si bien, éstas parecen funcionar como precursores en la formación de ciertos metabolitos secundarios en plantas.

En tejidos de callos de *N. tabacum* las poliaminas aparecen, casi en su totalidad, como amidas conjugadas (mediante unión covalente) a ácidos hidroxicinámicos (Mizusaki et al., 1971) y en cultivos de células en suspensión, de ciertos mutantes de *N. tabacum*, estos conjugados representan la mayoría de los constituyentes fenólicos en la célula (Berlin, 1981).

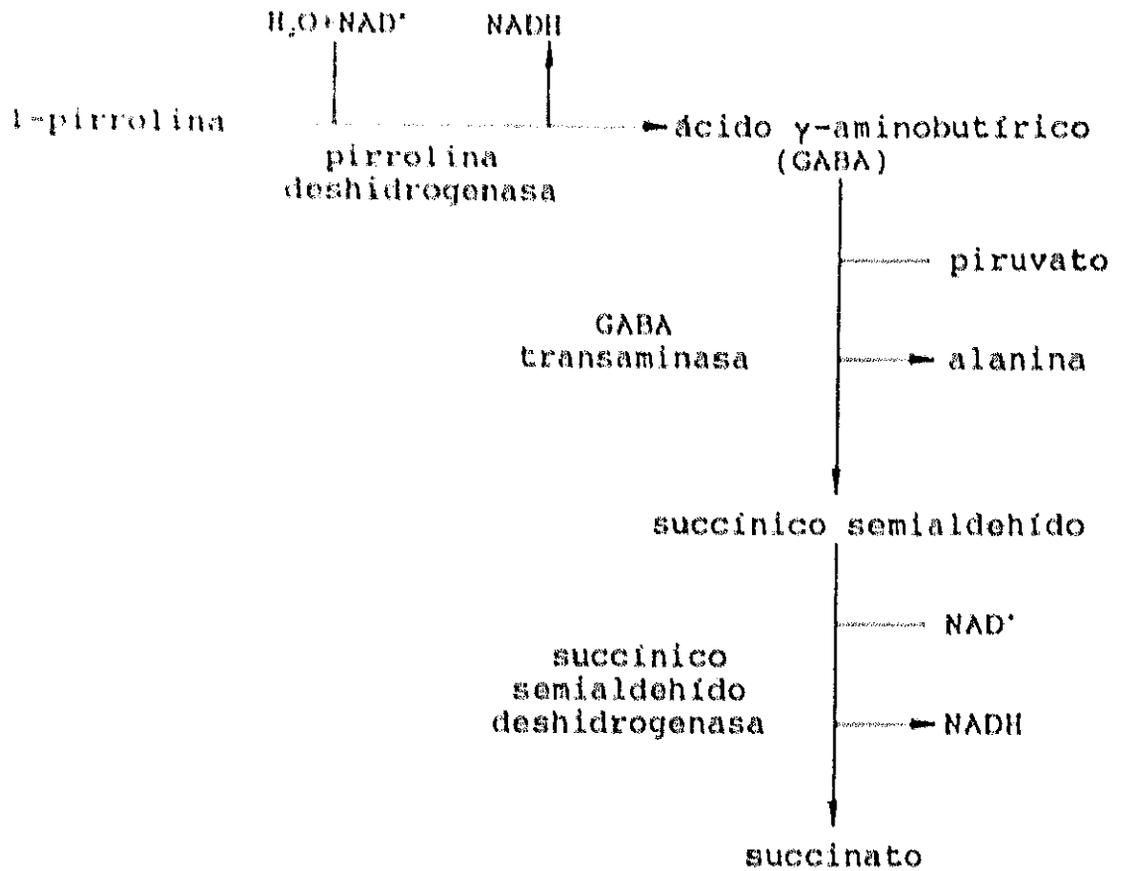
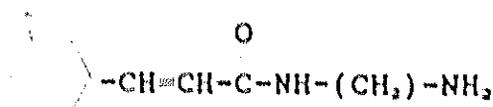
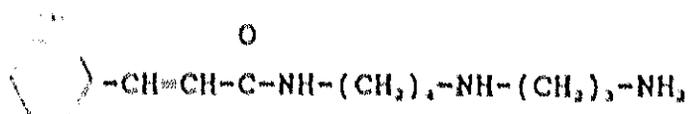


FIGURA 5.- Metabolismo de l-pirrolina a succinato (Slocum et al., 1984).



R=H	cumarilputrescina
R=OH	cafeilputrescina
R=OCH ₃	ferulilputrescina



cafeilespermidina

= Amidas de ácidos hidroxicinámicos =

En Solanaceae, donde las poliaminas existen principalmente como amidas conjugadas, no ha sido posible detectar actividad DAO, especulándose sobre la posibilidad de que el "pool" de poliaminas libres en estos tejidos pueda estar regulado por la formación reversible de conjugados, u otro tipo de metabolismo, más que a través del catabolismo oxidativo. Sin embargo, el significado fisiológico de estas amidas es aún desconocido.

Estos compuestos normalmente no están presentes en hojas y otros tejidos vegetativos de plantas de *N. tabacum*, pero se acumulan en los ápices del tallo, después de la inducción floral, pudiendo estar implicados en la fisiología de la floración. Incluso, los órganos sexuales masculinos y femeninos pueden diferenciarse por su diferente contenido en fenolaminas. En anteras, las amidas que se acumulan son

compuestos neutros, disustituídos (por ejemplo: di-p-cumarilputrescina, di-p-cumarilespermidina), mientras que las acumuladas en ovarios son alcalinas, monosustituídas (por ejemplo: p-cumarilputrescina, p-cumarilespermidina, ferulilputrescina, cafeilespermidina). Existe, por lo tanto, una aparente relación entre los cambios bioquímicos y la diferenciación sexual. En el resto de la planta durante el periodo juvenil están ausentes, encontrándose posteriormente amidas en la madurez (Cabanne et al., 1977).

Actualmente se ha purificado, en extractos de callos de *N. tabacum*, una enzima que cataliza la formación de cafeilputrescina a partir de cafeil-CoA y putrescina. La enzima cafeil-CoA-putrescina-N-cafeil transferasa es soluble y no es específica para putrescina, ya que puede conjugarse con espermidina, agmatina y cadaverina (Negrel, 1989).

Estas amidas pueden conferir resistencia a la infección viral en semillas y tejidos reproductores (Smith et al., 1983). En hojas de *N. tabacum* infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), las células sanas situadas alrededor de la lesión necrótica local, aparecida después de la inoculación del virus, incrementan la producción y acumulan amidas. Las partículas del virus están ausentes en órganos sexuales y en semillas, donde las fenolaminas se acumulan en grandes cantidades. Aplicaciones tópicas de estos conjugados a hojas infectadas, reducen el número de lesiones producidas por el virus (Martín y Martín-Tanguy, 1981).

Más recientemente, se ha estudiado el papel de las poliaminas conjugadas o libres en la proliferación celular y la diferenciación. El nivel intracelular de putrescina e hidroxifenilputrescina, incrementa marcadamente cuando los explantos foliares de *N. tabacum* son inducidos a proliferar. Los cambios morfológicos o de crecimiento se acompañan de cambios en los niveles de putrescina, específicamente de putrescina conjugada. Los niveles más altos de amidas se hallan durante los primeros

días de cultivo, cuando sucede la rápida proliferación celular y declinan en paralelo a la división celular, ocurriendo entonces la diferenciación. Los bajos niveles de espermidina y espermina hallados y los correspondientes niveles elevados de putrescina conjugada, sugieren que la principal ruta del metabolismo de la diamina es vía conjugación, no actuando los conjugados, al menos en este sistema, como una forma de almacenamiento de poliaminas (Martin-Tanguy et al., 1988).

En raíces de plantas de *N. tabacum*, la diamina putrescina es incorporada dentro del anillo N-metilpirrolidina de la nicotina (Mizusaki et al., 1973). En callos de esta planta creciendo sobre un medio con alta concentración (11,5 μM) de ácido α -naftalenacético, no óptimo para la síntesis de alcaloides de pirrolidina, se detecta formación de conjugados solubles en ácido de putrescina y espermidina; sin embargo, en callos que crecen con una baja concentración de hormona (1,5 μM), condición óptima para la síntesis de alcaloides, nornicotina y nicotina son los principales derivados de putrescina. Estos datos sugieren que los conjugados de putrescina solubles en la fracción ácida pueden actuar como un "pool" para la formación de alcaloides de pirrolidina, en sistemas donde la biosíntesis de alcaloides es operativa. En este sistema el ácido α -naftalenacético no sólo regula la biosíntesis de nicotina, sino también el metabolismo de poliaminas. Los cambios en la actividad ADC, más que ODC, se corresponden con el incremento en los niveles de alcaloides en el cultivo (Tiburcio et al., 1985).

En plantas de *N. tabacum* decapitadas es la actividad ODC, más que ADC, la relacionada, en principio, con la biosíntesis de nicotina (Mizusaki et al., 1973). Pero trabajos posteriores en plantas intactas demostraron que en raíces existe una actividad ADC que es 4,5 veces superior a la de ODC. El tratamiento con DFMA 1 mM inhibe fuertemente la síntesis de alcaloides de pirrolidina, siendo el tratamiento con DFMO 1 mM

menos efectivo. Por otra parte, el flujo de ^{14}C procedente de L-arginina hacia nicotina es más eficiente que el flujo desde L-ornitina (Tiburcio y Galston, 1986).

En otras plantas, las poliaminas forman parte de alcaloides más complejos (Smith et al., 1983). Dímeros de 4-cumarilagmatina, conocidos con el nombre de "hordatinas", fueron encontrados en tallos de *H. vulgare*. Estos compuestos inhiben la germinación de una amplia variedad de esporas fúngicas y confieren resistencia a plántulas de *H. vulgare* frente a la infección por *Helminthosporium sativum* (Smith y Best, 1978).

En cultivos de raíces de *Senecio vulgaris* L., se sintetizan alcaloides de pirrolizidina (grupo de constituyentes secundarios de plantas que probablemente sirven como agentes químicos protectores), con un porcentaje de incorporación de putrescina y espermidina del 20 al 30% (Hartmann y Toppel, 1987). En experimentos con isótopos radiactivos e inhibidores específicos de las actividades ADC y ODC, se demuestra que DFMA previene completamente la incorporación de ^{14}C -arginina y ^{14}C -ornitina en espermidina y alcaloides de pirrolizidina, concluyendo que la putrescina deriva exclusivamente de L-arginina vía agmatina, siendo la diamina un precursor común en la biosíntesis de poliaminas y en la de alcaloides de pirrolizidina (Hartmann et al., 1988).

I.2.5.- Compartimentación subcelular

Se conoce muy poco acerca de la localización subcelular de las poliaminas o de sus enzimas biosintéticas. A lo largo de las investigaciones realizadas se desprende la idea de su posible compartimentación. Se observa que el destino metabólico puede ser completamente diferente según se trate de L-arginina aplicada exógenamente o del "pool" de L-arginina endógena (Schuber y Lambert, 1974). Un problema similar surge

cuando se aportan poliaminas exógenamente: no son siempre metabolizadas de la misma forma que las poliaminas endógenas (Slocum et al., 1984). Por otro lado, el hecho de que la diamina putrescina pueda ser sintetizada a través de dos rutas metabólicas diferentes, pero coexistentes, y que las poliaminas derivadas de cada una de las actividades ODC y ADC puedan ejercer diferentes funciones fisiológicas, apoyan la idea de una localización celular tanto de las poliaminas como de sus enzimas biosintéticas (Hiatt, 1989).

Estudios de fraccionamiento celular, generalmente, revelan la localización citoplásmica de ADC (Smith, 1985a). La enzima arginasa ha sido localizada en la fracción mitocondrial de cotiledones de *V. faba* (Kollöffel y Dijke, 1975). La actividad espermidina sintasa, ha sido hallada en preparaciones de cloroplastos purificados de hojas de *B. chinensis* (Sindhu y Cohen, 1984). La enzima ODC se muestra asociada, en un 75%, con la cromatina nuclear y a otros orgánulos que contienen ADN en plántulas de *H. vulgare*, siendo el 25% restante citosólica (Panagiotidis et al., 1982; Kyriakidis et al., 1983). En cultivos celulares de *N. tabacum*, la mayor parte de la actividad ODC se encuentra en el sobrenadante, pero una gran proporción es localizada en la fracción nuclear (Walker et al., 1987).

Las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina, han sido halladas en la vacuola, así como en la fracción soluble del citoplasma de plántulas de *P. sativum* (Bagni y Serafini-Fracassini, 1974). También se han detectado en mitocondrias aisladas de tubérculos de *H. tuberosus* durante los distintas fases del estado de letargo y al principio de la fase G₁ del ciclo celular (Torrighiani y Serafini-Fracassini, 1980) así como en cloroplastos de *Euglena gracilis* Dang., hojas de *Spinacia oleracea* L. y de *Oryza sativa* L. (Bagni y Serafini-Fracassini, 1974; Chatterjee et al., 1988).

En células eucariotas, la tetraamina espermina tiende

a ser más abundante en el núcleo, asociándose con el ADN y ARN nuclear. La espermidina se halla a menudo en los ribosomas y, junto con putrescina, asociada con ARN_i y posiblemente ARN_m en el citosol (Galston y Kaur-Sawhney, 1981).

Las poliaminas han sido localizadas en cloroplastos de cotiledones de *P. radiata* y en mitocondrias de tubérculos de *H. tuberosus*. Dichas poliaminas pueden ser sintetizadas *in situ* ya que ambos orgánulos contienen las actividades ODC, ADC y SAMDC, y quizás estén relacionadas con la síntesis organular de macromoléculas (Torrighiani et al., 1986).

I.3.- TRANSPORTE DE POLIAMINAS

I.3.1.- Transporte celular

Hemos comentado algunos de los mecanismos que regulan la concentración de poliaminas en la célula, sin embargo otro a tener en cuenta sería el transporte de dichas sustancias, ya que, por ejemplo, se ha observado que la iniciación de la proliferación en fibroblastos humanos está acompañada de un incremento en el transporte de putrescina y no de una síntesis intracelular de la misma (Pohjanpelto, 1976). Por lo tanto, en los últimos años una gran parte del estudio en el campo de las poliaminas se ha centrado en la caracterización del transporte celular (hacia el interior o su secreción) como mecanismo regulador de los niveles endógenos de poliaminas.

Tabor y Tabor en 1966 fueron los primeros en abordar dicho estudio. Describieron que en *E. coli* son dos los mecanismos implicados en la acumulación de poliaminas: una absorción no dependiente de energía, que se desarrolla tanto a 37°C como a 0°C y un sistema transportador dependiente de los procesos metabólicos, que no ocurre a 0°C, y que decrece marcadamente por la ausencia de glucosa o por la adición de p-dinitrofenol.

En *Anacystis nidulans* Näg. la velocidad de captación

de putrescina es dependiente del pH extracelular, entre 8,5 y 10,5 y de la concentración de diamina externa (1-200 μM). La acumulación de putrescina exógena en la cianoficea es, así mismo, proporcional a la concentración de la diamina en el medio, sugiriéndose que la captación no está sujeta a una regulación celular. Dicho organismo presenta baja capacidad tamponadora, incrementando el pH externo durante la fase de crecimiento exponencial. Al permanecer el pH citoplásmico relativamente constante, existe un gradiente de pH entre el citoplasma y el medio. Se propone que la molécula difundiría libremente en su forma no cargada (neutra), quedando atrapada en la célula en su forma protonada, debido al bajo valor del pH intracelular (Guarino y Cohen, 1979a).

Recientemente ha sido abordado el estudio del transporte celular en plantas. La cinética de la captación de poliaminas ha sido estudiada en pétalos de *Saintpaulia ionantha* Wendl. En este sistema, la captación de putrescina, espermidina y espermina es dependiente del pH externo, observándose dos máximos: a bajas concentraciones extracelulares de poliaminas, el óptimo es a valores de pH entre 4,5 y 5,5, ocurriendo la captación en contra de un gradiente de concentración; a altas concentraciones de poliaminas, el pH óptimo es 8,0, siguiendo la captación un gradiente de concentración con valores de K_m de 8,6, 1,2 y 2,1 mM para putrescina, espermidina y espermina, respectivamente. Los resultados de experimentos de competición revelan que putrescina y espermidina no comparten el mismo sistema transportador. La mayor parte de la putrescina transportada se localiza en la vacuola, que ocupa una gran parte de las células del parénquima de *S. ionantha*. El mecanismo impulsor del transporte no está claramente definido. Diferentes agentes desacopladores no son capaces de afectar la captación, sin embargo, el transporte de espermidina es inhibido un 35% a 0°C y un 68% por el tratamiento con tiocianato sódico 20 mM, con respecto al control, estando implicado, posiblemente, un

mecanismo de transporte activo (Bagni y Pistocchi, 1985; Pistocchi et al., 1986).

Un segundo sistema en el que se ha estudiado el transporte de poliaminas ha sido en cultivos celulares de *D. carota*. La acumulación de putrescina y espermidina es muy rápida, rindiendo el máximo a tan sólo 1 min. Existe también un sistema bifásico con distintas afinidades para bajas y altas concentraciones. En ambos casos, la captación se muestra saturable para putrescina, mientras que el transporte de espermidina es lineal a altas concentraciones y saturable a bajas concentraciones. La diamina captada está localizada en la fracción soluble del citoplasma y la triamina principalmente en la pared celular. Este transporte se muestra parcialmente afectado por inhibidores metabólicos, no siendo completamente dependiente de energía. Los autores proponen que la entrada de poliaminas en la célula es conducida por un gradiente eléctrico a través de la membrana, con un posible intercambio (transporte bidireccional) entre moléculas de poliaminas dentro y fuera de la célula. Esta hipótesis está basada en la liberación al medio de la poliamina absorbida, en presencia de concentraciones externas crecientes, de la correspondiente poliamina o Ca^{2+} (Pistocchi et al., 1987).

En protoplastos y vacuolas aisladas de *D. carota*, donde no interviene la pared celular, la captación es dependiente, de forma lineal, de la concentración y del pH en protoplastos, mientras que en las vacuolas se observa una cinética de saturación y un estrecho margen de pH óptimo (alrededor de 7,0). Las diferencias entre ambos transportes apoyan la hipótesis de una entrada de poliaminas por simple difusión a través del plasmalema, siendo posteriormente transportadas del citosol a los orgánulos, particularmente dentro de la vacuola, en un proceso mediado por una molécula transportadora (Pistocchi et al., 1988).

I.3.2.- Translocación

Atendiendo a la regulación de la concentración endógena de poliaminas en la planta, otro factor a considerar es su posible transporte intercelular o si éstas son transportadas a larga distancia, entre órganos sintetizadores y sumideros, por medio de los elementos conductores.

Las investigaciones sobre la translocación de poliaminas surgen a raíz de considerar que tales sustancias son ubicuas y ejercen una importante función en los procesos de crecimiento y diferenciación. Con ello, su acción sería similar a la de hormonas vegetales, pudiendo ser las poliaminas un nuevo grupo de reguladores endógenos del crecimiento de naturaleza hormonal (en contraposición a otros hechos que apuntan hacia su papel como "segundos mensajeros" de la acción hormonal). Para tal consideración habría que demostrar su movilidad a lo largo de la planta como criterio para ejercer su función reguladora.

Hasta el momento, existen pocos datos, siendo éstos controvertidos. Chen y Kao (1983) exponen que el efecto antisenescente de poliaminas exógenas, sobre la pérdida de clorofilas en hojas cortadas de diferentes especies está limitado a los tejidos alrededor del corte o cerca de la vena principal. No parecen penetrar en áreas foliares no vascularizadas. Cuando son inyectadas poliaminas marcadas a cotiledones de *P. sativum* etiolados, éstas son transportadas pobremente a tejidos del epicótilo. Sin embargo, importantes niveles de radiactividad pueden ser recuperados en los tejidos del epicótilo, en forma de putrescina o cadaverina, cuando L-arginina o L-lisina marcadas se suministran a los cotiledones. Por tanto, las poliaminas sintetizadas en el tejido fuente (cotiledones) son translocadas a poca distancia (en 4 h), mientras que las poliaminas halladas en la región de crecimiento surgen del transporte y conversión de sus aminoácidos

precursores (Young y Galston, 1983b).

Recientemente, estudiando la distribución de poliaminas durante la germinación de *Z. mays*, Sepulveda y Sánchez de Jiménez (1988) determinaron que no existe un transporte entre tejidos embrionarios, más bien cada tejido sintetiza sus propias poliaminas.

En contraposición, otros trabajos apuntan hacia su posible translocación. Las pulverizaciones de poliaminas durante la fertilización de frutos de *Malus domestica* Borkh. demuestran la capacidad de las hojas jóvenes, así como de los frutos en formación, para sintetizar poliaminas, siendo putrescina, y probablemente espermidina y espermina, transportada de forma no polar vía pedúnculo entre ambos órganos (Bagni et al., 1984).

Los análisis de exudados vasculares (xilema y floema) de cuatro especies vegetales revelan que éstos contienen considerables cantidades de poliaminas, siendo putrescina la principal poliamina detectada, indicando con ello que pueden ser transportadas entre los diferentes órganos de la planta. Las mayores cantidades se hallan en exudados de plantas adultas o sometidas a tensión salina (Friedman et al., 1986).

Suministrando putrescina tritiada a raíces de diferentes especies, ésta es translocada rápidamente (30 min) a zonas superiores de las plántulas, incrementando su transporte a lo largo de 24 h y disminuyendo sus niveles progresivamente en las raíces. Dicho transporte es apolar, aunque bidireccional, ocurriendo mayoritariamente a través de los vasos xilemáticos (Rabiti et al., 1989).

Los altos niveles de poliaminas que son generalmente encontrados en cotiledones de *Beta vulgaris* L., pueden ser exportados en pocos minutos y en pequeñas cantidades a hipocótilos y radículas (Christ et al., 1989).

I.4.- FUNCION MOLECULAR DE LAS POLIAMINAS

Muchas de las funciones biológicas que ejercen las poliaminas parecen ser atribuidas a su naturaleza policatiónica. Dicho carácter permite su interacción electrostática con grupos fosfato negativos de los ácidos nucleicos, fosfolípidos de membrana así como grupos funcionales, cargados negativamente, de proteínas enzimáticas o estructurales de la célula.

Las poliaminas regulan la estructura de ácidos nucleicos a determinados niveles de organización (Tabor y Tabor, 1984). La tetraamina espermina, con sus cuatro grupos amino, se une electrostáticamente a dos aniones fosfato de cada cadena de ADN, imponiendo rigidez a la estructura y estabilizándola contra la desnaturalización térmica (Liquori et al., 1967). Las variaciones en el contenido de espermidina y espermina del ADN, facilitan los cambios conformacionales (transición de la forma funcional B a la no funcional Z en polinucleótidos sintéticos metilados) a concentraciones salinas fisiológicas (Behe y Felsenfeld, 1981).

Investigaciones llevadas a cabo por Cohen y Graenberg (1981) sugieren que las poliaminas pudieran estar implicadas en la determinación de la estructura secundaria de ácidos nucleicos, al observar que espermidina es un componente intrínseco del core de ARN de un virus vegetal. Las poliaminas también contribuyen al más alto nivel de organización del ADN al ser halladas en nucleoides bacterianos y en células de mamíferos en interfase donde espermina y putrescina inducen la condensación de los cromosomas y la disolución de la envuelta nuclear (Slocum et al., 1984). Más recientemente se ha determinado que la cromatina aislada de *Z. mays* contiene un 0,1% y un 3,7% de espermidina y espermina, respectivamente, con respecto al contenido total en el tejido completo, no hallando putrescina. La espermidina unida es totalmente solubilizada por tratamientos con ADNasa, no ocurriendo así con la espermina (Hirasawa

y Suzuki, 1985).

Las poliaminas, junto con las histonas del core nucleosomal y otros componentes básicos celulares, pueden participar en la regulación de la conformación del ADN y ser fundamentales en el control de la unión o el ensamblaje del nucleosoma y la consecuente expresión genética.

Sakai y Cohen (1976) sugieren en sus investigaciones que las poliaminas favorecen la conformación del ARN₄ en bacterias y levaduras y Loftfield et al. (1981) han demostrado que la velocidad y precisión de la aminoacilación de moléculas de ARN₄ se ve favorecida por concentraciones mM de espermina, bien por activación de la enzima aminoacil-ARN₄ sintetasa o por su capacidad para sustituir al Mg²⁺ en la reacción de aminoacilación durante la síntesis proteica. Complejos entre poliaminas y ARN₄, ARN₄ y una fracción conteniendo poli(A)-ARN y proteínas fueron hallados en tejidos de tubérculos de *H. tuberosus*. La cantidad de poliaminas unidas a ARN en células del parénquima en tubérculos en estado de letargo es menor e incrementa (especialmente de putrescina) con la activación del crecimiento (Serafini-Fracassini et al., 1984). Ribosomas aislados de tejidos en letargo son incapaces de llevar a cabo la síntesis proteica sin un aporte exógeno de espermidina y putrescina. Por contraste, ribosomas extraídos de tejidos activados contienen las necesarias poliaminas endógenas unidas para llevar a cabo dicha síntesis (Cocucci y Bagni, 1968).

En semillas de *O. sativa*, la pérdida de viabilidad se asocia con un progresivo decaimiento en su capacidad de síntesis proteica. En dichos estudios la administración de espermina (0,4 mM) favorece la síntesis proteica al incrementar la actividad aminoacil-ARN₄ sintetasa (Mukhopadhyay y Ghosh, 1986).

A concentraciones fisiológicas las poliaminas favorecen, de forma directa o indirecta, la replicación y transcripción del ADN, así como la traducción del ARN₄ *in vitro*

(Sakai y Cohen, 1976; Slocum et al., 1984). Tales sustancias pueden ser sustituidas en su unión a ácidos nucleicos por cationes inorgánicas divalentes tales como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Tabor y Tabor, 1984; Bachrach, 1973), sin embargo, el mecanismo de acción de las poliaminas reside en su especificidad química y no siempre pueden ser sustituidos por aquéllos. Tal es el caso en su capacidad de organizar la estructura del ARN, hacia su conformación activa (Quigley et al., 1978).

Sus efectos *in vivo*, tanto en plantas enteras como en cultivos vegetales, están estrechamente relacionados con la proliferación celular. Células en rápido crecimiento contienen niveles de poliaminas más altos que las no proliferantes. De hecho, la estimulación del crecimiento está acompañada, en general, por un incremento paralelo en el contenido celular de poliaminas y ácidos nucleicos (Smith et al., 1978; Bagni et al., 1981; Maiss et al., 1982; Cohen et al., 1984; Sepúlveda y Sánchez de Jiménez, 1988). Incluso, como ya hemos comentado en el apartado sobre inhibidores del metabolismo de poliaminas, el descenso en sus niveles puede bloquear la progresión de la célula a través del ciclo celular, hecho que puede ser revertido por la adición de poliaminas exógenas.

Sin embargo, aunque estos hechos están ampliamente establecidos, no se puede generalizar. En contraposición, se ha descrito que el acúmulo de putrescina es letal para la cianofícea *A. nidulans*, a un valor de pH extracelular, el cual estimula la rápida difusión de la molécula no cargada, produciéndose el acúmulo de la diamina cargada a pH intracelular (Guarino y Cohen, 1979a). Dicha letalidad es causada por un descenso en la capacidad de síntesis proteica, al disgregarse los ribosomas, y por una disminución de los niveles de ADN y ARN celulares (Guarino y Cohen, 1979b). Por otro lado, el estudio de los niveles de poliaminas en diferentes especies vegetales llevados a cabo por Felix y Harr (1987) indican que las zonas en crecimiento de una planta no tienen que contener

necesariamente altos niveles de poliaminas, aunque estos autores no descartan que un incremento en las concentraciones locales pueda darse.

Las poliaminas no sólo favorecen el mecanismo de acción de ácidos nucleicos, sino también su síntesis y degradación, controlando por tanto los niveles de dichas moléculas en la célula.

En hipocótilos de *Clycine max* (L.) Merr., la espermidina estimula la actividad de una ARN-polimerasa unida a la cromatina, la cual requiere para su actividad Mg^{2+} o Mn^{2+} . Por otro lado, en rodajas de tubérculos de *Solanum tuberosum* L. espermina, espermidina y putrescina (en este orden de efectividad) inhiben drásticamente la actividad ARNasa, reduciendo la síntesis neta de la enzima, la cual normalmente es inducida por la herida en el tejido del tubérculo (Altman, 1982b; Isola y Franzoni, 1989). Así mismo, durante la germinación de semillas de *O. sativa*, aplicaciones exógenas de poliaminas disminuyen, *in vivo* el nivel de actividad ARNasa (Sen y Ghosh, 1984), inhibiendo entre un 10 y un 40% la actividad de la enzima purificada.

Por otro lado, la espermidina inhibe la actividad proteasa en segmentos de hojas de *A. sativa*, por interacción con la enzima y no con el sustrato, ya que esta disminución en la actividad se observa solamente cuando la espermidina es preincubada con el extracto enzimático previamente al ensayo. El Ca^{2+} previene el efecto de la poliamina *in vivo*, pudiendo estar mediada aquella inhibición por un mecanismo de ligamiento iónico, en el cual Ca^{2+} y espermidina compitan por los mismos sitios aniónicos sobre la proteína (Kaur-Sawhney et al., 1982).

Se conoce que la actividad de muchas proteínas es regulada por medio de su fosforilación reversible. Las poliaminas controlan las actividades de ciertas enzimas por vía modulación de su estado de fosforilación. Kuehn et al. (1979) muestran que en *P. polycephalum* las poliaminas regulan la

fosforilación de cierta proteína nucleolar que estimula la síntesis de ARN. Han identificado esta última proteína como ODC y muestran que las poliaminas actúan regulando la actividad de una proteína kinasa, que a su vez regula el estado de fosforilación de ODC, y por tanto la actividad (Atmar y Kuehn, 1981).

En plantas ha sido descrito que las poliaminas inhiben la actividad de una proteína kinasa independiente de Ca^{++} (Yan y Tao, 1982), así como las proteínas kinasas I y II dependientes de Ca^{++} en germen de *Triticum aestivum* L. (Polya y Micucci, 1985). Por el contrario, la espermina estimula la fosforilación de ciertas proteínas nucleares en *P. sativum*, mediante la regulación de la actividad de una caseína kinasa independiente de AMP_c , la cual fue parcialmente purificada de la fracción cromatina (Datta et al., 1986; Datta et al., 1987). Las poliaminas pues, por medio de la regulación de la fosforilación de proteínas nucleares pueden ejercer un papel regulador en la expresión genética.

Estas sustancias parecen estar implicadas, más directamente, en la regulación de otras enzimas mediante diferentes tipos de interacciones iónicas. En *S. oleracea* las poliaminas favorecen la velocidad de oxidación de NADPH catalizada por un complejo flavoproteína-proteína-hierro-azufre, posiblemente al afectar la interacción entre las subunidades de la enzima. Espermidina y espermina previenen, reversiblemente, la activación de la enzima del cloroplasto fructosa-1,6-difosfatasa, sin afectar a la actividad catalítica de la enzima activada (Slocum et al., 1984).

La acción de ciertas proteínas puede, así mismo, estar regulada a través de una unión covalente de poliaminas, siendo tales conjugados liberados por hidrólisis ácida. Russell (1981) sugiere que la actividad ODC puede ser regulada por inhibición vía unión de putrescina a la proteína enzimática. En animales, las transglutaminasas median la unión de aminas primarias a proteínas, e incluso sería un mecanismo de regu-

lación post-transduccional (Folk, 1980; Lorand y Conrad, 1984). En plantas este hecho era desconocido, pero recientemente en parénquima de tubérculos activados de *H. tuberosus*, las poliaminas se conjugan mayoritariamente a proteínas, y se ha descrito una actividad enzimática que permite la unión covalente de dichas moléculas a sustratos endógenos (Serafini-Fracassini et al., 1988). La enzima muestra cierta similitud con las transglutaminasas de mamíferos, excepto el hecho de que aquella actividad no requiere aportaciones exógenas de Ca^{2+} . Incluso se ha descrito la modificación post-transduccional de una única proteína, por unión de espermidina, en cultivos de tejidos de *N. tabacum* y el resultado de esta investigación es consistente con el posible papel mediador de las transglutaminasas (Apelbaum et al., 1988).

Posterior a la aplicación de poliaminas exógenas, éstas pueden hallarse localizadas en la membrana plasmática o en la membrana de orgánulos celulares. En este sentido, la tetraamina espermina interacciona directamente con la membrana interna del cloroplasto de discos de hojas de *H. vulgare*, confiriendo estabilidad y protegiendo las funciones de la membrana tilacoidal frente a su degradación durante la senescencia (Popovic et al., 1979). Pistocchi et al. (1988) encontraron poliaminas unidas al plasmalema y al tonoplasto de protoplastos y vacuolas aislados de células de *D. carota*, tras la adición de poliaminas exógenas al medio.

Parece pues que las poliaminas no sólo se encuentran, en determinados casos, asociadas a las membranas biológicas, sino que parecen proteger las funciones características de tales membranas, posiblemente por medio de su unión con las cabezas cargadas negativamente de los fosfolípidos de la bicapa lipídica o los residuos aniónicos de las proteínas unidas a la membrana. Este efecto protector fue ya puesto en evidencia durante el aislamiento de protoplastos de hojas de *A. sativa*, favoreciendo las poliaminas la integridad de la membrana y

protegiéndolos contra la lisis que sigue a su aislamiento, retrasando de esta forma su senescencia (Altman et al., 1977).

Las poliaminas ejercen, así mismo, un control sobre la permeabilidad de la membrana a determinados solutos. En discos cortados del tejido de reserva de *B. vulgaris*, espermidina y espermina inhiben el eflujo del pigmento rojo betacianina, al disminuir la permeabilidad de la membrana inducida por la herida (Altman, 1982b).

Roberts et al. (1986) hallan putrescina, espermidina y espermina unidas a los lípidos de la membrana microsomal de hojas primarias de *P. vulgaris*. Estas interacciones confieren rigidez, tanto a las membranas nativas como a las desnaturalizadas por el calor y a los liposomas preparados del extracto lipídico total. Los autores proponen que de esta forma las poliaminas estabilizarían las membranas, ofreciendo así una explicación única para los efectos protectores descritos por la adición de poliaminas exógenas a determinados tejidos vegetales sometidos a condiciones de tensión o senescentes.

Sin embargo, se han descrito efectos fisiológicos específicos sobre la membrana. En segmentos de raíces de *Z. mays* la adición de poliaminas causa una inhibición de la captación de K^+ y salida de H^+ a través de la membrana plasmática. Estudios cinéticos indican que existe una competición entre poliaminas y K^+ y por tanto ocurre una interacción específica entre dichas moléculas con la membrana (De Agazio et al., 1988).

Las poliaminas a su vez parecen modular la actividad de ciertas enzimas localizadas en la membrana. Activan la ATPasa e inhiben la peroxidasa asociadas a la membrana de *Z. mays*, no actuando sobre dichas enzimas presentes en la fracción soluble, ni sobre las enzimas de membrana solubilizadas (Srivastava y Rajbabu, 1983a,b). En cultivos en suspensión de células de *G. max*, espermina activa la 1,3- β -glucano sintasa, localizada en la membrana plasmática, regulando por

tanto, la formación de calosa y su deposición durante el crecimiento celular o tras la injuria ocasionada en la pared celular por los patógenos (Fink et al., 1987).

I.5.- IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LAS POLIAMINAS

I.5.1.- En el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación

La relación entre crecimiento vegetal y poliaminas fue demostrada por primera vez en explantos de tubérculos, en estado de letargo, de *H. tuberosus*, cultivados *in vitro*. Dados los bajos niveles de poliaminas endógenas, así como de auxinas, citoquininas y giberelinas, no tiene lugar la proliferación celular en los tubérculos cuando están quiescentes, pero cuando se llevan a cabo aplicaciones exógenas de poliaminas, entre 10 y 100 μM , las células del tubérculo son capaces de dividirse y crecer sin el aporte de ninguna otra sustancia de crecimiento (Bagni, 1966).

Sus efectos en cultivos y plantas completas, *in vivo*, están estrechamente relacionados con la proliferación celular (Bagni et al., 1982). Células en estado de rápido crecimiento contienen mayores niveles de poliaminas que las no proliferantes, y la actividad de sus enzimas biosintéticos aumenta drásticamente en respuesta a numerosos estímulos de crecimiento. De hecho, esta estimulación del crecimiento lleva asociada, en general, un aumento en los niveles celulares de poliaminas, ADN y ARN.

Dichas sustancias están implicadas en el desarrollo vegetal, ya que cambios en los niveles de poliaminas se asocian con la germinación de semillas (Bagni, 1970), la diferenciación (Montagne et al., 1978), el retraso en la senescencia (Kaur-Sawhney y Galston, 1979) y son sustancias clave en la regulación de la morfogénesis en células y cultivo de tejidos (Desai y Mehta, 1985).

Dentro de una planta completa se producen gradientes en los niveles de poliaminas y de sus enzimas biosintéticos, y estos gradientes acompañan cambios paralelos en la velocidad de división celular y crecimiento de tejidos.

En plántulas de *V. radiata*, se hallan actividades específicas altas de ODC y ADC en yemas y hojas, mientras que son menores en la raíz y el hipocótilo. Por otro lado, la razón entre las actividades ADC y ODC varía dependiendo del tipo de tejido (Altman et al., 1982). Este hecho ha sido también descrito en el estudio de los diferentes estados del desarrollo en plántulas de *P. vulgaris*, encontrándose actividades específicas altas de ODC y ADC en todos los tejidos en rápido crecimiento (ápices radiculares, internodos jóvenes, yemas florales, hojas jóvenes...), siendo sus actividades menores en tejidos maduros o no proliferantes. Dichas correlaciones refuerzan la conexión entre las poliaminas, la división celular y actividad metabólica durante el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta (Palavan y Galston, 1982).

A su vez, las diferentes poliaminas tienden a presentar sus propios gradientes a lo largo de la planta. En coleóptilos de *Z. mays* y en la zona basal de raíces de *P. vulgaris*, donde no existe división celular sino elongación, la diamina es más abundante en la base y sus niveles decrecen acropétalmente, mientras que la espermidina muestra una distribución uniforme (Palavan y Galston, 1982; Dumortier et al., 1983). En plántulas de leguminosas, la distribución de espermidina y espermina se halla estrechamente relacionada con zonas meristemáticas en tejidos apicales, mientras que las diaminas, putrescina y cadaverina, incrementan sus niveles desde los ápices a la base de la raíz y tallo, siendo abundantes en zonas de elongación y diferenciación (Federico y Angelini, 1988).

Un bloqueo en la conversión de putrescina a espermidina puede ser un paso importante en el cambio de división a

elongación celular, durante el desarrollo, como ya propusieron Shen y Galston (1985), estudiando la correlación entre la razón de putrescina a espermidina en el desarrollo de raíces de plantulas de diferentes especies. Dichos autores demostraron que el contenido de putrescina se eleva en paralelo a la progresión de la elongación celular y que la razón putrescina a espermidina es paralela a la curva sigmoide de crecimiento, siendo espermidina y espermina más abundantes cerca de los ápices y declinando sus niveles progresivamente con el incremento de la edad de las células.

Las investigaciones llevadas a cabo han sido atendiendo principalmente a determinados estados del desarrollo vegetal.

El posible papel de las poliaminas en la formación de raíces y su crecimiento, ha sido investigado en *V. radiata* y *Phaseolus* sp. En *V. radiata*, Friedman et al. (1982) no hallaron una estimulación de la formación de raíces en los hipocótilos por dichas sustancias, sin embargo, midieron el incremento en los niveles de poliaminas después de la inducción en la formación de raíces por el ácido 3-indolbutírico. Los precursores marcados, son incorporados rápidamente en putrescina, espermidina y espermina, siendo la incorporación de L-arginina en putrescina mayor que la de L-ornitina. En el hipocótilo, la biosíntesis de putrescina y espermidina desde los precursores, está estrechamente relacionada con el modelo de formación de raíces: un primer pico, entre 0 y 24 h, que se corresponde con el periodo de formación del primordio y un segundo pico, entre 48 y 72 h, que se corresponde con el crecimiento y elongación de las raíces. El efecto inductor de la formación de raíces por auxinas requiere síntesis de poliaminas (Friedman et al., 1985).

En *Phaseolus aureus* L., el tratamiento con ácido 3-indolbutírico aumenta los niveles de poliaminas en los hipocótilos, previamente al desarrollo del primordio. Apli-

caciones exógenas de espermina incrementan el número de raíces y el tratamiento con MGBG reduce los niveles endógenos de poliaminas e inhibe la inducción y el crecimiento de raíces, en presencia o ausencia de la hormona (Jarvis et al., 1985). En *P. vulgaris*, Palavan (1987) determina, mediante el uso de inhibidores, que ADC es la principal ruta biosintética de putrescina implicada en el desarrollo de raíces, aunque ambas descarboxilasas, ADC y ODC, presentan actividades altas en ápices de raíces. La inhibición de ADC reduce los niveles de poliaminas y el crecimiento de raíces, siendo ambos parcialmente revertidos por la adición de putrescina.

En los sistemas anteriormente descritos, la diferenciación de la raíz es a partir, en general, de las células perivasculares. Sin embargo, se han realizado estudios en explantos de *N. tabacum*, compuestos de células epidérmicas, subepidérmicas y corticales, que demuestran diferenciación de raíces a partir de dichas células superficiales, cuando los explantos son cultivados *in vitro* (Tran Thank Van, 1973). La diferenciación de la raíz en este sistema depende del aumento en los niveles de putrescina (liberada de los conjugados solubles en ácido) y de la caída de pH del medio, actuando ambos factores independientemente. La inhibición de la biosíntesis de putrescina por DFMA, bloquea totalmente la diferenciación y dicha inhibición es completamente revertida por la aplicación exógena de putrescina. El tratamiento con DFMO inhibe, así mismo, la iniciación de la raíz, aunque sin reducir los niveles de la diamina, no siendo tal efecto revertido por la adición de putrescina exógena, tratándose por ello de una inhibición inespecífica. Los autores proponen que la putrescina es un buen marcador para la diferenciación de raíces, dado que su acumulación está relacionada con el pico de actividad mitótica y ocurre antes de que las raíces puedan observarse macroscópicamente (Tiburcio et al., 1989).

La ruptura del estado de letargo e iniciación de los

brotos en las yemas de la región apical en tubérculos de *S. tuberosum*, va acompañada de un rápido incremento de las actividades ODC y SAMDC, y consecuentemente de poliaminas (sobre todo espermina). En el resto del tubérculo estos parámetros permanecen presentes pero invariables (Kaur-Sawhney et al., 1982).

En la germinación de semillas de *Cicer arietinum* L., el tratamiento con DFMA y DFMO inhibe el crecimiento del eje embrionario, siendo más efectivo en presencia de DFMA. Estos efectos son parcialmente revertidos por la adición de putrescina, espermidina y espermina exógenas. La adición de DFMA y DFMO también inhibe el crecimiento de segmentos de epicotilos, así como la inducción del crecimiento debido al ácido indol-3-acético y ácido giberélico. En ambos casos, el efecto es revertido por la adición de poliaminas. Estos resultados reflejan la importancia de las poliaminas endógenas en el crecimiento de plántulas (Valle et al., 1989).

Durante la maduración de semillas de *Triticum durum* L., donde el desarrollo es debido mayoritariamente a la elongación celular, el contenido total de poliaminas es más alto en el embrión que en el endospermo. En el primero, la principal poliamina es espermina, siendo en el endospermo la putrescina. Atendiendo a las actividades de sus enzimas biosintéticas, en el embrión la ADC es más activa que la ODC, mientras que en el endospermo ambas son menos activas. Estos hechos pueden estar relacionados con las diferentes características histológicas de ambos tejidos durante el desarrollo de la semilla (Anguillesi et al., 1989).

Las poliaminas son requeridas para el óptimo crecimiento y desarrollo de granos de polen. En experimentos con L-arginina marcada, se determina que la síntesis de poliaminas precede a la emergencia del tubo polínico del polen de *M. domestica* (Bagni et al., 1981). La inclusión de poliaminas exógenas en la germinación *in vitro* de granos de polen de

floras de *Lilium longiflorum* Thunb., estimula el porcentaje de germinación y el crecimiento del tubo polínico. En presencia de DFMA y DFMO ambos procesos son inhibidos, aunque son revertidos completamente en presencia de putrescina o espermidina 1,0 mM (Rajam, 1989).

El desarrollo del fruto, durante la maduración de ovarios de *L. esculentum*, tras la fertilización o inducción por auxinas del desarrollo partenocárpico, también parece estar regulada por la disponibilidad de poliaminas. Durante las primeras etapas del desarrollo del fruto (un periodo que se caracteriza por la alta velocidad de división celular y actividad metabólica) el metabolismo de poliaminas está regulado principalmente por la actividad ODC. El crecimiento del fruto se ve marcadamente retrasado *in vivo* por el tratamiento con DFMO, efecto que es revertido por putrescina. En esta etapa tiene poco efecto el tratamiento con DFMA. Sin embargo, durante los últimos estados del desarrollo, en los cuales el crecimiento se debe principalmente a un alargamiento celular, la actividad ADC regula la biosíntesis de poliaminas (Cohen et al., 1982).

En tejidos de ovario de *N. tabacum* la ODC es también la principal enzima reguladora de la biosíntesis de putrescina, presentando un máximo de actividad posterior a la fertilización, aunque a diferencia de lo que ocurre en *L. esculentum*, predomina dicha actividad a lo largo de todas las etapas del desarrollo. Se observa, además, un incremento en los niveles de poliaminas (mayoritariamente conjugadas: cafeilputrescina y cafeilespermidina) que acompañan al aumento en la velocidad de síntesis de macromoléculas que precede al periodo de ensanchamiento del ovario. En los últimos estadios, durante la expansión celular, ocurre un descenso en los niveles de poliaminas (Slocum y Galston, 1985c).

Costa y Bagni (1983) demuestran que pulverizaciones de poliaminas, a concentraciones mM, sobre flores, nueve días

después de la floración, aceleran el desarrollo de frutos de *N. domestica* aparentemente por favorecer la velocidad de crecimiento del fruto durante la etapa de rápida división celular. Estudios posteriores indican que el nivel de poliaminas libres es elevado solamente durante las primeras semanas, tras la completa floración, descendiendo gradualmente cuando se inicia la expansión celular. Por otro lado, la cantidad de poliaminas conjugadas es mucho más alta que la de las libres y particularmente los conjugados de espermina mantienen sus niveles altos, incluso después de 40 días desde la floración. El pico de abscisión tiene lugar cuando los niveles de poliaminas libres son bajos o están en descenso (Biasi et al., 1988).

Como ya hemos comentado al tratar el metabolismo secundario de poliaminas, sus conjugados parecen estar implicados en la fisiología de la floración, acumulándose en determinadas etapas dentro del desarrollo de los órganos reproductores e incluso participando en la diferenciación sexual.

Malmberg y Rose (1987) han descrito el aislamiento de cultivos celulares de *N. tabacum* resistentes a MGBG, los cuales exhiben una morfología floral anormal. Algunas de estas líneas resistentes presentan elevados niveles de determinadas poliaminas o de sus conjugados. Así, los mutantes *Mgr 11* y *Mgr 14* contienen altos niveles de putrescina y de actividad en sus enzimas biosintéticas. Las líneas *Mgr 23* y *Mgr 3* poseen elevados niveles de espermidina libre y conjugada, conteniendo también, la primera de ellas, alta concentración de putrescina. Al menos para el mutante *Mgr 12* se obtuvo la evidencia de una mutación en el gen estructural para la enzima SAMDC, y probablemente ésta sea la causa genética de la resistencia celular a MGBG y del alterado fenotipo floral. Estos estudios sugieren la implicación de las poliaminas en la regulación de la diferenciación de meristemos florales en cultivos celulares.

Sin embargo, estos resultados difieren de los estudios realizados sobre plantas completas, Gerats et al.

(1988) analizaron los niveles de poliaminas y la actividad de sus enzimas biosintéticas en genotipos de *Petunia hybrida* Vilm., tanto del tipo silvestre como en los que se ha identificado una alteración en la morfología floral. Hallaron, por un lado, que genotipos con morfología normal pueden diferir en su contenido de putrescina (de los cuatro estudiados, dos de ellos poseen altos niveles de la diamina, siendo bajos en los restantes) y por otro lado que en tan sólo uno de los cuatro mutantes (*alf*) estudiados, con alterado desarrollo floral, muestra un elevado contenido en putrescina y actividad ADC, tanto en flores como en hojas viejas. Estos resultados proveen de un caso de niveles de putrescina alterados relacionado con una morfología normal y de un caso de niveles de diamina alterados relacionado con una significativa alteración morfológica. Por ello, los autores concluyen que los cambios en los niveles de la diamina por sí mismos, no deben ser el único factor crítico en cualquiera de los papeles que las poliaminas ejerzan en el desarrollo y diferenciación floral.

Hachos más definitivos aportan los estudios realizados sobre explantos de *N. tabacum*, señalando que existe una conexión entre los niveles elevados de espermidina y la iniciación floral. La inhibición de la síntesis de espermidina por DCHA previene el incremento en los niveles de la poliamina, inhibiendo la iniciación floral y promoviendo en cambio la formación de yemas vegetativas. Aplicaciones exógenas de espermidina favorecen la diferenciación de yemas florales en cultivos creciendo sobre un medio vegetativo. En yemas vegetativas, la poliamina predominante es la putrescina (Kaur-Sawhney et al., 1988). La inclusión en el medio de cultivo de espermidina marcada, revela que ésta es tomada rápidamente por los tejidos y se une covalentemente a una única proteína de 18 kDa. Tales uniones incrementan a los cuatro días de cultivo, coincidiendo con el principio de la diferenciación de las yemas y declinan antes de la completa floración. Esta modificación

post-traducciona! de una única proteina por unión de espermidina puede estar casualmente conectada con la aparición de yemas florales en explantos de *N. tabacum* (Apelbaum et al., 1988). Mediante el uso de los inhibidores DFMA y DFMO, se concluye que las poliaminas derivadas de ADC están implicadas en la diferenciación de las yemas florales y las derivadas de ODC son requeridas para el subsecuente crecimiento y futuro desarrollo de tales yemas (Tiburcio et al., 1988).

Durante la embriogénesis somática de *D. carota*, Montaque et al. (1978 y 1979) mostraron que la actividad ADC y los niveles de poliaminas se duplican (cultivo en medio libre de hormonas) comparados con los cultivos formadores de callos (en medios conteniendo auxinas y citoquininas). Feirer et al. (1984) demostraron que la transición entre un crecimiento desorganizado y una embriogénesis somática, puede ser bloqueada por la inhibición *in vivo* de ADC por DFMA y que esta inhibición es revertida por la adición de poliaminas exógenas. El tratamiento con DFMA no bloquea el crecimiento de callos, por lo que la necesidad de poliaminas parece ser un hecho fundamental en la diferenciación de embriones en el cultivo, más que en la velocidad de crecimiento. Estas poliaminas son sintetizadas vía ADC, ya que la embriogénesis no se ve afectada por la inclusión de DFMO en el medio. El tratamiento con DCHA disminuye los niveles de espermidina, aumentando los de putrescina y causando una gran reducción en el crecimiento y la embriogénesis de los cultivos, que es restaurada por la adición de espermidina al medio de cultivo. Parece que se requiere una síntesis específica de espermidina (y no de putrescina) para estos procesos del desarrollo en cultivos de *D. carota* (Feirer et al., 1985). Tales hechos han sido corroborados al encontrarse una línea celular mutante (la cual posee elevados niveles internos de auxinas) que es incapaz de formar embriones y elevar sus niveles de poliaminas, pero crece a la misma velocidad que la línea silvestre (Fienberg et al., 1984).

El que las poliaminas sean requeridas para la iniciación de la embriogénesis somática no es un hecho universal. En los estudios sobre la embriogénesis somática en dos líneas celulares de *Medicago sativa* L., con genotipos diferentes, Meijer y Simmonds (1988) encontraron que el tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de poliaminas reduce el contenido de las mismas en ambas líneas, aunque la embriogénesis sólo se ve afectada en uno de los genotipos estudiados.

Un aumento en los niveles de putrescina y espermidina, libre y conjugada, se produce durante la división celular y la diferenciación en plantas regeneradas a partir de cultivos de protoplastos del mesófilo de *Vigna aconitifolia* L. (Kaur-Sawhney et al., 1985). En cultivos de protoplastos del mesófilo de *P. hybrida*, el tratamiento con DFMA inhibe la organización de los centros meristemáticos y disminuye los niveles de putrescina libre y conjugada; el DFMO promueve el crecimiento y la organización, con un incremento paralelo en putrescina y espermidina conjugada. Ambos procesos, crecimiento y organogénesis en centros meristemáticos, son inhibidos por el tratamiento conjunto con DFMA, DFMO y DCHA, y parcialmente revertidos por concentraciones μM de putrescina y espermidina (Kaur-Sawhney et al., 1989).

I.5.2.- En la senescencia y el envejecimiento

En trabajos sobre la regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de *A. sativa*, se observa una progresiva degeneración que termina con la lisis del protoplasto. Altman et al. (1977) demostraron que aplicaciones exógenas de L-arginina, L-lisina o poliaminas retrasan el progresivo envejecimiento y los protege de la lisis durante su aislamiento. Demostraron, así mismo, que la efectividad relativa de cada poliamina, como agente antisenescente, se corresponde con el número de cargas positivas por molécula. Así, espermina es más

efectiva que espermidina y ésta más que putrescina y cadaverina. Al ser aplicadas exógenamente, favorecen la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, al incrementar la incorporación de L-leucina, uridina y timidina tritiadas en proteínas, ARN y ADN, respectivamente.

Posteriormente se observó que la espermidina promueve la síntesis de ADN y la actividad mitótica (Kaur-Sawhney *et al.*, 1980). Además, dichas poliaminas inhiben drásticamente el incremento de actividad ARNasa, inducido por el estado senescente (Galston *et al.*, 1978). Parece que las poliaminas actúan como agentes antisenescentes, siendo necesarias para el futuro desarrollo de los protoplastos. Este hecho fue comprobado al estudiar el contenido en poliaminas endógenas tanto en protoplastos de *V. aconitifolia*, los cuales se dividen rápidamente y regeneran plantas completas, como en los de *A. sativa*, que dividen sólo esporádicamente y senescen. En los primeros se observa un aumento en los niveles endógenos de poliaminas en paralelo a una activa división celular, mientras que en los segundos sus niveles decrecen conforme el protoplasto envejece (Kaur-Sawhney *et al.*, 1985).

Hojas cortadas de plantas o segmentos de hojas en oscuridad invariablemente envejecen y mueren. Su primera manifestación es un marcado aumento en la actividad ARNasa, seguido del incremento en la actividad proteasa y, por último, la degradación de clorofilas. Durante la senescencia en hojas caídas de *A. sativa*, bajas concentraciones de poliaminas retrasan o previenen los cambios degradativos, siendo más efectivas incluso que el tratamiento con quinetina o cicloheximida. La inclusión en los medios del ión Ca^{2+} , junto con las poliaminas, disminuye su acción, indicando probablemente la participación de un mecanismo inicial de unión iónica. La aplicación exógena de poliaminas retrasa el envejecimiento de hojas caídas o de segmentos de hojas de distintas especies de monocotiledoneas y dicotiledoneas (Kaur-Sawhney y Galston,

1979; Altman y Bachrach, 1981), sugiriéndose que esta respuesta puede ser ubicua.

Como ya comentamos en el apartado I.4., ha sido ampliamente demostrado que las poliaminas interaccionan con las membranas biológicas estabilizando sus funciones, e inhiben las actividades ARNasa y proteasas, tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo, quizás, a través de estos mecanismos por lo que ejercen su acción "anti-senescente".

En estudios sobre el retraso de la senescencia de hojas caídas de *Raphanus sativus* L., Altman (1982a) concluye que las poliaminas exógenas son más efectivas en prevenir la pérdida de clorofilas, posiblemente por controlar los primeros procesos ligados a la senescencia en oscuridad, más que por una inhibición directa de la degradación de clorofilas. La espermidina inhibe la actividad ARNasa y la degradación de proteínas. Sin embargo, no afecta a la pérdida de clorofilas y proteínas en suspensiones de cloroplastos aislados incubados en luz u oscuridad.

Ya que las aplicaciones de poliaminas retrasan el envejecimiento, cabría esperar que sus niveles endógenos decrecieran, tanto en hojas que senescen secuencialmente en la planta, como en el caso de hojas cortadas. La actividad ADC y los niveles de poliaminas disminuyen progresivamente durante el envejecimiento de la primera hoja unida a la planta y en hojas cortadas y mantenidas en oscuridad de *A. sativa*. Sin embargo, cuando las hojas cortadas son transferidas a la luz, el envejecimiento se retrasa y al mismo tiempo aumenta la actividad ADC y los niveles de poliaminas (Kaur-Sawhney et al., 1982). Parece, que, el descenso en la actividad de las enzimas biosintéticas de poliaminas y sus niveles, son procesos críticos en un complejo sistema de inducción y no simplemente resultado de la senescencia foliar.

Una función similar para las poliaminas ha sido hallada en otros sistemas vegetales. El aumento de la actividad

ARNasa, que ocurre como consecuencia del efecto deletéreo del corte y la senescencia, en discos de *S. tuberosum*, es inhibido por espermidina (Altman y Bachrach, 1981). El envejecimiento del tubérculo de *S. tuberosum* afecta a su metabolismo, perdiendo progresivamente su potencial de crecimiento; tubérculos de edad avanzada a menudo rinden plantas menos vigorosas. Con el almacenamiento, estos órganos acumulan putrescina y disminuye la concentración de espermidina y espermina. Esto puede ser debido: bien a una reducción de actividad, a síntesis de novo de espermidina y espermina sintasa, o bien a la baja disponibilidad de S-adenosilmetionina descarboxilada debida a su utilización para la síntesis de etileno, ya que los niveles de dicha hormona se elevan con la edad (Mikitzel y Knowles, 1989). Incluso las poliaminas cadaverina, putrescina, espermidina y espermina, inhiben la senescencia de cultivos en suspensión no fotosintéticos. En este caso, no se trata de un efecto anti-senescente debido a la reiniciación de la división celular ya que el tamaño de las células permanece invariable (Muhitch et al., 1983).

I.5.3.- En las condiciones de tensión

Las poliaminas juegan un papel clave en el control de la senescencia de plantas en general y particularmente en plantas sujetas a condiciones de tensión, como veremos.

Ya en 1952 Richards y Coleman encontraron que la putrescina era el principal compuesto nitrogenado que se acumulaba en plántulas de *H. vulgare* creciendo con deficiencia en K⁺. Posteriormente se determinó que tal respuesta es universal (Smith, 1970). En hojas intactas de plantas de *Sesamum indicum* L. creciendo en completa deficiencia de K⁺, se determina que, paralelamente al descenso de K⁺, incrementan los niveles de L-ornitina, citrulina, L-arginina, putrescina, N-carbamilputrescina y agmatina y se reduce la velocidad de

síntesis proteica; la diamina en este sistema se forma preferentemente a partir de citrulina, por vía N-carbamilputrescina como intermediario (Cromo y Basso, 1974).

En plántulas de *A. sativa* creciendo sobre KCl 6 μ M no se aprecian diferencias en la velocidad de crecimiento entre plántulas sujetas a deficiencia en K⁺ respecto a los controles (crecidos en KCl 6mM) hasta los 9-12 días. A este tiempo, en la primera hoja de plántulas deficientes, aparecen manchas necróticas. Los niveles de putrescina son 15 veces superiores a los de las plantas control, sólo 6 días después de la germinación. Este incremento es paralelo al aumento en la actividad ADC y ambos efectos son parcialmente revertidos por la adición de KCl 6 mM, así como los síntomas de necrosis y clorosis. Otros cationes monovalentes (Rb⁺, Na⁺) pueden revertir, así mismo, el efecto en la deficiencia de K⁺ sobre la actividad ADC (Young y Galston, 1984). Similar paralelismo con los elevados niveles de putrescina y el incremento de actividad ADC ha sido hallado en plantas creciendo en medios deficientes en Mg²⁺ (Smith, 1973; Smith, 1984) y con exceso en NH₄⁺ (Le Rudulier y Goas, 1975).

El tratamiento con Cd²⁺ de hojas caídas y plantas completas de *A. sativa* y *P. vulgaris*, en luz y oscuridad, causa un aumento en los niveles de putrescina (10 veces) en hojas, pero tiene poco efecto sobre espermidina o espermina. La actividad ADC aumenta junto con la acumulación de la diamina y los tratamientos con DFMA demuestran que dicha enzima es la responsable de los elevados niveles de putrescina. En hojas de *P. vulgaris*, el tratamiento con Cd²⁺ induce la acumulación de putrescina libre y de sus formas conjugadas solubles en ácido. Esto sugiere la existencia de un rápido intercambio entre ambas formas (libre y conjugadas) (Weinstein et al., 1986).

El análisis de los niveles de poliaminas en protoplastos aislados de hojas de *A. sativa* muestra diferencias con respecto a las células de las que derivan. Mientras que el

contenido en espermidina y espermina permanece inalterado, el de putrescina es 5-10 veces mayor, siendo, quizás, este incremento resultado directo de la tensión osmótica a la que está sujeta el aislamiento de los protoplastos (Flores y Galston, 1982a). Para demostrar tales hechos, se eliminó la epidermis inferior de las primeras hojas y se incubaron en condiciones de luz, en presencia o ausencia de sorbitol 0,6 mM a pH 5,8. A las 2 h se observó un significativo incremento de putrescina, siendo a las 6 h 60 veces superior. Sin embargo, en este caso, tal aumento no se debe a su liberación desde formas conjugadas. El ensayo con otros osmóticos: manitol, prolina o sacarosa, tienen similar efecto sobre los niveles de putrescina. Esta respuesta a la tensión osmótica no está restringida a *A. sativa*, ya que segmentos de hojas de otros cereales también responden de la misma forma. Como en el caso de la tensión por deficiencia en K', aquí también se observa un incremento de la actividad ADC (2-3 veces), siendo completamente prevenido por DFMA. El tratamiento con cicloheximida previene totalmente el aumento en los niveles de putrescina y espermidina, si es añadida durante las primeras horas, pero es inefectivo a tiempos más largos. Esto confirma la idea de una síntesis de novo de ADC encargada de tales respuestas (Flores y Galston, 1982b; Flores y Galston, 1984a). La respuesta en oscuridad o en luz, frente a la tensión osmótica, es similar con respecto al incremento de actividad ADC, aunque la acumulación de putrescina es menor bajo condiciones de oscuridad. No obstante, si en estas condiciones se suple L-ornitina o L-arginina la respuesta es similar a la de condiciones de luz. Por lo tanto, la disponibilidad de aminoácidos precursores es un factor limitante para la respuesta frente a las condiciones de tensión (Flores y Galston, 1984b).

Durante el aislamiento de protoplastos de cereales incrementa la actividad ADC y los niveles de putrescina, pero no existe, o es baja, la conversión de la diamina en espermidina-

na y espermina, por lo que la razón putrescina / poliaminas es alta y no dividen. En cambio, los protoplastos de dicotiledóneas sí generan plantas completas y tienen una respuesta opuesta frente a la tensión osmótica. Los niveles de putrescina, así como las actividades ADC y ODC, declinan mientras que espermidina y espermina se elevan, por lo que la razón putrescina / poliaminas es menor que para protoplastos de cereales. Los autores proponen que quizás esta respuesta diferente pueda ser responsable, en parte, de la inviabilidad de los protoplastos aislados de cereales cultivados *in vitro* (Tiburcio et al., 1986). La viabilidad de los protoplastos aislados de hojas de *A. sativa* mejora si las hojas se tratan con DFMA 6 h antes del choque osmótico, ya que decrecen los niveles de putrescina en un 45% e incrementan 2 veces los de espermina (Tiburcio et al., 1984).

Ya que muchas de las situaciones de tensión pueden tener un efecto directo sobre el balance iónico de la célula, se ha estudiado la respuesta a variaciones en el pH externo. Valores bajos de pH (menores o iguales a 5,0) incrementan los niveles de putrescina (5 veces) y la actividad ADC (2 veces) en segmentos de hojas sin epidermis procedentes de *A. sativa* y *F. sativum*. La cicloheximida y el DFMA inhiben completamente la acumulación de putrescina (Young y Galston, 1983a). Se ha llevado a cabo un estudio de la respuesta frente a la tensión ácida en tres líneas celulares de *N. tabacum* resistentes a inhibidores de la biosíntesis de poliaminas. La línea celular resistente a DFMO (*Dfr 1*) posee muy bajos niveles de actividad ODC, niveles altos de putrescina libre y alta actividad ADC. Este incremento en los niveles de la diamina no eleva los de espermidina, espermina o putrescina conjugadas. La línea celular *Dfr 1* sobrevive a la tensión ácida, incluso a molaridades letales para el cultivo cepa silvestre. Sin embargo, otros mutantes resistentes a NGBG (*Mgr 3* y *Mgr 12*), que poseen niveles normales de las tres poliaminas, pero alto contenido en

putrescina conjugada, son sensibles al cultivo en un medio ácido. Estos resultados sugieren que el incremento en el contenido de putrescina libre favorece la supervivencia frente a la tensión ácida. Esta conclusión se ve apoyada por el hecho de que los efectos citotóxicos producidos por la inhibición de ADC en el cultivo silvestre son dependientes de la acidez del medio. Por otro lado, las formas conjugadas no son utilizadas para mantener los niveles necesarios de putrescina libre, ya que tanto el mutante *Mgr 12* como el tipo silvestre responden a las condiciones de tensión induciendo la acumulación de putrescina libre, a pesar de contener altos niveles de putrescina conjugada (Hiatt y Malmberg, 1988).

En semillas de *O. sativa* creciendo sobre elevadas concentraciones de NaCl disminuye su contenido en ADN, ARN y proteínas (Prakash et al., 1988), y se inhibe la velocidad de germinación y el crecimiento del eje embrionario. La tensión salina implica cambios en el potencial osmótico al reducir la captación de agua y un efecto tóxico causado por la acumulación de iones Na^+ y Cl^- afectando a la integridad de la membrana (se produce un eflujo de azúcares, aminoácidos, poliaminas y electrolitos). Aplicando exógenamente putrescina a las semillas, se incrementa la velocidad de germinación y el crecimiento de las plántulas. Por otro lado, se reduce la acumulación neta de iones Na^+ y Cl^- e incrementa la captación de agua. Bajo condiciones de tensión salina, el contenido en poliaminas se eleva paralelamente al incremento en la actividad ADC (en el caso de putrescina el aumento es del 100%). Posiblemente la diamina actúa frente a la tensión manteniendo la integridad estructural y funcional de la membrana (Prakash y Prathapasenan, 1988; Basu et al., 1988). La relación entre poliaminas y resistencia a la tensión salina se pone de manifiesto cuando cultivos celulares de *D. carota* son pretratados con putrescina. Células tratadas con la diamina a una concentración 5 mM, desarrollan un número mayor de colonias,

frente al cultivo control, en presencia de altas concentraciones de NaCl (Mengoli et al., 1989).

Las poliaminas también están relacionadas con otros tipos de situaciones adversas. Los niveles de putrescina aumentan durante la refrigeración de frutos (McDonald y Kushad, 1986). Durante el periodo de aclimatación al frío, los frutos resistentes a la tensión por bajas temperaturas incrementan sus niveles de prolina y espermidina (Kushad y Yelenosky, 1987). Durante el almacenamiento de *Cucurbita pepo* L. a baja temperatura (2,5°C), el daño provocado por la refrigeración, está relacionado con un aumento en los niveles de putrescina, disminuyendo los de espermidina y espermina. Sin embargo, dicha tensión se ve reducida tanto por el tratamiento a 10°C durante dos días (precondicionamiento durante el cual incrementan los niveles de espermidina y espermina), como por el tratamiento de los frutos con espermina, antes de su almacenamiento. Se puede concluir que las poliaminas espermidina y espermina pueden prevenir el daño por enfriamiento mediante un mecanismo que implica la protección de los lípidos de la membrana frente a la peroxidación (Kramer y Wang, 1989).

El efecto de la disminución de la concentración de oxígeno en vástagos de *O. sativa* y plántulas de *T. aestivum*, induce el acúmulo de putrescina, coincidiendo con una disminución de la elongación del tallo, pero tal respuesta es diferente para cada especie. En *O. sativa*, el acúmulo de la diamina es mayor que en *T. aestivum*, estando, quizás, relacionada esta respuesta con la mayor tolerancia de las plantas de *O. sativa* a situaciones de extrema hipoxia (Remo y Bertani, 1989).

Debido a la similitud en las respuestas, se acepta que la acumulación de putrescina en las situaciones de tensión tiene un significado adaptativo para la supervivencia de las distintas especies. Ya que la mayoría es estas situaciones producen una acidificación del pH intracelular, este polication

podría actuar como un tampón, manteniendo constante el valor de pH intracelular, o bien facilitando el transporte de H⁺ u otros cationes a través de la membrana. A su vez, la putrescina inhibe las actividades ARNasa y proteasas, y mantiene la integridad de la membrana. Hechos que están asociados con el dano producido por la tensión. Sin embargo, queda abierta la cuestión de por qué espermidina y espermina no son igualmente efectivas (incluso se ve bloqueada su síntesis). Quizás éste, junto con otros hechos mencionados en capítulos anteriores, podría implicar la diferente función fisiológica de las di- y poliaminas.

1.6.- RELACION ENTRE LAS HORMONAS VEGETALES, LAS POLIAMINAS Y LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN SU SINTESIS

Debido a que las poliaminas ejercen acciones similares a las hormonas vegetales, en un principio abundaron las hipótesis acerca de que dichas sustancias constituyen un nuevo grupo de reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo vegetal. Sin embargo, los niveles de poliaminas hallados en las células son significativamente más altos (mM) que los de las hormonas vegetales (μ M). Por otro lado, existen pocos datos acerca de su translocación en plantas. Dado que determinados trabajos apuntan hacia el necesario incremento en la concentración de poliaminas bajo el tratamiento con hormonas estimulantes (auxinas, giberelinas y citoquininas), hoy en día se ve favorecida la idea de que tales sustancias actúan como "segundos mensajeros", mediando intracelularmente la acción hormonal. Algunas evidencias que sustentan dicha hipótesis han sido obtenidas estudiando si las poliaminas pueden sustituir el efecto hormonal, examinando la evolución de la respuesta de las poliaminas al tratamiento con reguladores del crecimiento y el efecto de la inhibición de la biosíntesis de poliaminas así como la reversión por aplicaciones exógenas de tales

sustancias.

El tratamiento con auxinas, (2-4 D y ácido naftalenoacético) de explantos de tubérculos de *H. tuberosus* en estado de letargo, activa la biosíntesis de poliaminas, la síntesis de macromoléculas y el crecimiento. Aplicaciones exógenas de poliaminas pueden sustituir la respuesta de la hormona en este sistema (Bagni, 1966; Schuber y Lambert, 1974) y este hecho apoya la idea de que las poliaminas median la respuesta hormonal. En este sistema, los efectos morfogenéticos asociados con la estimulación del crecimiento inducido por auxinas o poliaminas, son muy similares, sugiriéndose que ambos comparten un mecanismo de acción común (Serafini-Fracassini y Alessandri, 1981).

Similarmente, la inducción del desarrollo partenocárpico de frutos de *L. esculentum* por auxinas exógenas, se caracteriza por un rápido incremento en la actividad ODC (Mizrahi y Helmer, 1982). A su vez, el normal crecimiento postfertilización de estos órganos (inducido por auxinas endógenas) puede ser inhibido específicamente por DFMO, siendo revertido por putrescina exógena. En este tejido la biosíntesis de poliaminas parece ser un prerequisite para el crecimiento mediado por auxinas (Cohen et al., 1982).

La inducción de raíces adventicias por auxinas también necesita del incremento en la biosíntesis de poliaminas, tanto en la fase de formación del primordio como durante el crecimiento y elongación de las raíces. La formación de estos órganos se ve inhibida por el tratamiento con MGBG, siendo dicho efecto revertido por L-arginina o L-ornitina (Friedman et al., 1982; Friedman et al., 1985; Jarvis et al., 1985). Así mismo, el tratamiento con DFMO y DFMA inhiben el crecimiento de segmentos de epicótilos de *C. arietinum* inducido por el ácido indol-3-acético o por el ácido giberélico. En ambos casos, el efecto inhibitor es revertido por la adición de poliaminas (Valle et al., 1989).

Otras hormonas también parecen ejercer su acción a través del control de la biosíntesis de poliaminas. El tratamiento con ácido giberélico induce la elongación del internodo en plantulas de *P. sativum* enano, creciendo en luz. La actividad ADC y los niveles de putrescina y espermidina se elevan en paralelo a la elongación provocada por la giberelina. El tratamiento con un antagonista parcial de la hormona (AMO 1618), previene la elongación así como el aumento en la actividad ADC y los niveles de poliaminas. El tratamiento con ácido giberélico también revierte la inhibición de la actividad ADC inducida por luz roja (R) en epicótilos de *P. sativum* etiolados (Dai et al., 1982). A su vez, el tratamiento con DFMA (1 mM) inhibe efectivamente la actividad ADC y el crecimiento del internodo. La adición de putrescina (1 mM) sólo revierte parcialmente dicha inhibición. El incremento de actividad ADC debido al ácido giberélico probablemente requiere la síntesis de novo de ARN y proteínas, dado que el tratamiento con actinomicina-D y cicloheximida inhiben el aumento de la actividad ADC (Kaur-Sawhney et al., 1986).

La síntesis de putrescina incrementa por el ácido giberélico, durante la inducción del alargamiento, en hipocótilos de *Lactuca sativa* L. (Cho, 1983b).

Smith et al. (1985) cuantifican los niveles de poliaminas en mutantes de *P. sativum*, que poseen cuatro diferentes fenotipos para los internodos. La cantidad de poliaminas está directamente relacionada con el grado de elongación del internodo para cada mutante; DFMA y DFMO inhiben el alargamiento celular, así como el incremento en los niveles de poliaminas. La aplicación simultánea de putrescina y agmatina restaura parcialmente la elongación. No obstante, el papel del ácido giberélico aún no está claro. Parece que la inducción del crecimiento implica división y elongación celular. Estos autores proponen que las poliaminas pueden ser importantes para la respuesta de la giberelina a través de la

división celular, pero no estarían implicadas en la elongación celular.

Kyriakidis (1983) observa que el tratamiento con ácido giberélico y ácido indol-3-acético cuadruplica la actividad ODC en semillas de *H. vulgare* durante la germinación. La inducción de la síntesis de α -amilasa por giberelinas en la capa de aleurona puede ser inhibida por DFMA, aunque la naturaleza de la función de las poliaminas en esta respuesta no está clarificada (Bernal-Lugo, 1983). Los trabajos de Lin (1984) ponen en evidencia que los niveles endógenos de poliaminas, así como la incorporación de precursores o poliaminas marcadas en este sistema, no se alteran en respuesta a la inducción de la síntesis α -amilasa por la giberelina o a la inhibición de tal inducción por el ácido abscísico. Sin embargo, el inhibidor MGBG reduce dicho efecto hormonal y el tratamiento combinado de MGBG y espermidina restaura parcialmente los niveles de α -amilasa. Por lo tanto, la acción del ácido giberélico podría no estar mediada por poliaminas, aunque pueden ser requeridos suficientes niveles de espermidina para la inducción de α -amilasa.

En determinados sistemas, las citoquininas activan la biosíntesis de poliaminas. Quinetina y benciladenina favorecen la síntesis de putrescina en cotiledones de *L. sativa* creciendo en luz (Cho, 1983a). La actividad ADC y el contenido en putrescina de cotiledones etiolados de *Cucumis sativus* L. se elevan en respuesta al tratamiento con benciladenina, durante el reverdecimiento inducido por luz (Suresh et al., 1978). Sin embargo, la inclusión de poliaminas en el medio de incubación o la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, no afecta a la síntesis de clorofilas. Por ello, el incremento en los niveles de putrescina derivado del tratamiento con la citoquinina, no sería esencial para la inducción de la respuesta de reverdecimiento, aunque no se excluiría su posible implicación a través de la regulación de enzimas, estabilización de la membrana o

síntesis proteica (Walker et al., 1988).

Más extensamente ha sido investigada la relación entre el etileno y el metabolismo de poliaminas. El interés surge a raíz de que las poliaminas ejercen unas propiedades antisenescentes y son antagonistas de las respuestas mediadas por el etileno. Además, ambos comparten el intermediario S-adenosilmetionina, por lo que su síntesis puede ser competitiva bajo ciertas circunstancias. Por otro lado, tanto la actividad ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACC sintasa) como la actividad aminopropiltransferasa, sintetizan un producto común, 5'-metiltioadenosina, que, a través de varios intermediarios, vuelve a sintetizar L-metionina (Fig.6), aminoácido precursor en la biosíntesis de las poliaminas espermidina y espermina y del etileno (Slocum et al., 1984).

Durante la senescencia de plantas y la maduración de frutos, se ha observado una relación inversa entre los niveles de poliaminas y etileno.

Estudiando los niveles de etileno y poliaminas en frutos de *L. esculentum* silvestre y en un mutante (conteniendo un alelo recesivo *alc* que presenta un periodo más largo de maduración), se observa que éste último contiene niveles más bajos de etileno y un mayor contenido en putrescina (Dibble et al., 1988).

Tubérculos de *S. tuberosum*, almacenados durante un largo periodo, envejecen, disminuyendo sus niveles de espermidina y espermina e incrementando los de putrescina y etileno (Mikitzel y Knowles, 1989).

La adición de poliaminas exógenas reduce la síntesis de etileno en *V. radiata* (Suttle, 1981), *M. domestica*, *V. faba* y explantos de hojas de *N. tabacum* (Apelbaum et al., 1981). En meristemo apical de *P. sativum*, en respuesta al tratamiento con etileno se bloquea la síntesis de poliaminas mediante la inhibición de las actividades ADC y SAMDC (Apelbaum et al., 1985; Icekson et al., 1985), incrementándose la actividad

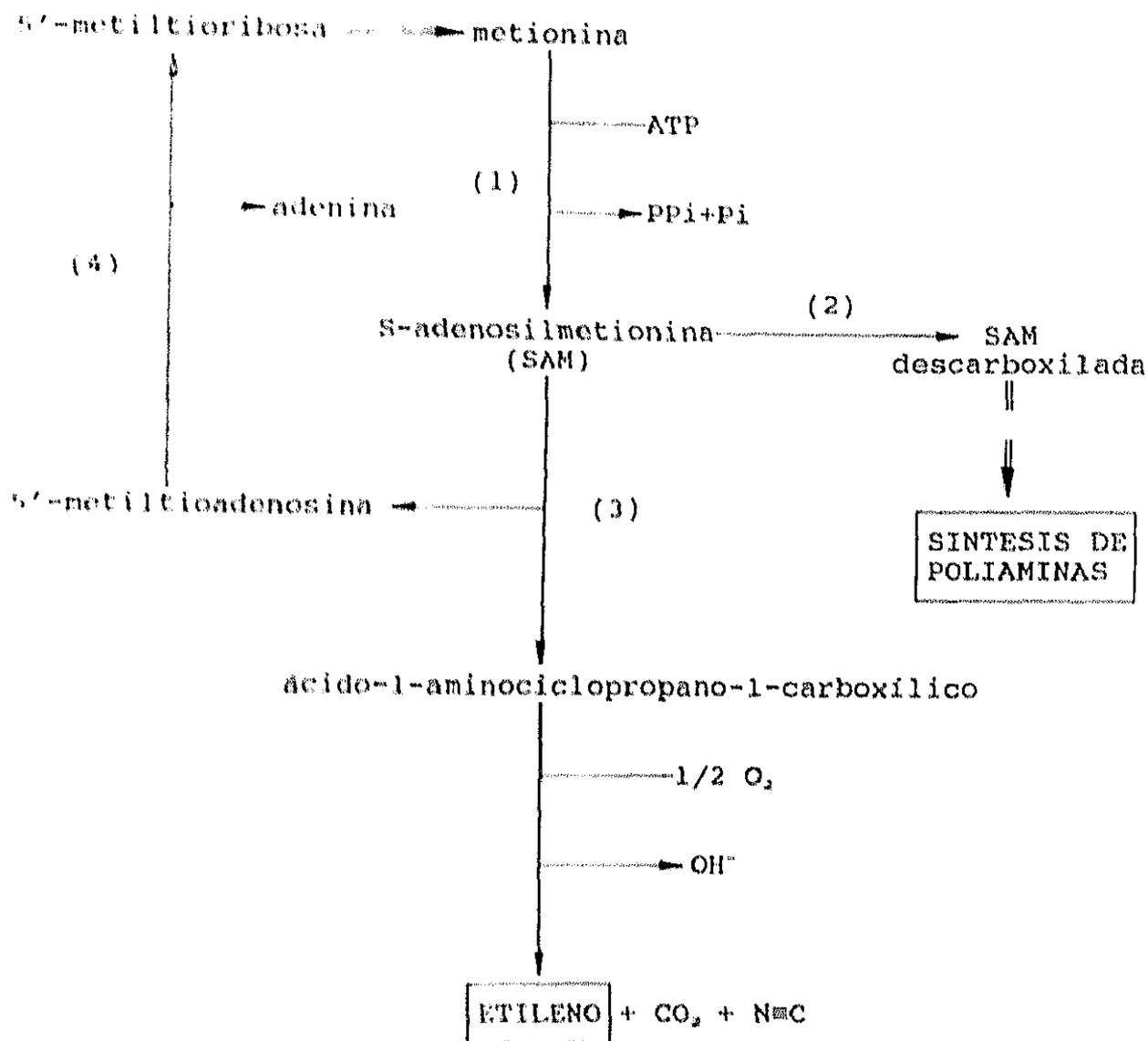


FIGURA 6.- Biosíntesis de etileno (Slocum et al., 1984):

- (1)- S-adenosilmetionina sintasa
- (2)- S-adenosilmetionina descarboxilasa
- (3)- ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa
- (4)- 5'-metiltioadenosina nucleosidasa

lisina descarboxilasa y, consecuentemente, los niveles de cadaverina en este sistema. Posiblemente como consecuencia de un mecanismo compensador del descenso de actividad ADC (Icekson et al., 1986).

Muchos de los estudios realizados intentan esclarecer la relación entre poliaminas y etileno a nivel celular. Cabe señalar que los niveles de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en el tejido son un factor limitante de la velocidad de producción de etileno. La enzima ACC sintasa, que requiere síntesis continua *de novo*, se encuentra localizada en el citosol y el sistema enzimático que oxida ACC a etileno es constitutivo y se halla asociado a la membrana, requiriendo la integridad estructural de ésta para la continua conversión de ACC en etileno (Apelbaum e Icekson, 1983).

Las poliaminas pueden bloquear la formación de etileno al inhibir la síntesis de ACC. Discos del fruto de *M. domestica*, incubados en diferentes concentraciones de espermina, disminuyen la producción de la hormona y la incorporación de uridina y L-leucina marcadas en ARN y proteínas. Las poliaminas, por tanto, inhiben la síntesis macromolecular necesaria para la síntesis *de novo* de ACC sintasa (Apelbaum et al., 1982). El mismo efecto se halla al incluir espermidina (1 mM), previamente a la inducción de etileno, en cultivos en suspensión de células de frutos de *Pyrus communis* L. (Ke y Romani, 1988).

Hyodo y Tanaka (1986) estudiando la actividad ACC sintasa *in vitro*, extraída de tejidos dañados del mesocarpo de *Cucurbita maxima* Duch., deducen que las poliaminas inhiben no competitivamente la actividad de la enzima. Winer y Apelbaum (1986) sugieren que las poliaminas pueden inhibir la actividad ACC sintasa al formar una base de Schiff con su cofactor, PALP. Las poliaminas no sólo bloquearían la síntesis de ACC, sino que utilizarían S-adenosilmetionina para su propia biosíntesis. Even-Chen et al., (1982), utilizando inhibidores de la síntesis

de etileno, estimulan la incorporación de L-metionina marcada en espermidina.

En flores cortadas de *Dianthus caryophyllus* L., la concentración endógena de espermidina y espermina no cambia con la edad, pero aumentan los niveles de la diamina paralelamente al incremento en los niveles de etileno.

La inhibición de la síntesis de poliaminas por D-arginina, DFMA o MGBG, promueve la síntesis hormonal y el principio de la senescencia. A la inversa, la inhibición de la síntesis de ACC por el ácido aminooxiacético, disminuye la producción de etileno y eleva el nivel de espermina, retrasándose el comienzo de la senescencia. Todo ello sugiere que ambos comparten el "pool" de S-adenosilmetionina, regulándose ambas rutas biosintéticas a través de un mecanismo "feedback" (Roberts et al., 1984).

Otros autores proponen que en pericarpo de *L. esculentum* las poliaminas inhiben la producción de etileno al bloquear el transporte del precursor ACC a través de la membrana de la vacuola (Saftner, 1989). Otro modo de acción sería mediante el control del complejo enzimático que oxida ACC a etileno. Fuhrer et al. (1982), encuentran que espermidina inhibe efectivamente dicha etapa en hojas de *A. sativa*, en las cuales se induce la síntesis de etileno al ser eliminadas las células epidérmicas. El ión Ca^{2+} reduce competitivamente la inhibición, por lo que, posiblemente, las poliaminas modularían la actividad del complejo enzimático que sintetiza etileno, induciendo ciertos cambios por medio de una interacción iónica con la membrana.

Determinados trabajos, sin embargo, indican que no existe una competición entre el etileno y las poliaminas. Durante el desarrollo del fruto de *Persea americana* Mill., los niveles de ambas sustancias no varían a lo largo del periodo de máxima producción de etileno o síntesis de poliaminas (Kushad et al., 1988). Cohen y Kende (1986) determinan que el trata-

miento de semillas de *O. sativa* con etileno, estimula el crecimiento del meristemo intercalary y las actividades ADC y SAMDC.

Estos hechos quizás puedan explicarse por la disponibilidad de S-adenosilmetionina, que puede estar limitada o no, dependiendo de la especie, del tejido o de determinadas circunstancias.

I.7.- RELACION ENTRE FITOCROMO Y POLIAMINAS

La luz, por medio del fitocromo, controla muchos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, incluyendo la germinación de semillas, el crecimiento de hojas y tallos, la floración y el comienzo de la senescencia (Hendricks y Borthwick, 1967).

El fitocromo y las poliaminas actúan regulando aspectos similares del crecimiento celular, pudiendo, quizás, estar relacionados funcionalmente.

Ya que, por un lado, el fitocromo controla la actividad de determinadas enzimas (Schopfer, 1977) y por otro, la actividad ADC se muestra influida por la luz (Kaur-Sawhney et al., 1982), se estudió si ambos estaban relacionados durante el crecimiento de plántulas etioladas de *P. sativum*. En este sistema, la forma Pfr del pigmento promueve el crecimiento de la yema terminal e inhibe, por el contrario, la elongación del epicotilo (Parker et al., 1949).

Una vez transcurridos 6 días de crecimiento, las plantas etioladas fueron expuestas a un pulso corto (5 min) R, acelerándose el crecimiento y duplicándose la actividad específica ADC en la yema terminal tras el tratamiento. Simultáneamente, en el epicotilo, donde los controles en oscuridad muestran un aumento de la actividad ADC, el pulso con R inhibe la elongación y previene completamente el incremento de actividad ADC. Ambas respuestas son fotorevertidas por

pulsos de luz roja lejana (FR). El tratamiento con cicloheximida inhibe drásticamente la actividad descarboxilasa, tanto en epicotilos en oscuridad como en las yemas terminales, que se desarrolla tras la irradiación con R. Parece por tanto, que el fitocromo controla la síntesis *de novo* de ADC en ambos órganos, pero de forma opuesta (Dai y Galston, 1981).

Estos hechos están apoyados con el estudio de los niveles de poliaminas. En yemas terminales, la luz R eleva los niveles de agmatina, putrescina y espermidina, mientras que, por el contrario, en epicotilos disminuyen. Los cambios en la biosíntesis de poliaminas son lo suficientemente rápidos como para responder de los cambios observados en la velocidad de crecimiento de ambos órganos. Tales efectos fotomorfológicos están estrechamente ligados a variaciones en los niveles de poliaminas, pudiendo estas sustancias estar implicadas bien directamente, bien como segundos mensajeros, en los procesos inducidos por el fitocromo (Goren et al., 1982).

Las variaciones descritas en la actividad ADC podrían estar relacionadas o ser una consecuencia de la modificación en la velocidad de crecimiento. Sin embargo, cuando se corta la yema terminal junto con una pequeña porción del epicotilo subyacente, la irradiación con R no promueve el crecimiento, pero sí favorece el desarrollo de la actividad ADC, siendo revertido por FR. Parece pues, que la R ejerce su efecto sobre la actividad ADC independientemente de sus efectos sobre el crecimiento (Goren et al., 1982).

Una variación en los niveles de poliaminas parece estar envuelta en la inducción fotoperiódica de la floración de *Pharbitis nil* Choise. Durante el fotoperiodo no inductivo (luz continua), los niveles de putrescina son altos y bajos los de espermidina y espermina en los cotiledones. Por el contrario, a lo largo del fotoperiodo inductivo (16 h de oscuridad), los niveles de la diamina son bajos y los de espermidina y espermina fluctúan alternativamente, coincidiendo con los tres

periodos cruciales del fotoperiodo. Posiblemente la espermina esté implicada en la síntesis del estímulo floral, ya que sus niveles máximos coinciden con el periodo concreto donde la síntesis del estímulo floral es más activa (12 h de oscuridad) (Dai y Wang, 1987).

Otro sistema en el que se halla una relación entre luz y poliaminas, es durante la germinación de semillas de *L. sativa* sensibles a la luz. Aplicaciones de putrescina y espermidina 1 mM estimulan la germinación de las semillas en oscuridad, siendo más efectivo el tratamiento con la triamina. Dicha germinación es, a su vez, estimulada por dosis no saturantes de R (20 s) o por el ácido giberélico. Cuando se aplicaron ambos tratamientos, R y ácido giberélico, junto con putrescina o espermidina, aumentó la velocidad de germinación en todos los casos (Sinska, 1988).

El fitocromo parece, también, mediar el control del catabolismo de poliaminas. Los epicotilos de plántulas etioladas de *L. culinaris* poseen, generalmente, altos niveles de DAO, indicando, posiblemente, que los productos resultantes del catabolismo de poliaminas sostendrían el crecimiento no fotosintético de tales plántulas en oscuridad (Flores y Filner, 1985). Cuando tales plantas son expuestas a R o luz azul continua, disminuyen drásticamente los niveles de DAO, siendo la FR menos efectiva. El fitocromo posiblemente esté implicado en tal respuesta mediada por la luz, ya que existe reversibilidad. La fotoregulación de los niveles de DAO está relacionada con la fotomorfogénesis y es independiente de la capacidad fotosintética de la plántula (Angelini et al., 1988).

Por otro lado, el control fotoperiódico de la senescencia de yemas de *P. sativum* G., no parece ejercerse a través de cambios en la concentración de poliaminas. Sus niveles permanecen altos e invariables durante el desarrollo en días cortos (retrasándose la senescencia) y la transferencia a un fotoperiodo largo no hace disminuir la concentración de

poliaminas, previamente a la aparición de los síntomas de senescencia (Smith y Davies, 1985b).

I.8.- POLIAMINAS EN LIQUENES

I.8.1. Antecedentes

Poco se conoce acerca del metabolismo de poliaminas en líquenes. Jäger y Weigel (1978) fueron los primeros en detectar poliaminas en tres especies liquénicas: *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf., *Plastisgmata glauca* (L.) Culb. Culb. e *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. En estas especies la concentración de di- y poliaminas (putrescina, cadaverina, agmatina y espermidina) es similar, e incluso un poco superior, a la de sus aminoácidos precursores. Siempre se detectan formando conjugados, no hallándose poliaminas libres en estas tres especies liquénicas. Los autores especularon sobre la unión de poliaminas a ácidos nucleicos, ribosomas y membranas, lo que estabilizaría tales estructuras frente a condiciones ambientales extremas, explicando, posiblemente, la resistencia de estos organismos a condiciones de gran sequía.

Posteriormente, Hamana y Matsuzaki (1985) estudiando diferentes especies de los géneros *Umbilicaria* y *Parmelia*, encontraron poliaminas en su forma libre: putrescina, 1-3-diaminopropano y espermidina, y sólo en algunas de ellas espermina, cadaverina y agmatina. Determinaron, a su vez, que contenían una serie de análogos estructurales o poliaminas no comunes como son: noespermidina y noespermina, las cuales han sido descritas en algas eucariotas (Kneifel y Hegewald, 1980; Hamana y Matsuzaki, 1982), en Briofitas y ciertos hongos (Hamana y Matsuzaki, 1985) y actualmente en *M. sativa* (Rodríguez-Garay et al., 1989) y la triamina homoespermidina, identificada en ciertas algas superiores (Hamana y Matsuzaki, 1982), cianofíceas (Hamana et al., 1983) y en determinadas

plantas superiores (Smith, 1985a).

sym-norespermidina: $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

sym-norespermina: $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$

sym-homoespermidina: $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$

La síntesis de norespermidina, norespermina y homoespermidina se muestra en la Figura 7.

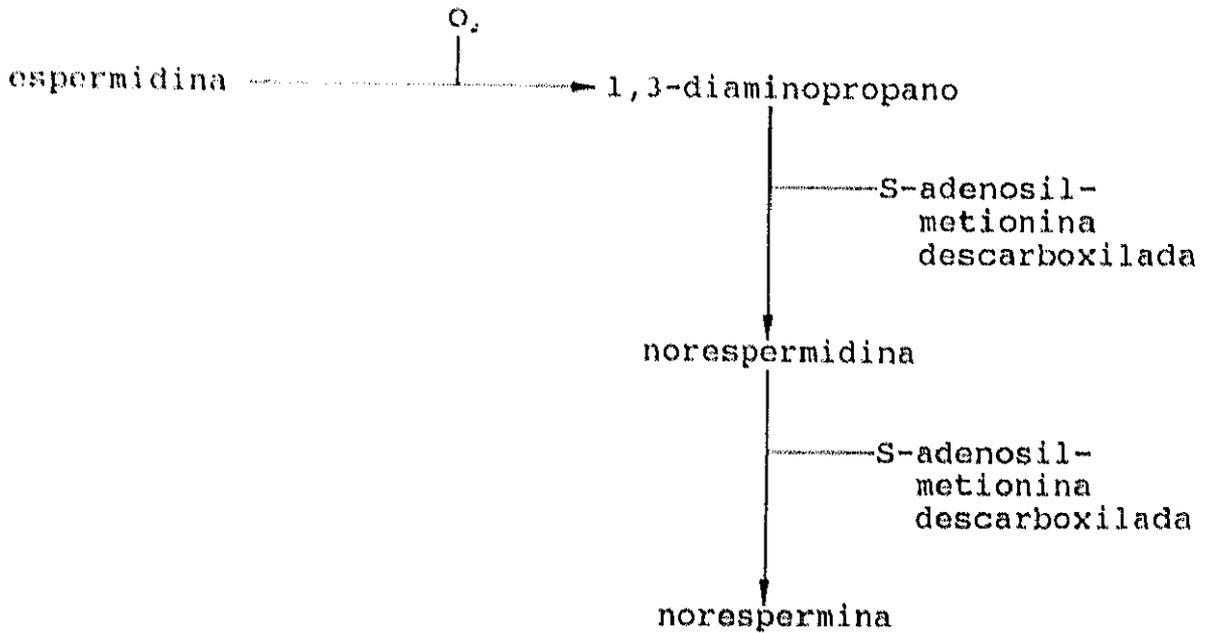
Se postula que la presencia y significado funcional de estas poliaminas no comunes, en los sistemas vivos, puede estar relacionada con la exposición a entornos en los que rigen unas condiciones ambientales extremas, siendo un mecanismo adaptativo para estos organismos (Adiga y Prasad, 1985).

1.8.2.- Catabolismo de L-arginina dirigido hacia síntesis de poliaminas en *Evernia prunastri*

Las especies líquénicas que contienen algas verdes como fotobionte acumulan los ácidos L-glutámico y L-aspartico como productos primarios de la asimilación de amonio (Ramakrishnan y Subramanian, 1966), mientras que *Evernia prunastri* (L.) Ach. (cuyo fotobionte es una *Chlorophyta* del género *Trebouxia*) contiene altas concentraciones de L-arginina dentro del "pool" de aminoácidos libres (Legaz et al., 1982). Los niveles de L-arginina están sujetos a variaciones estacionales, siendo altos en marzo y de mayo a julio y menores de agosto a octubre (Legaz et al., 1986).

Como se ha descrito para plantas superiores, en *E. prunastri*, la diamina putrescina se sintetiza a partir de L-arginina a través de dos rutas, una hidrolítica y otra descarboxilante vía agmatina.

La primera de ellas produce L-ornitina y urea mediante la hidrólisis de L-arginina por acción de una arginasa. Esta se muestra inducible por su sustrato, cuando el talo



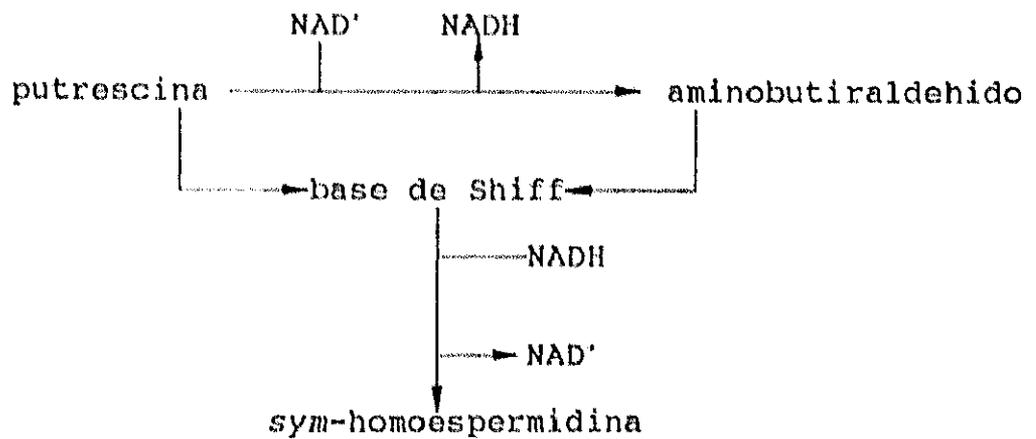


FIGURA 7.- Esquema propuesto para la biosíntesis de norespermidina, norespermina y *sym*-homoespermidina (Villanueva, 1981; Adiga y Prasad, 1985).

es incubado en oscuridad (Legaz y Vicente, 1980). La adición de urea al medio previene, o disminuye, la inducción de la arginasa causada por su sustrato. La proteína ha sido purificada, presentando un valor de K_m de 0,20 mM para L-arginina. Tiene dos valores de pH óptimo para su actividad: el principal a 9,0 y un segundo máximo a 6,5. Urea y agmatina son inhibidores competitivo y no competitivo, respectivamente, aunque L-ornitina y putrescina se muestran como activadores de la enzima. La inhibición de arginasa por urea provee de un mecanismo de regulación "feedback", que asegura la completa y efectiva regulación.

En este líquen se ha caracterizado, también en condiciones de oscuridad, una segunda forma de arginasa, ésta constitutiva. Dicha proteína, preexistente pero inactiva, es activada, posiblemente, por la liberación de L-arginina de la vacuola al citosol (Legaz y Vicente, 1982). La enzima fue purificada a partir de talos liquénicos incubados en cicloheximida (Martín-Falquina y Legaz, 1984), hallando un valor de K_m para L-arginina de 2,5 mM. L-Ornitina, agmatina y putrescina son activadores de la enzima. Ambas formas de arginasa, la constitutiva así como la inducible, son dependientes de Mn^{2+} para el desarrollo de su actividad.

La tercera forma de arginasa es una glicoproteína que se libera a los medios de incubación. Contiene 280 residuos de glucosa, 27 de fructosa y 85 de manosa por molécula de proteína. Posee un valor de K_m , para L-arginina, de 1,5 mM y es activada por ácido úsnico (Planelles y Legaz, 1987).

El aminoácido L-ornitina, producido como resultado de la hidrólisis de L-arginina, es posteriormente descarboxilado para rendir putrescina y urea mediante la acción de una ODC. La enzima presenta su máxima actividad cuando los talos son incubados en oscuridad en presencia de L-ornitina (Escribano y Legaz, 1984).

La segunda ruta de síntesis de putrescina es por

descarboxilación de L-arginina para rendir agmatina. En los talos líquénicos se desarrolla una actividad ADC inducible después de 4 h de incubación en L-arginina, en oscuridad. La enzima ha sido purificada, presentando un valor de K_m , para L-arginina, de 12,5 mM y un pH óptimo de reacción de 7,1. La ADC es inhibida por putrescina y urea, sugiriéndose una posible regulación "feedback". Agmatina produce solamente una moderada inhibición (Vicente y Legaz, 1981).

El producto de la reacción catalizada por ADC, agmatina, es posteriormente hidrolizado para rendir putrescina y urea, mediante la acción de una AAH. Dicha enzima, purificada, tiene un valor de K_m , para agmatina, de 6,4 mM y presenta un pH óptimo de reacción de 6,9. La enzima metaboliza específicamente agmatina, no hidrolizando L-arginina, L-ornitina o putrescina. Dichos análogos son activadores de AAH a bajas concentraciones de sustrato (menores de 14 mM) e inhibidores a altas concentraciones (mayores de 14 mM). La urea inhibe completamente la actividad de la enzima (Vicente y Legaz, 1982).

A su vez, la agmatina puede ser alternativamente metabolizada a N-carbamilputrescina, por acción de la enzima AIH. Tal actividad se desarrolla a las 2 h de incubar los talos en medios tamponados con Tris-HCl, sin embargo, la adición de L-arginina 40 mM al medio, favorece el incremento de la actividad a las 4 h de tratamiento. La presencia de la actividad hidrolasa es dependiente de la síntesis proteica y fue considerada como una inducción de la enzima por el aminoácido. La enzima purificada presenta un valor de K_m , para agmatina, de 0,8 mM. La urea es activador de la enzima y la L-arginina inhibe la actividad hidrolasa a altas concentraciones del sustrato, activándola a bajas concentraciones (Legaz et al., 1983).

Al menos hasta el momento, se puede concluir que en el líquen *E. prunastri* están presentes las dos rutas metabóli-

cas, ADC y ODC, que sintetizan la diamina putrescina, precursora de las poliaminas espermidina y espermina, como ha sido descrito para plantas superiores, e incluso una ruta alternativa que rinde putrescina directamente a través de agmatina.

1.8.3.- Localización celular de las enzimas de síntesis de putrescina en *Evernia prunastri*

Se ha estudiado la actividad, en términos de actividad específica, de las enzimas implicadas en la biosíntesis de putrescina en cada uno de los simbiontes aislados.

En general, ambos poseen todas las actividades enzimáticas descritas; sin embargo, AIH y ODC se encuentran mayoritariamente localizadas en el micobionte de *E. prunastri*, mientras que arginasa, ADC y AAH están principalmente restringidas a las células del ficobionte (Tabla I).

El talo de *E. prunastri* está formado principalmente por hifas fúngicas, con una pequeña capa de células algales. Debido a ello, en términos de actividad total, el micobionte es el que desarrolla mayoritariamente las actividades enzimáticas anteriormente descritas (Tabla I) (Legaz, 1985).

Estos datos implican que la principal fuente de síntesis de putrescina, en el líquen, es por parte del micobionte, aunque un pequeño "pool" de la diamina puede existir en el fotobionte, ya que es en este simbiote donde la AAH desarrolla una alta actividad específica.

La accesibilidad del sustrato por su enzima puede ser regulada a través de las distintas afinidades de dos enzimas para el mismo metabolito. La diamina agmatina es utilizada preferentemente por el micobionte líquénico, al poseer una mayor actividad específica de la enzima AIH. Además, su valor de K_m es 8 veces inferior al de la enzima AAH, localizada principalmente en el fotobionte (Vicente y Legaz, 1982; Legaz et al., 1983).

TABLA I.- Localización de las enzimas del catabolismo de L-arginina en talo de E. prunastri (Legaz, 1985).

ENZIMA	HOLOBIONTE				MICOBIONTE				FICOBIONTE			
	AE	%	AT	%	AE	%	AT	%	AE	%	AT	%
ARGINASA*	0,16	100	0,66	100	0,05	32,92	0,21	88,88	0,11	67,08	0,03	11,11
ADC*	0,72	100	2,88	100	0,17	23,61	0,64	82,90	0,55	76,39	0,13	10,10
ODC***	1,01	100	5,46	100	0,82	81,10	4,50	81,90	0,19	18,80	0,99	18,00
AAH*	0,16	100	0,64	100	0,01	6,25	0,04	51,08	0,15	93,75	0,04	48,92
AIH**	0,23	100	1,38	100	0,19	83,15	1,24	89,74	0,04	16,85	0,14	10,26

* La proporción de proteína total del micobionte / ficobionte $15,66 \pm 1,94$

** La proporción de proteína total del micobionte / ficobionte $1,77 \pm 0,05$

*** La proporción de proteína total del micobionte / ficobionte $1,05 \pm 0,02$

AE - actividad específica (unidades)

AT - actividad total (unidades)

La arginasa inducible de *E. prunastri* posee un valor de K_m para L-arginina, de 0,2 mM, mientras que el valor de K_m para ADC es de 12,5 mM (Legaz y Vicente, 1980; Vicente y Legaz, 1981). Esto implica que la afinidad de la arginasa por el aminoácido es 62,5 veces más alta que la afinidad de ADC por el mismo. Por ello, al menos en este líquen, la síntesis de putrescina es más efectiva por la vía hidrolítica que por la descarboxilante, y dentro de esta última, se sintetiza la diamina principalmente por acción de AIH, con agmatina como intermediario.

Sin embargo, los datos presentados son parciales, ya que no se han caracterizado las constantes cinéticas de la enzima ODC, y por otro lado, no existen aún resultados acerca del transporte de compuestos nitrogenados entre los simbioses.

Otro dato a tener en cuenta es que la hidrólisis de agmatina en el fotobionte podría estar limitada drásticamente, puesto que la urea producida en las células algales actúa como un potente inhibidor de la enzima AAH (Vicente y Legaz, 1982). Por ello, la putrescina, hasta el momento, sería sintetizada principalmente por el micobionte.

No obstante, la localización exacta de cada metabolito no se conoce por el momento, y se puede especular exclusivamente en función de las actividades enzimáticas relativas de ambos simbioses.

I.9.- MOVILIZACION DE NUTRIENTES ENTRE SIMBIOSIS LIQUENICOS

Mediante una larga co-evolución, algas y hongos han desembocado en una perfecta simbiosis. Lo que parece, en principio, beneficiar a ambos, permitiéndoles habitar y colonizar ambientes extremos.

En un principio se definieron los líquenes como una simbiosis mutualista, caracterizada por el movimiento de nutrientes entre células vivas de ambos simbioses (Smith,

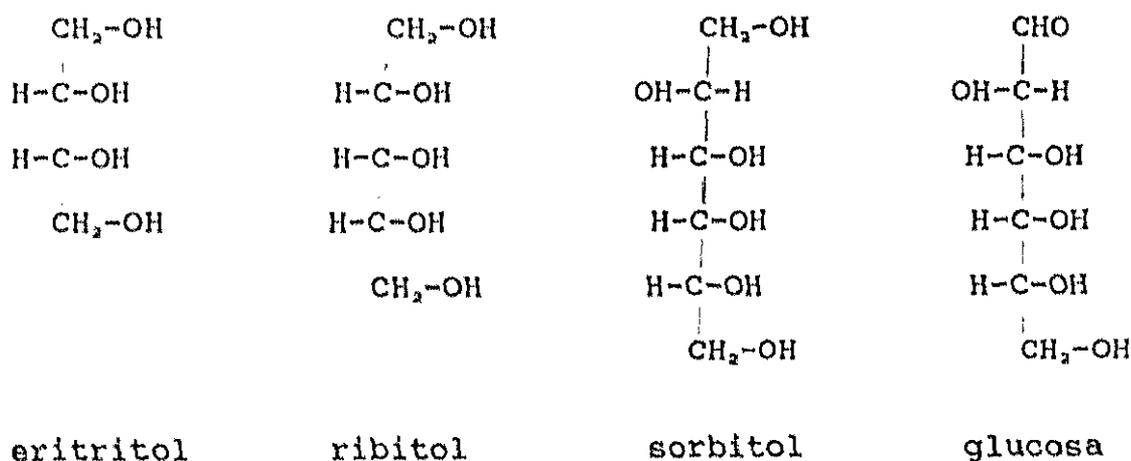
1980). Según Hill (1980), el hongo en el entorno liquénico, es incapaz de obtener hidratos de carbono de otra fuente que no sea el alga, de manera que la simbiosis liquénica se basaría en la transferencia de hidratos de carbono, productos de la fotosíntesis en el alga, desde el fotobionte al micobionte.

Los trabajos realizados por distintos investigadores, han permitido establecer las características básicas del movimiento de hidratos de carbono del alga al hongo. Smith (1980) las resume en los siguientes puntos:

1.- En los líquenes, una alta proporción del carbono fijado por el alga pasa al hongo, donde es transformado principalmente en un poliol fúngico, el manitol.

2.- Los hidratos de carbono de origen fotosintético liberados por el alga, se transfieren al hongo en forma de un solo tipo de molécula sencilla, de bajo peso molecular: el hidrato de carbono transferible o móvil.

3.- La naturaleza del hidrato de carbono móvil, depende del alga liquénica. En los líquenes cuyo fotobionte es una *Cyanophyta*, éste será siempre la glucosa, mientras que en los líquenes conteniendo *Chlorophyta* como fotobionte, será uno de los tres polialcoholes: eritritol, ribitol o sorbitol, dependiendo del género.



4.- El hecho de que cada alga libere un sólo tipo de hidrato de carbono, sugiere que existe un mecanismo de liberación concreto para cada polialcohol y que no se trata de un mecanismo general de permeabilidad indiscriminada. Debido a la similitud de los tres últimos carbonos de los polialcoholes anteriormente mencionados, se piensa que los mecanismos de liberación o de captación implicados son similares.

5.- La liberación masiva de hidratos de carbono del alga al hongo cesa rápidamente tras el aislamiento de los simbioses y es difícilmente detectable dos o tres horas después, aunque el tiempo depende del organismo estudiado. El hidrato de carbono móvil deja de ser el producto metabólico predominante del alga, tanto intracelularmente como extracelularmente.

Un proceso fundamental, y todavía no dilucidado, es el mecanismo que induce y controla la transferencia de hidratos de carbono desde el fotobionte al micobionte. Se sabe que la liberación de hidratos de carbono, por parte del alga, sólo se lleva a cabo mientras ésta se encuentra en simbiosis. Dicha actividad cesa rápidamente cuando es aislada, disminuyendo la liberación de ^{14}C al medio y la proporción de hidratos de carbono simples marcados, teniendo lugar un incremento paralelo en la incorporación de ^{14}C en material insoluble en etanol (Green y Smith, 1974). Por lo tanto, las algas modifican su metabolismo de hidratos de carbono y tienden a comportarse como la hacen las algas cultivadas (Green, 1970).

Se puede concluir que existe algún aspecto de la simbiosis responsable de las diferencias de comportamiento metabólico observadas. Entre los mecanismos físicos postulados existen los siguientes:

A- Control de la tensión de oxígeno y anhídrido carbónico en el talo.

B- Smith (1974) sugiere que la liberación de hidratos

de carbono podría resultar de una disminución o incluso inversión del potencial de membrana del fotobionte debida a su asociación con el hongo.

C- Control del crecimiento y de la división celular de las algas. Puesto que el alga recién aislada cesa de liberar hidratos de carbono, y utiliza internamente todo el carbono fijado para la síntesis de sus polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas, el hongo podría detener el ciclo celular del fotobionte en una etapa coincidente con una alta síntesis de hidratos de carbono. Al no ser éstos utilizados para el crecimiento y proliferación del fotobionte, serían desviados hacia el micobionte (Kanazawa et al., 1970; Smith y Drew, 1965).

Entre los mecanismos químicos contemplados, destaca la posibilidad de que el micobionte sintetice alguna enzima o algún factor específico responsable de los cambios metabólicos descritos.

Atendiendo a la influencia de ciertos factores ambientales, el nivel de hidratación del talo liquénico tiene un efecto muy marcado sobre la transferencia de hidratos de carbono. A altos niveles de hidratación, el hongo acumularía la mayor parte de los hidratos de carbono procedentes del alga, mientras que por debajo de un cierto nivel, quedarían retenidos en el alga, para asegurar su crecimiento y reproducción. Durante un ciclo de humedad y secado, cada simbiote tendría la oportunidad de obtener sus requerimientos de fotoasimilados, sin inconvenientes para el otro simbiote (Mac Farlane y Kershaw, 1982).

La cantidad de hidratos de carbono que recibe el hongo, es de 10 a 20 veces mayor que la requerida para su crecimiento. Sin embargo, no se corresponde con un rápido crecimiento del talo, que viene a ser de varios mm a varios cm por año (Smith, 1980). Farrar (1976) afirma que una gran

proporción de la fotosíntesis en líquenes se invierte en el mantenimiento de altos niveles en el "pool" de polialcoholes, dejando sólo una pequeña parte para los procesos de crecimiento.

Los polioles son los hidratos de carbono predominantes en líquenes y se les adjudican importantes funciones (Lewis y Smith, 1967):

- son compuestos más idóneos que los azúcares como almacén de energía.

- almacenamiento de poder reductor y regulación de coenzimas.

- como sustancias de osmoregulación, contra el déficit hídrico, disminuyendo el efecto de la tensión sobre el material insoluble (proteínas y polisacáridos).

- reparación rápida de las membranas tras cada ciclo de humedad y secado.

I.10.- RELACION ENTRE EL LIQUEN Y SU SUSTRATO

E. prunastrí es un líquen epífito, es decir, crece sobre la corteza y ramas de los árboles, recibiendo la luz y humedad necesarias para su desarrollo.

Los líquenes epífitos no tienen acceso al agua almacenada en el suelo, dependiendo del agua de la lluvia, de la niebla y de la cantidad de agua que sus raíces sean capaces de obtener del humus, derivado de la descomposición de la corteza del árbol que lo soporta.

El fitóforo provee de un "microhabitat" a los líquenes epífitos: las ramas altas están bien iluminadas, pero expuestas a la desecación, mientras que en el tronco y ramas bajas del árbol el microclima es oscuro pero húmedo. El máximo crecimiento de estos líquenes tiene lugar en los bosques de alta montaña, donde la humedad rara vez, o nunca, baja del 90% por el casi constante cinturón de nubes.

La relación entre el líquen y su sustrato es, a menudo, compleja. En un principio se pensó que los líquenes epífitos no tenían otra relación con el árbol más que la necesaria para su soporte, estando unidos a su sustrato por aprehensorios que no sobrepasaban los límites de las células epidérmicas muertas (Lindau, 1895).

Sin embargo, Porter en 1917 describió una extensa penetración de las hifas de *Ramalina* sp en la madera de su sustrato, a través de heridas y lenticelas, hasta alcanzar el cambium permaneciendo las hifas en los espacios intercelulares.

Investigaciones posteriores han establecido la penetración activa de líquenes epífitos dentro de los tejidos del fitóforo. Las hifas de *E. prunastri* llegan y progresan dentro de los vasos xilemáticos de *Fagus sylvatica* L. (Estevez et al., 1980), *Quercus pyrenaica* Willd. (Ascaso et al., 1980) y *Quercus rotundifolia* Lam. (Orus y Ascaso, 1982), lo que representa una base estructural para la interacción química entre metabolitos del líquen y procesos metabólicos del huésped, pudiendo representar una importante fuente de nutrientes para el epífito. La penetración se lleva a cabo a través de la acción química degradativa de los tejidos de la pared celular, encontrándose que *E. prunastri* posee actividades celulasas y poligalacturonasas, propias de los hongos fitopatógenos (Yagüe et al., 1984).

Ha sido ampliamente observado que ramas que soportan una gran población de líquenes epífitos aparecen con claros síntomas de defoliación, no ocurriendo esto en las ramas sin líquenes.

Estudiando la fisiología de la interacción, se encontró una clara participación de los fenoles liquénicos en el metabolismo de plantas superiores. Se han descrito inhibiciones en el transporte cíclico de electrones por quelación del Mn^{2+} de los cloroplastos (Orus et al., 1981), activación de la senescencia debida a la disminución del contenido hídrico,

aumento de la actividad fosfatasa ácida y una mayor tendencia a la abscisión, en hojas de *Q. rotundifolia* incubadas en presencia de fenoles extraídos de *E. prunastri* (Estevez et al., 1982). Esto indica que las sustancias líquénicas penetrarían dentro de los vasos del xilema y llegarían hasta las hojas, inhibiendo allí su metabolismo.

Avalos et al., (1986) han demostrado que pequeñas cantidades de ácido evérnico son translocadas por los vasos del xilema, llegando al nervio principal de las hojas. El fenol no sólo actúa a nivel foliar, sino que inhibe la diferenciación de las yemas y retrasan la formación de hojas debido a que provoca un descenso en la respiración (Legaz et al., 1988).

I.11.- SIMBIOSIS LIQUENICA

La amplitud y complejidad de la simbiosis hongo-alga (o cianoficea) es asombrosa, especialmente cuando el término "simbiosis" es utilizado de acuerdo con el criterio de De Bary (1878), que alude a organismos distintos que viven juntos, ya sea en asociaciones mutualistas, comensalistas o antagonistas.

En los últimos diez años, numerosos casos han llamado nuestra atención y han contribuido, de forma colectiva, a nuestro entendimiento de la naturaleza de las asociaciones líquénicas haciendonos pensar en su significado evolutivo.

Los taxones que hoy son aceptados como líquenes son simbiosis mutualistas en las que el micobionte es el exohabitante, desde el punto de vista morfológico, emitiendo prolongaciones haustoriales.

Morfológicamente se pueden diferenciar tres tipos de relaciones ultraestructurales (Honegger, 1984):

1.- En líquenes con un cianobionte, la zona de contacto se produce entre la hifa en crecimiento y la vaina gelatinosa (glicocalix) de la colonia de cianoficeas. Nunca hay

penetración ni contacto con la pared celular del endobionte.

2.- En líquenes con ficobionte, hay a veces contactos, no haustoriales, con la pared celular del alga, pero nunca penetración.

3.- En líquenes haustoriales, como los que contienen algas del género *Trebouxia*, se aprecian invaginaciones producidas por la progresión de las hifas fúngicas en la zona de contacto. En *E. prunastri*, el haustorio es intraparietal y, a veces, la pared celular del alga crece formando una vaina.

El micobionte, en la simbiosis líquénica, se reproduce sexualmente, mientras que el fotobionte (alga o cianoficea) reprime sus mecanismos de reproducción sexual, quizás controlado por el hongo de forma parásita, manteniendo así su número de células constantes.

En la configuración del talo, el micobionte parece jugar un papel clave, mientras que el fotobionte ocupa, o se encuentra limitado a una capa dentro del talo líquénico bien definida, llamada capa gonidial. La gran variedad existente de talos morfológicamente complejos puede ser atribuida al micobionte, que se esfuerza en exponer a la luz el área máxima de células del fotobionte, mejorando así su habilidad de propagarse en un ambiente, por otro lado hostil (Hawksworth y Hill, 1984).

Ha sido cuestionado que las asociaciones líquénicas sean verdaderamente mutualistas (Smith, 1975). De hecho, algunos autores afirman que el fotobionte es parasitado por el hongo (Ahmadjian y Jacobs, 1983), asegurando que la asociación alga-hongo en un líquen poco se diferencia de la relación hospedante-parásito, en la que el parasitismo, por parte del hongo, es débil y permite sobrevivir a la mayor parte de las células del hospedante algal.

Por otro lado, hay investigadores que opinan que existe una verdadera simbiosis alga-hongo en el talo líquénico,

pero el hongo mantiene al alga en un estado de esclavitud o helotismo, siendo el hongo el que obtiene el mayor beneficio en la asociación (citado por Galun, 1989).

Es evidente que, en un sentido evolutivo, los líquenes se originaron por helotismo o esclavitud del componente algal por parte del hongo, pero al menos en algunos líquenes, la asociación se ha desarrollado para formar una verdadera unión mutualista simbiótica. Generalmente, el micobionte es sólo capaz de sobrevivir con el fotobionte y éste se desarrolla en ambientes donde no podría sobrevivir aislado, por ello, la simbiosis ha de ser observada como mutualista. Al evaluar los "beneficios" obtenidos por el fotobionte, es esencial considerar las ventajas evolutivas de las poblaciones, en lugar de la de células individuales (Hawksworth y Hill, 1984).

Aún hoy día, los investigadores del campo de la liquenología no se han puesto de acuerdo para dar una única y ampliamente aceptada definición del término "líquen". Durante la asamblea general de la Asociación Internacional de Liquenología (IAL), celebrada dentro del 13° Congreso Internacional de Botánica de Sydney, en 1981, se propusieron cinco definiciones sobre el concepto de "líquen", de las cuales ninguna fue mayoritariamente aceptada, pero tampoco rechazada. Son las siguientes:

- Un líquen es una asociación de un hongo y un simbiote fotosintético cuyo resultado es un talo estable y una estructura específica. Propuesta por el Comité Terminológico de la IAL.

- Un líquen es una asociación estable y capaz de mantenerse a sí misma, de un micobionte y un fotobionte, en la cual el micobionte es el exohabitante. Propuesta por D.L. Hawksworth.

- Un líquen es una asociación hongo-alga estable que da como resultado un talo que, por lo general, difiere signifi-

cativamente de cualquiera de los simbioses en estado de vida libre (no liquenizado). Casos excepcionales de asociaciones hongo-alga que formen talos rudimentarios o mal definidos, son considerados como líquenes si el simbiote fúngico (micobionte) parece emparentado con otro taxon que forme auténtico líquen. Propuesta por I.M. Brodo.

- Un líquen es una asociación de un hongo, y unas veces, un alga y, otras una cianoficea (ocasionalmente ambos), que produce una estructura estable. Propuesta por A.L. Huber y D.K. Kidbey.

- Un líquen es una asociación simbiótica y estable de un hongo especializado y dominante con un alga, en la que los dos simbioses forman un talo concreto con una estructura peculiar. Propuesta por Wet Jiang-Chun.

El objetivo fundamental de este trabajo ha sido el estudio de la acumulación de las diferentes poliaminas en talo de *Evernia prunastri* (L.) Ach. Tal acumulación está influenciada por mecanismos de captación (síntesis), catabolismo y conjugación de éstas, estudiándose experimentalmente los tres procesos.

La caracterización experimental de un transportador para la putrescina exógenamente añadida, sentaría las bases para un estudio ulterior de la translocación de la diamina entre los simblontes liquénicos.

II. - MATERIAL Y METODOS

II.1.- MATERIAL BIOLÓGICO

El organismo utilizado en el presente trabajo ha sido el líquen *Evernia prunastri* (L.) Ach., creciendo sobre la corteza de *Quercus pyrenaica* Willd. y recogido en Valsain (Segovia).

Las muestras, limpias y secas, se almacenaron en oscuridad, a 7°C, en bolsas de plástico hasta su posterior utilización.

II.2.- VALORACION DEL PESO SECO

El peso seco se determinó gravimétricamente manteniendo los talos, después de su incubación, durante 1 h a 80°C.

II.3.- ESTIMACION DEL CONTENIDO EN AGUA DEL TALO

La cantidad de agua del talo se determinó estimando su contenido, por diferencia de pesada entre el talo hidratado (4 min en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15) y el peso seco del mismo.

El contenido de agua fue expresado en "ml.g⁻¹ peso seco del talo".

II.4.- CONDICIONES DE INCUBACION

Las incubaciones se realizaron sumergiendo fragmentos de talo líquénico, de 1 g de peso, en 25 ml de disoluciones tamponadas de acetato sódico 0,1 M, pH 5,0; fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 o Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15; de 0 a 8 h en oscuridad a 26°C. Cuando se indique, se añadió o no putrescina, así como diferentes metabolitos relacionados con la diamina.

Las modificaciones, de cualquiera de las condiciones de cultivo descritas, se indicarán en cada caso.

II.5.- SEPARACION DEL FOTOBIONTE Y EL MICOBIONTE

Cuando el estudio requirió medir distintos parámetros en cada uno de los simbioses, se procedió a su separación según modificaciones del método descrito por Ascaso (1980).

El talo fue macerado, tras la incubación, en tampón fosfato salino 10 mM, pH 7,2 o en agua destilada, agitando suavemente durante 20 min y filtrado a través de 3 capas de gasa.

El material retenido fue resuspendido, agitado y filtrado nuevamente. Ambos filtrados, conteniendo los simbioses, se juntaron y fueron centrifugados a 1000 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en sacarosa 0,25 M y alícuotas de 4 ml fueron depositadas suavemente en tubos que contenían 5 ml de KI al 80% y centrifugados a 30 x g durante 2 min. En el gradiente así formado se depositó la fracción algal en la zona intermedia, mientras que el micobionte cayó al fondo del mismo.

Cada simbiote fue recogido y lavado, tras varias centrifugaciones a 1000 x g durante 20 min, en tampón fosfato salino 10 mM, pH 7,2 o agua destilada. Una vez obtenida cada fracción de la forma descrita, quedaron preparadas para ser analizadas posteriormente según el parámetro a estimar.

Los valores obtenidos fueron referidos en unos casos al peso seco de cada fracción (apartado II.3.) y en otros, al contenido proteico (apartado II.8.).

En uno de los experimentos en el que se consideró sólo la fracción algal, se halló el rendimiento del método mediante la estimación del contenido en clorofilas de dicha fracción con respecto al talo completo, de la siguiente manera: - tanto el holobionte como las algas aisladas de la forma descrita anteriormente fueron maceradas en acetona pura. Ambos extractos se sonicaron durante 1 min a 20 KHz.s⁻¹, en un disruptor MSE, y se almacenaron en oscuridad a 10°C durante

12 h. El homogeneizado fue centrifugado a 3000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron recogidos, añadiéndoles agua hasta obtener una concentración de acetona del 80%.

El contenido de clorofilas fue estimado por el método de Arnon (1949) según la expresión:

$$20,2 \cdot DO_{665} + 8,02 \cdot DO_{663} = \text{mg de clorofilas totales} \cdot l^{-1}$$

El rendimiento obtenido por gramo de talo fue del 4,2% ± 1,07.

II.6.- VALORACION DEL CONTENIDO DE ARN

Se ensayó según el método descrito por Ramakrishna et al. (1978). En nuestro caso, los niveles de ARN se cuantificaron por la medida espectrofotométrica de los nucleósidos-3'-P del ácido, liberados por digestión alcalina (con KOH 0,3 M), a 260, 280 y 290 nm de longitud de onda, según las relaciones:

a) $DO_{260} - DO_{280}$ (cuantificación nucleósidos-3'-P)

b) DO_{260} / DO_{280} (medida de la pureza del ARN extraído)

usando como patrón ARN de levadura.

Las muestras de talo, después del tratamiento, fueron lavadas con agua destilada y secadas suavemente con papel de filtro. A continuación se maceraron en un mortero a 4°C, con 10 ml de acetona 100%; se eliminó la acetona por filtración a través de una doble capa de gasa y el extracto se dejó secar al aire.

Se añadieron 10 ml de ácido perclórico (HClO₄) al 5%, conteniendo β-mercaptoetanol 5 mM y se mantuvieron a 7°C durante una noche. Se centrifugaron en una Beckman JA-21, durante 30 min, a 46.000 x g a 2°C.

Los precipitados así obtenidos, se lavaron dos veces

con 10 ml de cada uno de los siguientes disolventes: etanol al 95%, etanol-éter (3:1 v/v) y éter al 100%, eliminando, en cada paso, el sobrenadante por centrifugación a 4.000 x g, durante 10 min a 2°C. Los precipitados se dejaron secar en un baño a 37°C y se resuspendieron en 8 ml de agua destilada, filtrándolos a través de filtros Millipore GS, de 0,22 µm de diámetro de poro.

Para la digestión del ARN extraído, se añadió a los filtrados 2 ml de KOH 1,5 M, permaneciendo durante 16 h a 37°C. Pasado este tiempo se adicionaron 120 µl de HClO, y se centrifugaron a 2.800 x g, durante 10 min, a fin de eliminar las proteínas y el ADN precipitados con el ácido.

Posteriormente se midió la absorbancia de los sobrenadantes, a las longitudes de onda señaladas anteriormente, en un espectrofotómetro Zeiss PM-2. En todos los ensayos se realizaron controles en los que no se incluía el extracto líquénico.

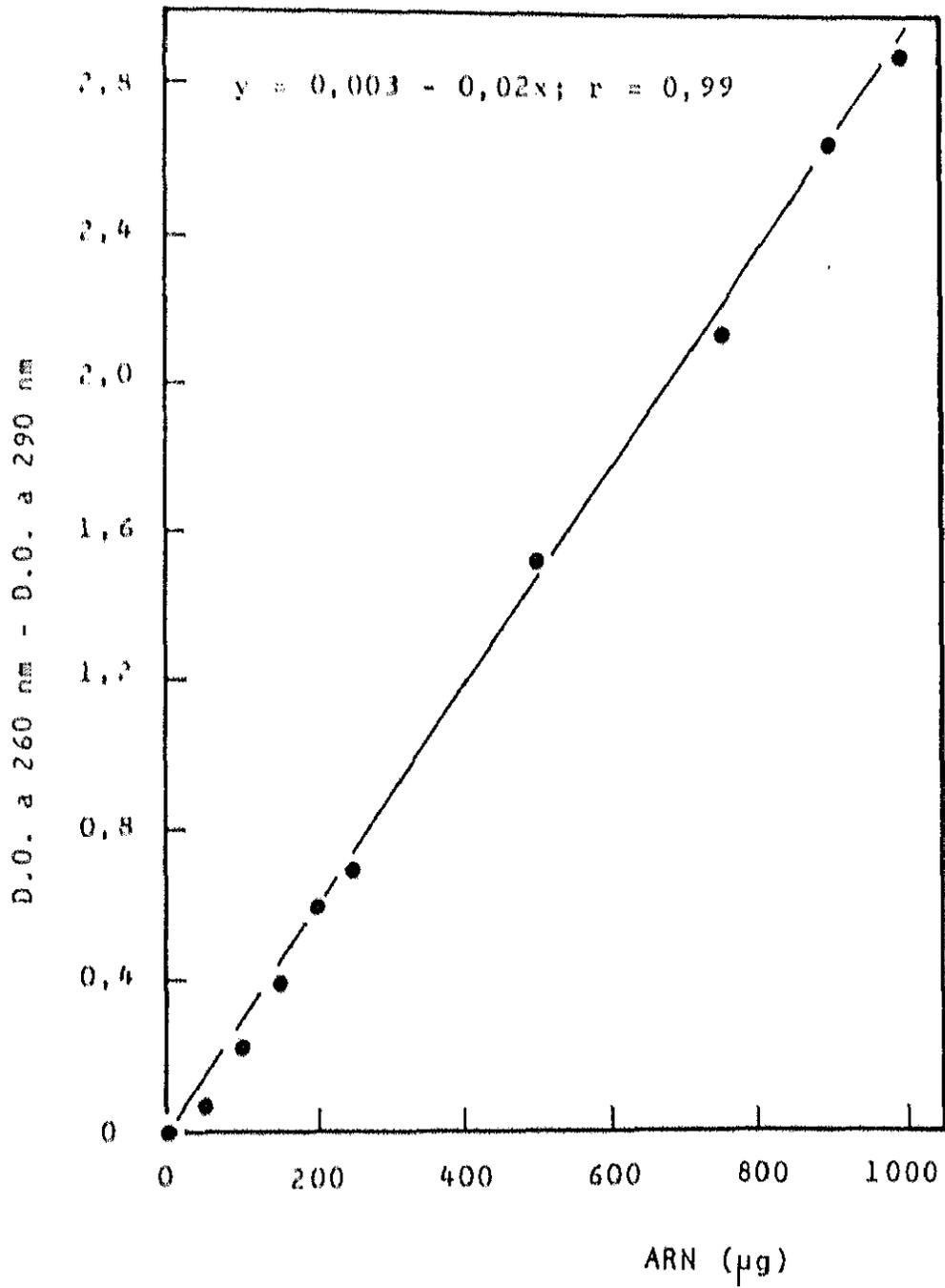
El valor de absorbancia, según la relación a), se transformó en µg de ARN, utilizando una recta patrón construida con cantidades crecientes y conocidas de ARN de levadura y procesadas de la forma descrita anteriormente (Fig.8).

II.7.- VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

II.7.1.- Actividad Ribonucleasa

La actividad ARNasa (EC 3.1.27.-) se valoró según el método descrito por Cherry (1973), estimando espectrofotométricamente la cantidad de ARN hidrolizado.

FIGURA 8.- Recta de calibrado de ARN utilizando diferentes concentraciones del ácido nucleico patrón.



El extracto libre de células se obtuvo, en este caso, macerando 1 g de talo en un mortero de porcelana porosa, a 4°C, con 10 ml de tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 y centrifugando durante 20 min, a 9.500 x g, 2°C; filtrando a continuación el sobrenadante.

Las mezclas de reacción contenían: 0,2 ml del extracto libre de células; 0,8 ml de tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0; 2 mg de ARN de levadura disuelto en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 y 1 ml de una disolución que contenía sacarosa 0,5 M, KCl 10 mM y MgSO₄ 1 mM en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0. Los controles se llevaron a cabo con las mismas mezclas de reacción pero en ausencia de ARN de levadura.

Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a 30°C y la reacción se finalizó enfriándolas sobre hielo. A continuación se añadieron 0,5 ml de una disolución que contenía HClO₄ 1 M y acetato de uranilo 25 mM; se centrifugaron durante 10 min a 450 x g y se guardaron los sobrenadantes (A). A los precipitados se les añadió, dos veces, 3 ml de una disolución de HClO₄ 2 M y acetato de uranilo 10 mM, centrifugando, en cada paso, 10 min a 450 x g y guardandose los sobrenadantes así obtenidos (B y C). En cada caso se mezclaron los tres sobrenadantes (A, B y C) y se completaron sus volúmenes hasta 10 ml con la disolución que contenía HClO₄ 0,2 M y acetato de uranilo 10 mM.

El ARN patrón hidrolizado se cuantificó midiendo las absorbancias a 260 y 290 nm, según la expresión:

$$DO_{260} - DO_{290} = 1 = 57 \mu\text{g ARN hidrolizado}$$

La unidad de actividad específica se definió como " μg de ARN hidrolizado por mg de proteína y por minuto".

11.7.2.- Actividad diamino oxidasa

La actividad DAO se valoró espectrofotométricamente, por el método de Solorzano (1969), estimando la cantidad de amonio producido a través de la formación de indofenol, según las etapas de reacción:

- a) putrescina + O₂ + H₂O -----> γ-aminobutiraldehído + H₂N + H₂O₂
 b) H₂N + NaClO -----> H₂ClN + NaOH
 c) H₂ClN + fenol + NaOH -----> p-aminofenol + NaCl + H₂O
 d) p-aminofenol + fenol + O₂ ----> indofenol + H₂O

El indofenol se cuantificó midiendo el color desarrollado a 640 nm.

Los reactivos empleados, almacenados a 4°C, fueron:

1- Disolución de fenol-alcohol:

10 g fenol / 100 ml alcohol etílico al 95%

2- Nitroprusiato sódico (Na₂[Fe(CN)₅NO]₂H₂O) al 0,5%:

1 g nitroprusiato sódico / 200 ml agua (preservado de la luz)

3- Disolución alcalina:

100 g citrato trisódico + 5 g NaOH / 500 ml agua

4- Hipoclorito sódico (al menos 1,5 N)

5- Disolución oxidante:

100 ml solución 3 / 25 ml solución 4 (preparada en el día)

El extracto libre de células se obtuvo, en este caso, macerando el talo, tras la incubación, con 10 ml de tampón fosfato sódico 75 mM, pH 6,9. En este ensayo, también se valoró la actividad DAO secretada a los medios, recogiendo éstos tras la incubación. Ambos extractos se centrifugaron a 11.500 x g durante 20 min a 2°C, se filtraron los sobrenadantes y se dializaron los filtrados, durante 18 h, frente al tampón de

maceración, a 7°C.

Las mezclas de reacción contenían: 260 μ moles de fosfato sódico, pH 6,9; 5 μ moles de putrescina y 1 ml del extracto libre de células. Los controles se llevaron a cabo con las mismas mezclas de reacción, pero con extracto libre de células hervido durante 20 min. Las mezclas de reacción se mantuvieron durante 20 min a 30°C, posteriormente se les añadió 1 ml la disolución de fenol, 1 ml de nitroprusiato sódico y 3 ml de la disolución oxidante. Una vez agitadas las mezclas, se esperó durante 1 h antes de medir el color desarrollado a 640 nm.

Los valores de absorbancia se transformaron en μ moles de amonio interpolando en una recta patrón construida con cantidades conocidas de sulfato amónico, procesadas de la misma forma que las mezclas de reacción.

La unidad de actividad específica se definió como " μ moles de amonio producidos por mg de proteína y por minuto".

II.8.- VALORACION DE PROTEINAS

Las proteínas se valoraron, en los extractos previamente dializados, según el método de Lowry et al. (1951), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

II.9.- VALORACION DE PUTRESCINA LIBRE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA (UV)

II.9.1.- Extracción de putrescina

Una vez realizada la incubación de 2 g de talo liquénico, en las condiciones que se indique, se maceraron con éter etílico al objeto de eliminar los fenoles, se filtraron a través de una doble capa de gasa y fueron secados en vacío.

Los medios de incubación se recogieron y trataron de la misma forma descrita para los talos.

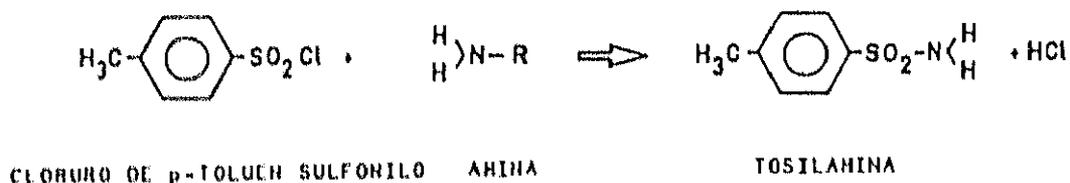
Ambos extractos secos fueron macerados en 15 ml de HClO, frío al 5%, conteniendo etilamina como patrón interno, y mantenidos durante 1 h en hielo. Los homogeneizados se centrifugaron posteriormente a 48.000 x g durante 20 min a 2°C. Los sobrenadantes fueron recogidos y neutralizados con NaOH 0,1 N hasta un pH final de 7,0 y filtrados a través de filtros Millipore GS, de 0,22 µm de diámetro de poro, eliminándose de esta forma las sales formadas.

En último lugar, los filtrados se liofilizaron y se resuspendieron en 2 ml de agua destilada.

II.9.2.- Derivatización de putrescina (tosilación)

Una vez extraída la diamina, se derivatizó con cloruro de p-toluensulfonilo (ClTs), según el método descrito por Sugiura et al. (1975), modificado por nosotros.

REACCION DE TOSILACION DE AMINAS PRIMARIAS



Al extracto acuoso se le añadió 1 ml de bicarbonato sódico 0,5 M y 30 mg de ClTs disueltos en 3 ml de acetona pura, permaneciendo durante 1 h a 70°C. Posteriormente se dejó enfriar sobre hielo y se añadieron 5 ml de NaOH 2 N, lavándolo 2 veces con 5 ml de n-hexano acompañado de una fuerte agi-

tación.

Una vez eliminada la fase orgánica, se añadieron a la fase acuosa resultante 7,5 ml de HCl 2 N y 5 ml de cloroformo, sucesivamente. La fase clorofórmica fue recogida, filtrada a través de sulfato sódico anhidro y evaporada a sequedad. El residuo seco fue resuspendido en 2 ml de metanol (grado HPLC) para su posterior cuantificación.

Como patrones se utilizaron poliaminas comerciales preparadas de la forma descrita.

II.9.3.- Separación y cuantificación de putrescina

El análisis y cuantificación de putrescina libre tosilada se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución, en un cromatógrafo líquido Varian 5000, equipado con un integrador Vista CDS 401, bajo las siguientes condiciones de análisis:

- columna: fase reversa C18, Micro-Pak MCH-10, 4mm x 30cm, rellena con partículas de 10 μ m
- fase móvil: metanol:agua (65:35 v/v)
- flujo: 1 ml.min⁻¹
- temperatura: 25°C
- presión: 130 atm
- atenuación: 8
- detector: UV a 254 nm; 0,004 UAFE
- patrón interno: etilamina (0,66 μ g)
- volumen de inyección: 10 μ l

La cuantificación de putrescina se llevó a cabo utilizando una recta de calibración indirecta de putrescina en función del patrón interno (etilamina), procesados de la forma descrita en el apartado II.9.2.

II.10.- VALORACION DE POLIAMINAS LIBRES Y CONJUGADAS POR HPLC Y DETECCION POR FLUORESCENCIA

II.10.1.- Extracción de poliaminas libres y conjugadas

La extracción de poliaminas totales se llevó a cabo macerando los talos, tras la incubación que se especifique, en ácido tricloroacético (TCA) frío al 5%, conteniendo n-butilamina como patrón interno.

Los medios de incubación se recogieron, se filtraron y se mezclaron con un volumen suficiente de TCA frío al 25% hasta una concentración final de ácido del 5%.

Las muestras fueron almacenadas en tubos de plástico durante 12 h a 5°C, siendo posteriormente centrifugadas a 48.000 x g durante 20 min a 2°C. Se recogieron los sobrenadantes y los precipitados se resuspendieron en un volumen de NaOH 1 N, conteniendo el patrón interno n-butilamina, igual al volumen inicial de TCA.

Con objeto de valorar las poliaminas conjugadas, se realizó una hidrólisis ácida, según el método descrito por TIBURCIO et al. (1985). Para ello, se mezclaron el precipitado resuspendido, así como parte del sobrenadante, con HCl 12 N en la proporción 1:1 (v/v) en ampollas de vidrio selladas en llama, permaneciendo las muestras durante 18 h a 110°C. Los hidrolizados fueron centrifugados a 30.000 x g durante 15 min a 2°C para eliminar el material carbonizado.

El sobrenadante no hidrolizado conteniendo las poliaminas libres (S), el sobrenadante hidrolizado conteniendo poliaminas libres y las conjugadas solubles en ácido (SH), así como el precipitado conteniendo los conjugados de poliaminas insolubles en ácido (PH), fueron secados a 70°C bajo corriente de aire y resuspendidos posteriormente en 2 ml de agua bidestilada.

El TCA fue extraído por lavados sucesivos con 5 ml

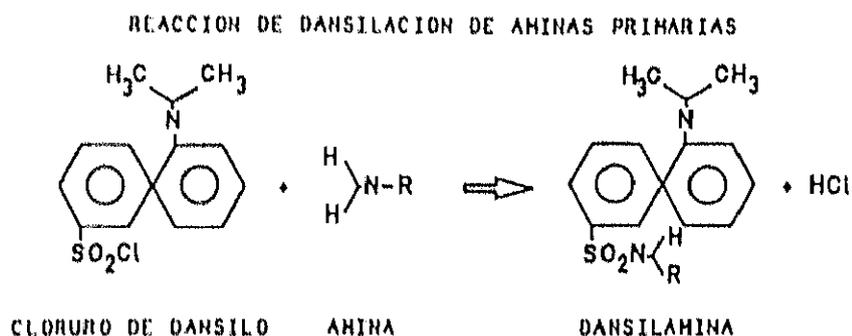
de éter etílico, siendo necesario este paso ya que la posterior reacción de derivatización requiere valores de pH alcalinos.

La fase etérea se separó, después de una centrifugación a $5.000 \times g$ durante 5 min, y fue desechada. El extracto acuoso se almacenó a -20°C hasta su posterior derivatización. El procedimiento esquematizado se muestra en la Figura 9.

Los patrones comerciales: n-butilamina, putrescina, espermidina y espermina, se disolvieron directamente en agua destilada.

II.10.2.- Derivatización de poliaminas (dansilación)

Una vez extraídas las poliaminas libres, así como las de los conjugados, se derivatizaron con cloruro de dansilo (ClDns) según el método descrito por Smith y Best (1977).



Para ello, se añadió a 0,2 ml del extracto acuoso, conteniendo las poliaminas, 100 mg de bicarbonato sódico y 0,4 ml de ClDns (30 mg. ml^{-1} de acetona). Tras fuerte agitación, los recipientes cerrados fueron almacenados en oscuridad durante 16 h a temperatura ambiente. Después se les añadieron

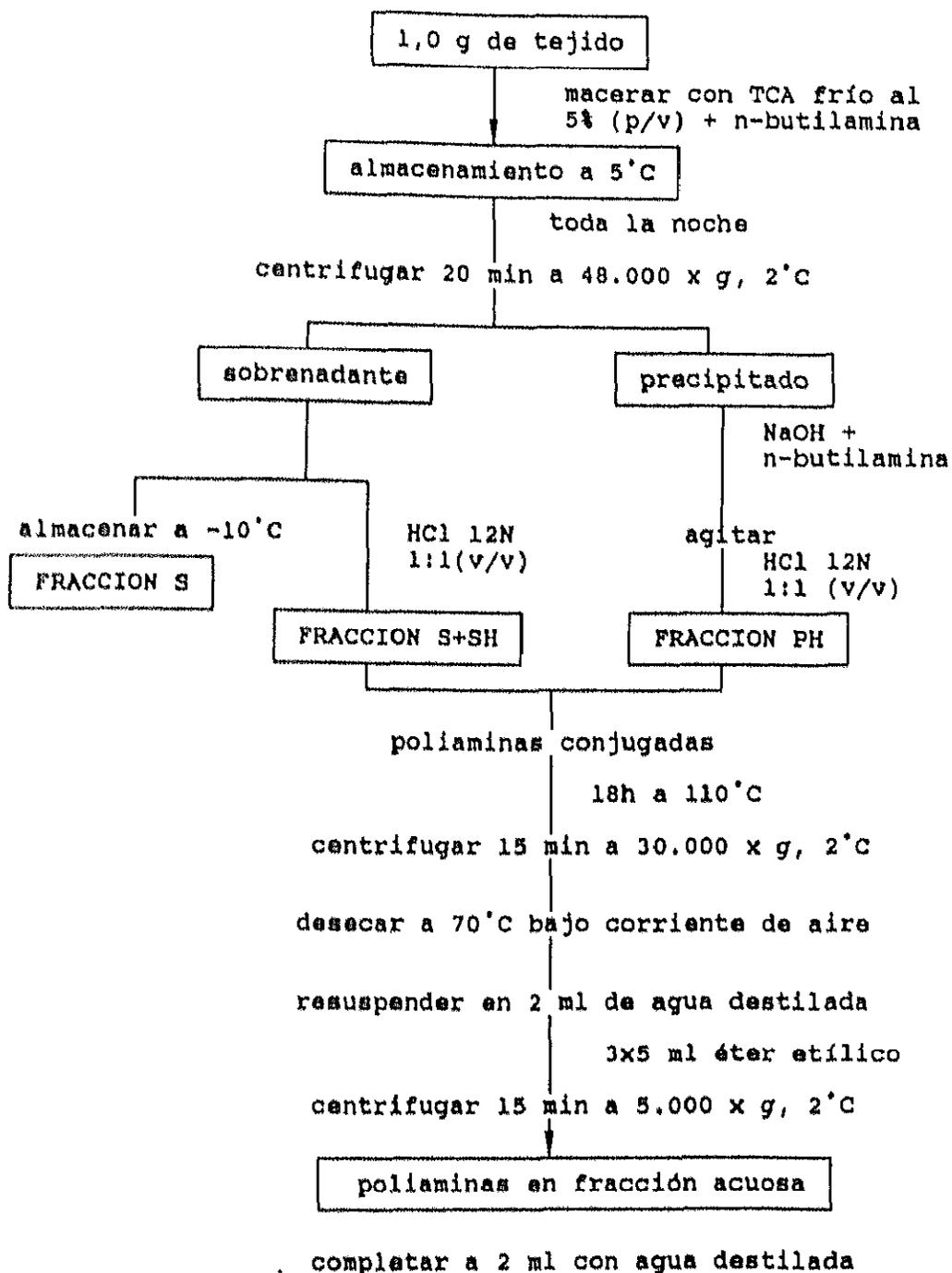


FIGURA 9.- Extracción de poliaminas libres y conjugadas.

40 mg de L-prolina en 0,2 ml de agua bidestilada, manteniéndolos durante 30 min a fin de destruir el exceso de ClDns.

Posteriormente las muestras fueron mantenidas a 65°C bajo corriente de aire hasta su total desecación. El residuo seco fue resuspendido en 0,2 ml de agua bidestilada y las poliaminas dansiladas fueron extraídas con 3 ml de tolueno (grado HPLC), secando, por último, el disolvente.

Las poliaminas dansiladas almacenadas a -20°C en oscuridad se mostraron químicamente estables durante varios meses.

Una vez terminada la derivatización, se realizó una limpieza de las muestras por hidrólisis alcalina, según el método descrito por Seiler y Knödgen (1979).

El extracto toluénico seco se mezcló con 600 µl de KOH 5 M en metanol y se mantuvo durante 45 min a 50°C a fin de eliminar los derivados dansilados fácilmente hidrolizables.

Posteriormente, se añadieron 1,5 ml de una mezcla que contenía 200 mg de KH_2PO_4 y 200 mg de Na_2HPO_4 en agua destilada. Las poliaminas dansiladas fueron extraídas con 3 ml de tolueno. El extracto toluénico fue recogido, evaporado a sequedad y el residuo fue resuspendido en 1 ml de metanol (grado HPLC) para su posterior análisis y cuantificación. El tratamiento de derivatización y limpieza se muestra en la Figura 10.

II.10.3.- Separación y cuantificación de poliaminas

El análisis y cuantificación de poliaminas dansiladas libres y conjugadas, se llevó a cabo por HPLC, en un cromatógrafo líquido Varian 5060 equipado con un integrador Vista CDS 401 y un detector de fluorescencia Fluorichrom TM de Varian, con una célula de 12,5 µl de volumen, utilizándose una combinación de filtros cuyo resultado proporcionó una longitud

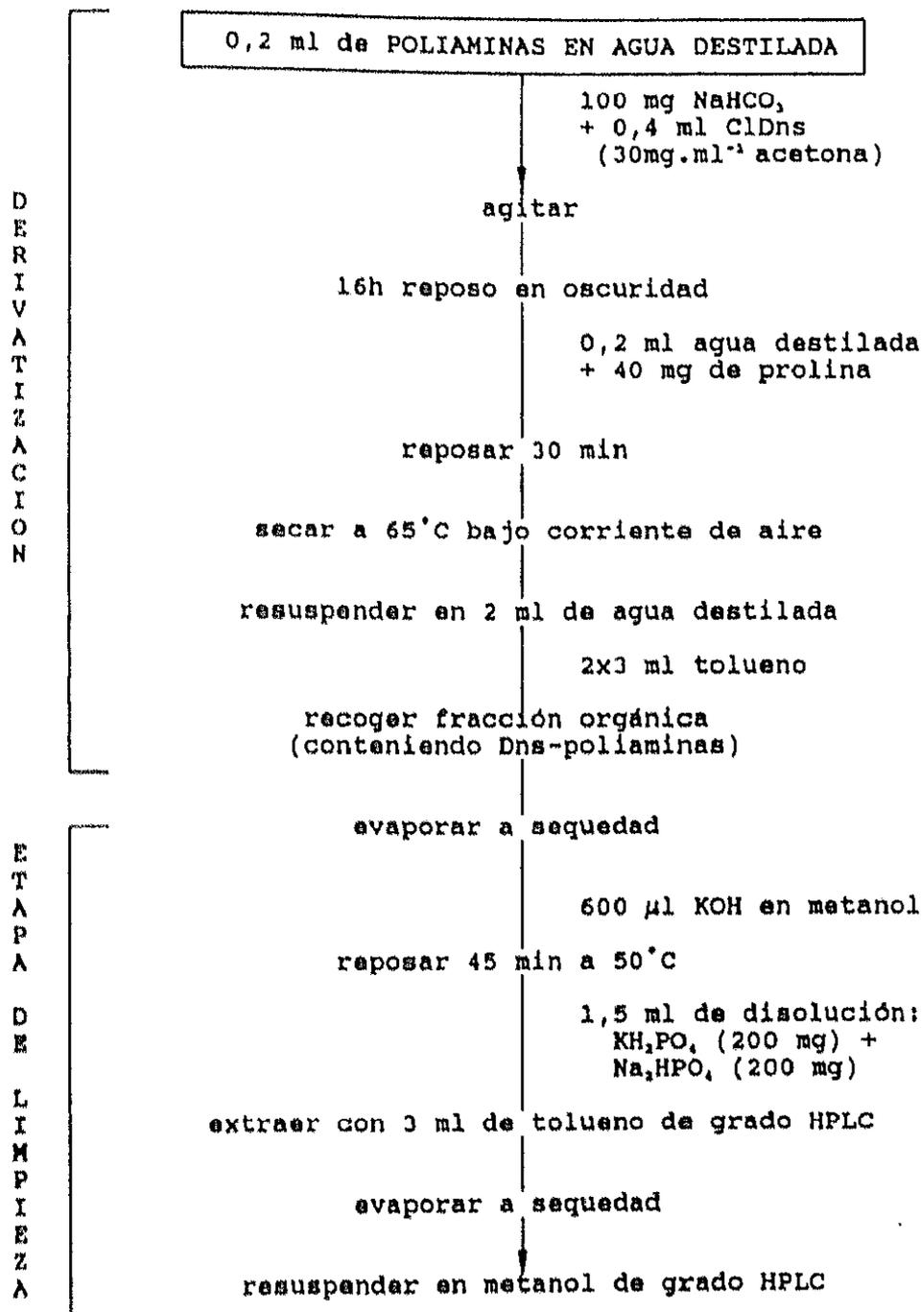


FIGURA 10.- Esquema de derivatización de poliaminas y limpieza post-derivatización.

de onda de excitación de 340 a 380 nm (ref. nº 7-54 y 7-60, Varian) y una longitud de onda de emisión de 460 nm (ref. nº 3-71 y 4-76, Varian). Las condiciones de análisis fueron:

- columna: fase reversa, C_{18} , Micro-Pak MCH-5N cap, de 15cm x 4mm, rellena con partículas de 5 μ m.
- fase móvil: metanol:agua en gradiente lineal del 60% al 85% de metanol en 15 min, manteniéndose ésta última composición hasta los 20 min.
- flujo: valor inicial de 0,7 ml x min⁻¹ incrementando a 1,7 ml x min⁻¹ en 15 min, manteniéndose este valor de flujo hasta los 20 min.
- temperatura: 40°C \pm 0,1°C.
- atenuación: 128
- patrón interno: n-butilamina (0,29 μ g)
- volumen de inyección: 10 μ l

La cuantificación de poliaminas se llevó a cabo realizando una recta de calibración indirecta, construida con cada una de las poliaminas patrón comerciales en función del patrón interno (n-butilamina) y procesados de la forma descrita en el apartado II.10.2.

II.11.- TRANSPORTE Y ADSORCION DE PUTRESCINA

II.11.1.- Tratamiento de las muestras

Para el estudio del transporte y la adsorción de putrescina se usaron técnicas isotópicas, mediante el empleo de mezclas de putrescina fría y 1,4[¹⁴C]-putrescina (111 mCi.mmol⁻¹) (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra).

Los talos liquénicos fueron previamente humedecidos con agua destilada, colocándolos en una placa Petri sobre papel de filtro humedecido e iluminados durante 15 h a una temperatu-

ra entre 15 y 18°C.

La iluminación a la que fueron sometidos presentaba una densidad de fluencia fotónica de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a nivel de talo liquénico.

Posteriormente se cortaron trozos de talo, cuyo peso húmedo osciló entre 8 y 30 mg, siendo hidratados durante 4 min en el tampón correspondiente, según el medio de incubación empleado en su estudio posterior.

Las incubaciones fueron realizadas en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 en oscuridad a 26°C, siempre que no se indique lo contrario.

II.11.2.- Medida del transporte y la adsorción

Una vez incubados, se recogieron los medios y los talos fueron sumergidos durante 2 min en TCA frío al 5%, con objeto de extraer y medir la diamina que permanece adsorbida sobre los talos.

Se determinó su peso seco y se extrajo de ellos la putrescina transportada, macerándolos con TCA frío al 5% y manteniéndolos durante una noche a 10°C. Se centrifugaron a $1.000 \times g$ durante 20 min y se cuantificó la radiactividad contenida en el sobrenadante tomando alícuotas de 400 μl y depositándolas en viales de centelleo que contenían 5 ml de mezcla NE-266 (Nuclear Enterprise, para muestras acuosas).

La medida de radiactividad se llevó a cabo en un contador de centelleo líquido Intertechnique SL 30.

Para la estimación de la radiactividad remanente en los medios de incubación, así como la adsorbida a los talos y extraídas por el lavado con TCA, se tomaron alícuotas de 50 y 200 μl , respectivamente, las cuales se incluyeron directamente en los viales, siendo procesadas de la manera descrita anteriormente.

La eficacia del conteo (%) fue evaluada en cada

experimento con los patrones o el medio empleado previa incubación.

Los valores del transporte y la adsorción fueron expresados como " $\mu\text{moles de putrescina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ peso seco".

II.11.3.- Medida del transporte y la adsorción de putrescina en función del pH

El efecto del pH en el transporte y adsorción de la diamina fue estudiado usando distintos medios tamponados:

- A - Tampón ácido cítrico - fosfato disódico 0,15 M, de pH 4,0 a 7,0.
- B - Tampón fosfato sódico 0,2 M, de pH 6,0 a 8,0.
- C - Tampón Tris-HCl 0,1 M, de pH 7,5 a 8,9.
- D - Tampón glicina - NaOH 0,2 M, de pH 8,5 a 10,6.

Las muestras fueron tratadas como se describe en los apartados II.11.1. y II.11.2., incluyendo en los medios de incubación 1 ml de putrescina 5 mM, conteniendo 0,15 μCi de 1,4[^{14}C]-putrescina por ml de medio y manteniéndolos durante 1 h en oscuridad a 26°C.

II.11.4.- Determinación de las constantes cinéticas del transporte

II.11.4.1.- Estimación de la K_m y V_{max}

Para la determinación de la K_m y V_{max} se procedió de la forma descrita en los apartados II.11.1. y II.11.2., variando la concentración de putrescina de 1 a 50 mM y añadiendo 0,15 μCi de 1,4[^{14}C]-putrescina por ml de medio, en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 durante 1 h en oscuridad a 26°C.

El valor de K_m y V_{max} se determinó según la represen-

tación de Lineweaver-Burk (1939) y Eadie-Hofstee (1959). Previa eliminación del componente difusor mediante el ajuste de una recta de regresión a los cuatro primeros valores del transporte total.

II.11.4.2.- Estimación de la concentración I_{50} y K_i

Como inhibidores del transporte de putrescina se ensayaron las poliaminas espermidina y espermina.

En primer lugar se construyó la curva "dosis-respuesta" manteniéndose constante la concentración de la diamina en 5 mM (conteniendo 0,25 μ Ci de 1,4[14 C]-putrescina por ml) y variando la de espermidina entre 0,25 y 30 mM y la de espermina entre 0,25 y 50 mM. El ensayo se realizó en medios tamponados a pH 9,15 con Tris-HCl 0,1 M, durante 1 h en oscuridad y a 26°C.

El valor I_{50} se determinó representando logarítmicamente el porcentaje del transporte frente a la concentración del inhibidor.

La cinética de inhibición fue determinada variando la concentración de putrescina entre 2 y 20 mM (conteniendo 0,25 μ Ci de 1,4[14 C]-putrescina por ml), sin inhibidor y con dos concentraciones de espermidina (1 y 3 mM) o espermina (0,75 y 2 mM).

Los valores de V'_{max} y K_{app} , en cada caso, se estimaron mediante la representación de Lineweaver-Burk. Los valores de K_i se obtuvieron, en cada caso, representando los valores de las pendientes, obtenidas en el cálculo de regresión de dobles inversas, frente a la concentración del inhibidor y determinando el punto de intersección de la función con el eje de abscisas.

La metodología utilizada en el estudio de los posibles efectores del transporte y la adsorción (análogos estructurales de putrescina, aminoácidos, cationes y fenoles

liquénicos) se detallará en el apartado correspondiente de Resultados.

II.11.5.- Transformación de putrescina

Para el estudio de la transformación de putrescina en espermidina, espermina o en ambas, las poliaminas fueron aisladas e identificadas por cromatografía en capa fina (TLC).

Una vez realizada la incubación de los talos, las poliaminas fueron extraídas según el apartado II.11.2.; en este caso, los medios fueron mezclados con TCA frío al 25% hasta obtener una concentración de TCA del 5%. Talos y medios de incubación fueron procesados de la misma manera.

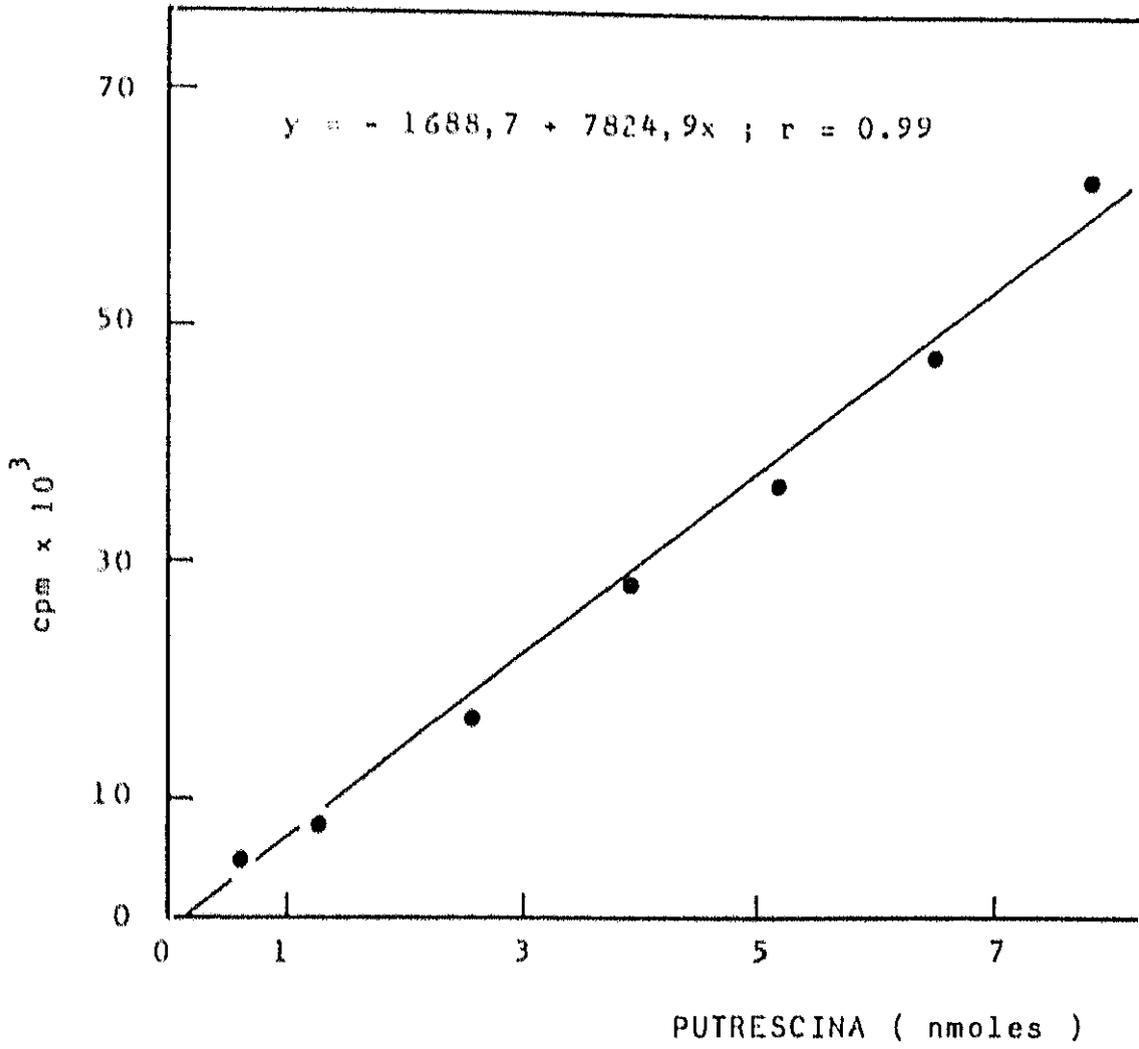
Una vez extraídas las poliaminas, se midió, mediante la toma de alícuotas, la radiactividad total presente en talos y medios. El resto del extracto fue secado totalmente a 65°C, bajo corriente de aire, resuspendido en 200 µl de agua destilada y dansilado según lo descrito en el apartado II.10.2.

Las poliaminas dansiladas y secas se resuspendieron en 100 µl de tolueno y fueron aplicadas en una capa de gel de sílice 60F254 (Merck) (20 x 20 cm) de 2 mm de grosor, previamente activada a 110°C durante 1 h. Como sistema de desarrollo ascendente se utilizó ciclohexano : acetato de etilo 1:1 (v/v). La cromatografía se desarrolló 3 veces consecutivas, previa desecación, a fin de obtener una mejor resolución.

Las poliaminas fueron visualizadas por fluorescencia inducida con una luz UV de 366 nm, en una lámpara DESAGA, e identificadas comparando su movilidad cromatográfica frente a la de poliaminas patrones dansiladas. Cada una de las manchas fue recogida e introducida en un vial, conteniendo 5 ml de líquido de centelleo y cuantificada su radiactividad.

Mediante el empleo de 1,4[¹⁴C]-putrescina dansilada se estableció que la recuperación de la radiactividad, en el empleo de la técnica de TLC, era superior al 85% (Fig.11).

FIGURA 11.- Recta patrón construida con diferentes concentraciones de 1,4[¹⁴C]-putrescina comercial extraída tras su cromatografía en capa fina.

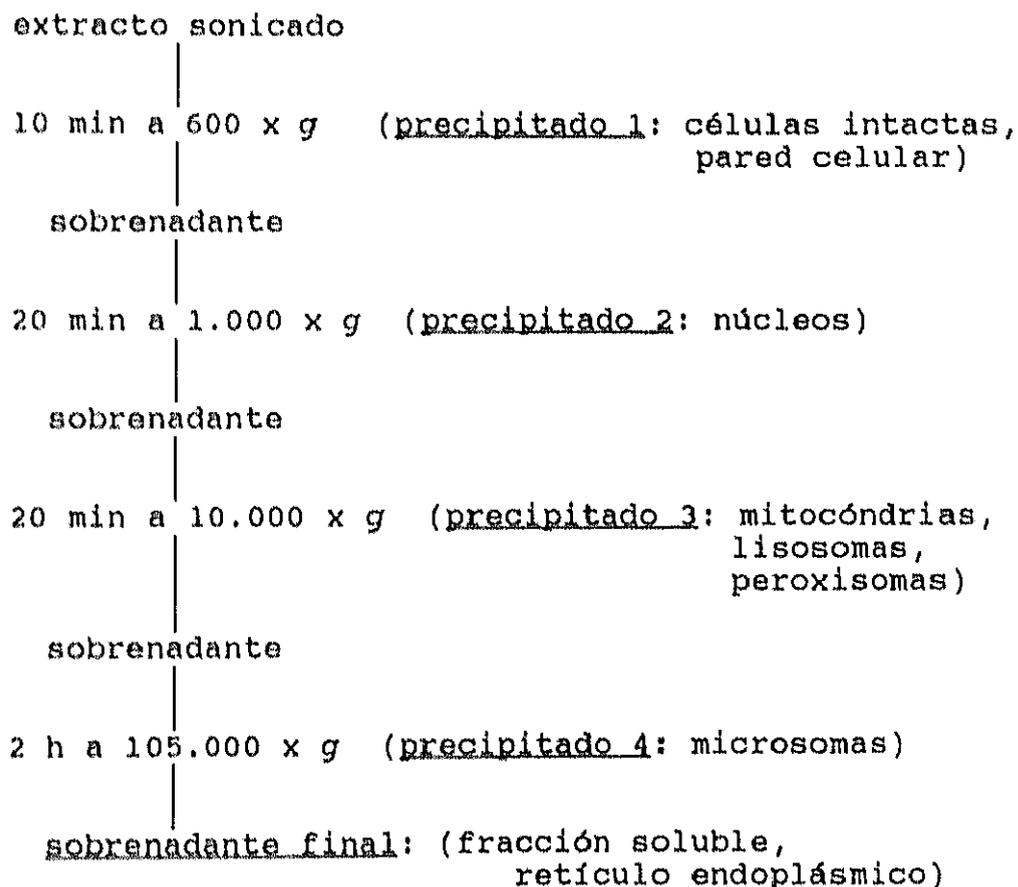


II.11.6.- Fraccionamiento celular

Para el desarrollo de este estudio, se partió de talos liquénicos cuyo peso osciló entre 121 y 125 mg de peso fresco. Las muestras fueron incubadas en 2 ml de putrescina 10 mM, conteniendo 0,75 μCi de 1,4[^{14}C]-putrescina por ml de medio, tamponados a pH 9,15 con Tris-HCl 0,1 M, durante 1 h y 30 min, en oscuridad a 26°C.

Los talos se lavaron con TCA frío al 5%, durante 2 min, siendo, después, macerados con 4 ml de tampón fosfato salino 10 mM, pH 7,2. Posteriormente fueron sonicados, durante 45 s, a 10 KHz.s $^{-1}$, en un disruptor MSE.

A continuación y tras sucesivas centrifugaciones (ver esquema, tomado de Bagni y Pistocchi, 1985, con ligeras modificaciones) se recogieron las correspondientes fracciones celulares:



Cada uno de los precipitados fue resuspendido y macerado en 1 ml de TCA frío al 5%, sonificado nuevamente y cuantificada su radiactividad, según lo descrito en el apartado II.11.2.

II.12.- ANALISIS ESTADISTICO Y PROCESO DE DATOS

Para el conjunto de valores obtenidos de los diferentes ensayos para cada punto, se calculó la media aritmética y la desviación estándar.

El ajuste de rectas fue realizado por el método de mínimos cuadrados.

III. - RESULTADOS

III.1.- EFECTO FISIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE PUTRESCINA

Se pretende estudiar la modificación de ciertos parámetros debida al pH, a la presencia de putrescina o a ambos factores.

Para ello, los talos liquénicos se mantienen en oscuridad a 26°C, entre 4 min (rehidratación) y 8 h en diferentes tampones: acetato sódico 0,1 M, pH 5,0; fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, con o sin putrescina 40 mM. Estas condiciones serán mantenidas en los sucesivos apartados, mientras no se indique lo contrario.

III.1.1.- Sobre el peso seco

La estimación del peso seco se llevó a cabo según se describe en el apartado II.2.

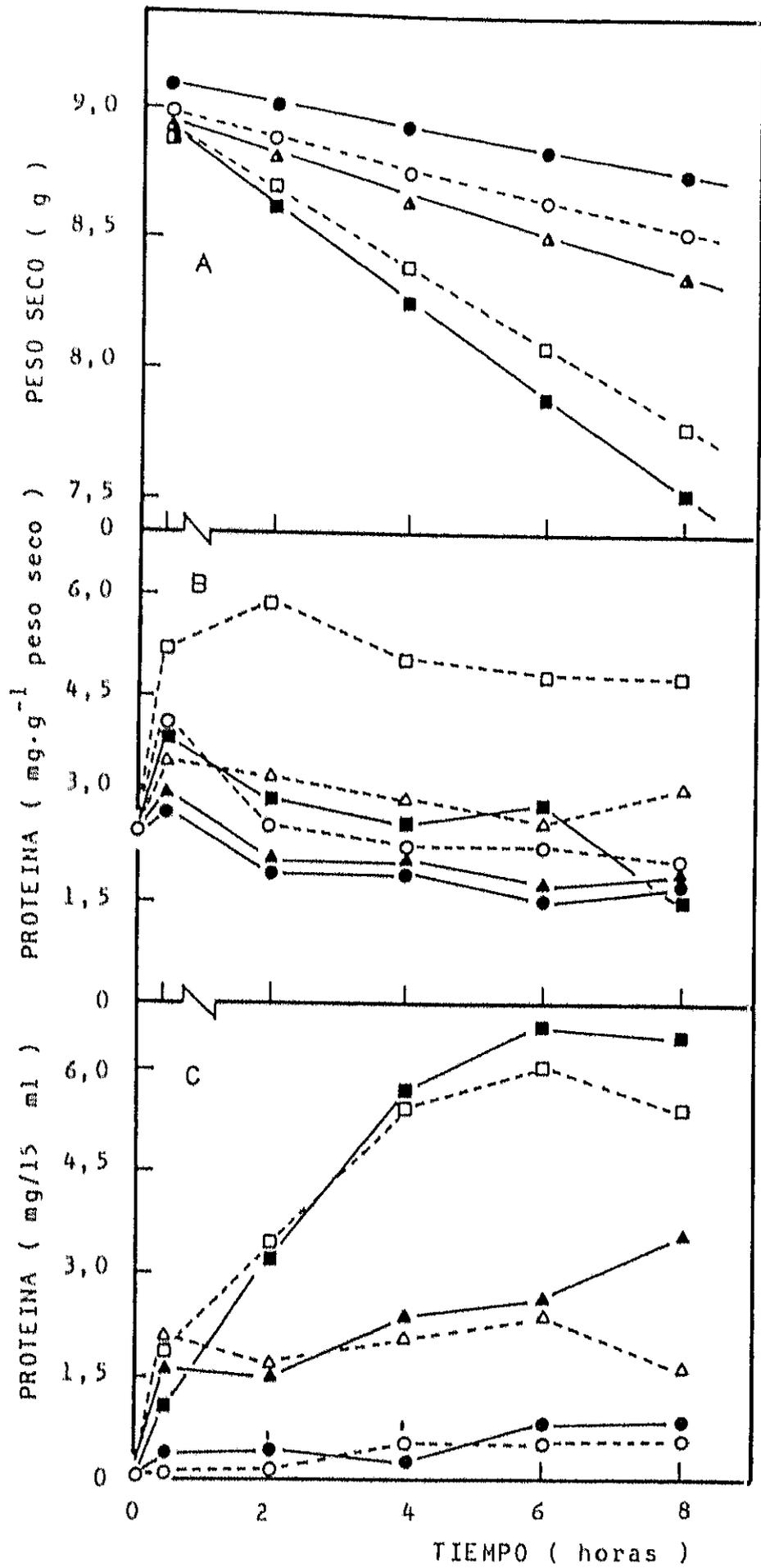
En la Figura 12A se representa las pérdidas de peso debidas al tratamiento. El ajuste de los valores por mínimos cuadrados dió los siguientes resultados (Tabla II):

TABLA II.-

<u>Incubación</u>	<u>Ecuación de la recta</u>	
tampón pH 5,0	$y = -0,005x + 0,90$	$r = 0,97$
putrescina pH 5,0	$y = -0,004x + 0,91$	$r = 0,88$
tampón pH 6,9	$y = -0,007x + 0,90$	$r = 0,97$
putrescina pH 6,9	$y = -0,007x + 0,90$	$r = 0,98$
tampón pH 9,15	$y = -0,014x + 0,90$	$r = 0,90$
putrescina pH 9,15	$y = -0,017x + 0,90$	$r = 0,92$

Como puede observarse, existe una pérdida de peso a medida que el medio se alcaliniza, hecho que no se modifica cuando los tratamientos se realizan en presencia de putrescina.

FIGURA 12.- Variación del peso seco (A), del contenido proteico del talo (B) y de las proteínas secretadas al medio (C) con el tiempo de incubación de talos de *E. prunastri*. Las incubaciones fueron realizadas en diferentes medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 (●, ○); fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 (▲, △) y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 (■, □); en presencia (símbolos llenos) o ausencia (símbolos vacíos) de putrescina 40 mM.



III.1.2.- Sobre el contenido y la secreción de proteínas

En las condiciones descritas, se determinó la cantidad de proteínas en los talos, así como su secreción al medio, a lo largo de las 8 h de tratamiento. Las proteínas se valoraron según se describe en el apartado II.8.

Como se muestra en la Figura 12B, en general, existe un incremento en el contenido proteico de los talos, tras 4 min de rehidratación, cesando posteriormente y manteniéndose niveles constantes hasta las 8 h. Así mismo, se observa que dichos niveles de proteínas son menores cuando la diamina está presente en los medios de incubación. Cabe destacar el marcado incremento cuando el pH de incubación es de 9,15, manteniéndose los niveles altos a lo largo de todo el tratamiento.

La putrescina no parece modificar el efecto que claramente ejerce el pH de incubación sobre la secreción proteica, a medida que éste incrementa se secreta una mayor cantidad de proteínas (Fig. 12C).

III.1.3.- Sobre el contenido de ARN y la actividad ARNasa

El contenido de ARN y la actividad ARNasa se determinaron según lo descrito en los apartados II.6. y II.7.1. respectivamente.

El contenido en ARN de los talos incrementa una vez rehidratados, en presencia de la diamina a pHs 6,9 y 9,15, pero disminuye en los demás tratamientos. A lo largo de las 8 h los valores oscilan alrededor de $75 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco, rindiendo al final del tratamiento valores relativamente más altos cuando la diamina está presente en los medios (Fig. 13A).

La actividad ARNasa incrementa a los 4 min, en paralelo a la evolución en el contenido de ARN, incremento que se mantiene a pH 5,0 y 6,9 en presencia o ausencia de putrescina. Sin embargo, dicha actividad decrece progresivamente hasta

FIGURA 13.- Variación del contenido en ARN (A) y evolución de la actividad ARNasa (B) con el tiempo de incubación de talos de *E. prunastri*. Las incubaciones fueron realizadas en medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 (●, ○); fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 (▲, △) y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 (■, □); en presencia (símbolos llenos) o ausencia (símbolos vacíos) de putrescina 40 mM.

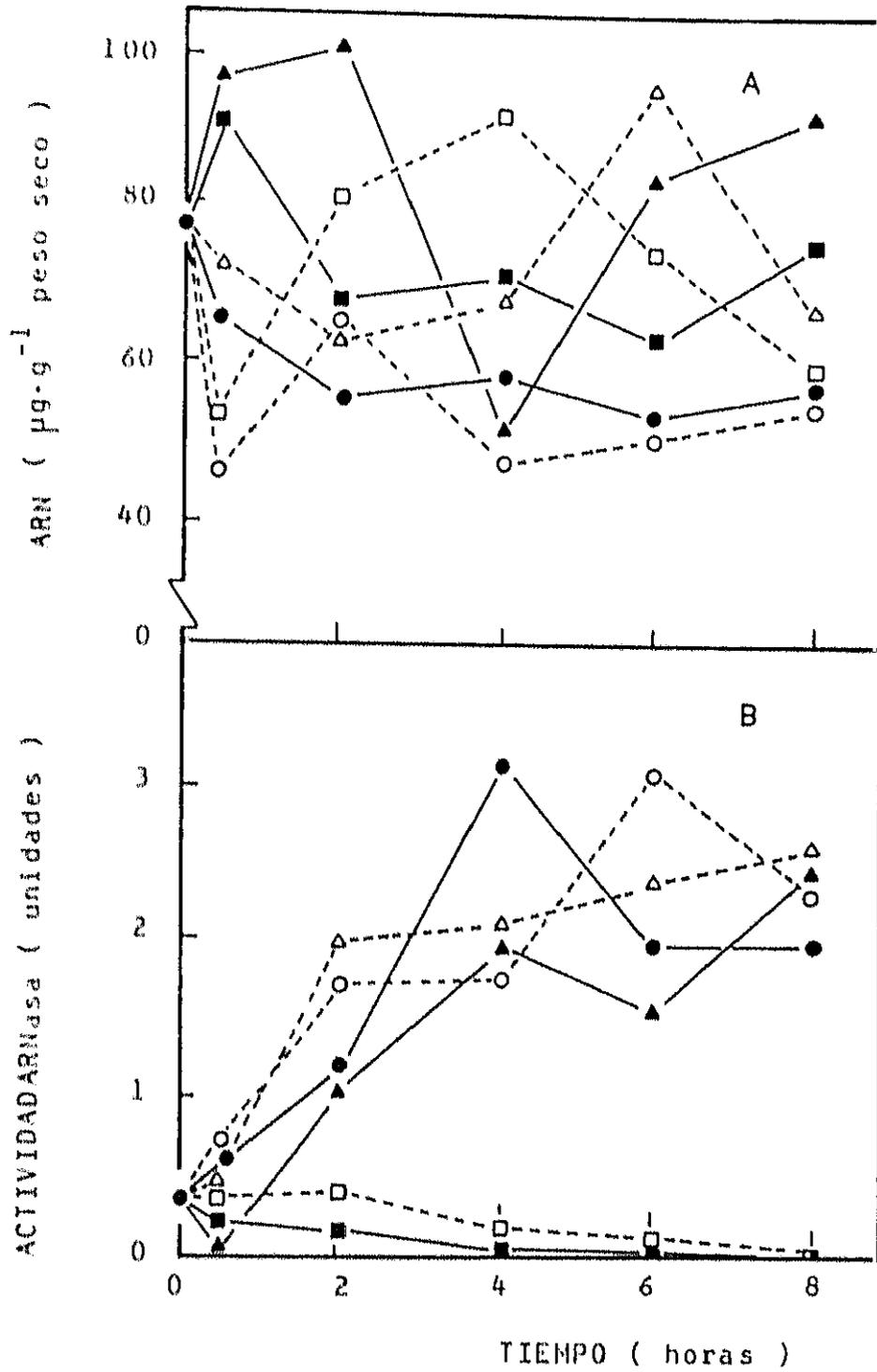


FIGURA 14.- Variación del pH del medio en función del tiempo de incubación de talos de *E. prunastri* mantenidos en diferentes medios tamponados con:

(○)- acetato sódico 0,1 M, pH 5,0
 $y = 0,011 x + 0,10 ; r = 0,53$

(●)- acetato sódico 0,1 M, pH 5,0
 conteniendo putrescina 40 mM
 $y = 0,014 x + 0,10 ; r = 0,59$

(△)- fosfato sódico 75 mM, pH 6,9
 $y = 0,026 x + 0,18 ; r = 0,63$

(▲)- fosfato sódico 75 mM, pH 6,9
 conteniendo putrescina 40 mM
 $y = 0,042 x + 0,13 ; r = 0,82$

(□)- Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15
 $y = 0,088 x + 0,20 ; r = 0,89$

(■)- Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 conteniendo
 putrescina 40 mM
 $y = 0,064 x + 0,20 ; r = 0,82$

Donde r es el coeficiente de correlación.
 Las cifras indican el valor de la pendiente
 en cada caso.

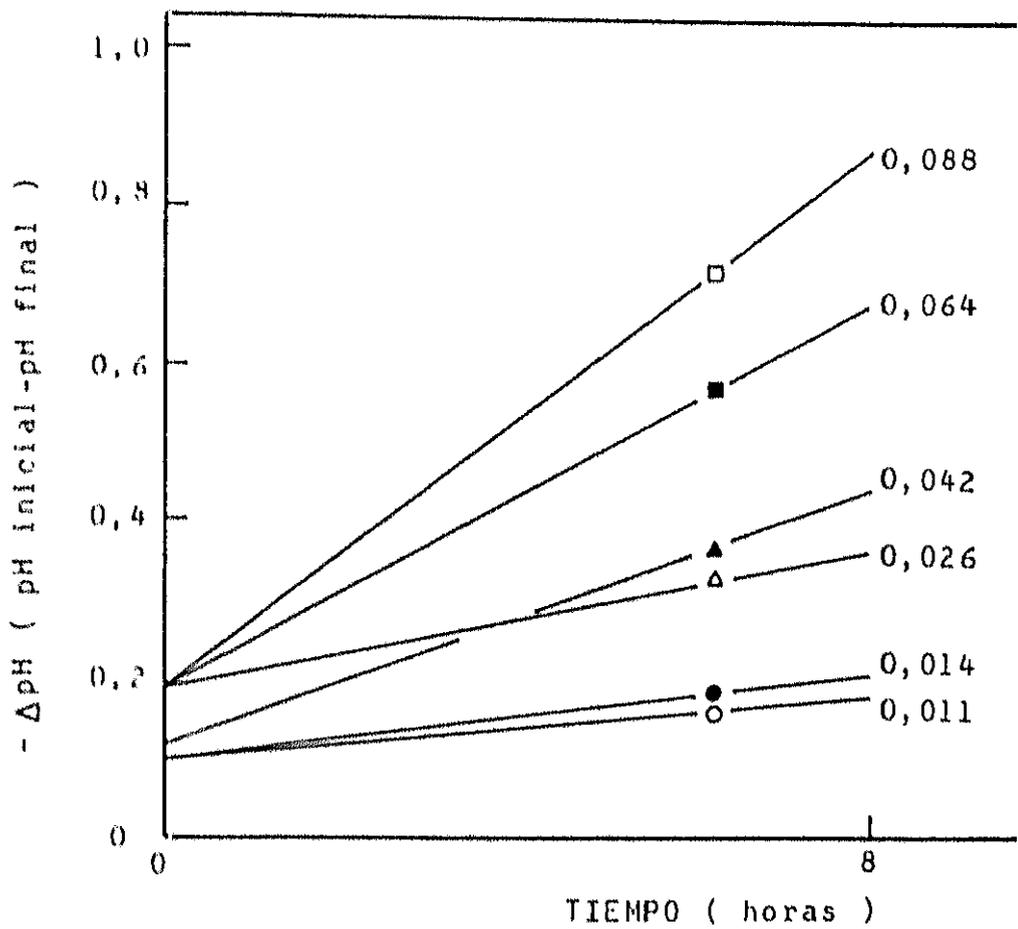
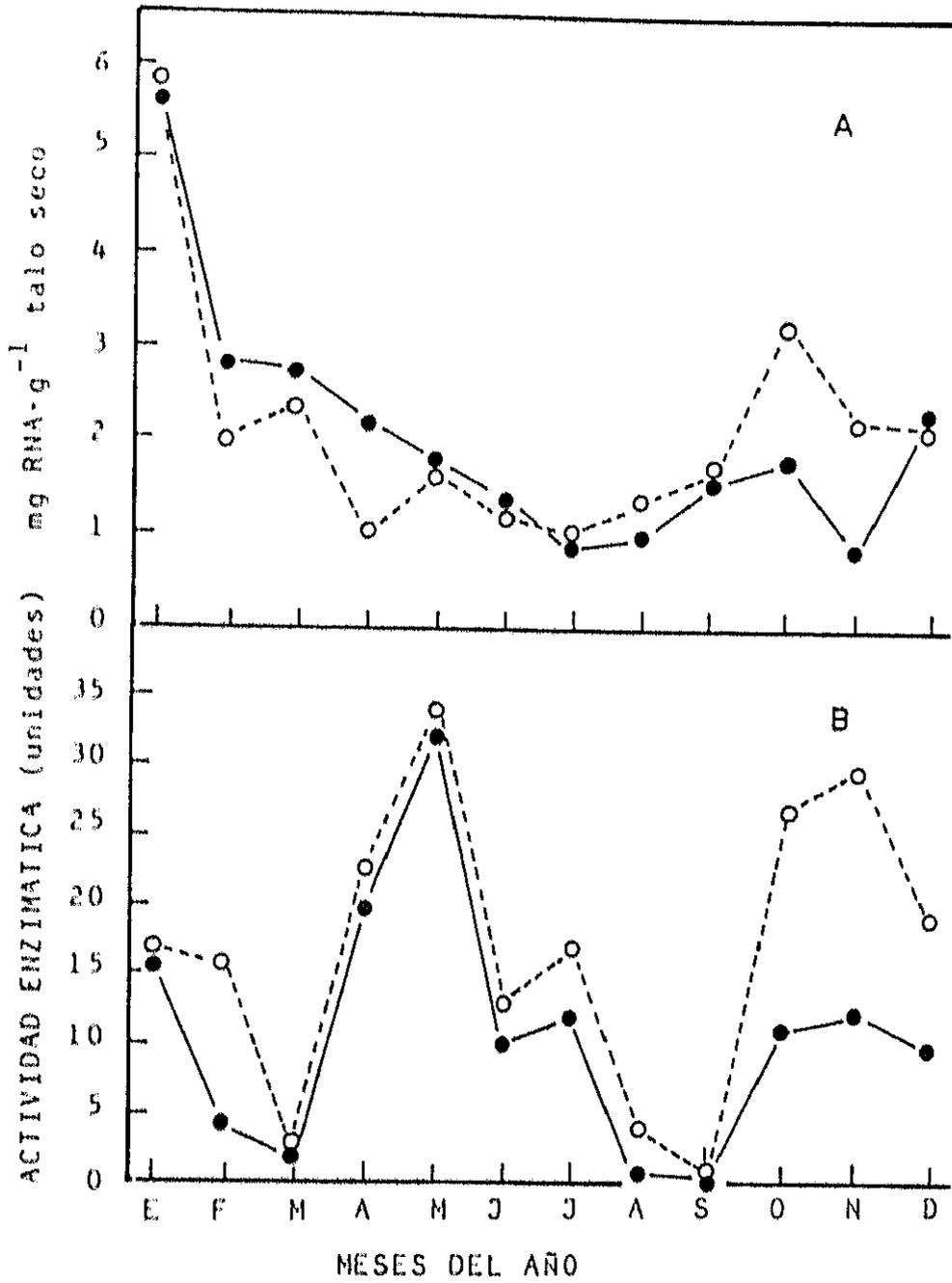


FIGURA 15.- Variación mensual del contenido en ARN (A) y de la actividad ARNasa (B) de talos de *E. prunastri*. Los símbolos vacíos hacen referencia a extractos preparados a partir de 4 min de rehidratación del talo y los llenos a aquellos preparados a partir de talos recién recogidos.



anularse, cuando los talos son incubados a pH 9,15 con o sin la diamina (Fig. 13B).

La variación del pH del medio, en las condiciones de incubación descritas, se muestra en la Figura 14.

Un estudio anual de ambos parámetros muestra que en los talos liquénicos el contenido de ARN es relativamente constante a lo largo del año, exceptuando un incremento durante el mes de enero (Fig. 15A). En cuanto a la actividad ARNasa, muestra dos periodos de mayor actividad, uno de abril a junio y otro en los meses de octubre y noviembre (Fig. 15B).

III.2.- CAPTACION DE PUTRESCINA LIBRE POR EL TALO LIQUENICO

III.2.1.- Identificación y cuantificación de putrescina

A fin de determinar la entrada de putrescina en los talos liquénicos, se desarrolló un método para su aislamiento, identificación y cuantificación, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección espectrofotométrica (UV).

Según se especifica en el apartado II.9., una vez que las poliaminas fueron extraídas y tosiladas según el método descrito por Sugiura et al. (1975), se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para su determinación en una columna de fase reversa, en análisis isocrático.

En la Figura 16A se muestra un cromatograma con los tiempos de retención de los patrones tosilados: etilamina (patrón interno), putrescina, espermidina y espermina. Los picos se resuelven en un tiempo inferior a 25 min.

La Figura 16B muestra las rectas de calibración directa de putrescina y etilamina y la Figura 16C la calibración indirecta de putrescina. Esta última se contruyó con la razón entre las cuentas de área de putrescina frente a las cuentas de área de etilamina a una concentración constante (0,66 μg en los 10 μl de inyección), siendo esta última

FIGURA 16.- Identificación cromatográfica y rectas de calibración de putrescina tosilada.

A), cromatograma representativo de la separación por HPLC de putrescina (p), donde (s) es el disolvente y (e) la etilamina utilizada como patrón interno.

B), calibración directa de (●) etilamina como patrón interno y (▲) putrescina, en función de la masa inyectada en la columna:

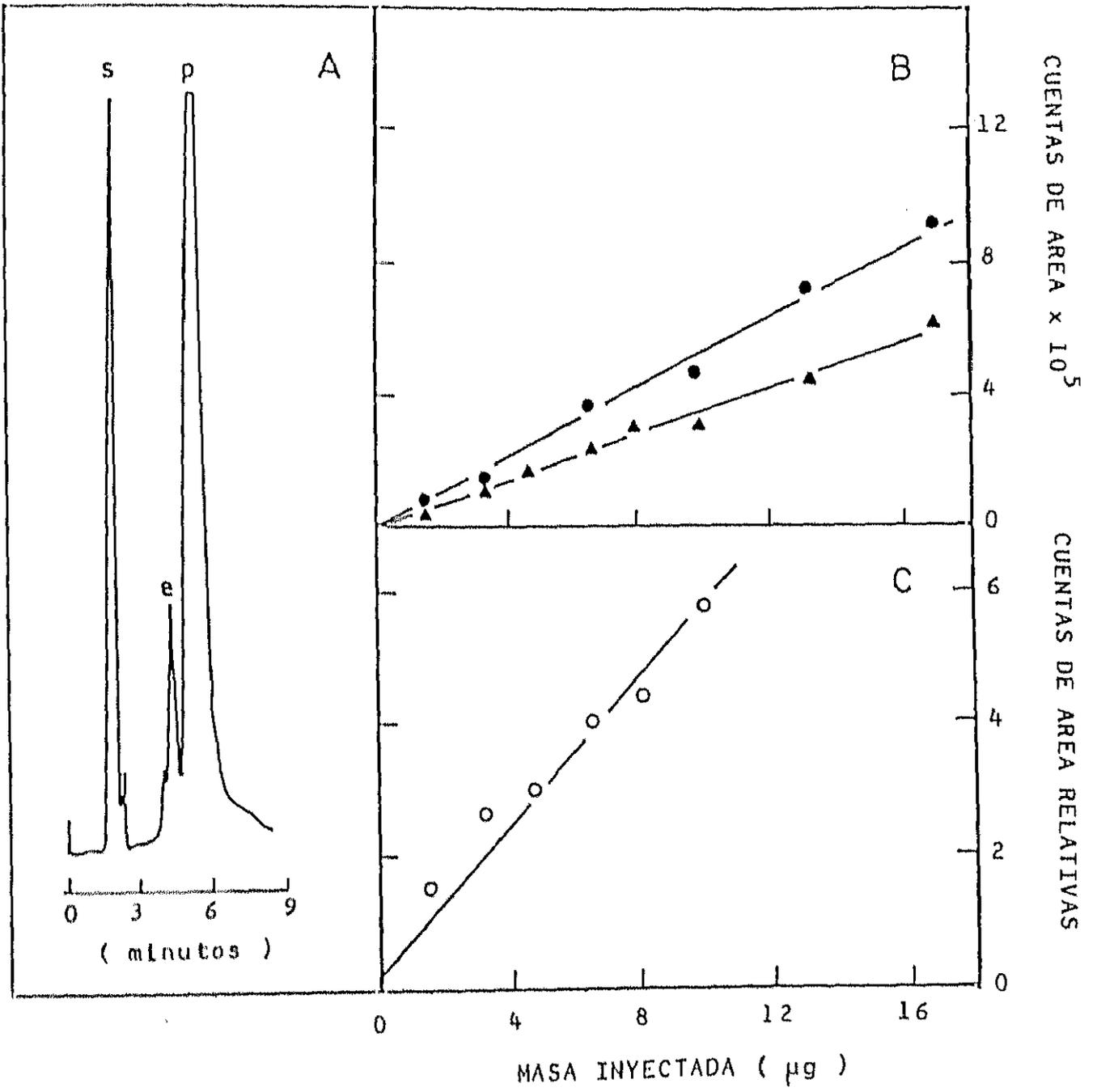
$$(●) y = 0,53 \cdot 10^5 x + 0,04 \cdot 10^5 ; r = 0,99$$

$$(▲) y = 0,36 \cdot 10^5 x + 0,05 \cdot 10^5 ; r = 0,99$$

C), calibración indirecta de putrescina en función del patrón interno:

$$(○) y = 0,54 x + 0,45 ; r = 0,98$$

Donde r es el coeficiente de correlación.



calibración la utilizada para la cuantificación posterior de putrescina. Los altos valores de los coeficientes de correlación indican la linealidad de la respuesta en el rango de concentraciones ensayadas.

III.2.2.- Captación de putrescina dependiente del pH extracelular

Una vez realizada la incubación, a distintos tiempos y a diferentes pHs, con putrescina 40 mM, se estimó la cantidad de diamina exógena que penetra en el talo y la remanente en los medios, según se describe en el apartado II.9. Paralelamente se llevó a cabo un control con talos incubados en medios tamponados, a los tres pHs indicados y en ausencia de la diamina, a fin de determinar la cantidad de poliaminas endógenas.

Según se observa en la Figura 17A, la captación de putrescina, por el talo liquénico, depende marcadamente del pH externo. Así, a pH 5,0, aproximadamente el 60% de la cantidad inicial de putrescina presente en el medio desaparece después de 30 min de incubación, mientras que el 40% restante permanece invariable a lo largo de las 8 h.

Un valor final similar, alrededor del 35%, se halla cuando la incubación se realiza a pH 9,15, sin embargo, en este caso, son necesarias 2 h de incubación para alcanzar un máximo en la captación.

Cuando el medio está tamponado a pH 6,9, no se observan cambios significativos en la concentración de putrescina de los medios a lo largo del tiempo.

Estos resultados están de acuerdo con la acumulación de putrescina hallada en los talos liquénicos (Fig. 17B). Sin embargo, no hay correspondencia a pH 5,0 entre la diamina captada y la acumulada, ya que el análisis de la putrescina en los talos, a dicho pH, revela que tal poliamina no se acumula a concentraciones mayores de 15 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ peso seco.

FIGURA 17.- Variación de la cantidad de putrescina remanente en el medio (A) y la hallada en talo (B), en función del tiempo de incubación de talos de *E. prunastri* mantenidos en medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 (●); fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 (▲) y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 (■) conteniendo putrescina 40 mM.

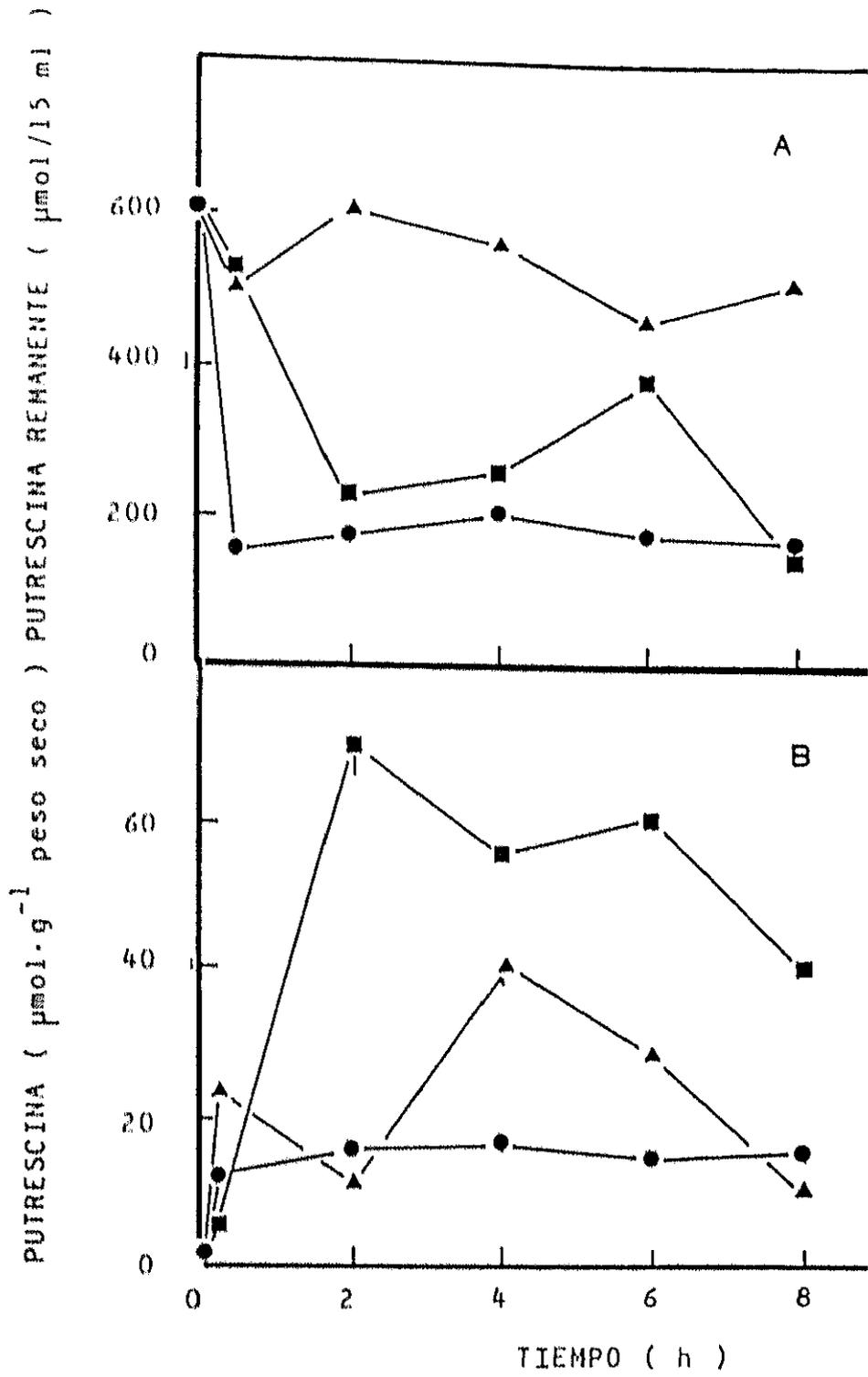


TABLA III.- Velocidad de acumulación y desaparición de putrescina en función del pH del medio de incubación.

pH *	VELOCIDAD DE CAPTACION ** ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	VELOCIDAD DE ACUMULACION *** ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
5,0	26,16	1,15
6,9	9,06	1,12
9,15	31,83	5,15

* Disoluciones de putrescina 40 mM tamponadas con: acetato sódico 0,1 M, pH 5,0; fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15.

** Calculado como la pendiente de la ecuación de putrescina remanente en el medio ajustado por regresión lineal.

*** Calculado como la pendiente de la ecuación de putrescina acumulada en los talos de *E. prunastri* después de la incubación, ajustado por regresión lineal.

En la Tabla III se indican las velocidades de acumulación y desaparición de la diamina de los talos y medios, expresadas como " μ moles de putrescina. $g^{-1}.h^{-1}$ ". Dicha estimación se obtuvo hallando las pendientes de las rectas que rinden los valores de cada tratamiento, ajustadas por regresión lineal.

III.2.3.- Catabolismo de putrescina

Con el objeto de explicar la falta de correlación entre la desaparición de putrescina del medio y su concentración en el talo, se estudió la actividad DAO, enzima que oxida directamente putrescina a H_2O_2 , NH_3 y pirrolidina.

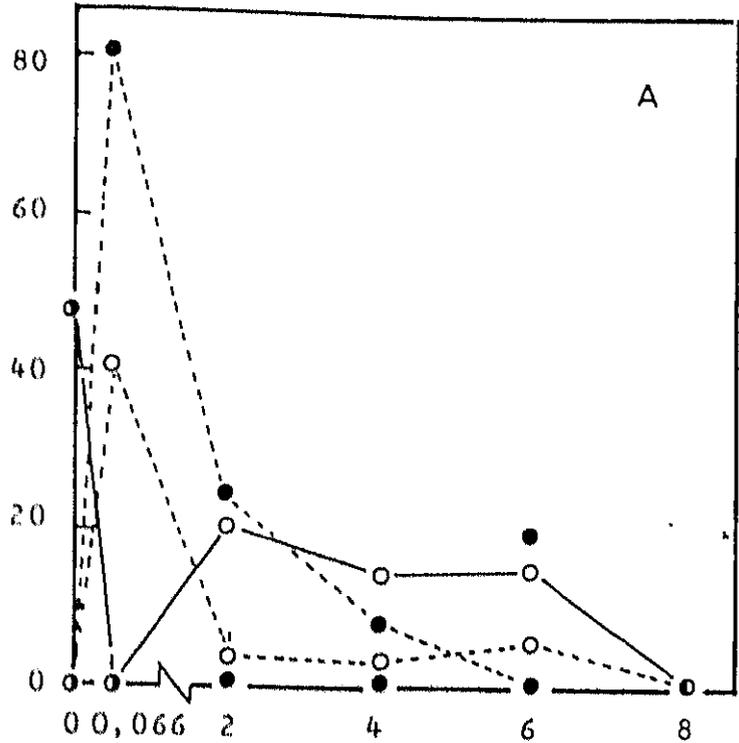
La actividad DAO se valoró en extractos crudos procedentes de los talos y medios de incubación, tras el tratamiento, según se describe en el apartado II.7.2.

En la Figura 18A se representa la evolución de esta actividad cuando el talo es incubado en putrescina 40 mM y/o tampón pH 5,0. A este pH, la actividad DAO experimenta un rápido incremento, siendo secretada al medio de incubación durante la rehidratación del talo y decreciendo progresivamente hasta anularse. A este pH, la diamina favorece la síntesis y secreción de DAO al medio de incubación. En el talo se detecta una menor actividad, siendo nula cuando la diamina está presente.

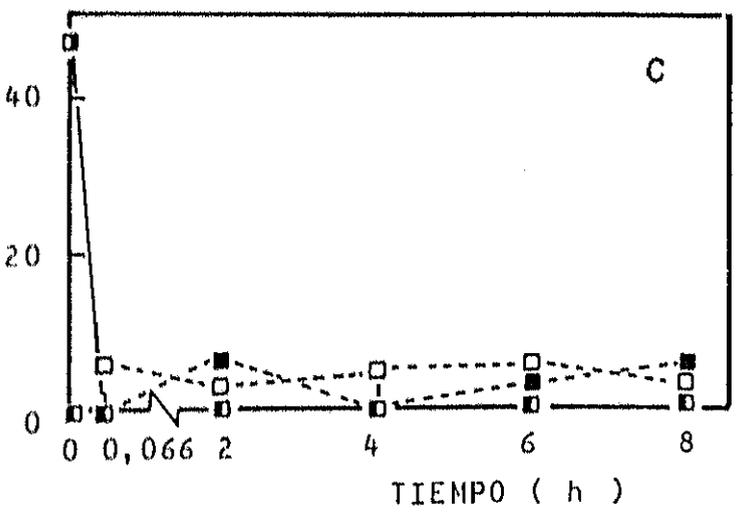
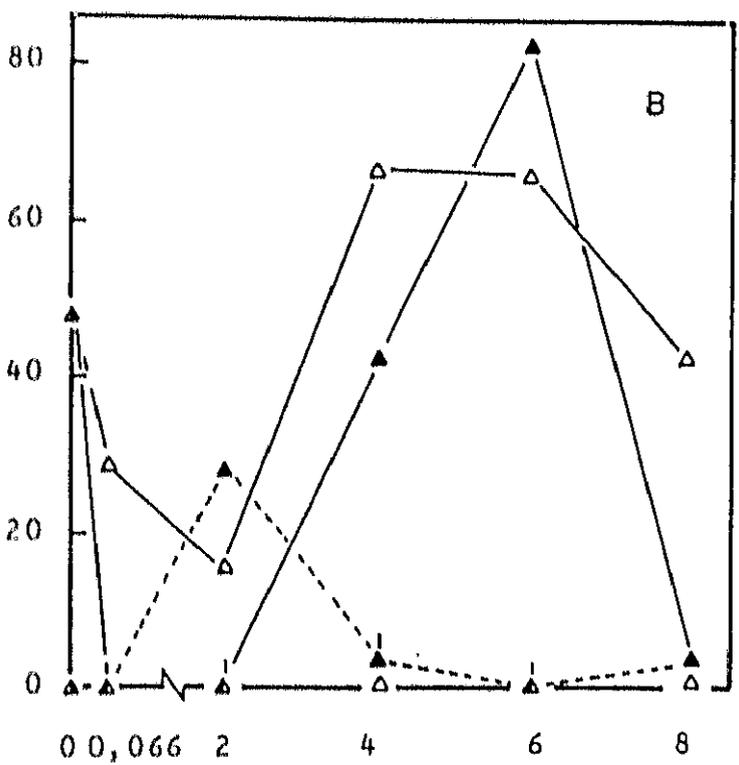
Un comportamiento inverso aparece cuando el pH extracelular es neutro. En este caso, la mayor actividad DAO se estima en el talo, tanto en presencia como en ausencia de putrescina y sólo es secretada al medio tras 2 h de incubación a pH 6,9, estando la diamina presente (Fig. 18B).

Cuando el pH del medio es 9,15, con o sin diamina, sólo se detecta una pequeña actividad que es secretada totalmente al medio, permaneciendo constantes sus niveles a lo largo de las 8 h de tratamiento (Fig. 18C).

FIGURA 18.- Evolución de la actividad diamino oxidasa con el tiempo en talos de *E. prunastri* (línea continua) y en medios (línea discontinua) en presencia (símbolos llenos) o ausencia (símbolos vacíos) de putrescina 40 mM, en medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0 (A); fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 (B) y Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 (C).



ACTIVIDAD ESPECIFICA (milliunidades)



TIEMPO (h)

III.3.- DETERMINACION DE POLIAMINAS LIBRES Y CONJUGADAS

III.3.1.- Identificación y cuantificación de poliaminas libres y conjugadas

La técnica de análisis empleada hasta el momento (HPLC), con detección a 254 nm, no permitió estimar el contenido real de poliaminas endógenas. Este hecho podría ser debido a dos causas: bien a que la sensibilidad del detector a 254 nm no era tan alta como para valorar el bajo nivel de poliaminas, bien a que éstas pudieran encontrarse en forma conjugada. Recordemos ahora que la respuesta del detector a las formas conjugadas no es la misma que a las formas libres.

Por todo ello, después de la extracción de las poliaminas, se realizó una hidrólisis ácida de las muestras, con el objeto de determinar la existencia de formas conjugadas (apartado II.10.1.). La posterior dansilación, con cloruro de dansilo, basada en la técnica descrita por Smith y Best (1977), permite, además, su detección por fluorescencia, uno de los métodos acoplados a la cromatografía líquida de alta resolución más sensibles (apartado II.10.2.). La hidrólisis alcalina, posterior a la dansilación, permite eliminar, además, todas aquellas sustancias que pudieran interferir en el análisis posterior de las poliaminas dansiladas (apartado II.10.2.).

La puesta a punto de este método de HPLC, con detección por fluorescencia, mediante el uso combinado de un gradiente de fase móvil y un programa de flujo adecuado, permitió que los dansil-amonio y otros dansil-derivados, que pudieran dificultar el análisis posterior de las dansil-poliaminas, eluyeran en los primeros minutos, obteniéndose una óptima separación de n-butilamina (patrón interno), putrescina, espermidina y espermina, en menos de 25 min (las condiciones cromatográficas se describen en el apartado II.10.3.).

En la Figura 19 se representa la variación en la composición de la fase móvil y el programa de flujo empleados. La comparación entre el cromatograma de poliaminas patrón dansiladas y detectadas a 254 nm y la misma mezcla patrón detectada por fluorescencia, a una longitud de onda de excitación entre 340-380 nm y una de emisión de 460 nm, permite estimar la diferencia de sensibilidad que existe entre ambos métodos de detección (Fig. 19).

En la Figura 20A se muestra la calibración directa de n-butilamina, putrescina, espermidina y espermina, y en la Figura 20B la calibración indirecta de cada poliamina frente a una concentración constante de patrón interno (0,29 μg de n-butilamina en los 10 μl de volumen de inyección), siendo esta última la calibración utilizada para la cuantificación de poliaminas. Los altos valores de los coeficientes de correlación hallados indican que el método es lineal para esta separación en el rango de concentraciones ensayados.

El método descrito permite la rápida separación y cuantificación de pequeñas cantidades de poliaminas, llegándose a detectar cantidades del orden de 0,3 pmoles en los 10 μl de volumen de inyección.

III.3.2.- Captación de putrescina por el fotobionte a pH alcalino

Una vez establecida que la máxima captación de putrescina ocurre a pH 9,15, entre 2 y 4 h de incubación de los talos en putrescina 40 mM (Fig. 17B), se determinó, en estas condiciones, que porción de la diamina captada por el talo líquénico está contenida en el fotobionte.

Para ello se incubaron talos en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, en presencia o ausencia de putrescina 40 mM, durante 3 h a 26°C en oscuridad.

FIGURA 19.- Cromatografía de poliaminas dansiladas mediante HPLC en una columna de MicroPak MCH-5N cap (15 cm x 4 mm).

A), perfil de los gradientes de flujo y composición de disolventes de la fase móvil (metanol:agua v/v).

B), detección a 254 nm.

C), detección por intensidad de fluorescencia (excitación 340-380 nm; emisión 460 nm).

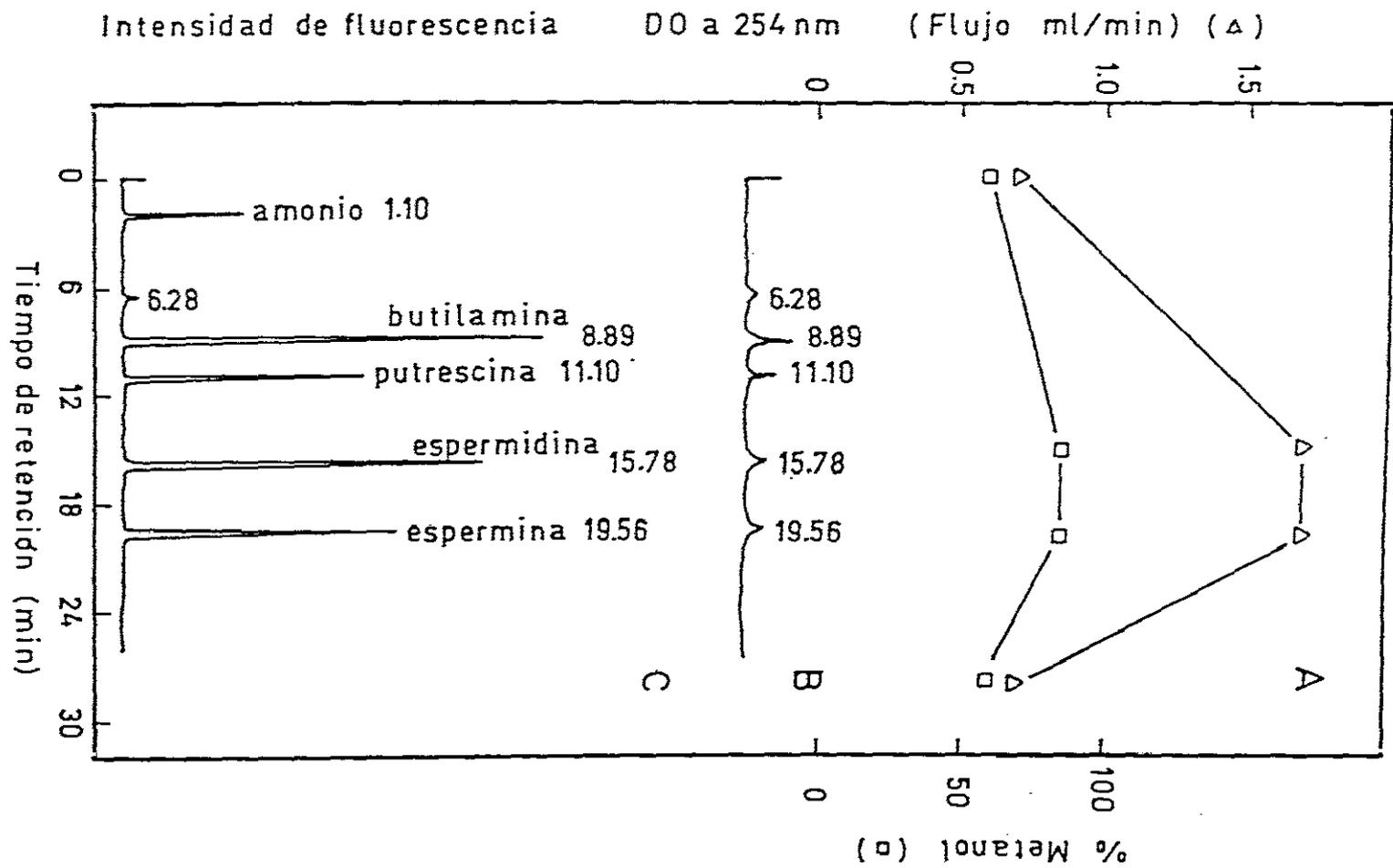


FIGURA 20.- Curvas de calibración de poliaminas dansiladas analizadas por HPLC.

A), calibración directa:

(○)- butilamina

$$y = 13,72 \cdot 10^6 x - 0,15 \cdot 10^6 ; r = 0,99$$

(●)- putrescina

$$y = 8,94 \cdot 10^6 x + 0,55 \cdot 10^6 ; r = 0,98$$

(■)- espermidina

$$y = 9,38 \cdot 10^6 x + 0,10 \cdot 10^6 ; r = 0,99$$

(▲)- espermina

$$y = 8,96 \cdot 10^6 x - 0,33 \cdot 10^6 ; r = 0,99$$

B), calibración referida al patrón interno (0,29 µg butilamina):

(●)- putrescina

$$y = 2,68 x + 0,001 ; r = 0,99$$

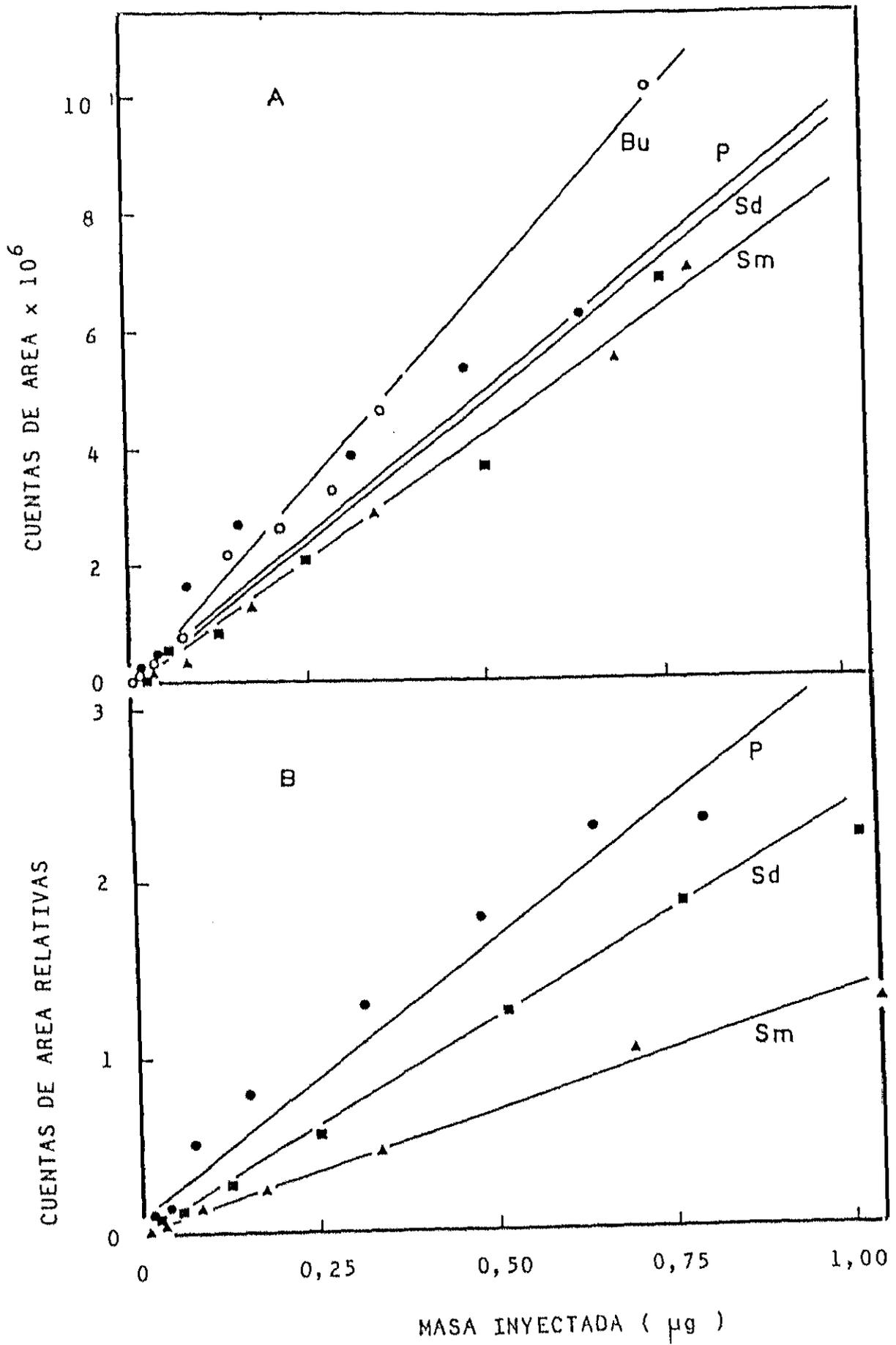
(■)- espermidina

$$y = 2,26 x + 0,120 ; r = 0,97$$

(▲)- espermina

$$y = 1,41 x - 0,020 ; r = 0,99$$

Donde r es el coeficiente de correlación; Bu, butilamina; P, putrescina; Sd, espermidina y Sm, espermina.



Tras la extracción y dansilación (apartados II.10.1. y II.10.2.), se valoró el contenido de putrescina libre y conjugada en tres muestras paralelas: el simbiote completo u holobionte, el fotobionte aislado (según se describe en el apartado II.5.) y la remanente en el medio.

En orden a establecer el rendimiento del método de aislamiento de la fracción algal, se determinó el contenido de clorofilas de las algas aisladas, en relación con el contenido del talo completo (apartado II.5.). La medida de tres valoraciones dió un rendimiento medio del $4,2\% \pm 1,07$ de algas aisladas por gramo de talo liquénico.

La diamina se cuantificó mediante HPLC y detección por fluorescencia (método descrito en el apartado II.10.3.)

Como se muestra en el diagrama de la Figura 21, el 12,6% de la cantidad inicial de putrescina se encuentra en el talo como putrescina libre y el 30,7% permanece en el medio de incubación tras las 3 h de tratamiento. Solamente el 5,4% de la putrescina captada por el holobionte, que supone el 0,62% de la cantidad inicial, fue hallada en el fotobionte.

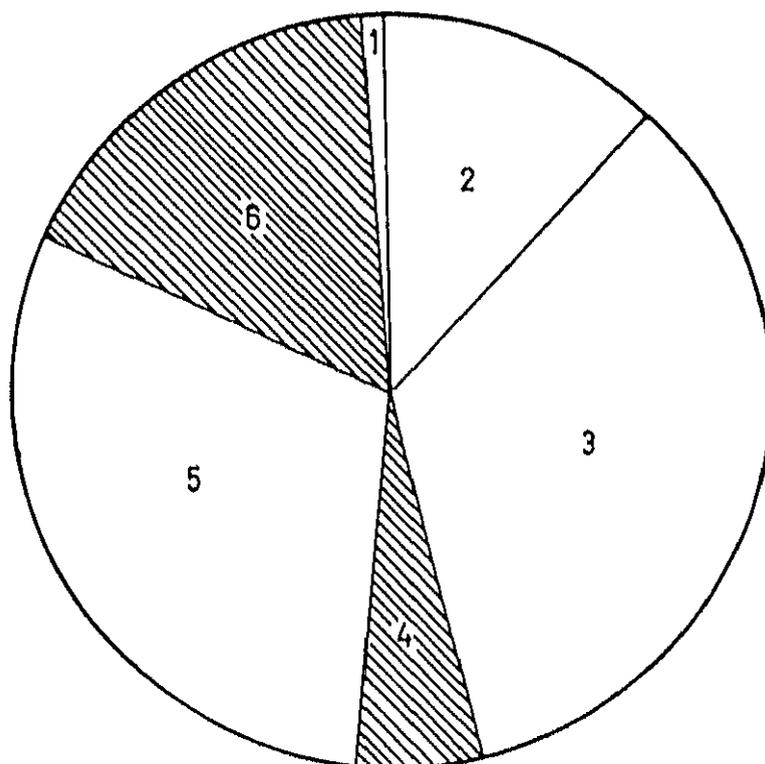
De la cantidad inicial de putrescina (96,66 mg = 100 %), sólo se recupera el 43,3%, en forma de diamina libre.

La ausencia de actividad DAO en los talos y sus bajos niveles en los medios en estas condiciones (Fig. 18C), hizo sospechar que pudiera encontrarse formando conjugados, antes o después de ser captada.

Por lo tanto, se procedió a estudiar el contenido de putrescina conjugada en talos y medios, separándolos en dos fracciones: una conteniendo moléculas conjugadas solubles en ácido (unidas a azúcares, fenoles, alcaloides...) y otra de conjugados insolubles en ácido (unida a proteínas, ácidos nucleicos, pared celular, fracciones de membrana...).

Los resultados se muestran en la Tabla IV. Se detecta la presencia de conjugados en el talo (16,7%) y en el medio tras la incubación (4,8%), formando mayoritariamente conjugados

FIGURA 21.- Distribución de putrescina exógena libre y conjugada en talo de *E. prunastri* y medio de incubación.



1. Libre en alga: 0,6 mg \pm 0,08
2. Libre en talo: 12,2 mg \pm 3,2
3. Metabolizada: 33,4 mg \pm 2,9
4. Conjugada en medio: 4,6 mg \pm 0,1
5. Libre en medio: 29,7 mg \pm 3,11
6. Comjugada en talo: 16,1 mg \pm 2,5

TABLA IV.- Putrescina exógena conjugada en talo y en medio.

FRACCION CONJUGADA	TALO (mg.g ⁻¹ peso seco)	MEDIO
putrescina conjugada soluble en ácido (SH)	13,73 ± 2,5 (13,7%)	4,24 ± 0,9 (4,4%)
putrescina conjugada insoluble en ácido (PH)	3,40 ± 0,4 (3,5%)	0,40 ± 0,06 (0,4%)

Entre paréntesis se representa los porcentajes de putrescina frente al total hallado en talo y en medio (p/p).

solubles en ácido. En ausencia de putrescina exógena no se detecta la diamina. En terminos de cantidad de putrescina total, el 29,7% es captada por el holobionte y un 35,5% permanece en el medio después de las 3 h de tratamiento. El 35% restante no detectado posiblemente fue metabolizado y/o parte pudo haberse perdido en los procesos de lavado del talo.

III.3.3.- Producción de diferentes formas de poliaminas dependientes del pH extracelular

Llegados a este punto y una vez desarrollado el método de HPLC que permite la separación y cuantificación de muy bajas concentraciones de poliaminas, tanto libres como conjugadas, se planteó el estudiar si la variación del pH extracelular favorece la síntesis y/o la conjugación de estas sustancias.

Para ello, los talos fueron incubados en medios que contenían tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0; tampón fosfato sódico 75 mM, pH 6,9 y tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15; a lo largo de 4 min (rehidratación), 2,4,6 y 8 h en oscuridad a 26°C.

El contenido de poliaminas libres y conjugadas (fracción soluble e insoluble en ácido) se valoró, tras la extracción y posterior dansilación de las muestras, mediante HPLC y detección por fluorescencia (apartado II.10.). Se analizaron tanto las poliaminas presentes en los talos como las secretadas al medio de incubación.

El análisis de poliaminas revela la presencia en los talos liquénicos, antes de ser sometidos a los distintos tratamientos, de las tres poliaminas básicas: putrescina, espermidina y espermina. Estas se encuentran tanto en forma libre como formando conjugados solubles e insolubles en ácido, siendo los niveles de espermidina los mayoritarios y mínimos los de espermina (Tabla V).

TABLA V.- Contenido de poliaminas endógenas en talo de *E. prunastri* en ausencia de cualquier tratamiento.

FRACCION	PUTRESCINA	ESPERMIDINA (nmol.g ⁻¹ peso seco)	ESPERMINA
poliamina libre (S)	72,30 ± 5,8	262,70 ± 13,9	12,01 ± 0,4
poliamina conjugada soluble en ácido (SH)	10,23 ± 0,6	38,77 ± 1,3	2,37 ± 0,2
poliamina conjugada insoluble en ácido (PH)	16,02 ± 1,8	50,80 ± 4,3	4,05 ± 0,4

Cuando la incubación se realiza a pH 5,0, la cantidad total de espermidina y espermina presente en el talo, no experimenta cambios significativos a lo largo del periodo de incubación (Fig. 22A). La poliamina mayoritaria es la espermidina, siendo la espermina la que se detecta en menor proporción. La cantidad total de putrescina, en el talo, por el contrario, disminuye durante las 2 primeras h de incubación (Fig. 22A), hecho que sucede en paralelo a su secreción al medio (Fig. 22B).

Un análisis más detallado, especificando la proporción de formas libres y los diferentes conjugados, se muestra en las Figuras 23 y 24. La espermidina en el talo se encuentra principalmente en forma libre (Fig. 23A) y formando conjugados insolubles (Fig. 23C) durante las 4 primeras h de incubación. El descenso encontrado en la espermina total al comienzo de la incubación (Fig. 22A) corresponde a una pérdida de formas conjugadas, tanto solubles como insolubles (Fig. 23B y C), ya que la cantidad de espermina libre no varía significativamente durante este mismo periodo (Fig. 23A).

La putrescina es la poliamina que experimenta una mayor movilidad. Existe una alta correspondencia entre el descenso de la diamina libre (Fig. 23A) o sus diferentes conjugados (Fig. 23B y C) en el talo y su secreción al medio (Fig. 24A,B y C) durante las 4 primeras h de incubación. A partir de este momento, las formas conjugadas insolubles permanecen invariables (Fig. 24C), siendo destacable la interconversión de formas libres (Fig. 24A) en conjugadas solubles (Fig. 24B).

Cuando los talos se mantienen a pH neutro (6,9), la cantidad total de poliaminas endógenas aumenta durante las primeras 2 h de incubación (Fig. 25A). Existe una secreción constante de espermidina y espermina al medio, mientras que la cantidad de putrescina varía durante el tratamiento, observándose una mayor secreción a partir de las 4 h (Fig. 25B). En

FIGURA 22.- Variación en talo (A) y en medio (B) de la cantidad total (fracción libre y fracciones conjugadas) de putrescina (○), espermidina (△) y espermina (□) cuando los talos de *E. prunastri* son incubados en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0.

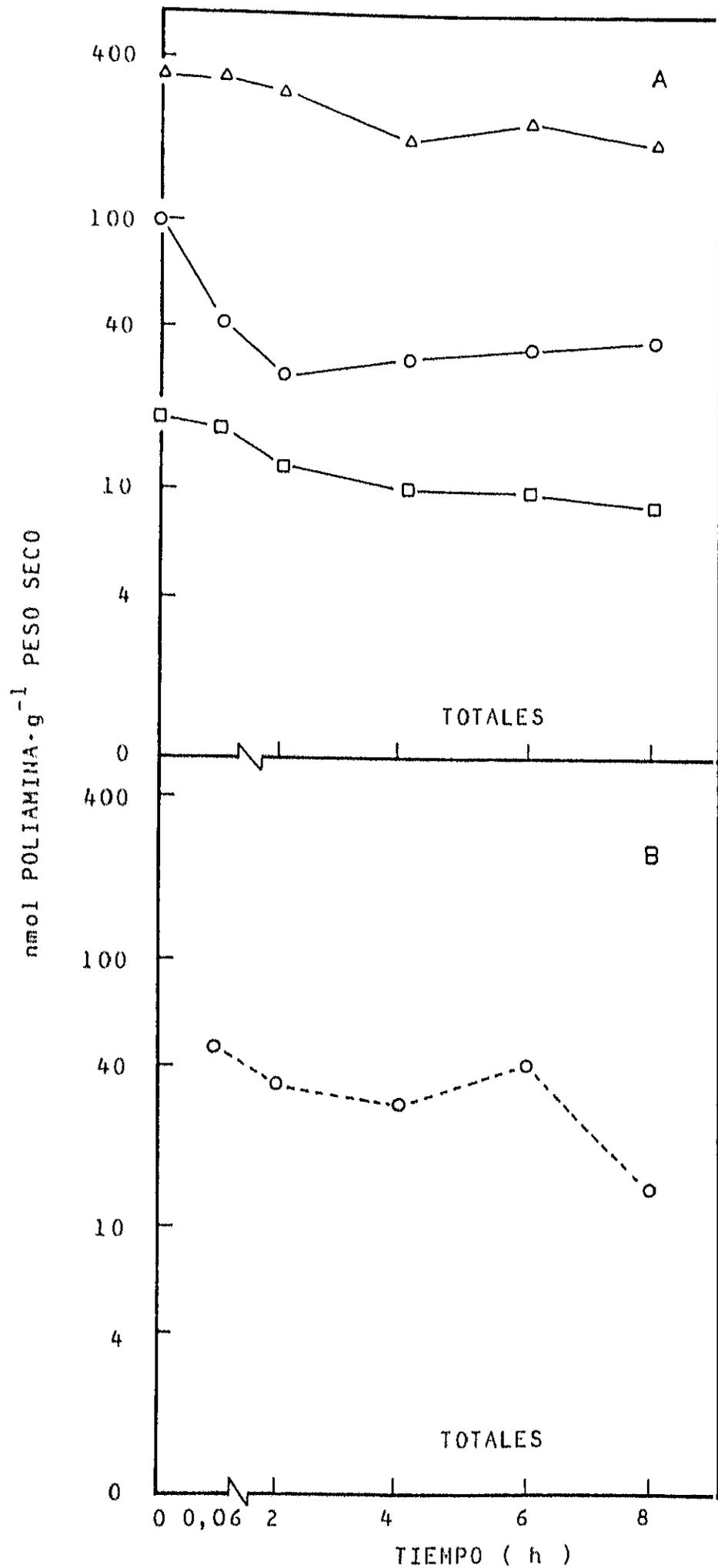


FIGURA 23.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo de incubación, en talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0.

En A se representa la fracción de poliaminas libres (S); en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).

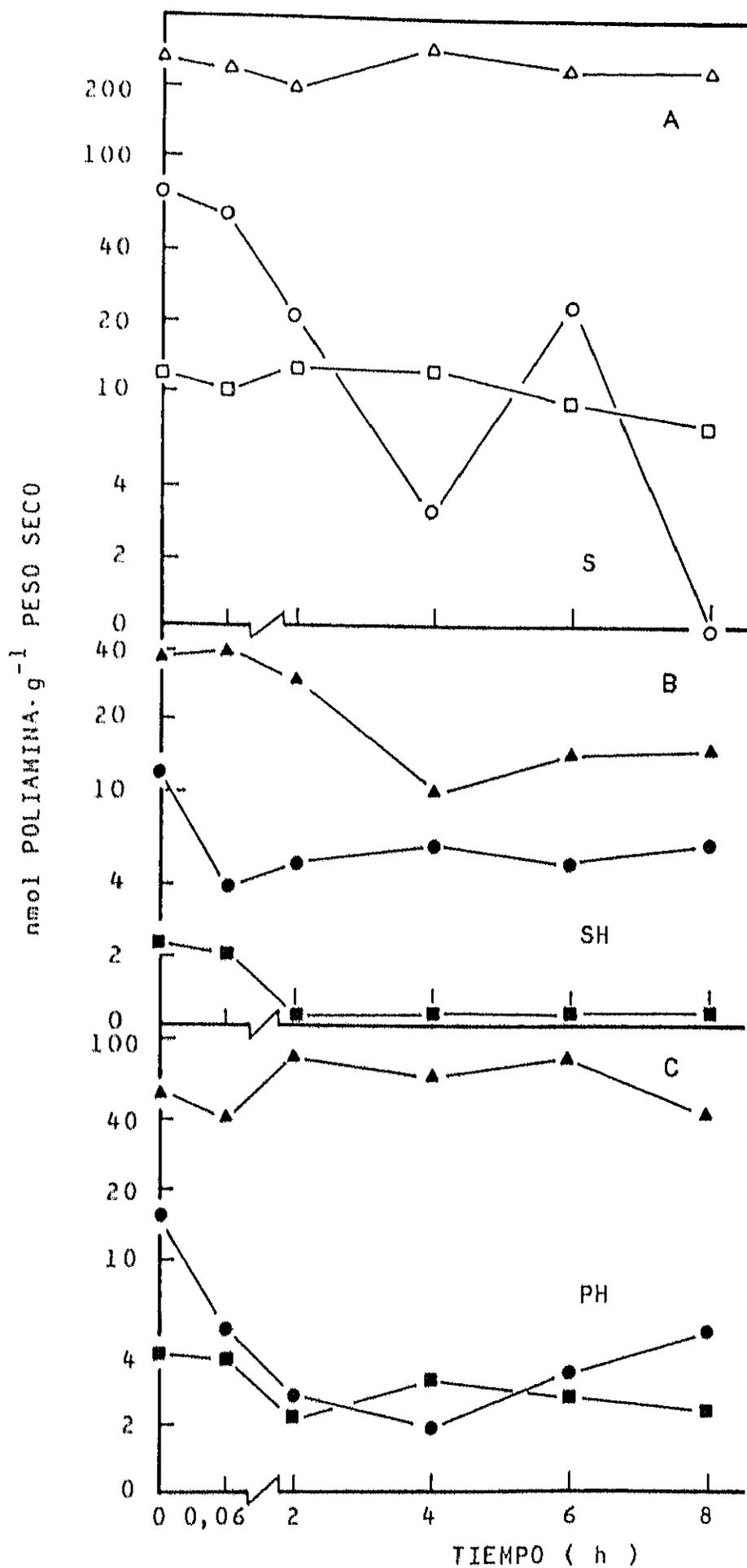
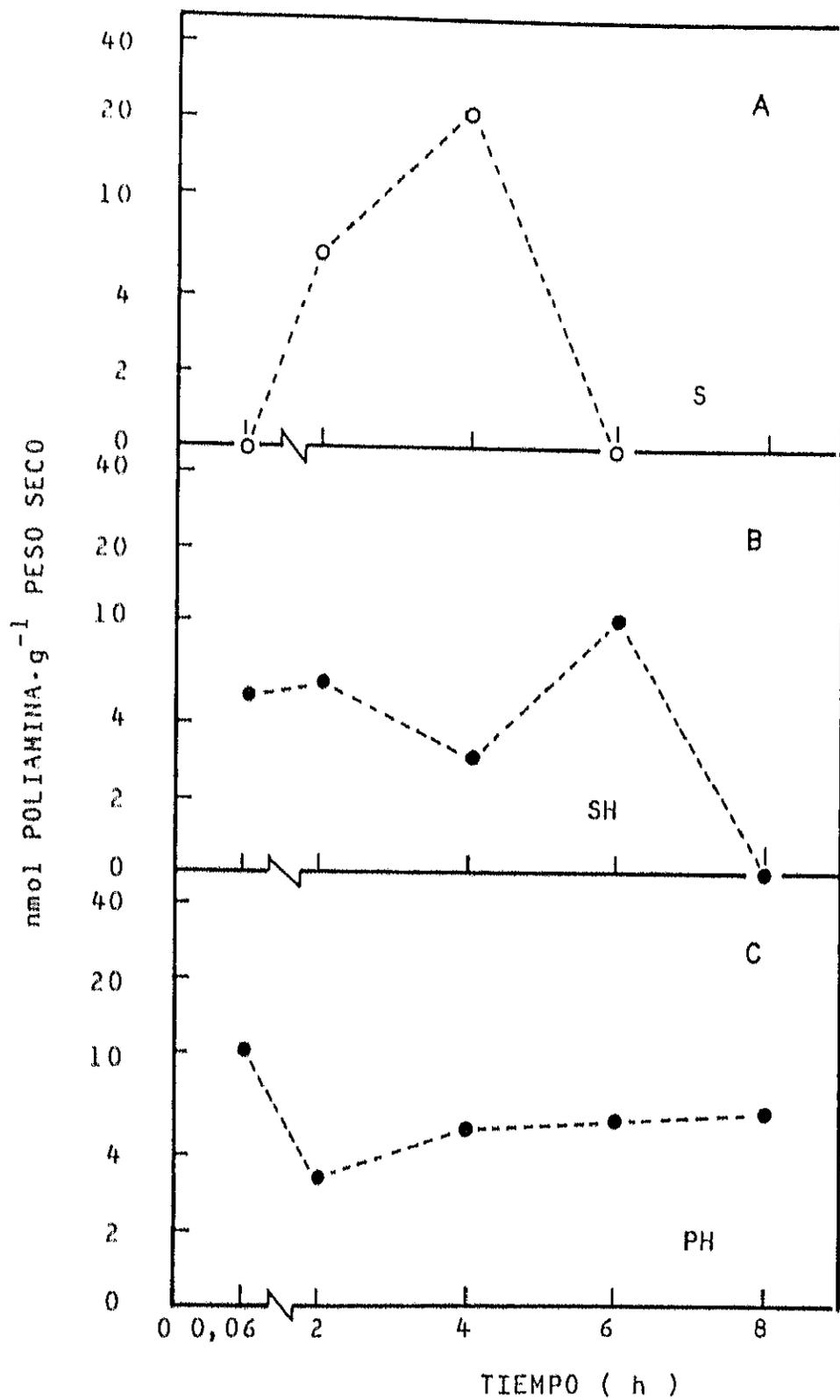


FIGURA 24.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo, secretadas al medio de incubación de talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con acetato sódico 0,1 M, pH 5,0.

En A se representa la fracción de poliaminas libres (S), en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).



general, a este pH, cabe destacar una síntesis de putrescina, parte de la cual es secretada al medio de incubación.

En la Figura 26A se representa la evolución de las poliaminas libres en el talo a pH 6,9. Es de resaltar el aumento en los niveles de putrescina, alcanzando una meseta a partir de 4 h de incubación. Permanecen constantes los de espermidina mientras que descienden los de espermina tras 2 h de incubación. A este pH se ve favorecida la formación de conjugados solubles de putrescina y espermina a partir de las 4 h de tratamiento, mientras que los de la triamina descienden (Fig. 26B).

Atendiendo a la fracción conjugada insoluble, los niveles de putrescina descienden en un principio, pero estos incrementan a largos tiempos de incubación (Fig. 26C). Por otro lado, se observa un aumento en los niveles de conjugados insolubles de espermidina y espermina durante las primeras 2 h, descendiendo posteriormente (Fig. 26C).

Al medio se secretan las tres poliaminas, permaneciendo constantes los niveles de espermidina y espermina durante el tratamiento, tanto en su forma libre como conjugada (Fig. 27A,B yC), destacándose una interconversión entre formas libres y conjugadas insolubles de espermina. La diamina es secretada en su forma libre durante la rehidratación del talo y a partir de las 4 h sus niveles vuelven a ser altos, llegándose a secretar, a las 8 h, del orden de 250 nmoles de putrescina libre.g⁻¹ de peso seco (Fig. 27A). A su vez, existe una secreción parcial de la diamina, en forma de conjugado soluble, a partir de los 4 min y hasta las 6 h de incubación (Fig. 27B), no detectándose la secreción de conjugados insolubles de la diamina a pH neutro (Fig. 27C).

Por último, se estudió la evolución de los niveles de poliaminas endógenas a pH 9,15. Atendiendo al contenido total de cada poliamina en el talo (Fig. 28A), se puede observar un mantenimiento en los niveles de dichas sustancias, siendo

FIGURA 25.- Variación en talo (A) y en medio (B) de la cantidad total (fracción libre y fracciones conjugadas) de putrescina (○), espermidina (△) y espermina (□) cuando los talos de *E. prunastri* son incubados en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 6,9.

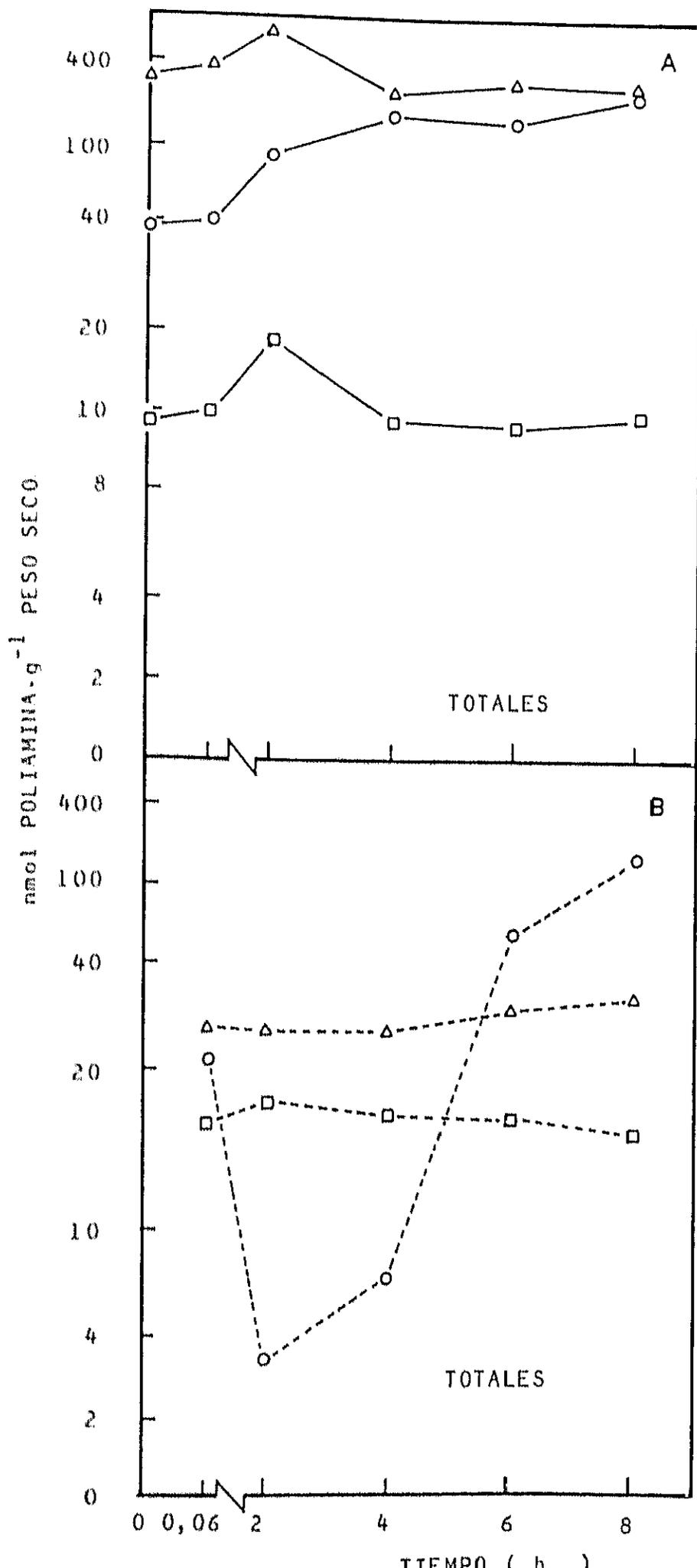


FIGURA 26.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo de incubación, en talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con fosfato sódico 75 mM, pH 6,9.

En A se representa la fracción de poliaminas libres (S); en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).

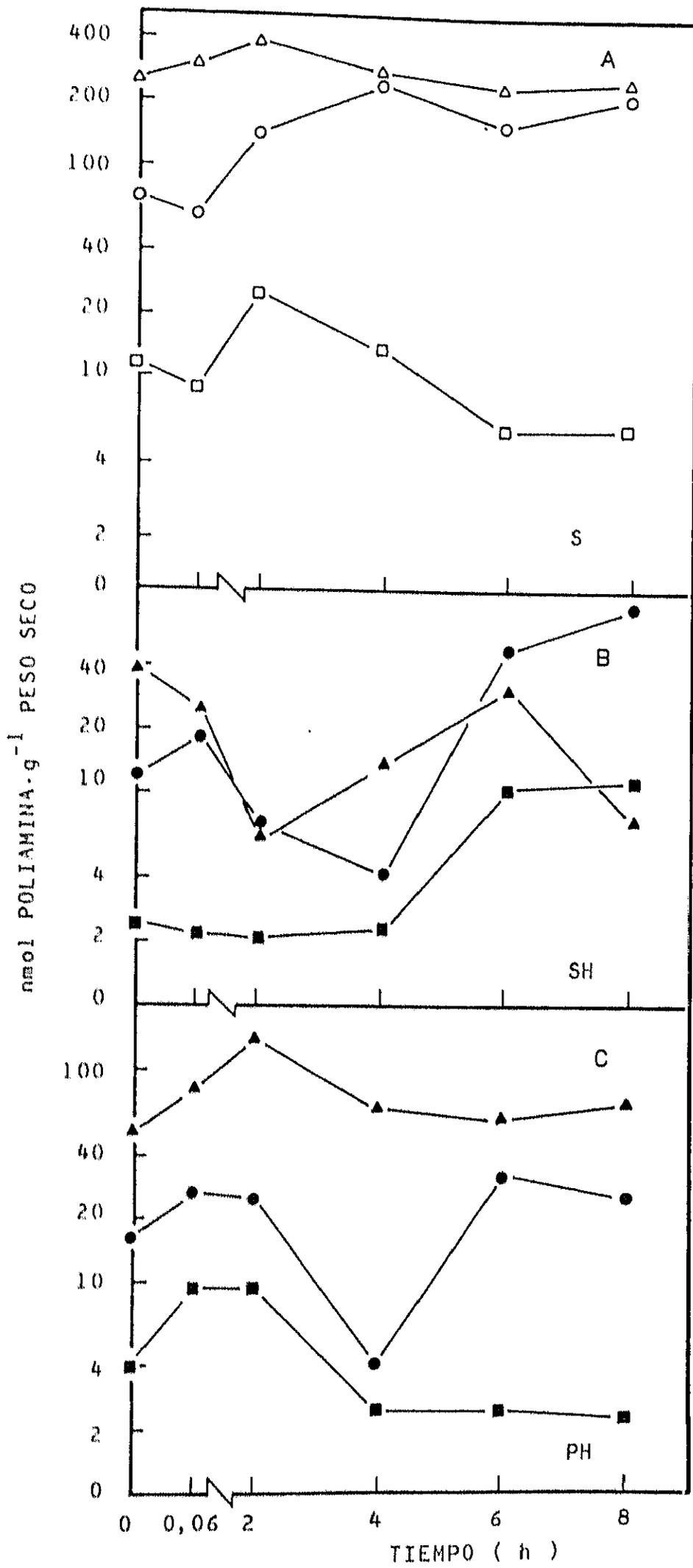
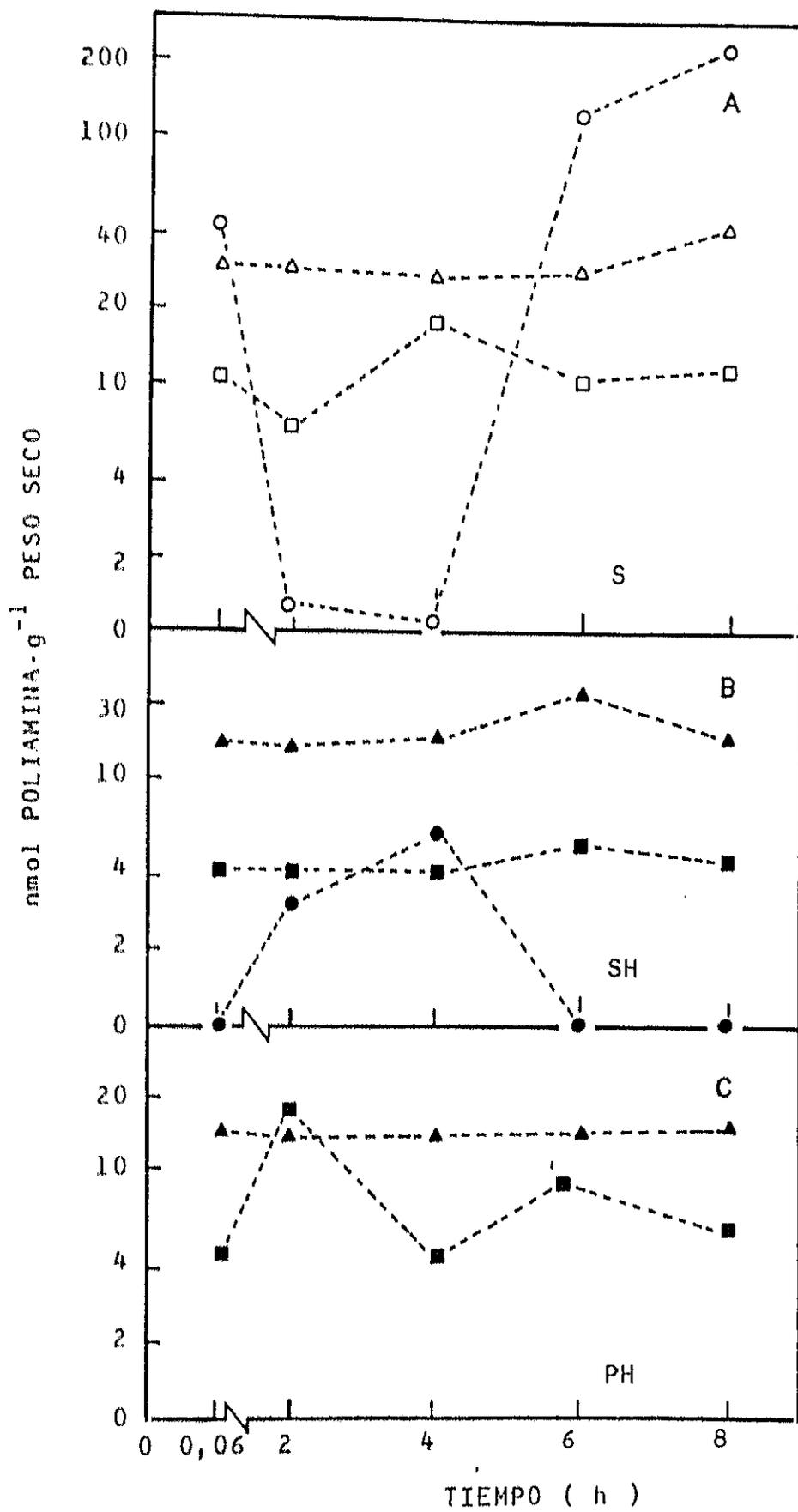


FIGURA 27.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo, secretadas al medio de incubación de talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con fosfato sódico 75 mM, pH 6,9.

En A se representa la fracción de poliaminas libres (S), en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).



secretadas al medio de incubación putrescina y espermidina, donde sí se incrementan los valores (Fig. 28B). La cantidad de espermina en el talo desciende, no detectándose la presencia de dicha poliamina en los medios a pH básico (Fig. 28A yB).

La evolución a lo largo del periodo de tratamiento de cada una de las formas: libres, conjugadas solubles y conjugadas insolubles, puede observarse en las Figuras 29 y 30.

En cuanto a las formas libres en el talo, los niveles de espermidina y espermina descienden ligeramente, mientras permanecen constantes los de putrescina (Fig. 29A). Atendiendo a la formación de conjugados solubles, los niveles de la diamina y la tetraamina decaen, llegando a anularse los de putrescina a las 6 h (Fig. 29B). En lo que se refiere a la espermidina, sus niveles descienden en las primeras 4 h, recuperándose posteriormente a lo largo del tratamiento a pH alcalino (Fig. 29B).

En el análisis de la evolución de formas conjugadas insolubles en talo, no se aprecian variaciones con respecto a los niveles hallados a tiempo inicial (fig. 29C).

Al medio de incubación se secreta espermidina, en forma libre, a lo largo de todo el periodo de incubación y putrescina a partir de las 4 h (Fig. 30A). En los medios a pH alcalino, no se detectan formas conjugadas solubles, sólo son secretados conjugados insolubles de espermidina, permaneciendo sus niveles constantes hasta el final del tratamiento (Fig. 30B).

III.4.- TRANSPORTE Y ADSORCION DE PUTRESCINA

Un estudio más detallado del mecanismo de captación de putrescina permitió determinar cómo se lleva a cabo su transporte: si es una simple difusión o si necesita una molécula transportadora.

En el estudio se emplearon técnicas isotópicas con

FIGURA 28.- Variación en talo (A) y en medio (B) de la cantidad total (fracción libre y fracciones conjugadas) de putrescina (○), espermidina (△) y espermina (□) cuando los talos de *E. prunastri* son incubados en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15.

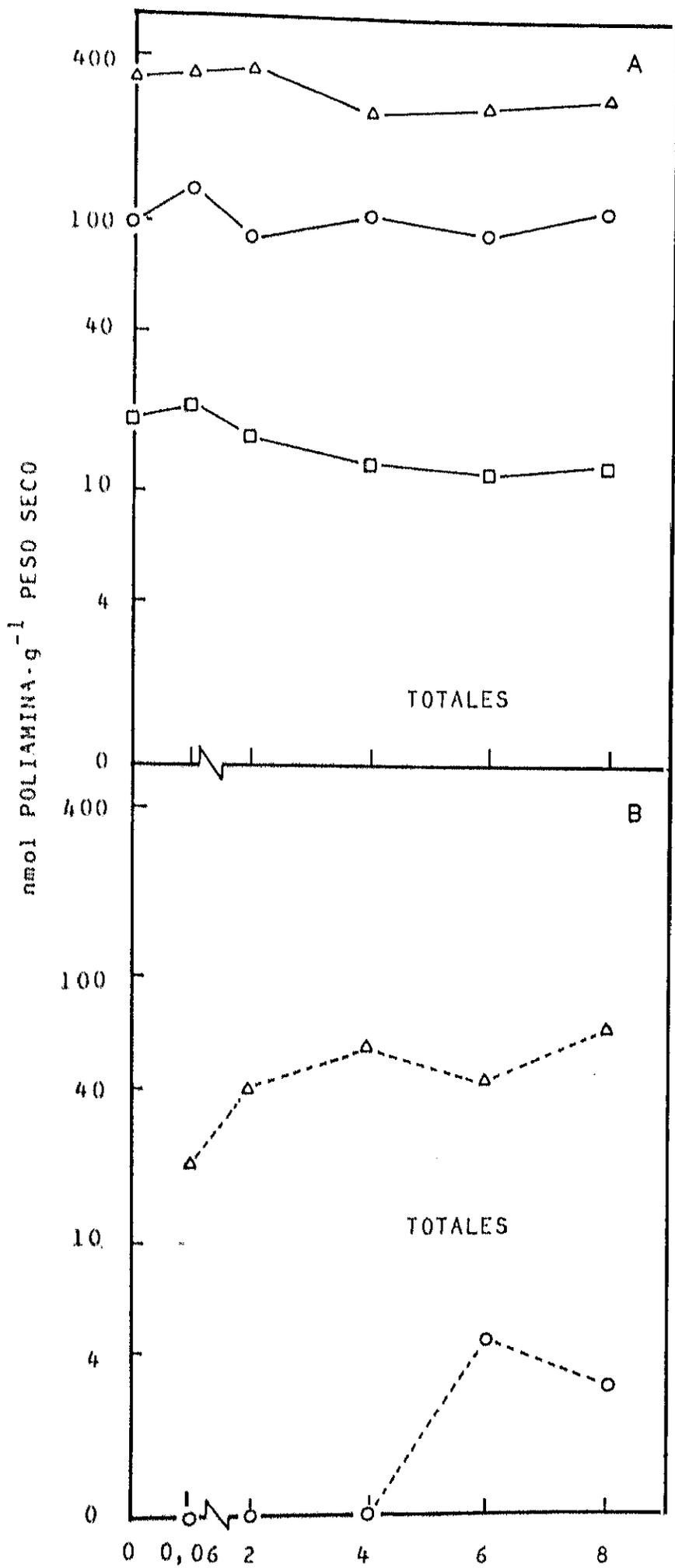


FIGURA 29.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo de incubación, en talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15.

En A se representa la fracción de poliaminas libres (S), en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).

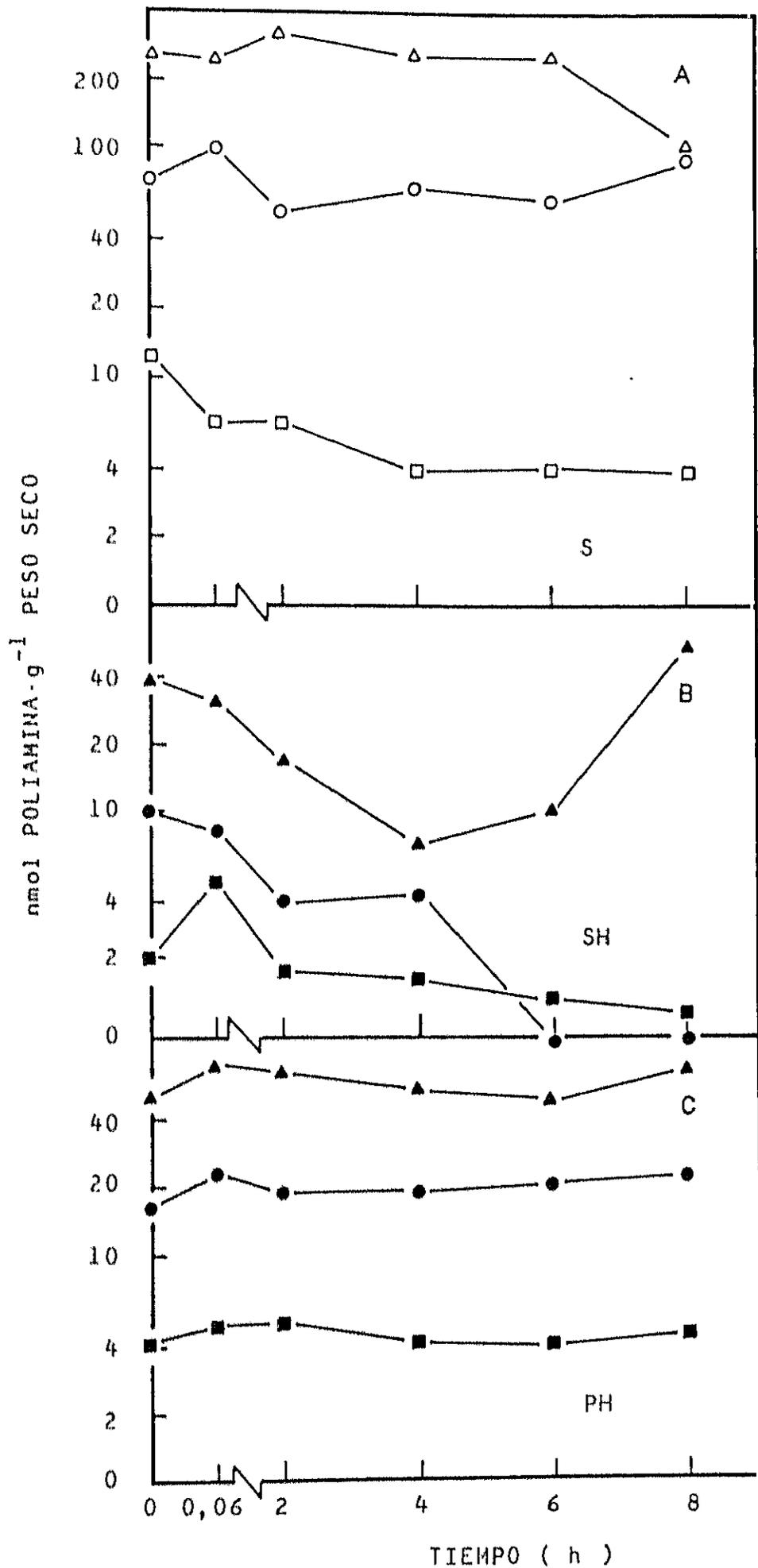
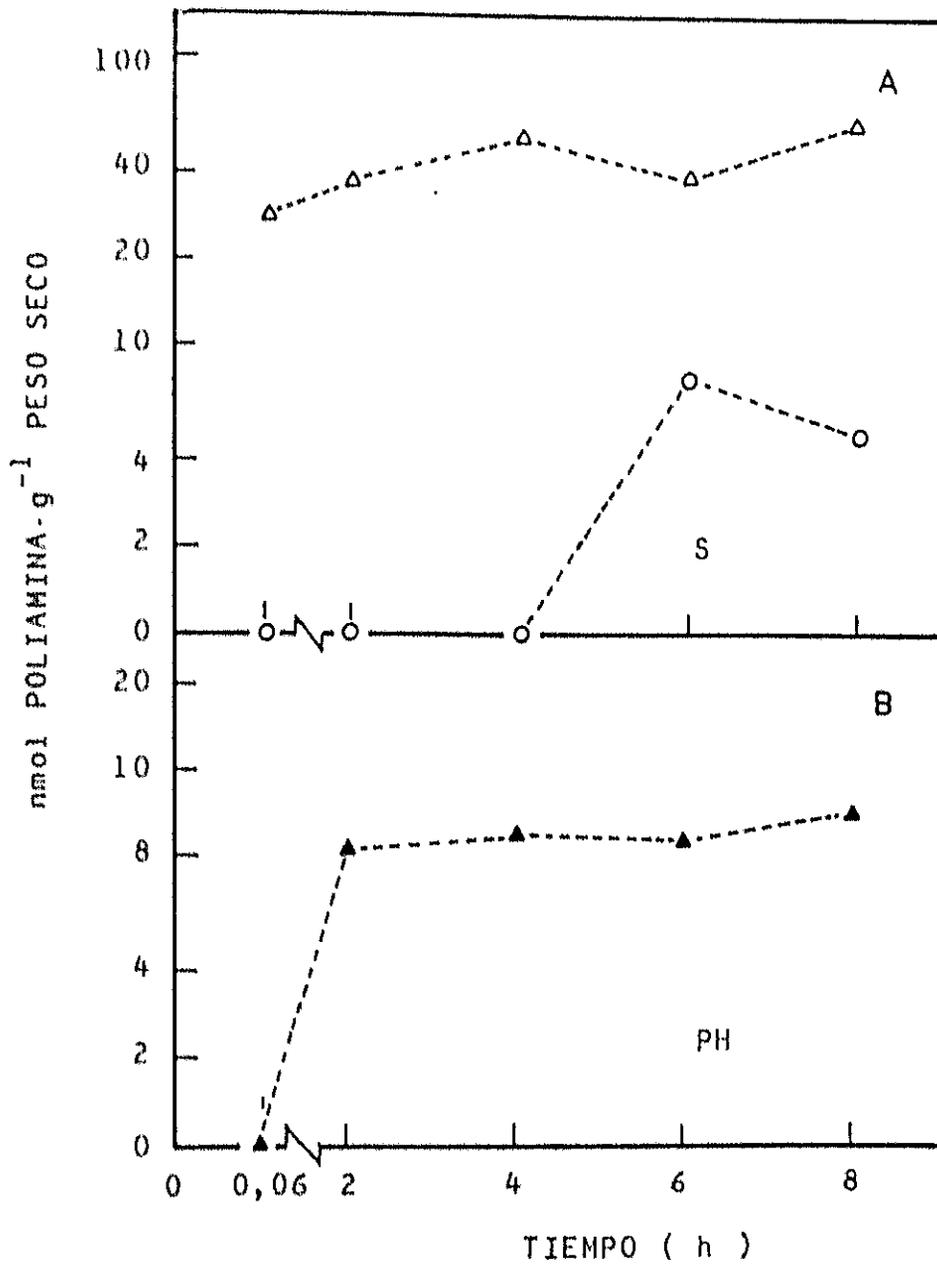


FIGURA 30.- Variación de la cantidad de putrescina (○, ●), espermidina (△, ▲) y espermina (□, ■) con el tiempo, secretadas al medio de incubación de talos de *E. prunastri* incubados en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15.

En A se representa la fracción libre (S), en B la de poliaminas conjugadas solubles en ácido (SH) y en C la de poliaminas conjugadas insolubles en ácido (PH).



putrescina fría y 1,4[¹⁴C]-putrescina. En todos los ensayos los talos liquénicos fueron incubados durante 4 min en el tampón indicado en cada caso, previamente al tratamineto, evitando así el paso de putrescina por simple rehidratación del talo. Después de la incubación, los talos se mantuvieron durante 2 min en TCA al 5% frío, eliminándose de esta forma la posible presencia de putrescina en los espacios intercelulares así como la adsorbida, dado que se comporta como un catión, cuantificándose posteriormente esta última.

III.4.1.- Transporte y adsorción en función del peso del talo

Una vez tratadas las muestras como se describe en el apartado II.11.1., los talos, cuyo peso seco osciló entre 3 y 11 mg, fueron incubados en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, a los que se les agregó putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$ de 1,4[¹⁴C]-putrescina), durante 1 h en oscuridad y a 26°C. El transporte y la adsorción fueron medidos (apartado II.11.2.) en función del peso seco del talo.

En la Figura 31A se observa que el transporte es lineal con respecto al peso del talo, mostrando un valor medio de $6,69 \pm 0,75 \mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Existe un gran componente de adsorción, que también es lineal con respecto al incremento del peso de los talos, presentando un valor medio de $115,3 \pm 11,65 \mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Fig. 31B).

III.4.2.- Transporte y adsorción en función del tiempo de incubación

Las muestras de talo fueron incubadas con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$) en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, de 0 a 4 h en oscuridad a 26°C.

En la Figura 32 se representa el transporte de la diamina en función del tiempo de incubación, observándose un

FIGURA 31.- Velocidad de transporte (A) y adsorción (B) de putrescina en función del peso seco del talo de *E. prunastri*. Estos fueron incubados, durante 1 h, en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -putrescina).

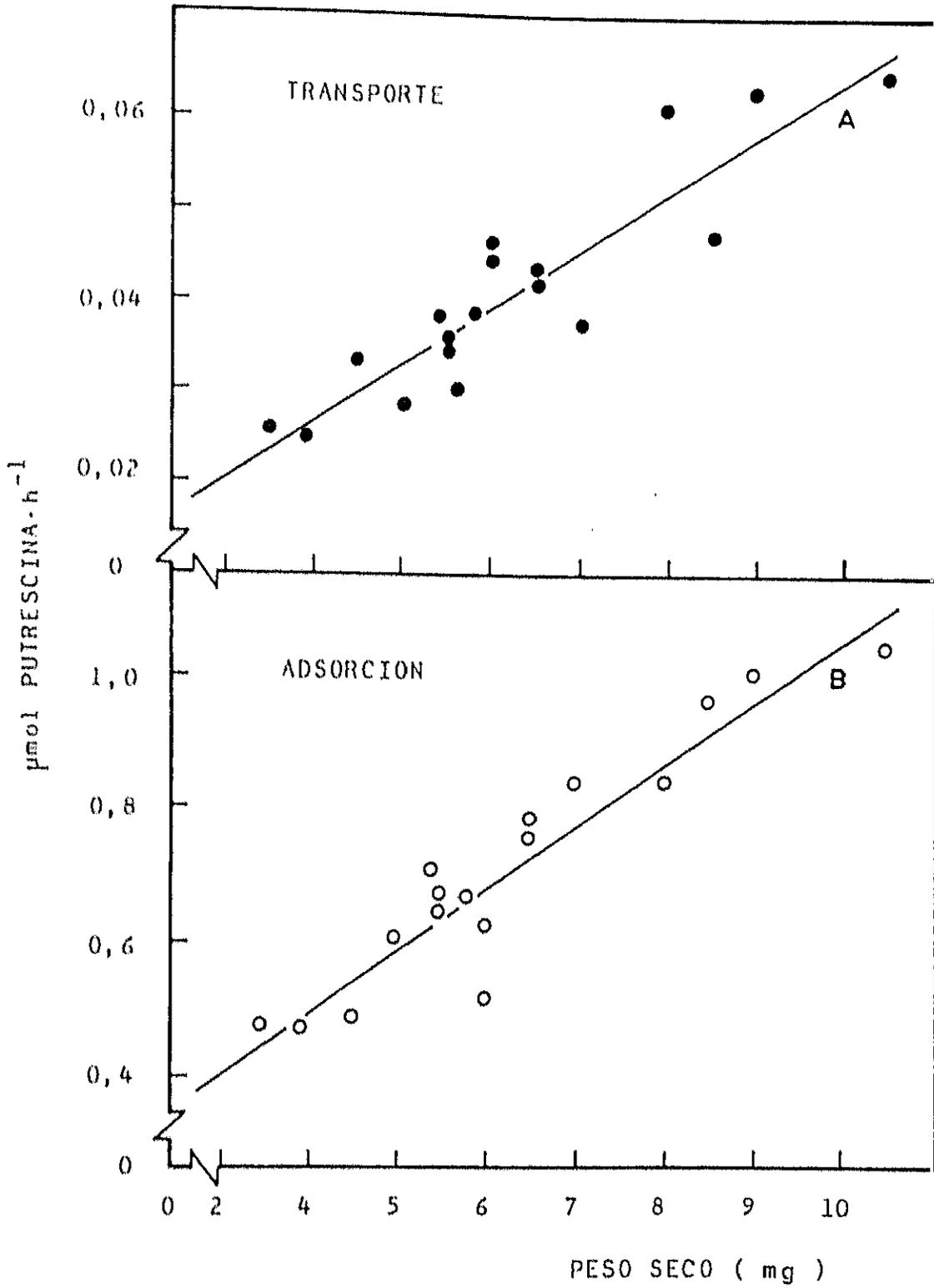
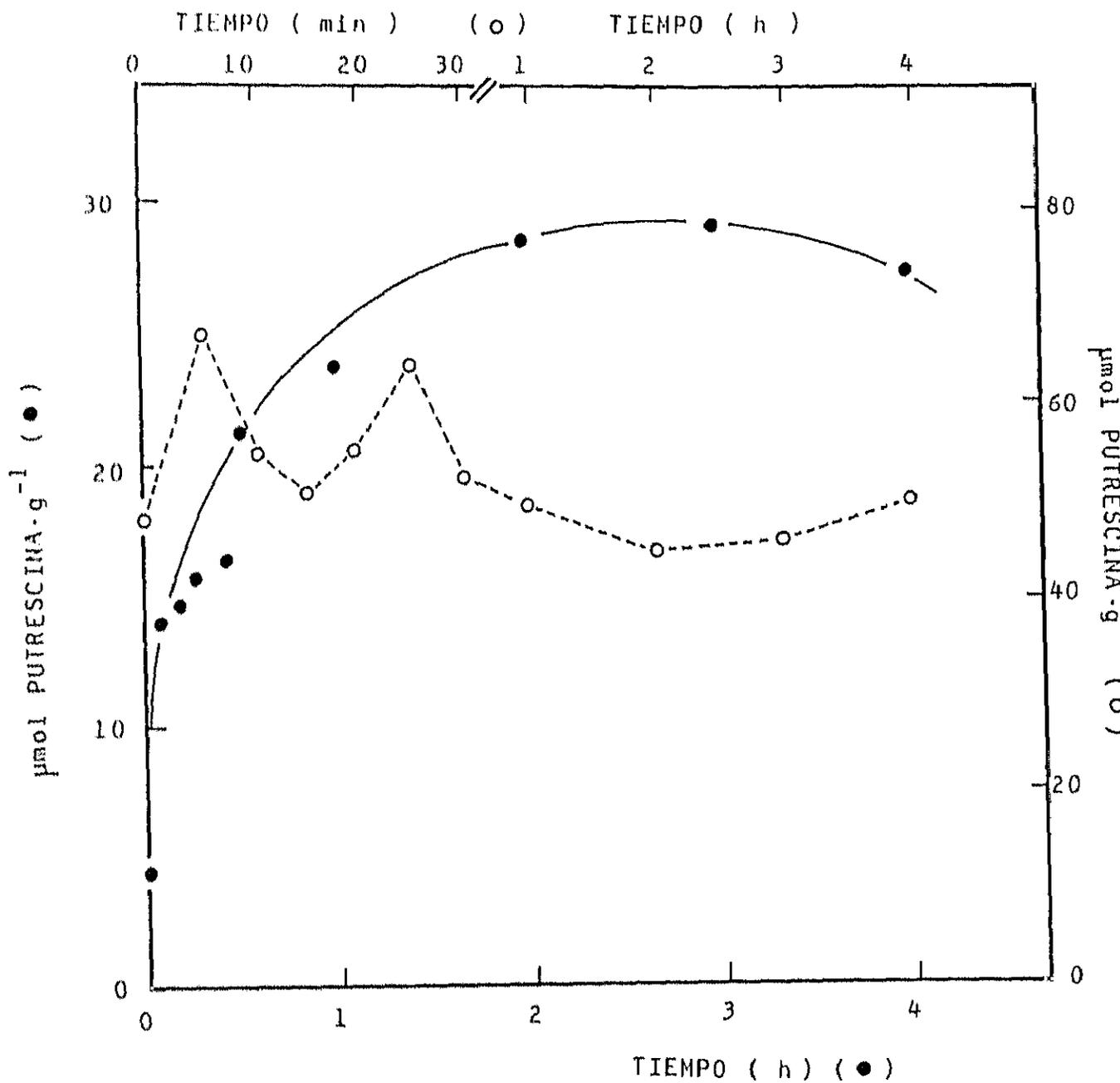


FIGURA 32.- Variación en el tiempo del transporte (●) y la adsorción (○) de putrescina por talos de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$ de 1,4[^{14}C]-putrescina).



aumento progresivo hasta rendir un máximo a las 2 h, decreciendo posteriormente hasta el final del tratamineto. Los valores de putrescina adsorbida (Fig. 32) presentan máximos a los 5 y 25 min de incubación.

III.4.3.- Transporte y adsorción en función del pH extracelular

El efecto del pH sobre el transporte y la adsorción de putrescina fue estudiado en un rango de pH entre 4 y 10,6 , obtenido mediante el uso de diferentes tampones, como se describe en el apartado II.11.3. La concentración de putrescina utilizada fue 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) y los talos fueron incubados durante 1 h en oscuridad a 26°C .

En la Figura 33 se representa el transporte de putrescina en función del pH. La entrada de la diamina es dependiente del pH extracelular, encontrandose una relación exponencial entre valores de pH 7 y 11 y no presentando dependencia de la naturaleza del tampón utilizado.

Por el contrario, la adsorción de la diamina (Fig. 33) es dependiente de la naturaleza del tampón, ya que no se observa una clara evolución con respecto a los distintos valores de pH. El tampón Tris-HCl parece favorecer la adsorción de putrescina sobre las paredes del talo liquénico a valores de pH entre 7,5 y 9. Sin embargo cuando el tampón utilizado es glicina-NaOH, la adsorción disminuye drásticamente a altos valores de pH (entre 9 y 11), hecho que bien pudiera deberse a la presencia de glicina en el medio.

Para demostrar si este efecto tiene lugar, los talos fueron incubados en putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$), en presencia o ausencia de glicina 20 mM, en medios tamponados a pH 9,15 con Tris-HCl 0,1 M, durante 1h en oscuridad a 26°C .

En la Tabla VI se muestran los resultados, observándose que la presencia de glicina no modifica los valores de transporte ni de la adsorción hallados en los experimentos

FIGURA 33.- Variación en la velocidad del transporte (símbolos llenos) y la adsorción (símbolos vacíos) de putrescina, en función del pH, por talos de *E. prunastri* incubados durante 1 h en diferentes medios tamponados con putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -putrescina.

Los tampones empleados fueron:

- (▲, △), ácido cítrico-fosfato disódico
0,15 M, pH 4,0-7,0
- (●, ○), fosfato sódico 0,2 M, pH 6,0-8,0
- (■, □), Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5-8,9
- (◆, ◇), glicina-NaOH 0,2 M, pH 8,5-10,6

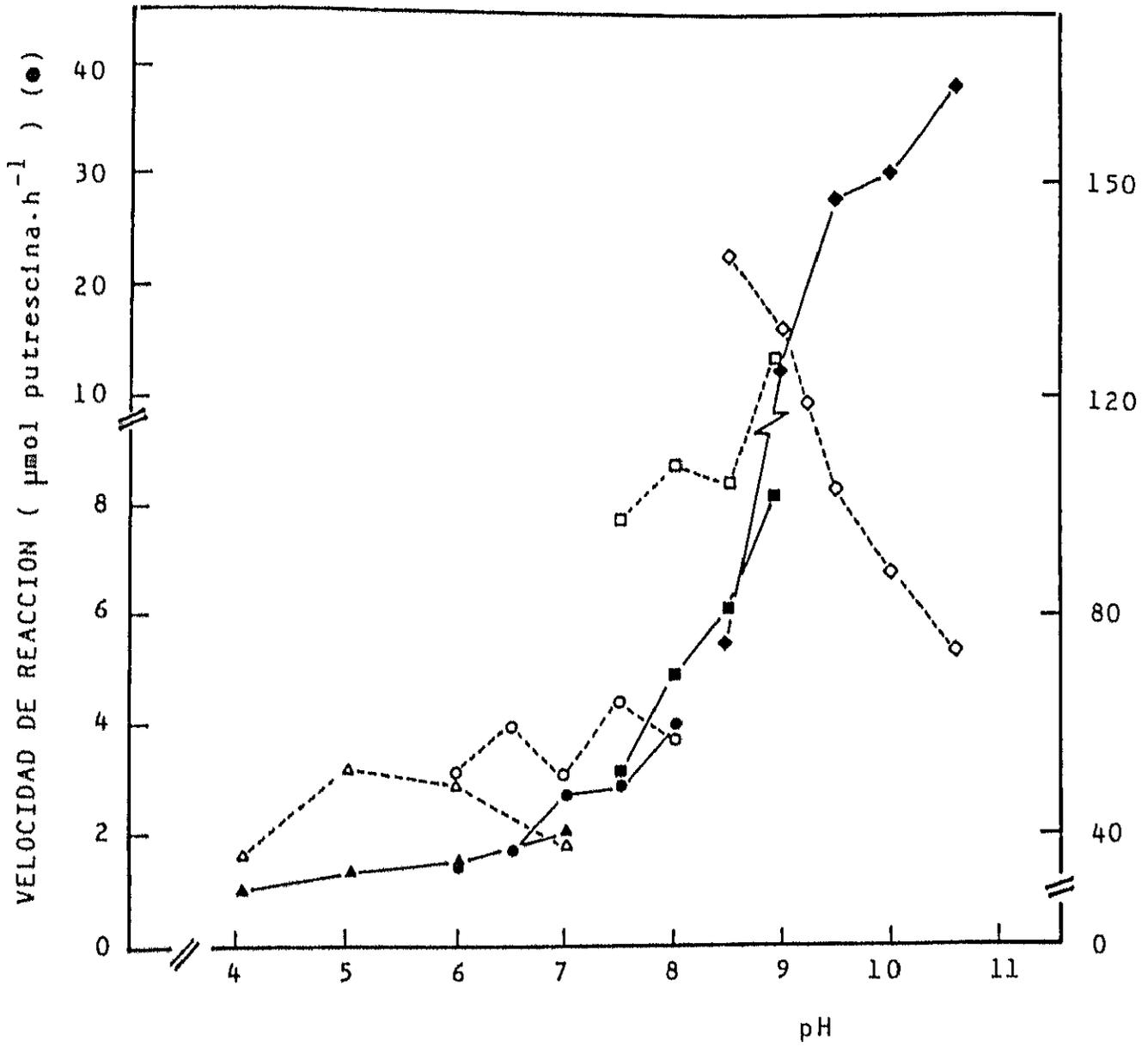


TABLA VI.- Transporte y adsorción de putrescina
(conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -
putrescina) en presencia de glicina.

MEDIO DE INCUBACION	TRANSPORTE ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	ADSORCION
control: putrescina 5 mM	$11,33 \pm 0,9$	$86,40 \pm 5,8$
glicina 5 mM + putrescina 5 mM	$10,16 \pm 1,3$	$87,45 \pm 3,8$

control. Por ello, la presencia de glicina en los medios de incubación no es la responsable del incremento en el transporte de putrescina ni de la caída en su adsorción, encontrados a valores de pH entre 8,5 y 10,6.

Se quiso demostrar, por lo tanto, si la baja entrada de diamina en el talo a pHs ácido y neutro (Fig. 33) era debida exclusivamente al pH o estaba limitada por la acción de una DAO (Fig. 18A yB).

Por ello, incubamos talos con putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$) en medios tamponados a pHs 5, 6 y 7, con ácido cítrico-fosfato disódico 0,1 M y a pHs 8 y 9 con Tris-HCl 0,1 M, durante 1h en oscuridad a 26°C .

En primer lugar se midió la radiactividad total dentro del talo, la adsorbida sobre las paredes y la contenida en el medio tras la incubación, según se describe en el apartado II.11.2. Posteriormente, una vez extraídas las poliaminas libres del medio de incubación éstas fueron dansiladas (apartado II.10.1. y II.10.2.) y a continuación separadas por TLC (apartado II.11.5.). En la Figura 34 se muestra un diagrama con los Rfs hallados para putrescina, espermidina y espermina en el desarrollo de la placa de TLC.

La Figura 35 recoge los resultados correspondientes a este experimento, expresados como " $\text{dpm.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de peso seco". La putrescina que permanece en el medio (Fig. 35B), al cabo de 1 h de tratamiento, sigue una evolución paralela a la hallada en las moléculas radiactivas totales del medio, disminuyendo sus niveles conforme el pH se hace más básico y en paralelo al incremento de la entrada de putrescina a los talos (Fig. 35A). Debido a ello, el transporte no está limitado por bajos niveles de la diamina en el medio de incubación a pH ácido o neutro, pero sí por el valor del pH extracelular.

Cabe destacar los bajos niveles de putrescina hallados con respecto al marcaje total en los medios, lo que indica un alto metabolismo de la diamina, que parece estar

FIGURA 34.- Diagrama de cromatografía en capa fina de putrescina, espermidina y espermina comerciales, según el procedimiento descrito en el apartado II.11.5. de Material y Métodos.

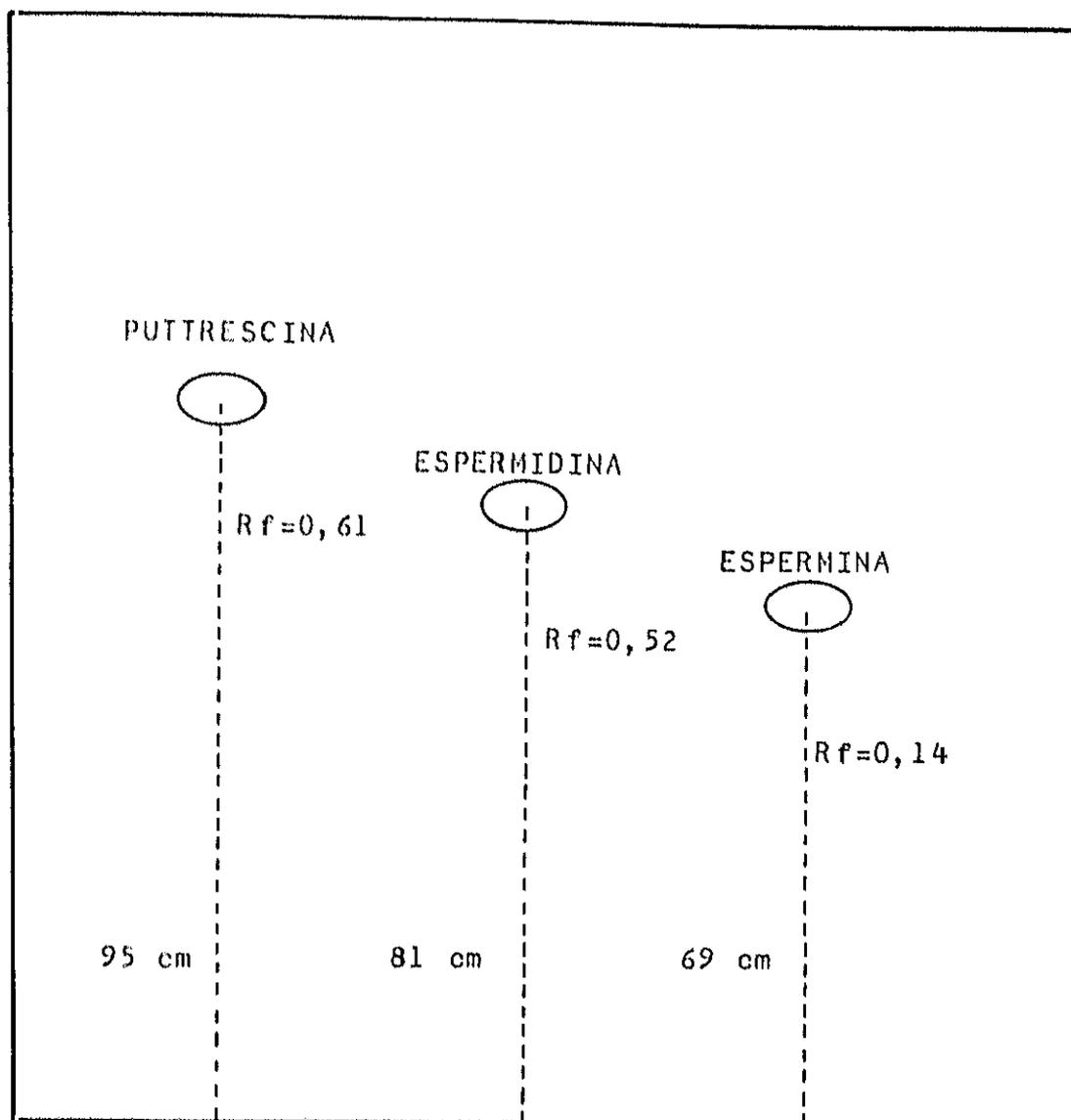
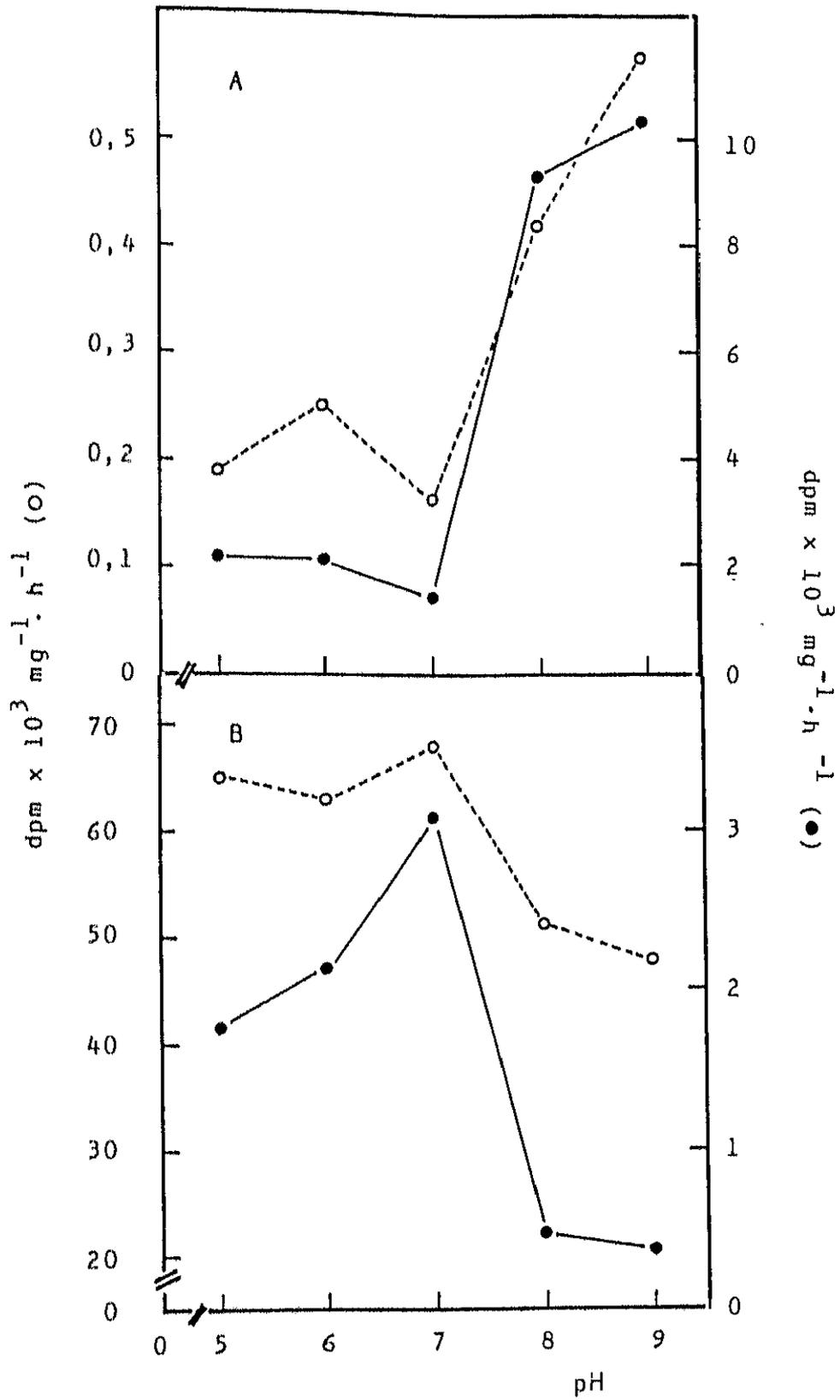


FIGURA 35.- Variación de la radiactividad total en función del pH de incubación de talos de *E. prunastri* incubados durante 1 h con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci. ml}^{-1}$ de 1,4[^{14}C]-putrescina) en medios tamponados a pH 5-7 con ácido cítrico-fosfato disódico 0,1 M y a pH 8-9 con Tris-HCl 0,1 M.

En A) se representa la radiactividad total en talo (○) y la adsorbida (●). En B) se representa la radiactividad total en medio (○) y la recuperada, mediante cromatografía en capa fina, en putrescina (●).



inclinado hacia su catabolismo o conjugación más que hacia la síntesis de espermidina o espermina, ya que para cada uno de los pHs ensayados solamente se encuentra radiactividad en las manchas correspondientes a la diamina.

III.4.4.- Transporte y adsorción en función de la temperatura

Para este estudio, los talos fueron previamente mantenidos durante 30 min en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, en oscuridad a 0, 4, 18, 26, 30, 37 y 45°C. Pasado este tiempo se les adicionó putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$), permaneciendo durante 1 h en las mismas condiciones y temperaturas antes señaladas.

La cantidad de putrescina adsorbida y transportada, a cada temperatura, fue valorada según se describe en el apartado II.11.2.

El transporte de la diamina no se ve afectado por bajas temperaturas, rindiendo un máximo a los 37°C y decreciendo posteriormente conforme la temperatura incrementa (Fig. 36). La adsorción muestra un comportamiento diferente, hallándose un máximo a 26°C y un mínimo a 30°C, se observa también un incremento posterior en la adsorción de la diamina a medida que incrementa la temperatura de incubación (Fig. 36).

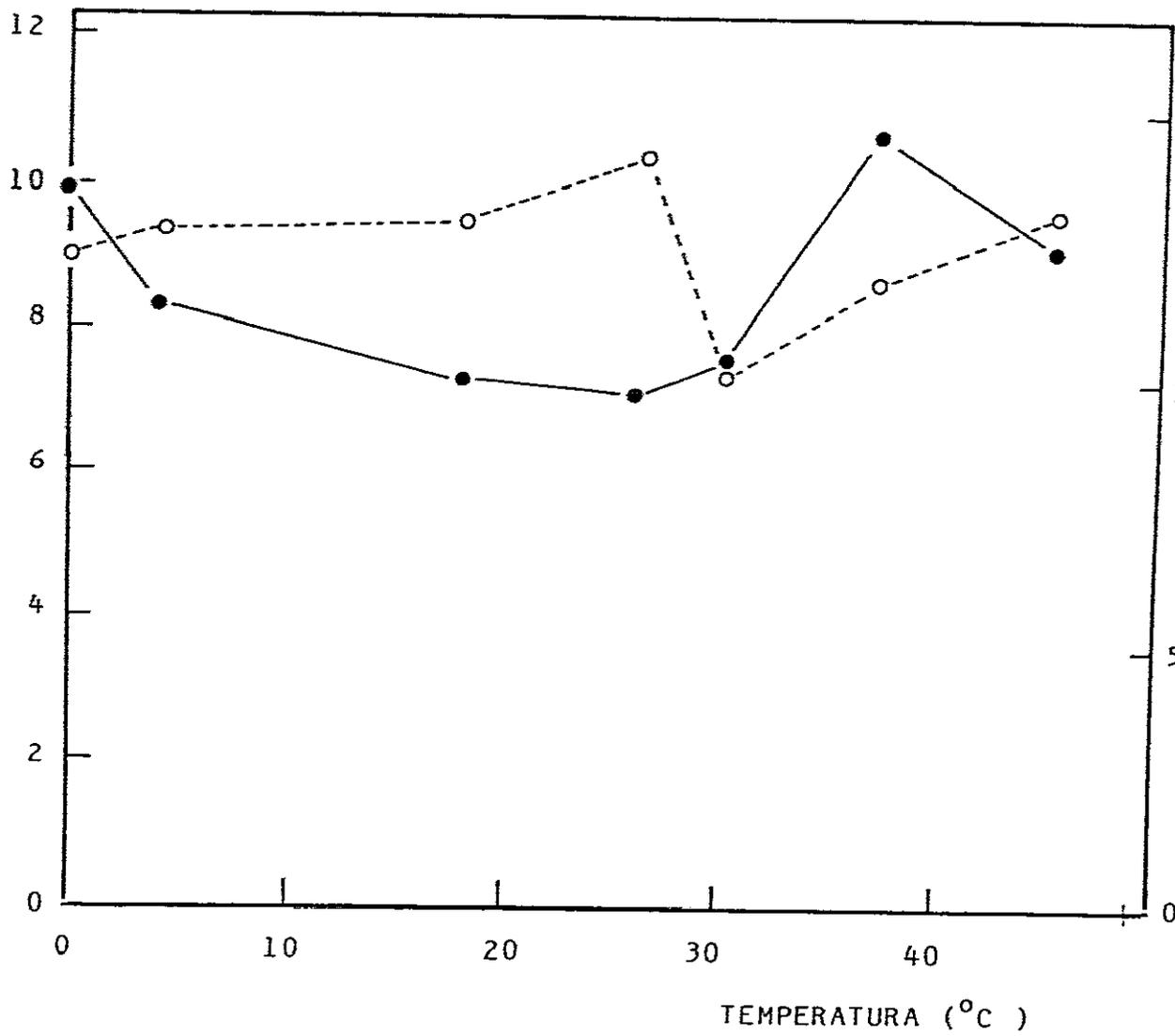
III.4.5.- Efecto de inhibidores metabólicos

Ya que el transporte de putrescina no es anulado por bajas temperaturas (0°C), se ensayaron distintos inhibidores metabólicos con el fin de confirmar si dicho transporte es llevado a cabo por un sistema independiente de la energía metabólica.

Los inhibidores fueron: cianuro sódico 1 mM, 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) 1 mM y nistatina en una dosis de 10.000 unidades. ml^{-1} .

FIGURA 36.- Variación en la velocidad del transporte (●) y la adsorción (○) de putrescina en función de la temperatura, por talos de *E. prunastri* incubados durante 30 min en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 1,4[^{14}C]-putrescina).

VELOCIDAD DE REACCION ($\mu\text{mol putrescina}\cdot\text{h}^{-1}$) (●)



VELOCIDAD DE REACCION ($\mu\text{mol putrescina}\cdot\text{h}^{-1}$) (○)

TABLA VII.- Efecto de inhibidores metabólicos sobre el transporte y la adsorción de putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 1,4[^{14}C]-putrescina).

	INHIBIDOR	CONCENTRACION	VELOCIDAD ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
T R A N S P O R T E	control	---	8,3 \pm 0,05
	nistatina	10.000 u.ml $^{-1}$	8,4 \pm 1,20
	NaCN	1 mM	9,0 \pm 0,82
	2,4-DNP	1 mM	8,0 \pm 0,50
A D S O R C I O N	control	---	110,4 \pm 9,80
	nistatina	10.000 u.ml $^{-1}$	100,8 \pm 2,50
	NaCN	1 mM	94,4 \pm 4,10
	2,4-DNP	1 mM	112,2 \pm 15,8

Los talos fueron preincubados durante 30 min en medios tamponados a pH 9,15 con Tris-HCl 0,1 M, conteniendo o no los inhibidores metabólicos, en oscuridad a 26°C. Posteriormente se suministró putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$) manteniendolos durante 1 h en las mismas condiciones.

Una vez procesadas las muestras, se determinó la cantidad de putrescina contenida en los talos, así como la adsorbida (apartado II.11.2.).

Como se muestra en la Tabla VII, los valores obtenidos para el transporte y la adsorción no se modifican bajo la presencia de los distintos inhibidores metabólicos ensayados.

III.4.6.- Cinética del transporte

III.4.6.1.- K_m y V_{max}

La estimación de la velocidad del transporte frente a la concentración de putrescina se realizó según se describe en el apartado II.11.4.1.

En la Figura 37 se muestran estos resultados, confirmando que el transporte se corresponde con una ecuación del tipo:

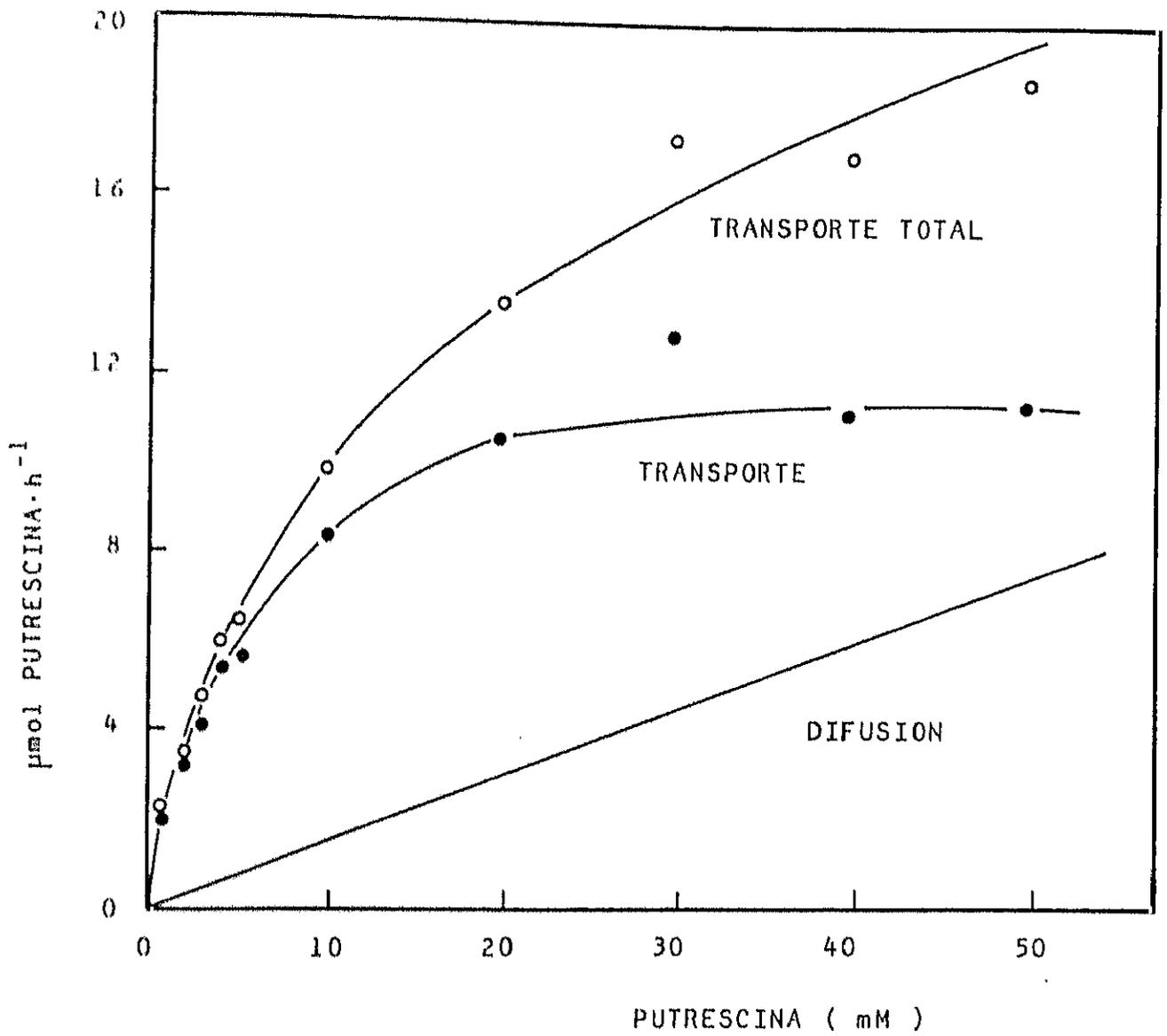
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} + K_d \cdot [S]$$

indicando claramente que en él están implicados dos componentes:

- A- Un componente no saturable en el rango de concentraciones ensayadas, difusión pasiva, cuya ecuación sería:

$$v = K_d \cdot [S]$$

FIGURA 37.- Variación en la velocidad del transporte y la difusión de putrescina en función de las concentraciones de diamina suministradas a talos de *E. prunastri*.



Mediante el método de los mínimos cuadrados se ajustó una recta de regresión a los cuatro primeros valores del transporte total (transporte más difusión), obteniéndose la ecuación:

$$y = 0,15x \quad r = 0,87$$

pudiéndose estimar, por lo tanto, que posee una K_a de $0,15 \mu\text{moles de putrescina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{mM}^{-1}$ (Tabla VIII).

B- Un segundo componente, saturable a partir de concentraciones superiores a 20 mM de putrescina, que muestra una cinética del tipo descrito por Michaelis Menten. Mediante la representación de dobles inversos de Lineweaver-Burk (Fig. 38A) se determina una V_{max} de $12,5 \mu\text{moles de putrescina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$, y una K_m de 5,3 mM (Tabla VIII). La representación de Eadie-Hofstee (Fig. 38B) muestra valores semejantes para cada una de las constantes cinéticas, V_{max} con un valor de $13,4 \mu\text{moles de putrescina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ y un valor de K_m de 6,025 mM (Tabla VIII).

III.4.6.2.- I_{50} para espermidina y espermina

Como inhibidores del transporte de putrescina se ensayaron las poliaminas espermidina y espermina. Se incubaron talos en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, con putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$) y espermidina o espermina 5 mM, durante 1 h en oscuridad a 26°C .

En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos, demostrando que ambas poliaminas actúan como inhibidores del transporte y de la adsorción de la diamina. La espermina es la que mayor efecto ejerce, inhibiendo el transporte un 54,2% y la espermidina un 51,2%.

TABLA VIII.- Constantes cinéticas del transporte de putrescina.

DIFUSION $y = 0,148 x + 11,46$; $r = 0,87$

$$K_d = 0,15 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{mM}^{-1}$$

REPRESENTACION DE LINEWEAVER-BURK

TRANSPORTE $y = 0,425 x + 0,08$; $r = 0,99$

$$V_{\text{max}} = 12,5 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$$

$$K_m = 5,3 \text{ mM}$$

TRANSPORTE + DIFUSION $y = 0,417 x + 0,06$; $r = 0,99$

$$V_{\text{max}} = 17,03 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$$

$$K_m = 6,66 \text{ mM}$$

REPRESENTACION DE EADIE-HOFSTEE

TRANSPORTE $y = -6,025 x + 13,41$; $r = -0,97$

$$V_{\text{max}} = 13,41 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$$

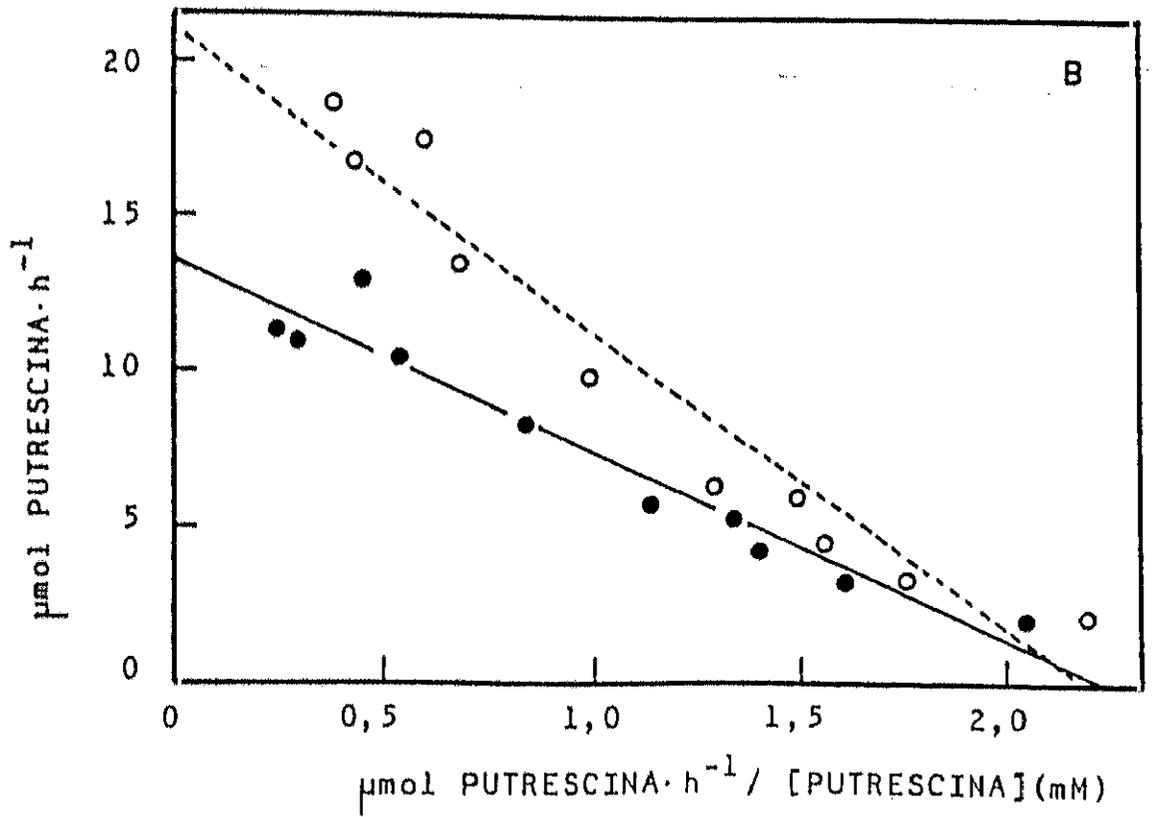
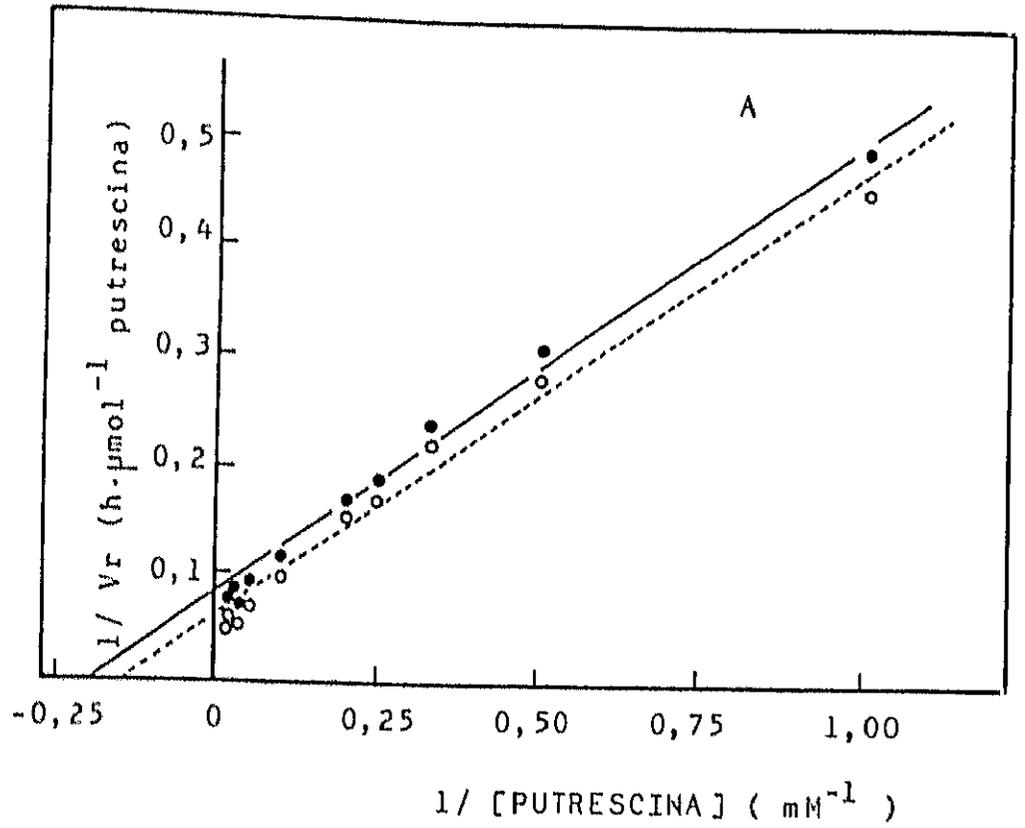
$$K_m = 6,02 \text{ mM}$$

TRANSPORTE + DIFUSION $y = -9,77 x + 20,98$; $r = -0,97$

$$V_{\text{max}} = 20,98 \mu\text{moles.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$$

$$K_m = 9,77 \text{ mM}$$

FIGURA 38.- Representación doble recíproca de la variación en la velocidad del transporte (●) y del transporte más difusión (○) de putrescina en función de las concentraciones de diamina suministradas a talos de *E. prunastri* (A). En (B), representación de Eadie-Hofstee del transporte (●) y del transporte más difusión (○).



Atendiendo a la adsorción, la respuesta es semejante, inhibiendo la espermina el 65,9% y la espermidina un 58,8%.

Para la obtención de la curva "dosis-respuesta" se procedió como se describe en el apartado II.11.4.2.

En la Figura 39 se representa la velocidad del transporte frente a la concentración de espermidina. Mediante la representación doble logarítmica se determina un valor de I_{50} para esta poliamina de 2,17 mM. En la Figura 40 se representan los datos de la velocidad del transporte frente a la concentración de espermina, estimando un valor de I_{50} de 1 mM.

III.4.6.3.- K_i de espermidina y espermina. Transporte de espermina

Las cinéticas de inhibición para espermidina y espermina se determinaron según lo descrito en el apartado II.11.4.2.

Mediante la representación de dobles inversas de Lineweaver-Burk, se demuestra que ambas poliaminas se comportan como inhibidores competitivos en el transporte de putrescina (Figs. 41 y 42).

El valor de K_i se determinó en cada caso, representando los valores de las pendientes frente a la concentración de inhibidor. En la Tabla X se recogen estos valores, así como los de K_{app} y V'_{max} .

Dado que espermidina y espermina son inhibidores competitivos, se quiso determinar si, además, éstas eran transportadas. Para ello, se realizó un ensayo de transporte de espermina, mediante el uso de mezclas isotópicas de espermina fría y $1,7[^{14}C]$ -espermina ($110 \text{ mCi.mmol}^{-1}$). Los talos fueron incubados en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con espermina 5 mM (conteniendo $0,15 \text{ } \mu\text{Ci.ml}^{-1}$), durante 1 h en oscuridad a 26°C . Las muestras fueron tratadas y la radiactividad medida como se describe en los apartados II.11.1 y II.11.2.

TABLA IX.- Inhibición del transporte y la adsorción de putrescina 5 mM (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -putrescina) por espermidina y espermina.

MEDIO DE INCUBACION	VELOCIDAD DE TRANSPORTE ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$)	VELOCIDAD DE ADSORCION ($\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$)
CONTROL.	$6,76 \pm 0,2$	$125,60 \pm 8,4$
ESPERMIDINA (5 mM)	$3,30 \pm 0,2$ (51,20)	$51,80 \pm 4,1$ (58,76)
ESPERMINA (5 mM)	$3,10 \pm 0,3$ (54,14)	$42,80 \pm 2,8$ (65,92)

Entre paréntesis se representa los porcentajes de inhibición de la velocidad del transporte y de la adsorción.

FIGURA 39.- Curva dosis-respuesta de espermidina como inhibidor del transporte de putrescina en talos de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo $0,25 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -putrescina). En el recuadro interno se muestra la representación semilogarítmica usada para la determinación gráfica del valor I_{50} .

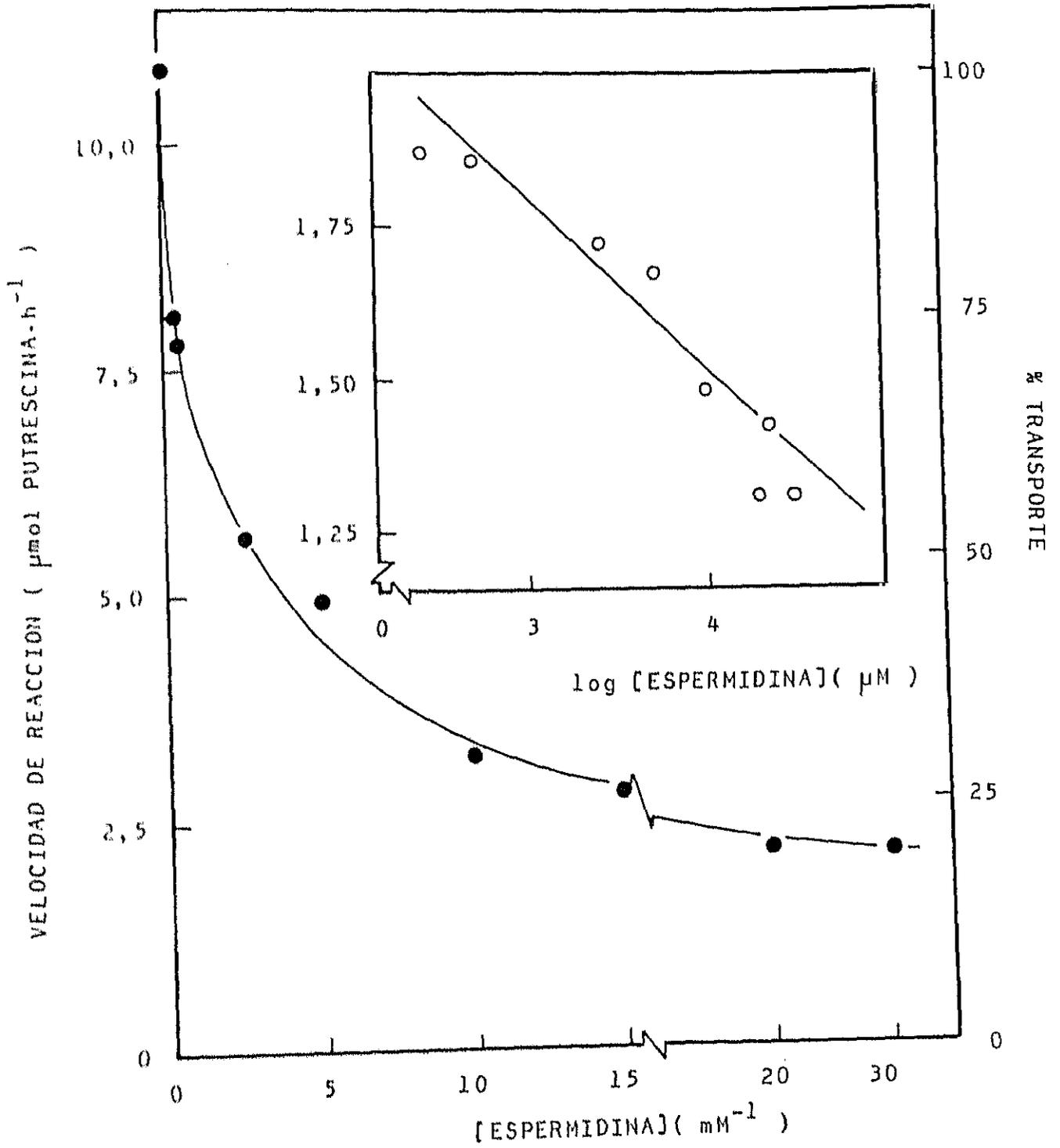


FIGURA 40.- Curva dosis-respuesta de espermina como inhibidor del transporte de putrescina en talos de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo $0,25 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $1,4[^{14}\text{C}]$ -putrescina. En el recuadro interno se muestra la representación semilogarítmica usada para la determinación gráfica del valor I_{50} .

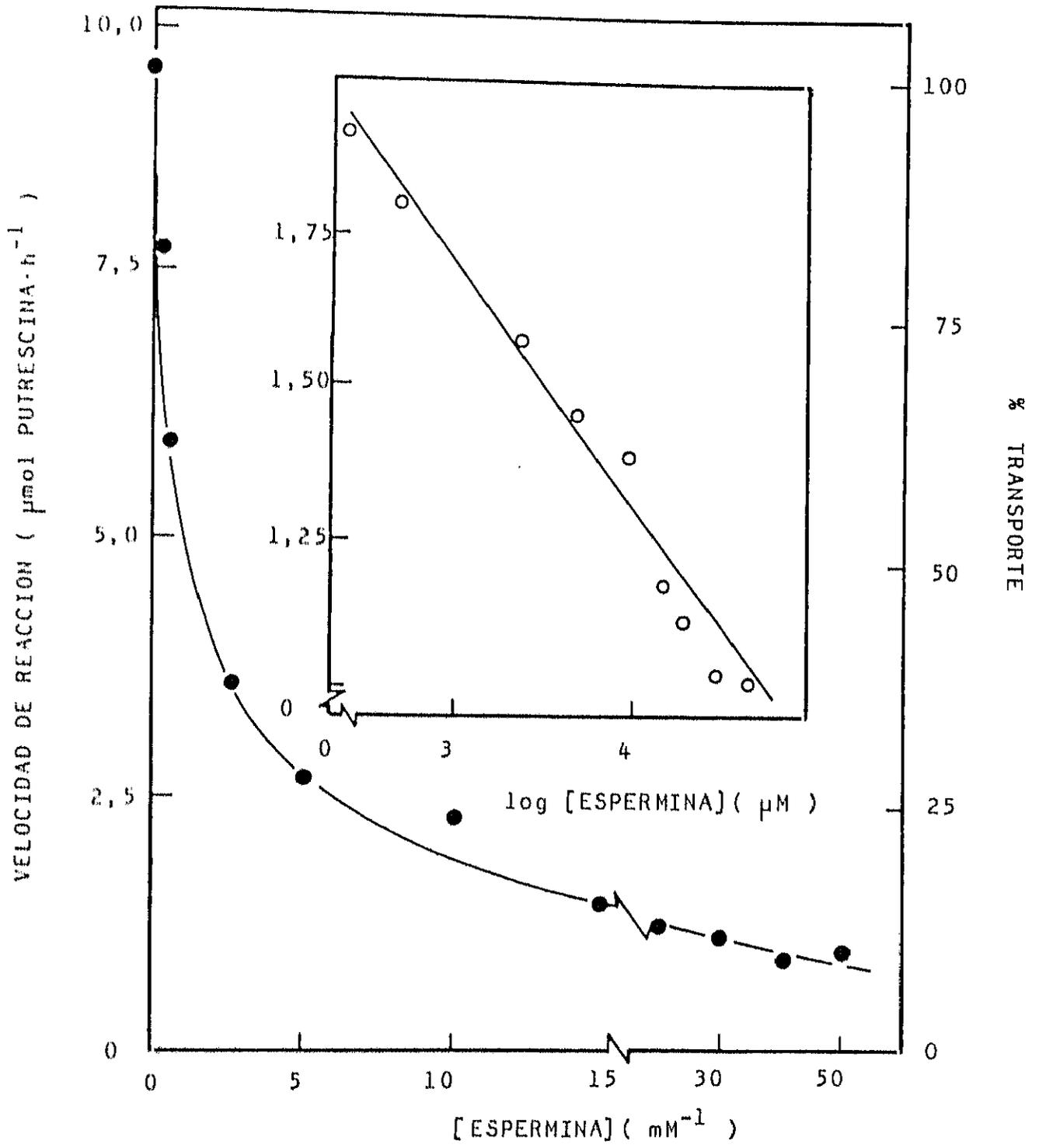


FIGURA 41.- Efecto de la concentración de espermidina 1 mM (Δ) y 3 mM (O) sobre la velocidad del transporte de putrescina en función de las concentraciones de esta diamina suministradas a talos de *E. prunastri*. En el recuadro interno se muestra la representación de las pendientes, utilizada para el cálculo de K_i .

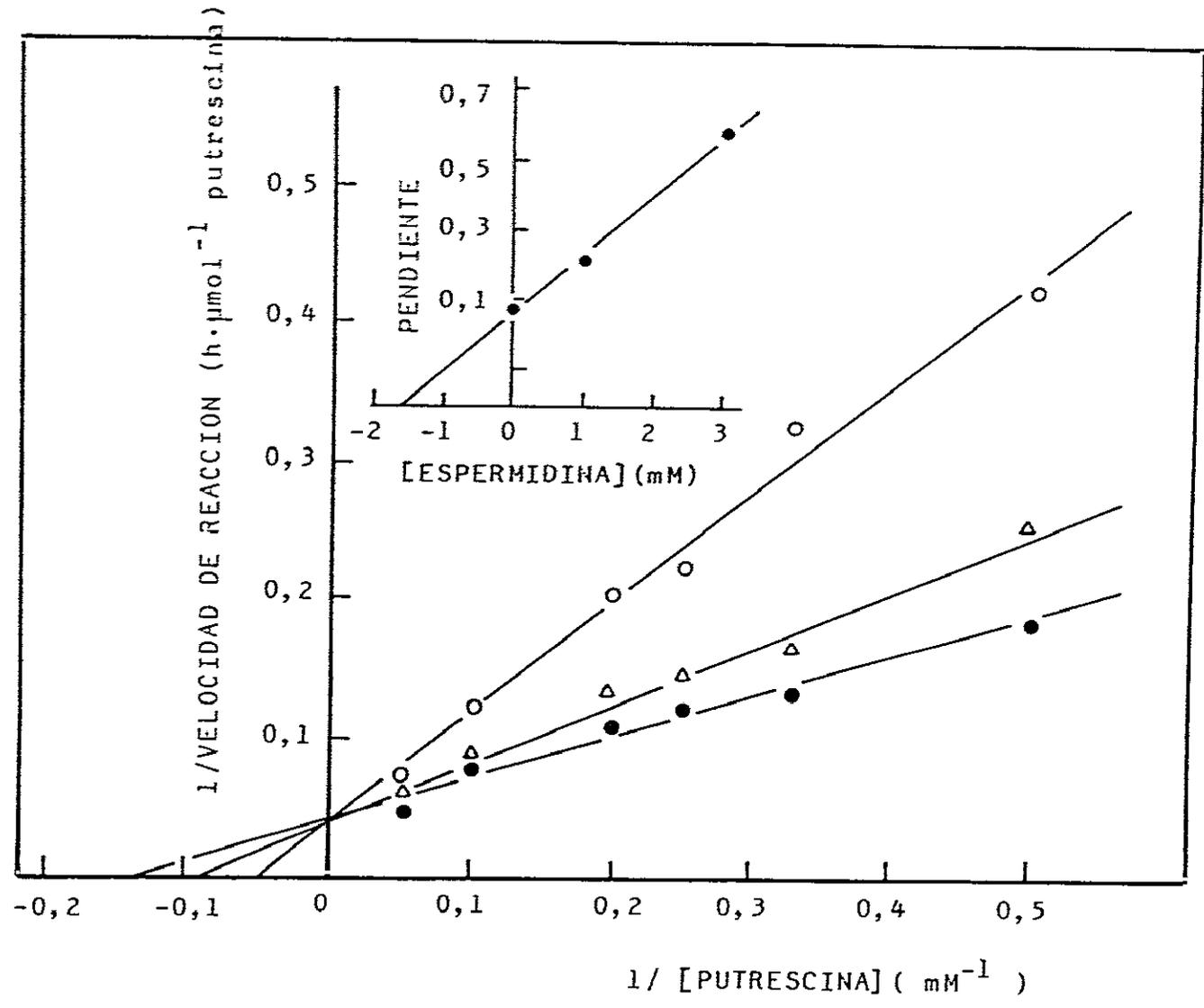


FIGURA 42.- Efecto de la concentración de espermina 0,75 mM (Δ) y 2 mM (\circ) sobre la velocidad del transporte de putrescina en función de las concentraciones de esta diamina suministradas a talos de *E. prunastri*. En el recuadro interno se muestra la representación de las pendientes, utilizada para el cálculo de K_i .

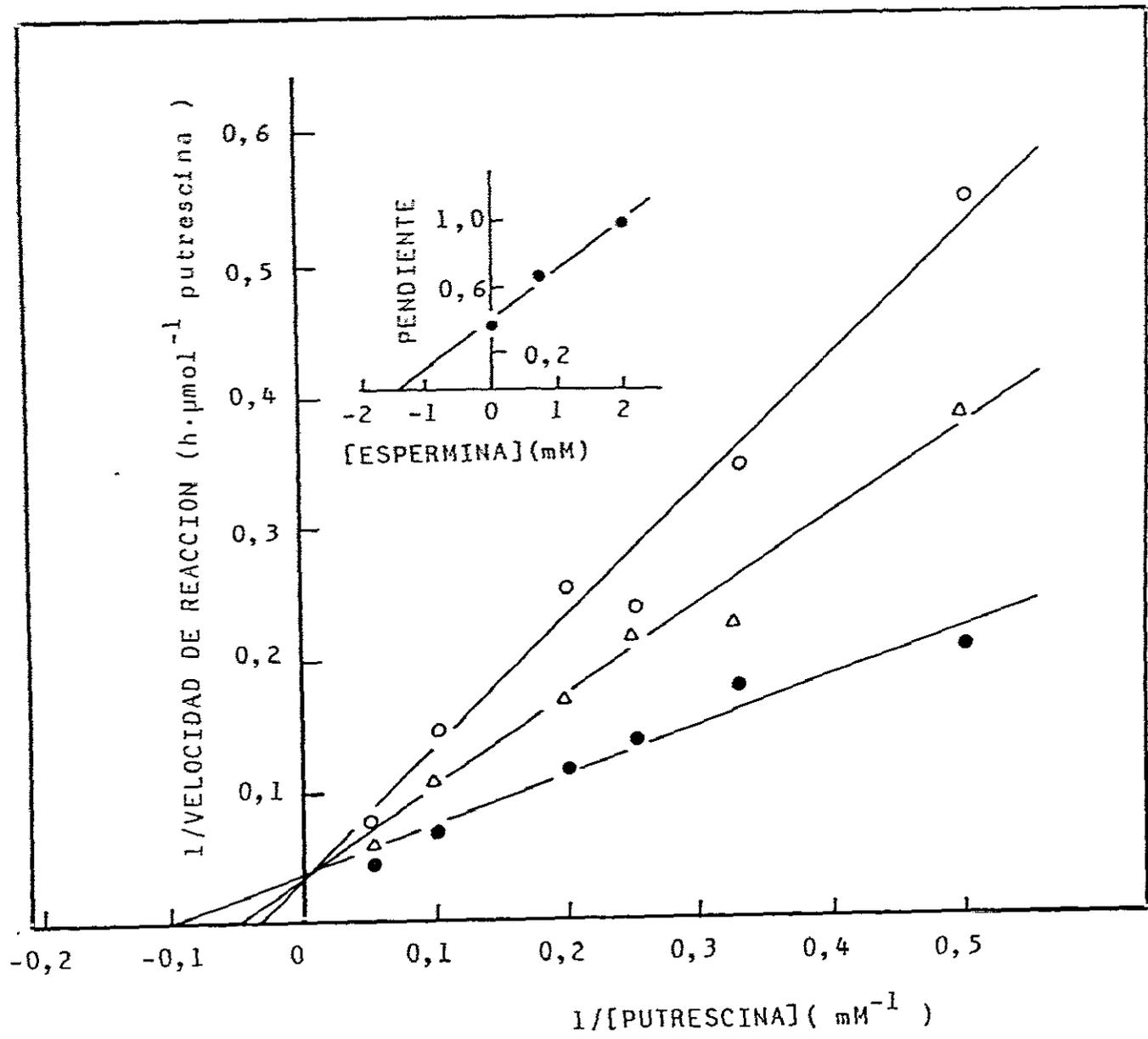


TABLA X.- Constantes cinéticas de la inhibición del transporte de putrescina (representación de Lineweaver-Burk) por espermidina y espermina.

ESPERMIDINA

control: $y = 0,28 x + 0,044$; $r = 0,98$
 $K_m = 6,32$ mM
 $V_{MAX} = 22,73$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

espermidina 1 mM: $y = 0,41 x + 0,039$; $r = 0,99$
 $K_{nap} = 10,56$ mM
 $V'_{MAX} = 25,64$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

espermidina 3 mM: $y = 0,78 x + 0,040$; $r = 0,99$
 $K_{nap} = 19,5$ mM
 $V'_{MAX} = 25,0$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

$K_i = 1,55$ mM $y = 0,17 x + 0,26$; $r = 0,99$

ESPERMINA

control: $y = 0,37 x + 0,039$; $r = 0,98$
 $K_m = 9,56$ mM
 $V_{MAX} = 25,64$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

espermina 0,75 mM: $y = 0,69 x + 0,032$; $r = 0,99$
 $K_{nap} = 21,65$ mM
 $V'_{MAX} = 31,25$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

espermina 2 mM: $y = 1,00 x + 0,034$; $r = 0,99$
 $K_{nap} = 29,32$ mM
 $V'_{MAX} = 29,40$ $\mu\text{moles}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$

$K_i = 1,34$ mM $y = 0,31 x + 0,41$; $r = 0,99$

En la Tabla XI se indican los resultados obtenidos para la adsorción y el transporte de la tetraamina. Los valores son superiores a los encontrados para putrescina, adsorbiéndose 134,2 $\mu\text{moles de espermina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ y siendo su velocidad de transporte de 18,14 $\mu\text{moles de espermina.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$.

III.4.7.- Estimación de la concentración de poliaminas endógenas

Con ánimo de determinar si el transporte de putrescina se realiza a favor o en contra del gradiente de concentración, se estimó la concentración de poliaminas endógenas, libres y conjugadas, en los talos liquénicos.

Las muestras fueron previamente activadas, como se especifica en el apartado II.11.1. y las poliaminas extraídas, dansiladas y cuantificadas por HPLC como se describe en el apartado II.10.

A fin de expresar los valores obtenidos en unidades de concentración, se determinó el contenido en agua del talo, según se describe en el apartado II.3., hallándose un valor de $1,53 \pm 0,13$ ml de agua. g^{-1} de peso seco.

En la Tabla XII se recogen los valores de concentración de poliaminas libres y conjugadas presentes en 1,0 g de peso seco de talo, previamente a los experimentos de transporte de putrescina. Entre ellas, la concentración de la diamina libre se estimó en 51,6 μM .

En los talos están presentes las tres poliaminas, apareciendo tanto en forma libre como formando conjugados solubles e insolubles (excepto conjugados solubles de espermidina).

La concentración total es de 0,332 mM de poliaminas endógenas por gramo de talo.

TABLA XI.- Transporte y adsorción de espermina 5 mM
(conteniendo $0,15 \mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de $1,7[^{14}\text{C}]$ -
espermina).

	VELOCIDAD ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)
TRANSPORTE	$18,14 \pm 0,67$
ADSORCION	$134,20 \pm 16,15$

TABLA XII.- Concentración de poliaminas endógenas en talo de *E. prunastri* en ausencia de cualquier tratamiento.

FRACCION	PUTRESCINA ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$)	ESPERMIDINA ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$)	ESPERMINA ($\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$)
poliamina libre (S)	51,6 (78,9 \pm 11,3)	134,0 (205,4 \pm 34,7)	14,7 (22,4 \pm 0,8)
poliamina conjugada soluble en ácido (SH)	16,1 (24,6 \pm 1,1)	---	9,2 (14,2 \pm 0,9)
poliamina conjugada insoluble en ácido (PH)	51,3 (78,5 \pm 3,4)	37,1 (56,7 \pm 8,4)	18,3 (28,1 \pm 3,7)
CONCENTRACION DE POLIAMINA	119,0	171,0	42,0

- La concentración total de poliaminas en talo es de 332,0 $\mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco.
- Entre paréntesis se representan los nmoles de poliamina $\cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco.

III.4.8.- Efectores del transporte y la adsorción

III.4.8.1.- Análogos estructurales y aminoácidos

El estudio de competición se realizó a una concentración 5 mM de cada uno de los posibles competidores frente a 5 mM de putrescina (conteniendo $0,15 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$), en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 durante 1 h en oscuridad a 26°C.

En la Figura 43A se muestra el efecto de la poliamina agmatina, así como de la urea y el paraquat (metil-viológeno, herbicida) en el transporte de putrescina. Todos ellos se manifiestan como competidores en el transporte de la diamina, siendo la agmatina la que mayor efecto ejerce, alcanzando valores de inhibición del 53,4%. El paraquat inhibe un 41,2% y la urea un 16,5%.

En lo que a la adsorción se refiere (Fig. 43B), la competencia es muy semejante, aunque en este caso se observan mayores valores de inhibición (de hasta un 57% en el caso de la agmatina).

Se estudió el efecto que sobre dicho transporte ejercen diferentes aminoácidos: ácido glutámico, L-arginina, L-ornitina y L-lisina, todos ellos relacionados con el metabolismo de putrescina (Fig. 44A). En general, se observa una menor competición. El ácido glutámico y la L-ornitina son los que ejercen un mayor efecto competitivo, aunque se alcanzan, como máximo, valores del 15% de inhibición. L-arginina o L-lisina no modifican el transporte de putrescina.

Sin embargo se observa competencia por los sitios de unión extracelular de la diamina, ya que la adsorción de esta poliamina se ve disminuida en presencia de dichos aminoácidos (Fig. 44B). La L-lisina es el aminoácido que mayor efecto competitivo ejerce sobre la adsorción, con valores del 27,5% de inhibición.

FIGURA 43.- Velocidad de transporte (A) y adsorción (B) de 1,4[¹⁴C]-putrescina desde medios de incubación tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$), por talos de *E. prunastri* mantenidos en medios que sólo contienen la diamina (rayado) o a los que se adicionan los análogos indicados a una concentración 5 mM.

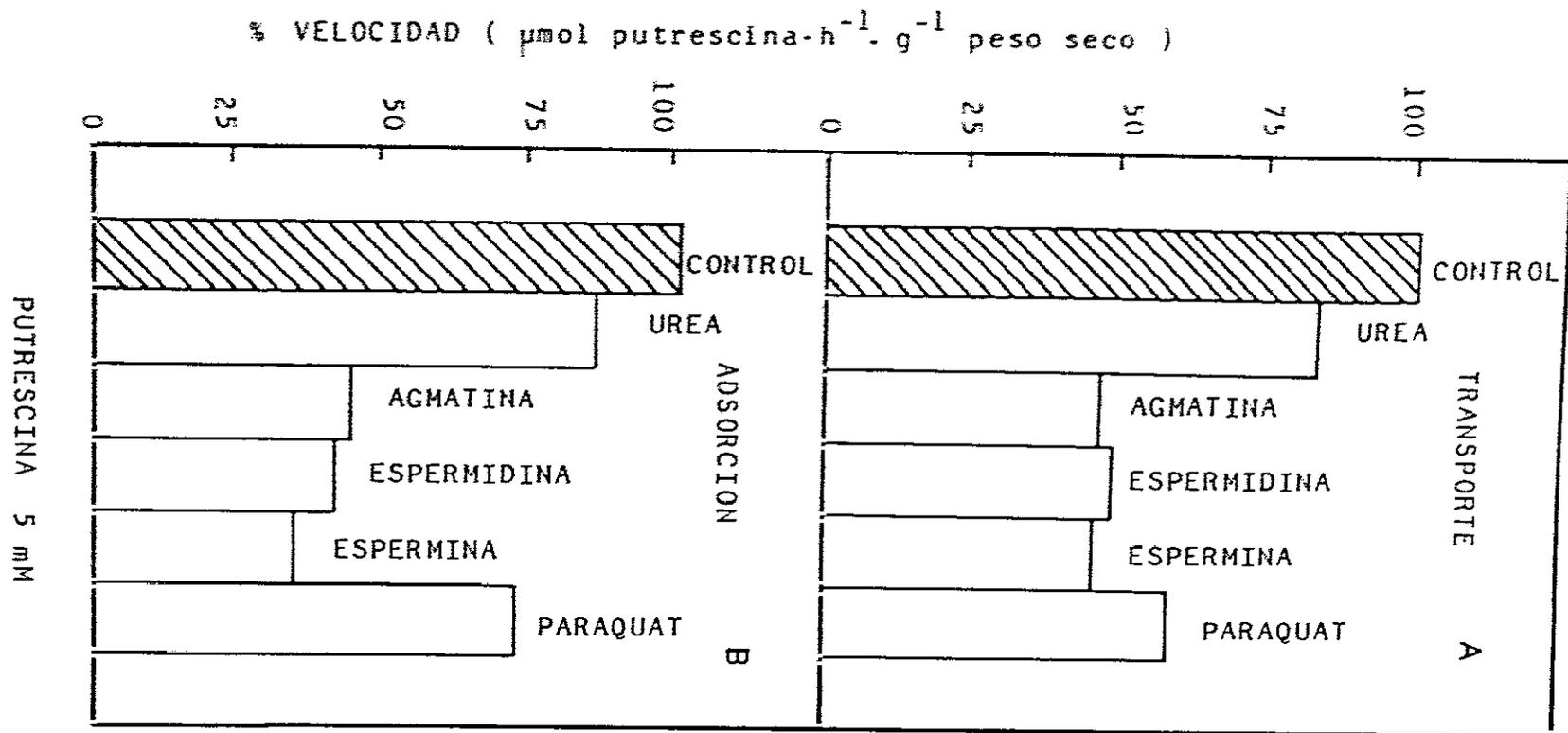
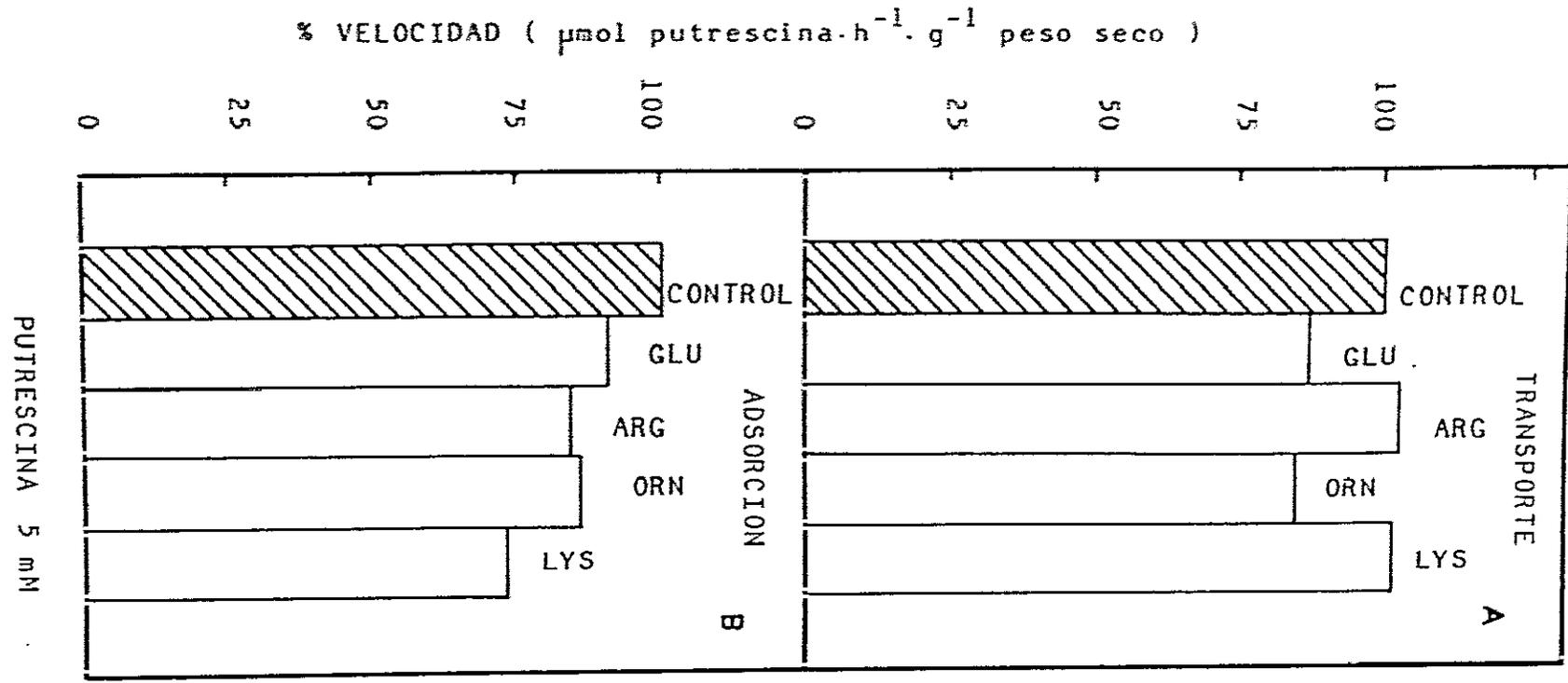


FIGURA 44.- Velocidad de transporte (A) y adsorción (B) de 1,4[¹⁴C]-putrescina desde medios de incubación tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$), por talos de *E. prunastri* mantenidos en medios que sólo contienen la diamina (rayado) o a los que se adicionan los aminoácidos indicados a una concentración 5 mM.



III.4.8.2.- Cationes

Dado que las poliaminas parecen comportarse como cationes orgánicos, se ensayó el efecto que sobre el transporte y la adsorción de la diamina ejercen diferentes cationes inorgánicos.

La concentración utilizada de cada catión fue de 20 mM. Los ensayos fueron realizados preincubando las muestras durante 30 min en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, conteniendo o no las distintas sales, en oscuridad a 26 °C. Pasado este tiempo, se les agregó putrescina 20 mM (conteniendo 0,25 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$), permaneciendo los talos durante 1 h en las condiciones anteriormente descritas. Las sales empleadas fueron: NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , NiSO₄ y La(NO₃)₃.

El transporte de putrescina aumenta en presencia de cationes monovalentes (Na⁺ y K⁺) así como en los divalentes Ca²⁺ y Mg²⁺ y es inhibido por Mn²⁺, Ni²⁺ y La³⁺ (Fig. 45A), siendo éste último el que muestra un mayor efecto en la inhibición del transporte de la poliamina, con valores del 62,5%.

Sin embargo, el efecto de estos cationes inorgánicos sobre la adsorción es diferente. Ya que ésta se ve favorecida en presencia de los cationes monovalentes y es inhibida por los di- y polivalentes, siendo el más efectivo el La³⁺ que inhibe hasta un 77,5% (Fig. 45B).

III.4.8.3.- Fenoles liquénicos

Se estudió el efecto que los fenoles liquénicos mayoritarios en *E. prunastri* (ácido úsnico y ácido evérnico) tienen en el transporte.

Los talos liquénicos fueron incubados en medios con una concentración 100 y 200 μM de uno o ambos fenoles y putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$), tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, durante 1 h en oscuridad a 26 °C.

FIGURA 45.- Velocidad de transporte (A) y adsorción (B) de 1,4[¹⁴C]-putrescina desde medios de incubación tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 20 mM (conteniendo 0,25 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$), por talos de *E. prunastri* mantenidos en medios que sólo contienen la diamina (rayado) o a los que se adicionan los cationes indicados a una concentración 20 mM.

% VELOCIDAD ($\mu\text{mol putrescina}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco)

PUTRESCINA 20 mM

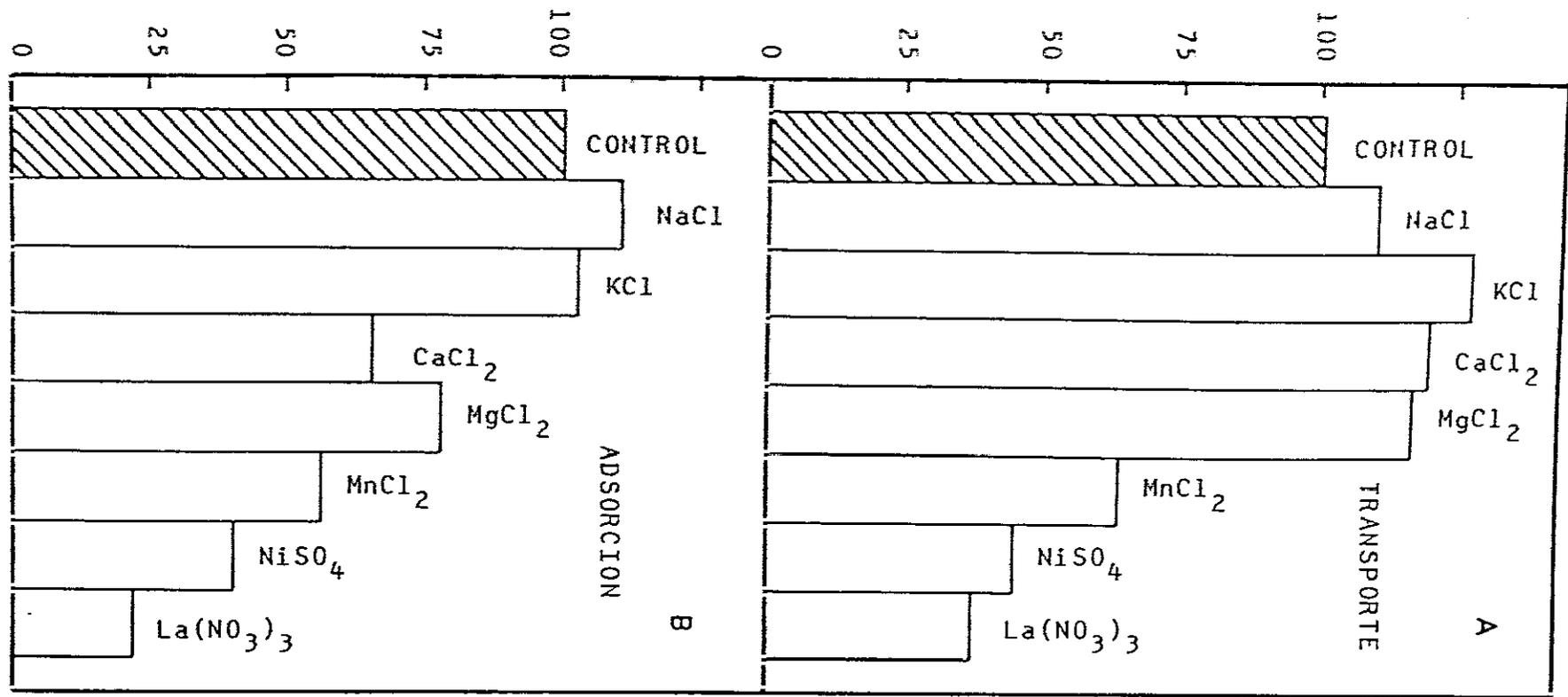
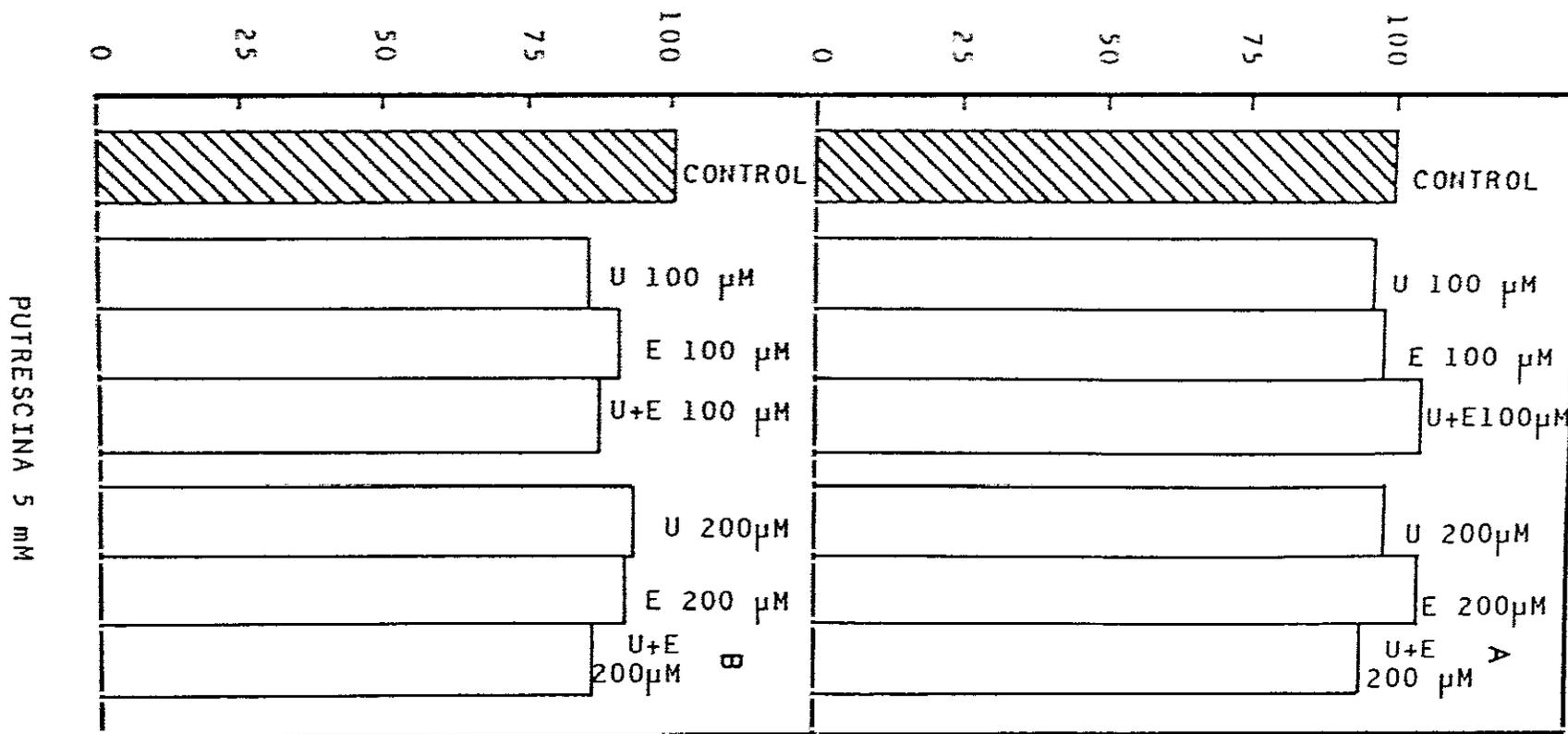


FIGURA 46.- Velocidad de transporte (A) y adsorción (B) de 1,4[¹⁴C]-putrescina desde medios de incubación tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 5 mM (conteniendo 0,15 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$), por talos de *E. prunastri* mantenidos en medios que sólo contienen la diamina (rayado) o a los que se adicionan los fenoles indicados a una concentración 100 y 200 μM .

VELOCIDAD ($\mu\text{mol putrescina} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco)



Los datos obtenidos se representan en el histograma de la Figura 46A, donde puede observarse que los fenoles liquénicos no tienen efecto alguno en el transporte de la diamina.

Observando los valores de la adsorción (Fig. 46B), la presencia de fenoles liquénicos en el medio de incubación disminuye la adsorción de putrescina, pero su efecto es suave, ya que el valor de máxima inhibición se obtiene para una concentración 100 μM de ácido usnico.

III.4.9.- Estudio de la transformación de putrescina

Se estudió la posible transformación de la diamina transportada a otras poliaminas, tales como espermidina y espermina.

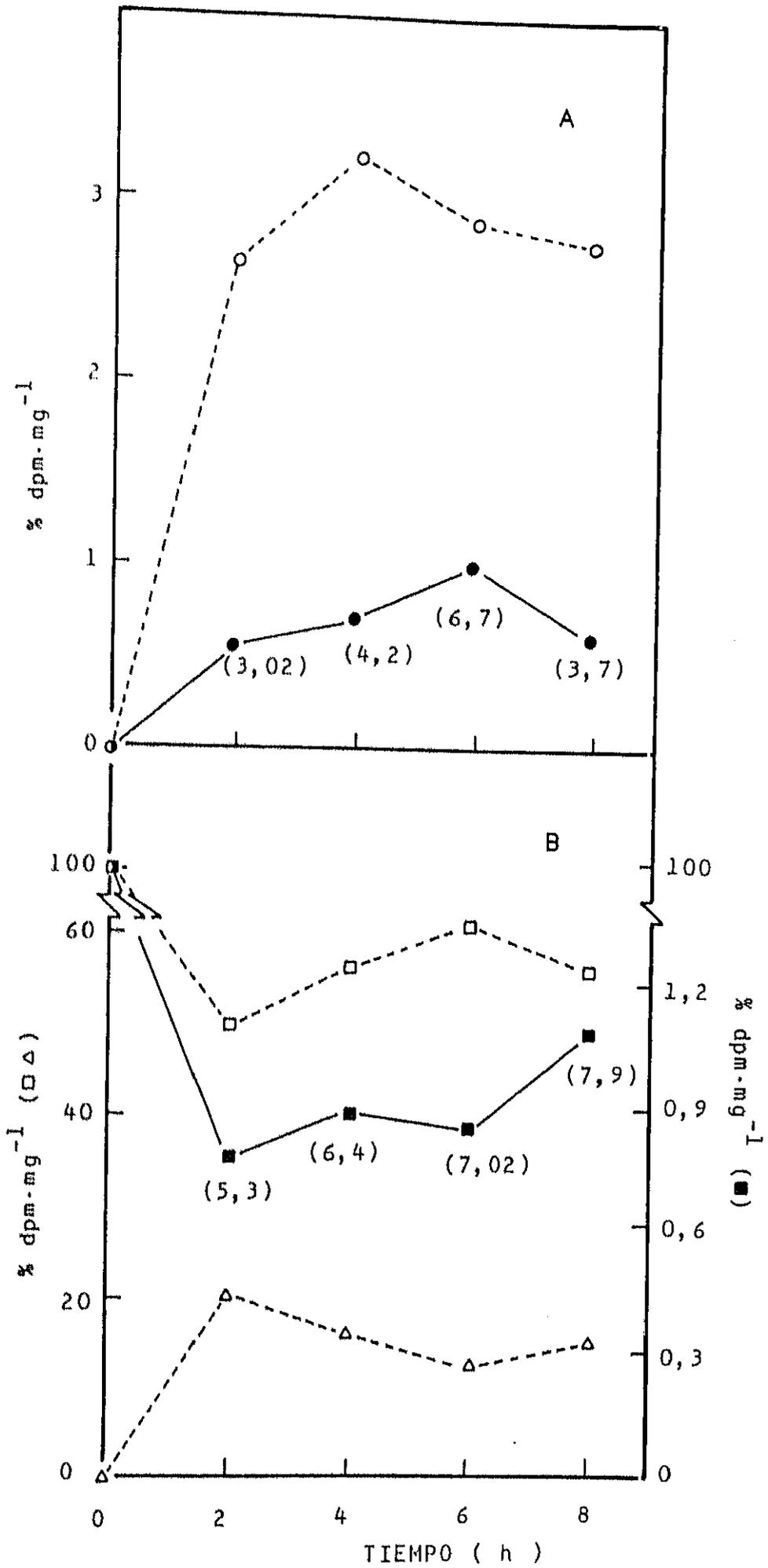
Los talos fueron incubados en putrescina 10 mM (conteniendo 0,73 $\mu\text{Ci.ml}^{-1}$), en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, a lo largo de 8 h, en oscuridad a 30°C, midiéndose la radiactividad total dentro de los talos, la adsorbida y la presente en los medios una vez terminada la incubación. Posteriormente, se extrajeron y dansilaron las poliaminas contenidas en los talos y medios de incubación. Cada muestra problema fue cebada con patrones dansilados (no radiactivos) de putrescina, espermidina y espermina. Las dansil-poliaminas fueron separadas mediante TLC y cuantificada la radiactividad de cada una de las manchas como se describe en el apartado II.11.5.

En la Figura 47A se representa la radiactividad total de los talos (expresada en dpm.mg^{-1}) y la correspondiente a la mancha de putrescina (expresada en dpm.mg^{-1} y $\mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}$ peso seco) frente al tiempo de incubación. Las dos medidas son paralelas, aunque los niveles de putrescina son menores y su máximo está desplazado 2 h con respecto al pico de máxima radiactividad total en el talo.

FIGURA 47.- Variación de la radiactividad total (○) y de la correspondiente a putrescina (●) recuperada por cromatografía en capa fina, en función del tiempo en talos (A) de *E. prunastri* incubados en tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15 con putrescina 10 mM (conteniendo 0,73 $\mu\text{Ci}\cdot\text{ml}^{-1}$ de 1,4[^{14}C]-putrescina).

En (B) se representa la variación en el tiempo de la radiactividad total remanente en el medio (□), de la recuperada por cromatografía en capa fina en putrescina (■) y de la adsorbida por el talo (Δ).

Las cifras entre paréntesis indican el valor, en μmoles , de putrescina.g $^{-1}$ peso seco recuperados mediante cromatografía en capa fina.



Ya que no se detectó radiactividad en las manchas correspondientes a espermidina y espermina, se puede afirmar que no existe transformación de la diamina transportada en otras poliaminas.

En la Figura 47B, los resultados son similares a los anteriormente descritos, pero en este caso corresponden al medio de incubación, hallando radiactividad tan sólo en la mancha correspondiente a putrescina. Ambas medidas descienden drásticamente en las primeras 2 h de tratamiento, en paralelo al incremento en el talo. Posteriormente sus niveles oscilan, y mientras que la radiactividad total del medio disminuye a las 8 h de incubación, la de putrescina aumenta.

En la Figura 47B también se representa la variación de radiactividad total adsorbida a lo largo del tiempo de incubación.

Se puede observar que, tanto en el talo como en el medio, los niveles de putrescina son mucho menores que los valores correspondientes de radiactividad total.

III.4.10.- Localización celular de putrescina

Para ello se recogieron talos cuyo peso osciló entre 121 y 125 mg y se incubaron en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, a una concentración 10 mM de putrescina (conteniendo $0,75 \mu\text{Ci} \cdot \text{ml}^{-1}$) durante 1 h y 30 min en oscuridad a 26°C . Los talos fueron procesados y las distintas fracciones celulares recogidas según se especificó en el apartado II.11.6.

En la Tabla XIII se muestran los resultados del fraccionamiento celular. De la cantidad total de putrescina transportada, se recuperó el 65,3% ($5,2 \mu\text{moles de putrescina} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso seco). De éstos, el 74,2% fue hallado en la fracción soluble (sobrenadante de la centrifugación a $105.000 \times g$) y el 21,6% se recuperó en el precipitado de $600 \times g$.

TABLA XIII.- Localización subcelular de putrescina transportada en talo de *E. prunastri*.

FRACCION (x g)	μ moles de putrescina.g ⁻¹	% CONTROL
control	7,95 \pm 0,03	100,00
precipitado de 600	1,12 \pm 0,09	14,08
precipitado de 1.000	0,10 \pm 0,01	1,28
precipitado de 10.000	0,09 \pm 0,02	1,23
precipitado de 105.000	0,02 \pm 0,5.10 ⁻³	0,24
sobrenadante de 105.000	3,85 \pm 0,03	48,43

RECUPERACION : 65,3%

III.4.11.- Captación de putrescina por el fotobionte y el micobionte

Finalmente, se determinó la proporción de putrescina, que transportada por el talo liquénico, se encuentra localizada en el fotobionte y en el micobionte.

Para ello se partió de talos, cuyo peso seco osciló entre 79 y 85 mg, que se incubaron con putrescina 10 mM (conteniendo $0,75 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$), en medios tamponados con Tris-HCl 0,1 M, pH 9,15, durante 1 h y 30 min, en oscuridad a 26°C . Tras macerar las muestras en tampón fosfato salino 0,1 M, pH 7,2, los simbioses fueron aislados según el procedimiento descrito en el apartado II.5. En este caso, los valores fueron referidos al peso seco de cada fracción (apartado II.3.).

En la Tabla XIV se reflejan los resultados correspondientes a cada simbiote. El micobionte capta $0,81 \mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}$ y el fotobionte $0,45 \mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}$. Es, por lo tanto, el micobionte el que mayor cantidad de diamina acumula, representando casi el doble de la captada por la fracción algal.

TABLA XIV.- Transporte de putrescina entre los simbioses de *E. prunastri*.

SIMBIONTE	$\mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}$
FOTOBIONTE	$0,45 \pm 0,07$
MICOBIONTE	$0,81 \pm 0,16$

IV. - DISCUSSION

El desencadenante de una experimentación como la que se ha planteado en el presente trabajo surge a raíz de la observación de una serie de hechos cuyo fin último hacía sospechar una alteración del equilibrio entre ambos simbioses.

El progresivo blanqueamiento de los talos cuando éstos se incuban en putrescina, la pérdida de consistencia y de peso seco del tejido (Vicente y Legaz, 1983) y la secreción de ribitol al medio, unido a un descenso de manitol en el talo (Legaz *et al.*, 1985) hizo pensar en un efecto deletéreo de la putrescina sobre el talo, preferentemente sobre las algas. En *A. nidulans*, por ejemplo, la putrescina causa letalidad a pHs extracelulares que estimulan una rápida difusión de la diamina que, en el interior, queda retenida como especie cargada (Guarino y Cohen, 1979b; Ramakrishna *et al.*, 1978). Downs y Lovell (1986) observan que el tratamiento con espermidina o putrescina acelera el comienzo de la senescencia en flores de *D. caryophyllus*. También hay extensas referencias a un efecto opuesto y, en general, se afirma que las poliaminas previenen la senescencia y el envejecimiento vegetal y favorecen el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos.

En *E. prunastri* no se puede concluir que exista un claro efecto deletéreo de la putrescina sobre el talo. Tanto la pérdida de peso (Fig. 12A) como el ligero descenso de proteínas en talo (Fig. 12B) o la secreción de éstas al medio (Fig. 12C) son más la consecuencia de la alcalinización del pH y de un periodo de incubación de 8 h, que la acción específica de la putrescina.

Tampoco parece existir una clara relación entre los niveles de putrescina y el contenido en ARN. Sólo se podría resaltar que la cantidad de ARN es algo mayor en presencia de putrescina. La diamina estimula la terminación de la transcripción de ARNs que se están formando (Sakai y Cohen, 1976; Loftfield *et al.*, 1981), lo que justificaría el ligero incremento, aunque dicha poliamina no anula la actividad ARNasa

desarrollada a valores de pH ácido o neutro (Fig. 13A y B). Esta falta de relación entre los niveles de putrescina y espermidina y los de ADN, ARN o proteínas ha sido descrita también en cultivos de células de *Rosa* sp. en suspensión (Smith et al., 1978).

Si el efecto fisiológico de la putrescina exógena sólo se manifiesta a determinados valores de pH extracelulares, es inmediato pensar que, dada la naturaleza catiónica de la poliamina, ésta pudiera quedar retenida en el exterior, dependiendo del pH, no ejerciendo, así, acción alguna en el interior.

En efecto, se comprobó que la putrescina disminuye en los medios de incubación a lo largo del tratamiento, especialmente a pHs 5,0 y 9,15. Este hecho hizo pensar que la entrada de putrescina se ve favorecida a valores extremos de pH (Fig. 17A). En pétalos de *S. ionantha*, la captación de putrescina también depende marcadamente del pH externo y se observan dos máximos, uno a pH 5,0-5,5 para bajas concentraciones de putrescina exógena (0,5 μ M) y otro a 8,0 para altas concentraciones de diamina exógena (50 mM) (Bagni y Pistocchi, 1985). Guarino y Cohen (1979a) describen una relación exponencial de captación de poliaminas a valores de pH entre 8,5 y 10,5 en *A. nidulans*.

La desaparición de putrescina exógena a pH 9,15 va asociada a su incremento en el interior (Fig. 17B). Sin embargo, aunque la desaparición de putrescina de los medios es similar a pHs 9,15 y 5,0, no se encuentra el paralelo incremento de la diamina en el interior cuando el talo es incubado a pH ácido (Fig. 17B).

Esta falta de correspondencia puede ser debida a distintas causas y, entre ellas, se puede especular en el sentido de una síntesis o activación de DAO, enzima que catalizaría el exceso de putrescina. Otra explicación podría ser la unión de la poliamina a ciertos componentes de la

membrana o la pared celular, como describen Vallée et al. (1983) para *N. tabacum* y *L. esculentum*. Finalmente, la putrescina, que se comporta como un catión a valores de pH celulares ácidos, podría unirse a constituyentes aniónicos de las células, tales como ribosomas, ADN, ARN y membranas, según plantean Slocum et al. (1984) e incluso a componentes aromáticos, tales como fenoles (Martin-Tanguy et al., 1973).

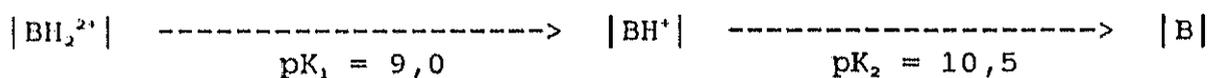
Nosotros hemos detectado actividad DAO en talo, la cual se segrega al medio rápidamente cuando el pH extracelular es 5,0 (Fig. 18A). El máximo se obtiene si además está presente la putrescina. La actividad DAO desarrollada a pH 6,9 o 9,15 (Fig. 18B y C) en talo y en medio, se corresponde con los niveles de putrescina exógena encontrados. Una alta actividad PAO a pH 5,0 en hojas de *H. vulgare* ha sido descrita por Smith (1976). En general, en los vegetales superiores, la enzima DAO se encuentra preferentemente en la pared celular y su localización puede estar relacionada con la producción de peróxido de hidrógeno implicado en los procesos de rigidez y lignificación de la pared celular (Federico y Angelini, 1986). Probablemente, la DAO, al reciclar el nitrógeno y el carbono de las poliaminas, regule el nivel celular de putrescina y, por tanto, de poliaminas en el citoplasma y en la pared celular, como también sugieren Torrigiani et al. (1989).

La segunda explicación que se propone para explicar la falta de correlación entre la putrescina que desaparece del medio y el nivel que se detecta en talo estaría en función de sus valores de pK. Ya que el pK₁ y pK₂ de la putrescina a 30°C es 9,0 y 10,5, respectivamente (Guarino y Cohen, 1979a), la molécula se encuentra mayoritariamente en forma diprotonada a pHs 5,0 y 6,9, mientras que a pH 9,15 existe un 50% de formas mono- y diprotonadas (Tabla XV).

Por ello, a pH neutro, la putrescina en su forma diprotonada quedaría unida a sitios aniónicos de la pared celular, ya que la membrana celular es impermeable a este tipo

TABLA XV.- Concentración relativa de putrescina como base libre $|B|$, molécula monoprotónada $|BH^+|$ y molécula diprotónada $|BH_2^{2+}|$, calculada a partir de los valores de pK de la diamina y del pH del medio de incubación.

pH	% $ B $	% $ BH^+ $	% $ BH_2^{2+} $
5,0	$3,2 \cdot 10^{-8}$	$9,99 \cdot 10^{-3}$	99,99
6,9	$1,8 \cdot 10^{-4}$	0,79	99,21
9,15	2,55	57,06	40,39
13,0	99,68	0,32	$3,15 \cdot 10^{-5}$



$$pH = pK_1 + \log \frac{|BH^+|}{|BH_2^{2+}|}$$

$$pH = pK_2 + \log \frac{|B|}{|BH^+|}$$

de moléculas. Como tampoco existe actividad DAO en el medio a pH 6,9, la putrescina no sería hidrolizada previamente (Fig. 18B).

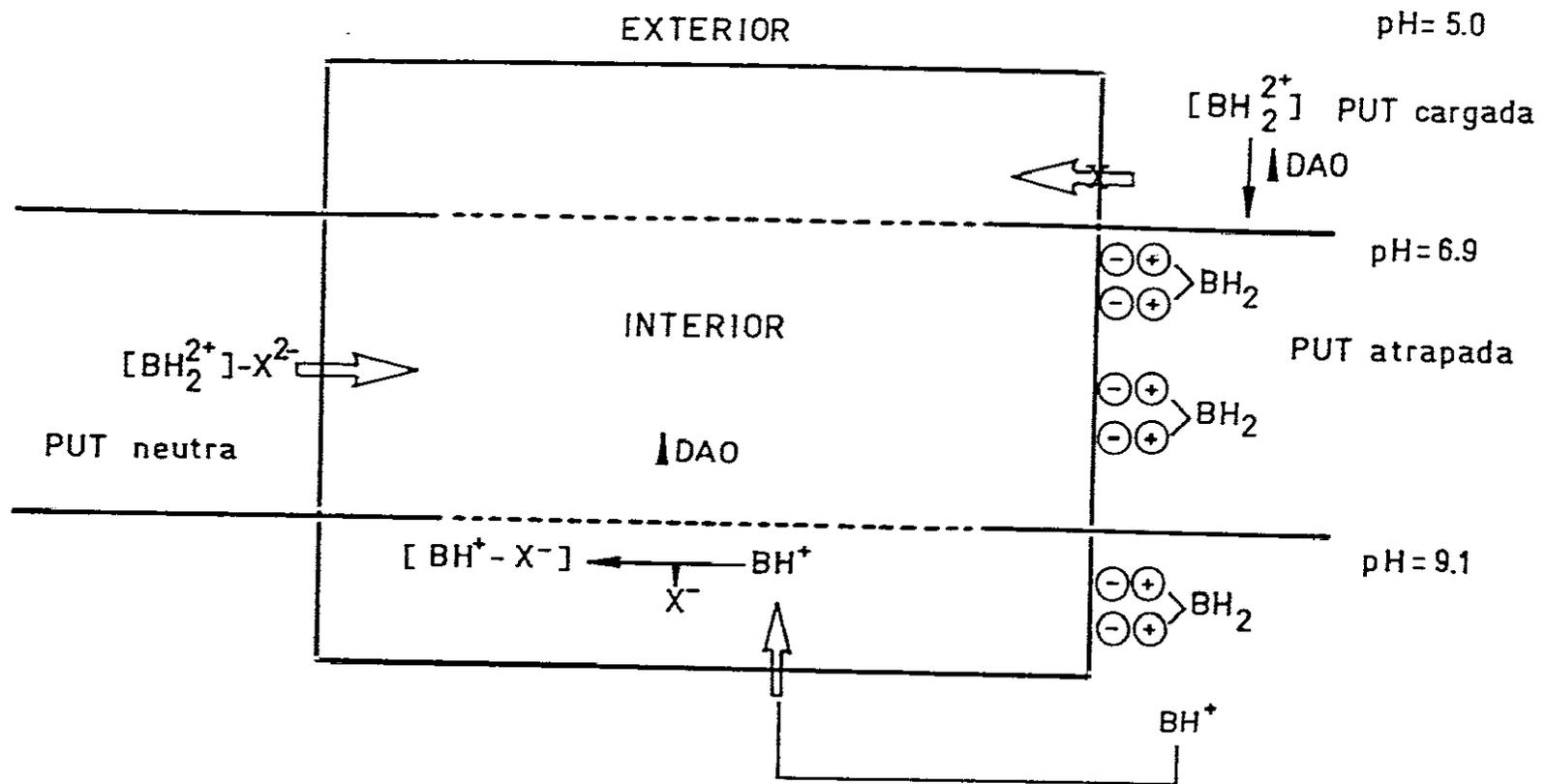
Cuando el pH externo es 9,15, la diamina se encuentra en los medios al 50% entre formas mono- y diprotonadas. En estas condiciones, ciertas moléculas en su forma monoprotionadas pueden difundir a través de la membrana celular y acumularse en el talo, no siendo tampoco hidrolizadas ya que no existe actividad DAO en el talo a pH 9,15 (Fig. 18C).

A pH ácido (5,0), la falta de correlación que existe entre la desaparición de putrescina del medio y su baja concentración en el talo, se explica por la alta actividad DAO segregada al medio de incubación que hidrolizaría la diamina antes de que ésta sea captada (Fig. 18A). Un esquema sobre estos resultados se muestra en la Figura 48.

Bagni y Pistocchi (1985) explican el efecto bifásico del pH en la captación de putrescina en pétalo de *S. ionantha*, sobre la base de una pequeña cantidad de putrescina monoprotionada a pH 8,0, que pasa a través de la membrana plasmática, mientras que a pH ácido, la putrescina podría ser acetilada previamente a su entrada. Los resultados obtenidos por Guarino y Cohen (1979a), acerca de la captación de putrescina por *A. nidulans*, también sugieren que la putrescina no cargada difundiría libremente a través de la membrana celular, siendo por ello la concentración de moléculas neutras un factor limitante, ya que la base libre sólo se encontraría a valores de pH superiores a 10,5.

La cuantificación de putrescina en particular, y de poliaminas en general, no resulta problemática cuando se trata de analizar concentraciones altas, como las utilizadas en los experimentos de captación. Sin embargo, la concentración de poliaminas endógenas puede ser mucho menor y además existe la posibilidad de que éstas se encuentren formando conjugados, como sugieren Jäger y Weigel (1978).

FIGURA 48.- Esquema representativo de la captación de putrescina, acumulación en el interior de las células y del proceso de atrapamiento (adsorción) en función del pH extracelular. (DAO indica diamino oxidasa).



En estas condiciones, la detección espectrofotométrica de poliaminas, como la que se ha llevado a cabo para valorar altas concentraciones, puede dar resultados no satisfactorios o equívocos, cuando lo que se analiza son niveles muy bajos.

Se han propuesto numerosos métodos cromatográficos para la valoración de poliaminas. Entre ellos, uno de los más utilizados es la derivatización con cloruro de benzoilo y su separación posterior en fase reversa-HPLC (Redmond y Tseng, 1979), pero este método presenta muchas interferencias y disminuye la fiabilidad cuando se aplica sobre extractos crudos vegetales (Flores y Galston, 1982a). Sugiura et al. (1975) mediante tosilación de las poliaminas y detección a 254 nm, obtienen una respuesta 10 veces inferior a la descrita por nosotros. Smith y Davies (1985a) describieron un método de detección de poliaminas dansiladas por fluorescencia, previa separación en fase reversa. Sin embargo, el alto nivel de impurezas y el programa erróneo agua:metanol utilizado como fase móvil hacen el análisis difícil.

El método desarrollado en el presente trabajo se basa en la separación, mediante fase reversa, de poliaminas dansiladas y su posterior detección por fluorescencia. No sólo es la detección por fluorescencia, unas 1000 veces más sensible que la espectrofotométrica (Yost et al., 1980), lo que queremos resaltar sino el tratamiento de las muestras previo al análisis. La hidrólisis alcalina, posterior a la derivatización de las muestras, permite eliminar otros derivados dansilados fácilmente hidrolizables que pudieran interferir en el análisis de las poliaminas dansiladas.

Es posible analizar entonces, según el método propuesto, tanto las poliaminas libres (fracción S), como las conjugadas solubles (fracción SH) o insolubles en ácido (fracción PH). La alta sensibilidad del método queda patente en la Figura 19, donde se detectan cantidades de putrescina, espermidina y espermina alrededor de 1,0 nmol. El límite de

detección más bajo es aproximadamente 0,3 pmol de masa inyectada en columna, para poliaminas comerciales. Walter y Geuns (1987) también obtienen una sensibilidad de detección 50 veces superior cuando utilizan un detector de fluorescencia en lugar de uno espectrofotométrico.

El procedimiento utilizado en el presente trabajo, para separar poliaminas dansiladas, es más sensible que el descrito por Seiler et al. (1978) para tejidos de mamíferos, ya que dichos autores detectan putrescina en un rango entre 10 y 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco.

Otra ventaja adicional del método que se propone es la rapidez de la separación. En 20 min eluyen: putrescina, espermidina y espermina, junto con el patrón interno (n-butilamina).

Con este método rápido, altamente sensible, específico de poliaminas y reproducible se ha podido determinar que tan sólo el 0,62% de la putrescina exógena permanece en el fotobionte como putrescina libre (Fig. 21). Este hecho pudiera indicar que las células del alga controlan la entrada de poliaminas, siendo éste un mecanismo de defensa frente al efecto tóxico de la diamina sobre su propio metabolismo.

La mayor parte de la putrescina captada permanece en forma libre o formando conjugados solubles en ácido, es decir, unida a moléculas de bajo peso molecular (Tabla IV). Pudiera ser que la putrescina se una a fenoles y ácidos fenólicos, los cuales representan un alto porcentaje de las moléculas solubles en la mayoría de los líquenes.

Los ápices de tallos de *N. tabacum* (Cabanne et al., 1977) y callos de este tejido (Tiburcio et al., 1985; Misuzaki et al., 1971) contienen amidas del ácido hidroxicinámico. La cafeilputrescina y otras amidas se hallan en alta concentración en órganos reproductores de *N. tabacum*. Se han sugerido numerosas funciones para estos compuestos y se ha propuesto que su formación esté asociada funcionalmente con la reproducción

(Cabanne et al., 1981). La putrescina conjugada en la fracción soluble podría actuar como un "pool" para la formación de alcaloides de pirrolidina en callos de *N. tabacum*, donde la biosíntesis de alcaloides es funcional (Tiburcio et al., 1985).

En los líquenes, y concretamente en *E. prunastri*, la putrescina puede hallarse conjugada a fenoles y entonces regular la síntesis de compuestos nitrogenados, especialmente urea, L-ornitina o agmatina. En *E. prunastri*, las actividades: ureasa, ADC y AAH, entre otras, están reguladas por la concentración de fenoles liquénicos en el talo (Legaz et al., 1986; Vicente y Legaz, 1983; Legaz, 1985).

El establecimiento de la concentración adecuada de putrescina para su captación por las células se ve favorecida por la existencia de estructuras superficiales semejantes a cífelas (Legaz et al., 1985) en la superficie del talo de *E. prunastri*. Una vez que esta concentración de putrescina se ha conseguido en los espacios intercelulares, la entrada de la diamina en las células, se lleva a cabo por dos mecanismos diferentes:

- una difusión pasiva, no saturable, al menos en el rango de concentraciones ensayado, que transcurre a través de los poros hidrofílicos de la membrana y

- un segundo sistema, saturable a partir de una concentración 20 mM de putrescina, cuyos valores cinéticos indican su mediación por un transportador. La velocidad del transporte no se ve afectada por bajas temperaturas (0°C y 4°C) ni por el pretratamiento con inhibidores metabólicos (NaCN y 2,4-DNP) o fungicidas tales como el ionóforo nistatina, incluso a altas concentraciones (Fig. 36, Tabla VII). Todo ello nos sugiere que el transporte de putrescina es conducido por un sistema de internalización no activo, mediado por una molécula transportadora, en un proceso independiente de energía (ATP) o difusión facilitada, de baja afinidad y siguiendo un gradiente de concentración.

Un transporte de putrescina de características similares, que no se vea afectado por inhibidores metabólicos y con valores para las constantes cinéticas del orden de las descritas para *E. prunastri*, ha sido encontrado en pétalos de *S. ionantha* (Bagni y Pistocchi, 1985), sin embargo, las células de *C. carota*, en cultivo, presentan constantes cinéticas notablemente más bajas en el transporte de putrescina (Pistocchi et al., 1987).

Cabe destacar las semejanzas halladas entre el transporte de putrescina en *E. prunastri* y la captación intracelular del ión cadmio en *Peltigera horizontalis* (Huds.) Baumg. (líquen que contiene una cianoficea como fotobionte). Se trata de un transporte saturable y pasivo en condiciones de oscuridad, aunque presenta valores menores de velocidad y K_m (Beckett y Brown, 1984a y b). Las características de los distintos sistemas de transporte mencionados se resumen en la Tabla XVI.

Un sistema dual, con difusión pasiva y un segundo mecanismo mediado por un transportador, ha sido descrito para el transporte de espermidina en vacuolas aisladas de células de *C. carota* (Pistocchi et al., 1988) y para el transporte de putrescina y espermidina en *N. crassa* (Davis y Ristow, 1988).

A diferencia de otras especies, en *E. prunastri* el transporte de putrescina se efectúa siguiendo un gradiente de concentración de la diamina. La concentración de putrescina libre en talo, en ausencia de cualquier tratamiento es de $51,6 \mu\text{M}$ (Tabla XII), valor bastante más bajo que el determinado en los sistemas que presentan un transporte en contra de gradiente. Así, los pétalos de *S. ionantha* tienen una concentración de putrescina libre de $114 \mu\text{M}$ (Bagni y Pistocchi, 1985), siendo de $417,1 \mu\text{M}$ en las células de *C. carota* (Pistocchi et al., 1987).

La diamina, que se comportaría como un catión

TABLA XVI.- Características del transporte de putrescina y cadmio en diferentes organismos.

CARACTERISTICAS DEL TRANSPORTE	TRANSPORTE DE PUTRESCINA EN <i>S. ionantha</i> (1)	TRANSPORTE DE PUTRESCINA EN <i>D. carota</i> (2)	TRANSPORTE DE PUTRESCINA EN <i>E. prunastri</i>	TRANSPORTE DE PUTRESCINA EN <i>P. horizontalis</i> (3)
máximo transporte	3 - 4 h	1 min	2 h	lineal
pH óptimo	5,5 y 8,0	5,0 y 8,0	> 8,0	---
cinética	saturable	saturable	saturable	saturable
K_m	2,4 mM	41,9 μ M	5,3 mM	65 μ M
V_{max}	0,33 μ mol.h ⁻¹ .g ⁻¹	---	12,5 μ mol.h ⁻¹ .g ⁻¹	3,9 μ mol.h ⁻¹ .g ⁻¹
velocidad de transporte	6,7 nmol.h ⁻¹ .g ⁻¹	---	6,7 μ mol.h ⁻¹ .g ⁻¹	1,7 μ mol.h ⁻¹ .g ⁻¹
dependencia de energía	parcial	parcial	pasivo	pasivo
compartido con otras poliaminas	no	si	si	---

(1)- Cinética del transporte a pH 8,0 (Bagni y Pistocchi, 1985)

(2)- Cinética del transporte a pH 5,0 (Pistocchi *et al.*, 1987)

(3)- Transporte en condiciones de oscuridad (Beckett y Brown, 1984a y b)

orgánico, podría unirse extracelularmente, quizás, a la superficie externa de la pared celular de las hifas fúngicas. Esta conducta no resultaría sorprendente ya que los líquenes poseen una alta capacidad de intercambio de cationes solubles inorgánicos, si se les compara con plantas superiores (Brown y Beckett, 1985).

El hecho de que en la captación extracelular de cationes, en líquenes, esté implicado un mecanismo rápido, pasivo y reversible, ha sido interpretado como un fenómeno de intercambio iónico, posiblemente modificado por la formación de complejos metálicos. Este proceso, puramente fisicoquímico, implica, principalmente, uniones reversibles a sitios cargados negativamente en la pared celular. Este proceso es un fenómeno de equilibrio de intercambio iónico, permaneciendo los sitios de unión saturados a altas concentraciones externas de cationes. Determinados cationes desplazan a elementos previamente unidos, con una precisa estequiometría, de tal forma que cationes divalentes podrían desplazar a un solo átomo divalente o a dos átomos monovalentes (Puckett et al., 1973).

La naturaleza de los sitios de unión es aún desconocida, pero ya que la unión de cationes es dependiente del pH, Nieboer et al. (1976) sugieren dos sitios con distintos valores de pK_a , pudiendo ser grupos ácido carboxílicos o hidroxicarboxílicos de los polisacáridos de la pared celular. Recientemente se ha profundizado en la hipótesis según la cual estarían implicados los ácidos pécticos con ácidos carboxílicos ligados (ácido poliurónico), fenoles liquénicos e incluso proteínas unidas a la pared celular y a la membrana (Brown y Beckett, 1985).

La adsorción de poliaminas sobre la superficie celular es un hecho importante a tener en cuenta, ya que en *E. prunastri*, la cantidad de putrescina que se adsorbe es, aproximadamente, unas 17 veces superior a la cantidad neta que difunde al interior celular. La adsorción en *E. prunastri*, a

semejanza con lo descrito para cationes inorgánicos en líquenes, es un proceso rápido, alcanzando valores máximos de adsorción de putrescina a 5 y 25 min de tratamiento (Fig. 32) y pasivo (Fig. 36, Tabla VII). Esta adsorción es dependiente del pH, viéndose favorecida a valores entre 8,0 y 9,0 (Fig. 33), a los cuales la molécula se encontraría principalmente en su forma monoprotónada, y decrece bruscamente a valores de pH en los que aumenta la concentración de moléculas neutras (pH mayor de 9,0). Todo ello indica que la diamina se uniría principalmente a grupos aniónicos con una sólo carga negativa, o quizás carezca de suficiente afinidad como para desplazar a otros cationes divalentes, previamente unidos.

Mariani et al. (1989), describieron que las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina, pueden interaccionar con los polímeros de la pared celular (posiblemente sustancias pécticas) de *C. carota* mediante uniones electrostáticas o iónicas, siendo su unión dependiente del pH, y alcanzándose la máxima adsorción a valores de pH superiores a 4,0 e inferiores a 10,0.

El transporte de putrescina es máximo a valores de pH alcalinos, corroborando los datos anteriormente discutidos. Ya que los valores de pK para la diamina, a 30°C, son 9,0 y 10,5; la diamina se transportaría en su estado monoprotónado e incluso en su forma no cargada, puesto que a pH 10,6 rinde su máxima velocidad de transporte (Fig. 33). A pHs alcalinos, posiblemente se favorezca la difusión pasiva, al permanecer la molécula en su estado neutro, ya que, para su transporte por difusión facilitada, parece intervenir la unión de la diamina a sitios aniónicos de la molécula transportadora, como se comentará al analizar su competición con cationes inorgánicos. Gran parte de la putrescina transportada se acumula en el talo, alcanzándose niveles del orden de 85 veces superior al contenido endógeno (Fig. 47A).

El transporte de putrescina en función del pH

extracelular difiere de lo expuesto en plantas superiores (Tabla XVI), donde existen dos máximos: uno a valores de pH alrededor de 5,0 y otro a pH 8,0 (Bagni y Pistocchi, 1985; Pistocchi et al., 1987).

La putrescina no adsorbida o transportada debe metabolizarse ya que los niveles de la diamina recuperados, tras su separación por TLC, son menores que el total de moléculas marcadas que permanecen en el medio, sobre todo a pHs ácidos (Fig. 35B). Sin embargo, queda suficiente cantidad de putrescina como para que su transporte no se vea limitado por bajas concentraciones (del orden de $24,1 \pm 0,9$; $30,6 \pm 4,7$ y $45,8 \pm 2,6$ $\mu\text{moles de putrescina.g}^{-1}$ peso seco se encuentran en el medio después de los tratamientos a pHs 5,0; 6,0 y 7,0, respectivamente).

El descenso con el tiempo de la concentración de putrescina en el medio, hace pensar en su catabolismo, hecho que está en consonancia con la alta actividad DAO hallada en el medio a pH ácido (Fig. 18A), o quizás en su conjugación (Fig. 24B y C).

La putrescina que es transportada dentro de los cotiledones de *P. radiata*, es catabolizada a GABA, vía γ -aminobutiraldehído y pirrolina, entrando los productos posteriormente en el ciclo del ácido tricarbóxico, y reciclando, de esta manera, el carbono y el nitrógeno procedentes de la diamina (Kumar y Thorpe, 1989). En explantos de hojas de *N. tabacum*, Martin-Tanguy et al., (1988) sugieren que la mayor ruta del metabolismo de putrescina es vía conjugación.

Estos hechos podrían ser también válidos en el líquen, puesto que la diamina transportada no es metabolizada a espermidina ni espermina, a lo largo de las 8 h de tratamiento (Fig. 47A), aunque sí desciende su concentración en el talo, con respecto al total transportado.

La putrescina, no catabolizada, acumulada en el talo se encuentra principalmente en la fracción soluble del cito-

plasma, hallándose en menor proporción en el precipitado de 600 x g, posiblemente unida a la pared celular (Tabla XIII). Idéntica localización ha sido descrita para la diamina transportada en *C. carota* (Pistocchi et al., 1987; Mengoli et al., 1989), *N. tabacum* (Walker et al., 1987) y *S. ionantha* (Bagni y Pistocchi, 1985), proponiéndose para ésta última su compartimentación en la vacuola. D'Orazi y Bagni (1987) describen una interacción *in vitro* entre poliaminas y componentes de la pared celular (sustancias pécticas) en células de *C. carota*, siendo confirmadas tales interacciones *in vivo* por Mariani et al. (1989).

En cuanto al papel que desempeña cada simbiote en el transporte de putrescina al talo liquénico, parece ser el micobionte el principal responsable (Tabla XIV), hecho que quizás esté relacionado con las condiciones de oscuridad en las que se ha estudiado dicho transporte. En futuras investigaciones se podrá comprobar si tal relación se modifica bajo condiciones de iluminación, discerniendo, así, la influencia del fotobionte en el transporte de putrescina. La captación intracelular del catión cadmio en *P. horizontalis* incrementa en condiciones de luz, no modificándose su unión extracelular, lo cual representa, probablemente, un transporte adicional de cadmio al interior de las células algales (Beckett y Brown, 1984a).

El transporte de putrescina es de baja afinidad al competir por la molécula transportadora otras poliaminas y compuestos relacionados con el metabolismo de la diamina (Figs. 43 y 44).

Espermidina y espermina se muestran como inhibidores competitivos del transporte de putrescina (Figs. 41 y 42). Además, dado que los talos de *E. prunastri* transportan la tetraamina espermina (Tabla XI), parece existir un sistema común que media la internalización de las poliaminas.

Un hecho a resaltar es que el herbicida paraquat

inhibe con más efectividad el transporte de putrescina (41,7%) que su adsorción (28,3%) (Fig. 43). Estos resultados corroboran lo que otros autores postulan sobre el mecanismo de toxicidad del paraquat, el cual se lleva a cabo por competición, en la entrada, con la molécula transportadora de poliaminas (Smith, 1985).

En presencia de determinados aminoácidos no se modifica la velocidad del transporte, lo que confirma que se trata de un sistema diferente, no compartido con el de aminoácidos (Fig. 44A).

El pretratamiento de las muestras con los cationes: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , no inhibe el transporte de putrescina (Fig. 45A). El hecho de que en presencia de K^+ se estimule la velocidad del transporte de la diamina hasta un 40%, nos hace pensar que estamos ante un mecanismo de cotransporte de ambos iones. En pétalos de *S. ionantha* la captación intracelular de putrescina y espermidina tampoco se ve inhibida por tales cationes, incluso el ión K^+ favorece la entrada de espermidina en las células (Pistocchi et al., 1986).

En células en cultivo de *C. carota*, el ión Ca^{2+} inhibe el transporte de putrescina, a una concentración 0,5 mM, posiblemente por una competición con la poliamina (Pistocchi et al., 1987), hallando por otra parte, que el incremento en la concentración de putrescina endógena produce un descenso de la captación de Ca^{2+} (Mengoli et al., 1989), pudiendo deberse a su competición por la molécula transportadora. En nuestro sistema, el ión Ca^{2+} podría utilizar diferentes canales para su transporte.

Otros cationes divalentes, e incluso polivalentes, inhiben el transporte de putrescina (Fig. 45A). El La^{3+} inhibe hasta un 63,3%, y como este polication no permea en la célula, su efecto inhibitor se debería a una cierta interferencia o competición con los sitios de unión de putrescina necesarios para su transporte dentro de la célula.

El efecto de los cationes divalentes y el La^{3+} sobre la adsorción extracelular de la diamina es bien distinto ya que existe una mayor afinidad de éstos por los sitios de unión, y por tanto, un desplazamiento de la putrescina (Fig. 45B).

La adsorción extracelular de poliaminas podría funcionar como un mecanismo para evitar el efecto tóxico de altas concentraciones o como reservorio para su posterior entrada.

La función del transporte de poliaminas es un punto controvertido, ya que las células poseen la habilidad de sintetizar *de novo* sus propias poliaminas. Pegg (1988) sugiere que el transporte de poliaminas es una necesidad para aquellas células en las que la síntesis de estos compuestos ha sido inhibida. En plantas, la putrescina es sintetizada por una doble vía, ODC y ADC. Sin embargo, la vaporización durante la fertilización de frutos de *M. domestica* con disoluciones de poliaminas, favorece el crecimiento y la formación del fruto, a pesar de su síntesis endógena (Bagni et al., 1984).

El transporte de putrescina puede ser definitivo en la regulación de los niveles de poliaminas en plantas, aunque también estaría condicionado por la producción endógena de las mismas. La síntesis de putrescina en *E. prunastri* tiene lugar a través de dos rutas funcionales. Por un lado, la L-arginina puede ser descarboxilada a agmatina mediante la acción de una ADC (Vicente y Legaz, 1981). La agmatina es más tarde utilizada para la formación de putrescina y urea, por vía AAH (Vicente y Legaz, 1982). Esta vía de síntesis es funcional a pH neutro; al menos *in vitro*, el pH óptimo de la ADC y la AAH es aproximadamente igual a 7,0.

La segunda vía de síntesis de putrescina es mediante la hidrólisis de L-arginina, por acción de una arginasa, para rendir L-ornitina y urea (Legaz y Vicente, 1982). La L-ornitina es después descarboxilada a putrescina por acción de una ODC (Escribano y Legaz, 1984). La vía hidrolítica es funcional a pH

alcalino, ya que, al menos *in vitro*, el pH óptimo de la arginasa (9,15) y la ODC (8,0) es básico.

Un hecho importante a destacar es que ambas vías de síntesis de putrescina son excluyentes mutuamente en el tiempo: cuando la vía arginasa es activa, la iniciada por ADC no lo es, y viceversa (Legaz et al., 1986). Por ello, la L-arginina se puede catalizar casi de forma continua a pHs neutros o alcalinos, para producir putrescina, siendo la única limitación un pH ácido.

Este hecho parece confirmarse, ya que a pH 5,0 no se observa una marcada síntesis de putrescina (Figs. 22-24). Los resultados son contrarios a los expuestos por Young y Galston (1983a) para hojas de *A. sativa*, aunque en este caso, la ADC es activa a pH ácidos, mientras que en *E. prunastri* no lo es.

A pH neutro, sin embargo, cuando la ADC y la AAH son funcionales, la L-arginina se cataboliza para formar putrescina, permaneciendo, ésta, principalmente como forma libre o formando conjugados solubles a tiempos mayores. Tiburcio et al. (1988) también encuentran el mayor porcentaje de putrescina y espermidina formando conjugados solubles en tejidos de callos de *N. tabacum*. El exceso de putrescina libre en talo sale al medio, en principio, por un mero efecto de gradiente de concentración (Figs. 25-27).

Cuando el pH es alcalino (9,15) y por tanto la arginasa-ODC activas, más que una síntesis de putrescina existe degradación de las tres poliaminas principales: putrescina, espermidina y espermina, puesto que desaparecen los conjugados solubles de éstas, no incrementando las formas libres o conjugadas insolubles (Figs. 20-30). Es posible que la degradación de poliaminas en estas condiciones sea producto de la acción de complejos amino-oxidasas, conteniendo Cu^{2+} , según sugieren Seiler et al. (1985) ya que se trata de reacciones terminales, al menos en aminaes.

La interconversión entre formas libres y conjugadas

de poliaminas, como la descrita en *E. prunastri*, es un hecho observado por numerosos autores. Sin embargo, el mecanismo que regula tal conversión, y lo que es más importante, la función específica de cada una de las formas es, hoy por hoy, algo no totalmente conocido. Slocum y Galston (1985c), sugieren sólo un intercambio limitado entre poliaminas libres y conjugadas, mientras que Flores y Filner (1985) postulan que la conjugación con ácidos cinámicos, puede ser una vía de regulación del "pool" de poliaminas libres en la célula. Martin-Tanguy et al. (1988) y Burtin et al. (1989) proponen que los conjugados no actúan como formas de almacenamiento debido a que la organogénesis e incluso el crecimiento de explantos foliares de *N. tabacum*, están acompañados de cambios en la concentración de putrescina conjugada.

Sobre el significado fisiológico de las poliaminas conjugadas, Cabanne et al. (1977) y Malmberg y McIndoo (1983) sugieren un cierto papel en la regulación de la floración. Smith et al. (1983) demuestran que las amidas de ácidos cinámicos de di- y poliaminas confieren resistencia viral a las semillas.

La fisiología de las plantas superiores es siempre más compleja que la de los líquenes. Sin embargo, en éstos, un punto decisivo que condicionará las acciones fisiológicas de las poliaminas es la translocación de éstas desde los centros de producción a los centros de acción.

Los resultados experimentales expuestos en esta memoria, acerca de la captación de putrescina exógena por talos de *E. prunastri*, revelan los mecanismos de transporte mediante los cuales la putrescina endógena, producida a partir de L-arginina, debe moverse entre ambos simbioses.

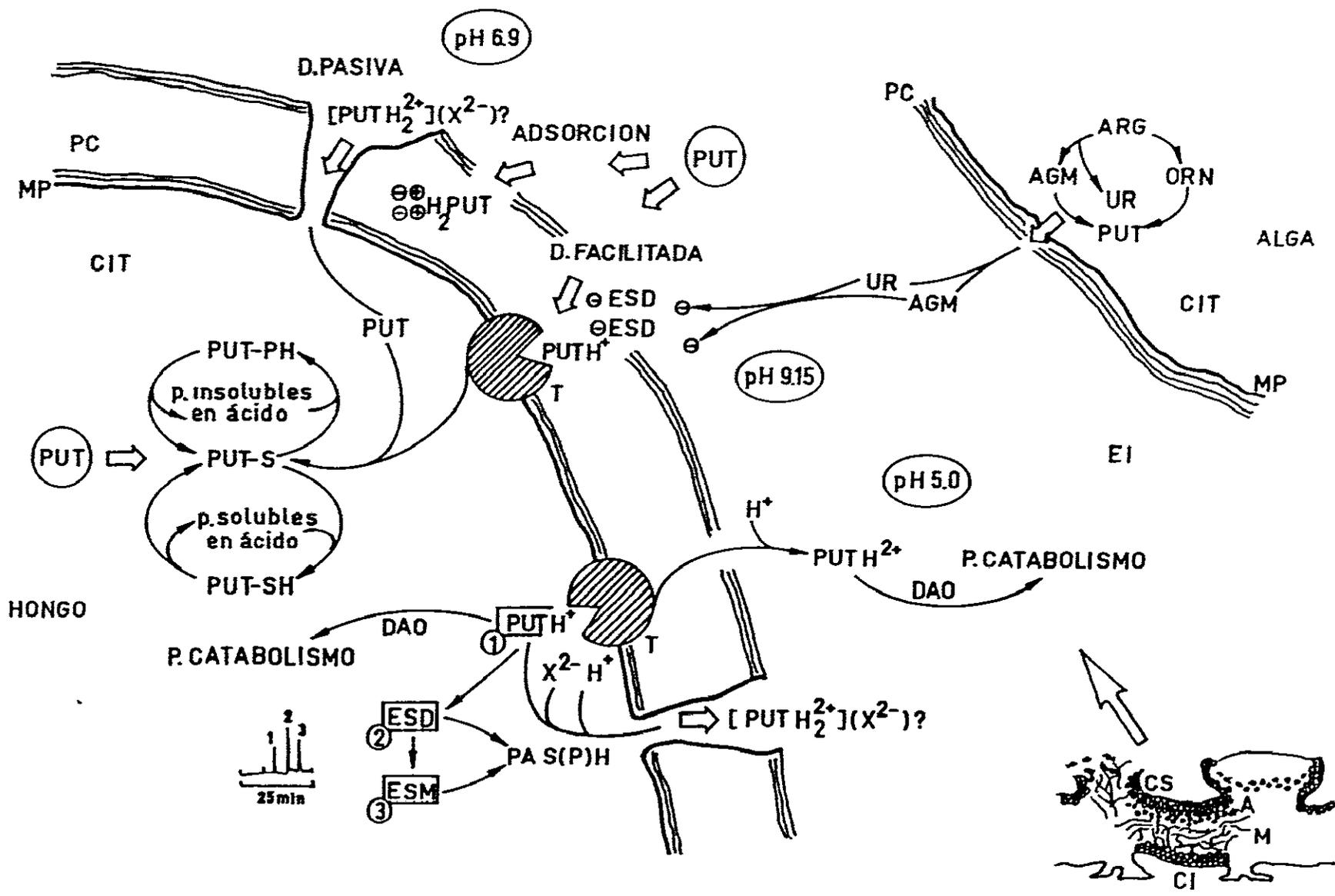
En *E. prunastri*, al menos en las condiciones de estudio, se transporta putrescina, lo que induce a pensar en su posterior utilización como fuente nutritiva o como un mecanismo de osmoregulación, puesto que su entrada no conduce a la

síntesis de espermidina ni espermina en tales células.

Como conclusión se podría decir que la regulación de la concentración interna de putrescina incluye la formación de conjugados solubles e insolubles en ácido, la adsorción extracelular, su catabolismo y su transporte facilitado; todo ello dependiente del estado protonado de la molécula que a su vez es función del pH extracelular (Fig. 49).

FIGURA 49.- Esquema de regulación de la concentración interna de putrescina en *E. prunastri*.

A- alga
AGM- agmatina
ARG- arginina
CI- cortex inferior
CIT- citoplasma
CS- cortex superior
DAO- diamino oxidasa
EI- espacio intercalular
ESD- espermidina
ESM- espermina
M- médula
MP- membrana plasmática
ORN- ornitina
PC- pared celular
PUT- putrescina
T- transportador
UR- urea



V.- CONCLUSIONES

1ª. Se ha puesto a punto un método de HPLC que permite separar poliaminas, en menos de 25 minutos, mediante derivatización pre-columna, utilizando cloruro de dansilo y detección por fluorescencia (longitud de onda de excitación 340-380 nm y de emisión 460 nm). La respuesta del detector es lineal, en función de la masa inyectada en la columna y permite cuantificar hasta 0,3 pmoles de putrescina, espermidina y espermina.

La hidrólisis ácida de las poliaminas totales extraídas permite separarlas en tres fracciones: formas libres (S), formas conjugadas solubles en ácido (SH) y formas conjugadas insolubles en ácido (PH). La hidrólisis alcalina, posterior a la dansilación, permite eliminar los analitos que interfieren en el análisis cromatográfico posterior.

2ª. *Evernia prunastri* (L.) Ach. sintetiza las tres poliaminas básicas: putrescina, espermidina y espermina, encontrándose tanto en forma libre como conjugada. Su concentración en talo y su secreción al medio varían en función del tiempo y el pH de incubación. La espermina es la poliamina que alcanza mayores concentraciones en talo.

3ª. La putrescina es internalizada de forma pasiva ($K_d = 0,15 \mu\text{moles de putrescina} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) y mediante un mecanismo de difusión facilitada, cuyo transportador exhibe una cinética del tipo descrito por Michaelis Menten ($K_m = 5,3 \text{ mM}$; $V_{max} = 12,5 \mu\text{moles de putrescina} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) frente a la concentración de sustrato. Los valores de K_m y V_{max} obtenidos a partir de la representación de Eadie-Hofstee fueron de 6,03 mM y 20,9 $\mu\text{moles} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente.

La putrescina es también adsorbida sobre la pared celular.

- 4^a La espermidina y la espermina se comportan como inhibidores competitivos del transporte de putrescina con valores de K_i de 1,55 y 1,34 mM, respectivamente. Los valores I_{50} , obtenidos a partir de la representación semilogarítmica de la curva dosis-respuesta, fueron de 2,17 y 1,0 mM para espermidina y espermina, respectivamente.
- 5^a El transporte de putrescina es inhibido por análogos estructurales de la diamina, tales como urea, agmatina. Los ácidos evérnico y úsnico no compiten con la putrescina en su transporte.
- 6^a El transporte de putrescina es saturable con el tiempo y función, tanto del peso seco del talo como del pH extracelular; mayor a medida que éste se basifica debido a la protonación de la molécula.
- 7^a La putrescina transportada se encuentra localizada, principalmente, en la fracción soluble del citoplasma y en una menor proporción en la pared celular. El fotobionte es capaz de controlar el transporte de putrescina exógena, siendo el micobionte el que la acumula. Dicha acumulación induce a pensar en su utilización como fuente nutritiva o como un mecanismo de osmoregulación, puesto que no conduce a la síntesis de espermidina ni espermina.
- 8^a La putrescina endógena y exógena pueden ser catabolizadas por acción de una diamino oxidasa cuya actividad es función del pH extracelular.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- ADIGA, P.R. y PRASAD, G.L. (1985): Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regul.*, 3: 205-226.
- AHMADJIAN, V. y JACOBS, J.B. (1983): Algal-fungal relationships in lichens: recognition, synthesis and development. En: *Algal Symbiosis*, Goff, L.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, p 147-172.
- ALTMAN, A. (1982a): Retardation of radish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.*, 54: 189-193.
- ALTMAN, A. (1982b): Polyamines and wounded storages tissues. Inhibition of RNase activity and solute leakage. *Physiol. Plant.*, 54: 194-198.
- ALTMAN, A. y BACHRACH, U. (1981): Involvement of polyamines in plant growth and senescence. *Adv. Polyamine Res.*, 3: 365-375.
- ALTMAN, A., FRIEDMAN, R. y LEVIN, N. (1982): Arginine and ornithine decarboxylases, the polyamine biosynthetic enzymes of mung bean seedlings. *Plant Physiol.*, 69: 876-879.
- ALTMAN, A., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1977): Stabilization of oat leaf protoplast through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.*, 60: 570-574.
- ANGELINI, R., FEDERICO, R. y MANCINELLI, A. (1988): Phytochrome-mediated control of diamine oxidase level in the epicotyl of etiolated lentil (*Lens culinaris*, Medicus) seedlings. *Plant Physiol.*, 88: 1207-1209.
- ANGELINI, R., MANES, F. y FEDERICO, R. (1987): Histochemical demonstration of amine oxidase involvement in peroxide production in the cell wall. *Giorn. Bot. Ital.*, 121: 119-120.
- ANGUILLESI, M.C., GRILLI, I. y FLORIS, C. (1989): Polyamine metabolism in plants: arginine and ornithine decarboxylase activity in ripening *Triticum durum* seeds. *Biologia Plantarum (Praha)*, 31(2): 81-87.
- APELBAUM, A., BURGOON, A.C., ANDERSON, J.D., LIEBERMAN, M., BEN-ARIE, R. y MATTOO, A.K. (1981): Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher-plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiol.*, 68: 453-456.

- APELBAUM, A., CANELLAKIS, Z.N., APPLEWHITE, P.B., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1988): Binding of spermidine to a unique protein in thin-layer tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, 88: 996-998.
- APELBAUM, A., GOLDLUST, A. e ICEKSON, I. (1985): Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol.*, 79: 635-640.
- APELBAUM, A. e ICEKSON, I. (1983): Applied polyamines inhibit macromolecular synthesis in plant tissue. *Adv. Polyamine Res.*, 4: 437-442.
- APELBAUM, A., ICEKSON, I., BURGOON, A.C. y LIEBERMAN, M. (1982): Inhibition by polyamines of macromolecular synthesis and its implication for ethylene production and senescence processes. *Plant Physiol.*, 70: 1221-1223.
- ARNON, D.I. (1949): Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.
- ASCASO, C. (1980): A rapid method for the quantitative isolation of green algae from lichens. *Ann. Bot.*, 45: 483.
- ASCASO, C., GONZALEZ, C. y VICENTE, C. (1980): Epiphytic *Evernia prunastri* (L.) Ach.: ultraestructural facts. *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1: 43-51.
- ATMAR, V.J. y KUEHN, G.D. (1981): Phosphorylation of ornithine decarboxylase by a polyamine-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5518-5522.
- AVALOS, A., LEGAZ, M.E. y VICENTE, C. (1986): The occurrence of lichen phenolics in the xylem sap of *Quercus pyrenaica*, their translocation to leaves and biological significance. *Biochem. System. Ecol.*, 14 (4): 381-384.
- BACHRACH, U. (1973): *Function of Naturally Occurring Polyamines*, Academic Press, New York.
- BAGNI, N. (1966): Aliphatic amines and a growth factor of coconut milk stimulate cellular proliferation of *Helianthus tuberosus in vitro*. *Experientia*, 22: 732-736.
- BAGNI, N. (1970): Metabolic changes of polyamines during

- germination of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.*, 69: 159-164.
- BAGNI, N. (1986): The function and metabolism of polyamines in plants. *Acta Horticulturae, Growth Regulators*, 179: 95-103.
- BAGNI, N., ADAMO, P., SERAFINI-FRACASSINI, D. y VILLANUEVA, V.R. (1981): RNA, proteins and polyamines during tube growth in germinating apple pollen. *Plant Physiol.*, 68: 727-730.
- BAGNI, N., BARALDI, R. y COSTA, G. (1984): Uptake, translocation and metabolism of aliphatic polyamines in leaves and fruitlets of *Malus domestica* (cv. Ruby Spur). *Acta Horticulturae*, 149: 173-178.
- BAGNI, N. y PISTOCCHI, R. (1985): Putrescine uptake in *Saintpaulia* petals. *Plant Physiol.*, 77: 398-402.
- BAGNI, N. y SERAFINI-FRACASSINI, D.S. (1974): The role of polyamines as growth factors in higher plants and their mechanism of action. En: *Plant Growth Substances, parte VII*, Hirokawa Publ., Co., Inc., Tokyo, p 1205-1217.
- BAGNI, N., SERAFINI-FRACASSINI, D. y TORRIGIANI, P. (1982): Polyamines and cellular growth processes in higher plants. En: *Plant Growth Substances*, Wareing, P.F. (ed.), Academic Press, New York, p 473-482.
- BASU, R., MAITRA, N. y GHOSH, B. (1988): Salinity results in polyamine accumulation in early rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.*, 15: 777-786.
- BECKETT, P.J. y BROWN, D.H. (1984a): The control of cadmium uptake in the lichen genus *Peltigera*. *J. Exp. Bot.*, 35: 1071-1082.
- BECKETT, P.J. y BROWN, D.H. (1984b): The relationship between cadmium uptake and heavy metal tolerance in the lichen genus *Peltigera*. *New Phytol.*, 97: 301-311.
- BEHE, M. y FELSENFELD, G. (1981): Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly(dG-m⁵dC).poly (dG-m⁵dC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1619-1623.
- BERLIN, J. (1981): Formation of putrescine and cinnamoylputrescine in tobacco cell cultures. *Phytochemistry*, 20: 53-55.

- BERLIN, J. y FORCHE, E. (1981): DL- α -Difluoromethylornithine causes enlargement of cultured tobacco cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 101: 277-282.
- BERNAL-LUGO, I. (1983): Relationship of polyamines endogenous content and GA₃ effect in barley aleurone layers. *Plant Physiol.*, 72: S-473.
- BIASI, R., BAGNI, N. y COSTA, G. (1988): Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. *Physiol. Plant.*, 73: 201-205.
- BIONDI, S., BAGNI, N. y SANSOVINI, A. (1986): Dicyclohexylamine uptake and effects on polyamine content in cultured cotyledons of radiata pine. *Physiol. Plant.*, 66: 41-45.
- BIRECKA, H., GARRAWAY, M.O., BAUMANN, R.J. y McCANN, P.P. (1986): Inhibition of ornithine decarboxylase and growth of the fungus *Helminthosporium maydis*. *Plant Physiol.*, 80: 798-800.
- BITONTI, A.J., CASARA, P.J., McCANN, P.P. y BEY, P. (1987): Catalytic irreversible inhibition of bacterial and plant arginine decarboxylase activities by novel substrate and product analogues. *Biochem. J.*, 242: 69-74.
- BROWN, D.H. y BECKETT, R.P. (1985): Mineral and lichens: acquisition, localization and effect. En: *Surface Physiology of Lichens*, Vicente, C., Brown, D.H. y Legaz, M.E. (eds.), Editorial de la Universidad Complutense, Madrid, p 127-149.
- BURTIN, D., MARTIN-TANGUY, J., PAYNOT, M. y ROSSIN, N. (1989): Effects of the suicide inhibitors of arginine and ornithine decarboxylase activities on organogenesis, growth, free polyamine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explants of *Nicotiana tabacum*, xanthi n.c., cultivated *in vitro* in a medium producing callus formation. *Plant Physiol.*, 89: 104-110.
- CABANNE, F., DALEBROUX, M.A., MARTIN-TANGUY, J. y MARTIN, C. (1981): Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c. *Physiol. Plant.*, 53: 399-404.
- CABANNE, F., MARTIN-TANGUY, J. y MARTIN, C. (1977): Phénolamines associées à l'induction florale et à l'état reproducteur du *Nicotiana tabacum* c.v. xanthi n.c. *Physiol. Vég.*, 15: 429-433.

- CANELLAKIS, E.S., KYRIAKIDIS, D.A., RINEHART, C.A., HUANG, S.C., PANAGIOTIDIS, C. y FONG, W.F. (1985): Regulation of polyamine biosynthesis by antizyme and some recent developments relating the induction of polyamine biosynthesis to cell growth. *Bioscience Reports*, 5: 189-204.
- COCUCCI, S. y BAGNI, N. (1968): Polyamine induced activation of protein synthesis in ribosomal preparation from *Helianthus tuberosus* tissue. *Life Sci.*, 7: 113-120.
- COHEN, E., ARAD, S., HEIMER, Y.M. y MIZRAHI, Y. (1982): Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiol.*, 70: 540-543.
- COHEN, E., ARAD, S.M., HEIMER, Y.M. y MIZRAHI, Y. (1984): Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chorella*: correlation between ornithine decarboxylase and DNA synthesis at different light intensities. *Plant Physiol.*, 74: 385-388.
- COHEN, S.S. y GREENBERG, M.L. (1981): Spermidine, an intrinsic component of turnip yellow mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. USA*. 78: 5470-5474.
- COHEN, E., HEIMER, Y.M. y MIZRAHI, Y. (1982): Ornithine decarboxylase and arginine decarboxylase activities in meristematic tissues of tomato and potato plants. *Plant Physiol.*, 70: 544-546.
- COHEN, E. y KENDE, H. (1986): The effect of submergence, ethylene and gibberellin on polyamines and their biosynthetic enzymes in deep-water rice internodes. *Planta*, 169: 498-504.
- COSTA, G. y BAGNI, N. (1983): Effects of polyamines on fruit-set of apple. *HortScience*, 18 (1): 59-61.
- CROCOMO, O.J. y BASSO, L.C. (1974): Accumulation of putrescine and related amino acids in potassium deficient *Sesamum*. *Phytochemistry*, 13: 2659-2665.
- CHATTERJEE, S., MAITRA, N., GHOSH, B. y SEN, S.P. (1988): Effect of polyamines on photosynthesis of source and sink organs in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol.*, 29 (7): 1207-1213.
- CHEN, S.H. y KAO, C.H. (1983): Localized effect of polyamines on chlorophyll loss. *Plant Cell Physiol.*, 24 (8): 1463-1467.

- CHERRY, J.H. (1973): Measurement of ribonuclease (RNase) activity. En: Molecular Biology of Plants. Columbia University Press, New York and London, p 17-20.
- CHO, J.C. (1983a): Effects of cytokinin and several inorganic cations on the polyamine content of lettuce cotyledons. *Plant Cell Physiol.*, 24: 27-32.
- CHO, J.C. (1983b): Enhancement by putrescine of gibberellin-induced elongation in hypocotyls of lettuce seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 24: 305-308.
- CHRIST, M., HARR, J. y FELIX, H. (1989): Transport of polyamines in sugar beet seedlings. *Z. Naturforsch.*, 44c: 59-63.
- DAI, Y. y GALSTON, A.W. (1981): Simultaneous phytochrome-controlled promotion and inhibition of arginine decarboxylase activity in buds and epicotyls of etiolated peas. *Plant Physiol.*, 67: 266-269.
- DAI, Y., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1982): Promotion by gibberellic acid of polyamines biosynthesis in internodes of light-growth dwarf peas. *Plant Physiol.*, 69: 103-105.
- DAI, Y. y WANG, J. (1987): Relation of polyamines titer to photoperiodic induction of flowering in *Pharbitis nil*. *Plant Science*, 51: 135-139.
- DATTA, N., HARDISON, L.K. y ROUX, S.J. (1986): Polyamine stimulation of protein phosphorylation in isolated pea nuclei. *Plant Physiol.*, 82: 681-684.
- DATTA, N., SCHELL, M.B. y ROUX, S.J. (1987): Spermine stimulation of a nuclear NII kinase from pea plumules and its role in the phosphorylation of a nuclear polypeptide. *Plant Physiol.*, 84: 1397-1401.
- DAVIS, R.H. (1985): Regulation of polyamine synthesis in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics of Filamentous Fungi*, Liss, A.R., Inc., p 145-156.
- DAVIS, R.H. y RISTOW, J.L. (1988): Polyamine transport in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 267 (2): 479-489.
- DE AGAZIO, M., GIARDINA, M.C. y GRECO, S. (1988): Effect of exogenous putrescine, spermidine and spermine on K⁺ uptake and H⁺ extrusion through plasma membrane in maize root segments. *Plant Physiol.*, 87: 176-178.

- DE BARY, A. (1878): Die Erscheinung der Symbiose. Verlag von Karl J. Thrübner. Strassbourg.
- DESAI, H.V. y MEHTA, A.R. (1985): Changes in polyamines levels during shoot formation, root formation and callus induction in cultured *Passiflora* leaf discs. *J. Plant Physiol.*, 119: 45-53.
- DIBBLE, A.R.G., DAVIES, P.J. y MUTSCHLER, M.A. (1988): Polyamine content of long-keeping alcobaca tomato fruit. *Plant Physiol.*, 86: 338-340.
- D'ORAZI, D. y BAGNI, N. (1987): *In vitro* interactions between polyamines and pectic substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148 (3): 1259-1263.
- DOWNES, C.G. y LOVELL, P.H. (1986): The effect of spermidine and putrescine on the senescence of cut carnations. *Physiol. Plant.*, 66: 679-684.
- DUMORTIER, F.M., FLORES, H.E., SHEKHAVAT, N.S. y GALSTON, A.W. (1983): Gradients of polyamines and their biosynthetic enzymes in coleoptiles and roots of corn. *Plant Physiol.*, 72: 915-918.
- ESCRIBANO, M.I. y LEGAZ, M.E. (1984): L-Ornithine decarboxylase from *Evernia prunastri*. *Phyton*, 14: 171-177.
- ESTEVEZ, M.P., ORUS, M.I. y VICENTE, C. (1980): Estudios morfológicos sobre *Evernia prunastri* de vida saprofítica. *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1 (1): 33-41.
- ESTEVEZ, M.P., ORUS, M.I. y VICENTE, C. (1982): Desfoliación de *Quercus rotundifolia* inducida por *Evernia prunastri* en condiciones naturales y simuladas. En: Estudios sobre Biología, Editorial Universidad Complutense, Madrid, p 117-131.
- EVEN-CHEN, Z., MATTOO, A.K. y GOREN, R. (1982): Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from ¹⁴C-methionine into spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.*, 69: 385-388.
- FARRAR, J.F. (1976): Ecological physiology of the lichen *Hypogymnia physodes*, II. Effects of wetting and drying cycles and the concept of "physiological buffering". *New Phytol.*, 77: 105-113.
- FEDERICO, R., ALISI, CH. y FORLANI, F. (1989): Properties of

- the polyamine oxidase from the cell wall of maize seedlings. *Phytochemistry*, 28 (1): 45-46.
- FEDERICO, R., ALISI, CH., FORLANI, F. y ANGELINI, R. (1989): Purification and characterization of oat polyamine oxidase. *Phytochemistry*, 28 (8): 2045-2046.
- FEDERICO, R. y ANGELINI, R. (1986): Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta*, 167: 300-302.
- FEDERICO, R. y ANGELINI, R. (1988): Distribution of polyamines and their related catabolic enzymes in etiolated and light-growth leguminosae seedlings. *Planta*, 173: 317-321.
- FEDERICO, R., ANGELINI, R., ARGENTO-CERU, M.P. y MANES, F. (1985): Immunohistochemical demonstration of lentil diamine oxidase. *Cell. Mol. Biol.*, 31: 171-174.
- FEDERICO, R., ANGELINI, R., CESTA, A. y PINI, C. (1985): Determination of diamine oxidase in lentil seedlings by enzymatic activity and immunoreactivity. *Plant Physiol.*, 79: 62-64.
- FEIRER, R.P., WANN, S.R. y EINSPAHR, D.W. (1985): The effects of spermidine synthesis inhibitors on *in vitro* plant development. *Plant Growth Regulation*, 3: 319-327.
- FEIRER, R.P., MIGNON, G. y LITVAY, J.D. (1984): Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science*, 223: 1433-1435.
- FELIX, H. y HARR, J. (1987): Association of polyamines to different parts of various plant species. *Physiol. Plant.*, 71: 245-250.
- FIENBERG, A.A., CHOI, J.H., LUBICH, W.P. y SUNG, Z.R. (1984): Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Planta*, 162: 532-539.
- FINK, J., JEBLICK, W., BLASCHEK, W. y KAUSS, H. (1987): Calcium ions and polyamines activate the plasma membrane-located 1,3- β -glucan synthase. *Planta*, 171: 130-135.
- FLORES, H.E. y FILNER, P. (1985): Polyamine catabolism in higher plants: characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*, 3: 277-291.

- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982a): Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, 69: 701-706.
- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982b): Polyamines and plant stress: activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science*, 217: 1259-1260.
- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1984a): Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. I. Physiological parameters of the response. *Plant Physiol.*, 75: 102-109.
- FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1984b): Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. II. Relation to amino acid pools. *Plant Physiol.*, 75: 110-113.
- FOLK, J.E. (1980): Transglutaminases. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 517-531.
- FRIEDMAN, R., ALTMAN, A. y BACHRACH, U. (1982): Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. I. Effect of exogenous compounds and changes in endogenous polyamines content. *Plant Physiol.*, 70: 844-848.
- FRIEDMAN, R., ALTMAN, A. y BACHRACH, U. (1985): Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. II. Incorporation of precursors into polyamines. *Plant Physiol.*, 79: 80-83.
- FRIEDMAN, R., LEVIN, N. y ALTMAN, A. (1986): Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant Physiol.*, 82: 1154-1157.
- FUHRER, J., KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L. y GALSTON, A.W. (1982): Effects of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oats leaves. II. Inhibition of ethylene biosynthesis and possible mode of action. *Plant Physiol.*, 70: 1597-1600
- GALSTON, A.W., ALTMAN, A. y KAUR-SAWHNEY, R. (1978): Polyamines, ribonuclease and the improvement of oat leaf protoplasts. *Plant Science Letters*, 11: 69-79.
- GALSTON, A.W., DAI, Y., FLORES, H.E. y YOUNG, N.D. (1983): Control of arginine decarboxylase activity in higher plants. *Adv. Polyamine Res.*, 4: 381-393.
- GALSTON, A.W. y KAUR-SAWHNEY, R. (1981): Effects of polyamines on macromolecular metabolism and development

- processes in plant cells. Role RNA Dev. Reprod., Proc. Int. Symp., 2nd, p 200-210.
- GALUN, M. (1989): Lichen research: an overreview with some emphases (review article). En: Endocytobiology IV, 4th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L. y Smith, D.C. (eds.), INSA, Villeurbanne, France, p 161-168.
- GERATS, A.G., KAYE, C., COLLINS, C. y MALMBERG, R.L. (1988): Polyamine levels in petunia genotypes with normal and abnormal floral morphologies. Plant Physiol., 86: 390-393.
- GOREN, R., PALAVAN, N., FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982): Changes in polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatment. Plant Cell Physiol., 23 (1): 19-26.
- GOREN, R., PALAVAN, N. y GALSTON, A.W. (1982): Separating phytochrome effects on arginine decarboxylase activity from its effect on growth. J. Plant Growth Regul., 1: 61-73.
- GREEN, D.C. (1970): The Biology of Lichen Symbionts. D. Phil. Thesis, University of Oxford.
- GREEN, T.G.A. y SMITH, D.C. (1974): Lichen physiology, XIV. Differences between lichen algae in symbiosis and in isolation. New Phytol., 73: 753-766.
- GREENBERG, M.L. y COHEN, S.S. (1985): Dicyclohexylamine-induced shift of biosynthesis from spermidine to spermine in plant protoplasts. Plant Physiol., 78: 568-575.
- GUARINO, L.A. y COHEN, S.S. (1979a): Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacystis nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (7): 3184-3188.
- GUARINO, L.A. y COHEN, S.S. (1979b): Mechanism of toxicity of putrescine in *Anacystis nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (8): 3660-3664.
- HAMANA, K. y MATSUZAKI, S. (1982): Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. J. Biochem., 91: 1321-1328.
- HAMANA, K. y MATSUZAKI, S. (1985): Distinct difference in the polyamine compositions of *Bryophyta* and *Pteridophyta*. J. Biochem., 97: 1595-1601.

- HAMANA, K., MIYAGAWA, K. y MATSUZAKI, S. (1983): Occurrence of sym-homospermidine as the mayor polyamine in nitrogen-fixing cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112 (2): 606-613.
- HARTMANN, T., SANDER, H., ADOLPH, R. y TOPPEL, G. (1988): Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta*, 175: 82-90.
- HARTMANN, T. y TOPPEL, G. (1987): Senecionine N-oxide the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry*, 26 (6): 1639-1643.
- HAWKSWORTH, D.L. y HILL, D.J. (1984): *The Lichen-Forming Fungi*, Bleckie, Glasgow and London.
- HENDRICKS, S.B. y BORTHWICK, H.A. (1967): The function of phytochrome in regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58: 2125-2130.
- HERBEST, E.J. y SNELL, E.E. (1948): Putrescine as a growth factor for *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Biol. Chem.*, 176: 989-990.
- HIATT, A. (1989): Polyamine synthesis in maize cell lines. *Plant Physiol.*, 90: 1378-1381.
- HIATT, A. y MALMBERG, R.L. (1988): Utilization of putrescine in tobacco cell lines resistant to inhibitors of polyamine synthesis. *Plant Physiol.*, 86: 441-446.
- HIATT, A., McINDOO, J. y MALMBERG, R.L. (1986): Regulation of polyamine biosynthesis in tobacco: Effects of inhibitors and exogenous polyamines on arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, 261 (3): 1293-1298.
- HIBASAMI, H., TANAKA, M., NAGAI, J. e IKEDA, T. (1980): Dicyclohexylamine, a potent inhibitor of spermidine synthase in mammalian cells. *FEBS Lett.*, 116: 99-101.
- HILL, D.J. (1980): The physiology of lichens. En: *Lichenology: Progress and Problems*, Brown, D.H., Hawksworth, D.L. y Bailey, R.H. (eds.), Academic Press, London, New York y San Francisco, p 457-513.
- HILL, J.M. (1971): Diamine oxidase (pea seedling). *Methods Enzymol.*, 17B: 730-735.

- HIRASAWA, E. y SUZUKI, Y. (1983): Biosynthesis of spermidine in maize seedlings. *Phytochemistry*, 22: 103-106.
- HIRASAWA, E. y SUZUKI, Y. (1985): Occurrence of spermine in chromatin of *Zea mays*. *Plant Growth Regulation*, 3: 239-245.
- HOFSTEE, B.H.J. (1959): Noninvert versus plot in enzyme kinetics. *Nature*, 184: 1296-1298.
- HONEGGER, R. (1984): Citological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist*, 16 (2): 111-127.
- HYODO, H. y TANAKA, K. (1986): Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity by polyamines, their related compounds and metabolites of S-adenosylmethionine. *Plant Cell Physiol.*, 27 (3): 391-398.
- ICEKSON, I., BAKHANASHVILI, M. y APELBAUM, A. (1986): Inhibition by ethylene of polyamine biosynthetic enzymes enhanced lysine decarboxylase activity and cadaverine accumulation in pea seedlings. *Plant Physiol.*, 82: 607-609.
- ICEKSON, I., GOLDLUST, A. y APELBAUM, A. (1985): Influence of ethylene on S-adenosylmethionine decarboxylase activity in etiolated pea seedlings. *J. Plant Physiol.*, 119: 335-345.
- ISOLA, M.C. y FRANZONI, L. (1989): Inhibition of net synthesis of ribonuclease by polyamines in potato tuber slices. *Plant Science*, 63: 39-45.
- JÄGER, H.J. y WEIGEL, H.J. (1978): Amino acids metabolism in lichens. *Bryologist.*, 81 (1): 107-113.
- JARVIS, B.C., YASMIN, S. y COLEMAN, M.T. (1985): RNA and protein metabolism during adventitious root formation in stem cuttings of *Phaseolus aureus* cultivar berkin. *Plant Physiol.*, 64: 53-59.
- KALLIO, A., McCANN, P.P. y BEY, P. (1981): DL- α (difluoromethyl)-arginine: A potent enzyme-activated irreversible inhibitor of bacterial arginine decarboxylase. *Biochemistry*, 20: 3163-3166.
- KANAZAWA, K.A. (1977): Physiological-environmental interactions in lichen, II. The pattern of net photosynthetic acclimation in *Peltigera canina* (L.) Willd. var.

- praextata* (Floerke in somm.) Hue, and *P. polydactyla* (Neck) Hoffm. *New Phytol.*, 79: 31-39.
- KAUR-SAWHNEY, R., CHACKALAMANNIL, A. y GALSTON, A.W. (1989): Effects of inhibitors of polyamine biosynthesis on growth and organization of meristematic centers in *Petunia* protoplast cultures. *Plant Sciences*, 62: 123-128.
- KAUR-SAWHNEY, R., DAI, Y. y GALSTON, A.W. (1986): Effect on inhibitors of polyamines biosynthesis on gibberellin-induced internode growth in light-growth dwarf peas. *Plant Cell Physiol.*, 27 (2): 253-260.
- KAUR-SAWHNEY, R., FLORES, H. y GALSTON, A.W. (1980): Polyamine-induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.*, 65: 368-371.
- KAUR-SAWHNEY, R., FLORES, H. y GALSTON, A.W. (1981): Polyamine oxidase in oat leaves: a cell wall-localized enzyme. *Plant Physiol.*, 68: 494-498.
- KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1979): Interactions of polyamines and light on biochemical processes involved in leaf senescence. *Plant Cell Environ.*, 2: 189-196.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHEKHAWAT, N.S. y GALSTON, A.W. (1985): Polyamine levels as related to growth, differentiation and senescence in protoplast-derived cultures of *Vigna aconitifolia* and *Avena sativa*. *Plant Growth Regulation*, 3: 329-337.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L., CEGIELSKA, T. y GALSTON, A.W. (1982): Inhibition of protease activity by polyamines. Relevance for control of leaf senescence. *FEBS Lett.*, 145 (2): 345-349.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L., FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982): Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol.*, 69: 405-410.
- KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L. y GALSTON, A.W. (1982): Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol.*, 69: 411-415.
- KAUR-SAWHNEY, R., TIBURCIO, A.F. y GALSTON, A.W. (1988): Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta*, 173: 282-284.

- KE, D. y ROMANI, R.J. (198): Effects of spermidine on ethylene production and the senescence of suspension-cultured pear fruit cells. *Plant Physiol. Biochem.*, 26 (2): 109-116.
- KNEIFEL, H. y HEGEWALD, E. (1980): Amines in algae. IV: Norspermidine and other polyamines in the genus *Scenedesmus*. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 60: 87-96.
- KOLLÖFFEL, C. y VAN DIJKE, H.D. (1975): Mitochondrial arginase activity from cotyledons of developing and germinating seeds of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.*, 55: 507-510.
- KRAMER, G.F. y WANG, CH.Y. (1989): Correlation of reduced drilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiol. Plant.*, 76: 479-484.
- KUEHN, G.D., AFFOLTER, H.U., ATMAR, V.J., SEEBECK, T., GUBLER, U. y BRAUN, R. (1979): Polyamine-mediated phosphorylation of a nucleolar protein from *Physarum polycephalum* that stimulates rRNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2541-2545.
- KUMAR, P.P. y THORPE, T.A. (1989): Putrescine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 76: 521-526.
- KUSHAD, M.M. y YELENOSKY, G. (1987): Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus. *Plant Physiol.*, 84: 692-695.
- KUSHAD, M.M., YELENOSKY, G. y KNIGHT, R. (1988): Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening. *Plant Physiol.*, 87: 463-467.
- KYRIAKIDIS, D.A. (1983): Effect of plant growth hormones and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. *Physiol. Plant.*, 57: 499-504.
- KYRIAKIDIS, D.A., PANAGIOTIDIS, C.A. y GEORGATSOS, J.G. (1983): Ornithine decarboxylase (germinated barley seeds). *Methods Enzymol.*, 94: 162-166.
- LEGAZ, M.E. (1985): The regulation of urea biosynthesis. En: *Surface Physiology of Lichens*, Vicente, C., Brown, D.H. y Legaz, M.E. (eds.), Ed. Universidad Complutense, Madrid, p 57-72.

- LEGAZ, M.E., AVALOS, A., DE TORRES, M., ESCRIBANO, M.I., GONZALEZ, A., MARTIN-FALQUINA, A., PEREZ-URRIA, E. y VICENTE, C. (1986): Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environm. Exp. Bot.*, 26 (4): 385-396.
- LEGAZ, M.E., DE TORRES, M. y ESCRIBANO, M.I. (1985): Putrescine affects mannitol metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Photosynthetica*, 19: 230-236.
- LEGAZ, M.E., DIVASSON, A. y VICENTE, C. (1985): Cyphellae-like structures and pseudocyphellae of *Evernia prunastri* and *Pseudevernia furfuracea*. *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 6: 343-347.
- LEGAZ, M.E., GONZALEZ DE BUITRAGO, G. y VICENTE, C. (1982): Exogenous supply of L-arginine modifies free amino acids content in *Evernia prunastri* thallus. *Phyton*, 42 (2): 213-218.
- LEGAZ, M.E., IGLESIAS, A. y VICENTE, C. (1983): Regulation of agmatine-iminohidrolase of *Evernia prunastri* by L-arginine metabolites. *Z. Pflanzenphysiol.*, 110 (1): 53-59.
- LEGAZ, M.E., PEREZ-URRIA, E., AVALOS, A. y VICENTE, C. (1988): Epiphytic lichens inhibit the appearance of leaves in *Quercus pyrenaica*. *Biochem. System. Ecol.*, 16 (3): 253-259.
- LEGAZ, M.E. y VICENTE, C. (1980): Arginase regulation in *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Cryptog. Bryol. Lichénol.*, 1: 407-414.
- LEGAZ, M.E. y VICENTE, C. (1982): Two forms of arginase in *Evernia prunastri* thallus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104: 1441-1446.
- LE RUDULIER, D. y GOAS, G. (1975): Influence des ions ammonium et potassium sur l'accumulation de la putrescine chez les jeunes plantes de *Soja hispida* Moench, privées de leurs cotyledons. *Physiol. Vég.*, 13: 125-136.
- LEWIS, D.H. y SMITH, D.C. (1967): Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants, I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol.*, 66: 143-184.
- LIN, P.P.C. (1984): Polyamine metabolism and its relation to response of the aleurone layers of barley seeds to gibberellic acid. *Plant Physiol.*, 74: 975-983.

- LIN, P.P.C. (1985): Effects of methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) and abscisic acid on polyamine metabolism in embryonectomized barley seeds. *Plant Growth Regulation*, 3: 257-268.
- LINDAU, G. (1985): Lichenologische Untersuchungen. Heft I. Ueber Wachstum und Anheftungsweise der Rinderflechten, Heinrich, C., Dresden.
- LINEWEAVER, H. y BURK, D. (1939): The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
- LIQUORI, A.M., COSTANTINO, L., CRESCENZI, V., ELIA, V. GIGLIO, E., PULITI, R., DE SANTIS SAVINO, M. y VITAGLIANO, V. (1967): Complexes between DNA and polyamines: a molecular model. *J. Mol. Biol.*, 24: 113-122.
- LOFTFIELD, R.B., EIGNER, E.A. y PASTUSZYN, A. (1981): The role of spermine in preventing misacylation by phenylalanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, 256: 6729-6735.
- LORAND, L. y CONRAD, S.M. (1984): Transglutaminases. *Mol. Cell. Biochem.*, 58: 9-35.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- MAISS, B., KORDY, E., KNEIFEL, H. y SOEDER, C.J. (1982): Amines in algae. 7. Concentration changes of polyamines in synchronous *Chlorella emersonii*: kinetic relationships to DNA and RNA content. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 106 (3): 213-221.
- MALMBERG, R.L. (1979): Temperature sensitive variants of *Nicotiana tabacum* isolated from somatic cell culture. *Genetics*, 92: 215-221.
- MALMBERG, R.L. y McINDOO, J. (1983): Abnormal floral development of a tobacco mutant with elevated polyamine levels. *Nature*, 305: 623-625.
- MALMBERG, R.L. y ROSE, D.J. (1987): Biochemical genetics of resistance to MGBG in tobacco: mutants that alter SAM-decarboxylase or polyamine ratios, and floral morphology. *Mol. Gen. Genet.*, 207: 9-14.
- MARIANI, P., D'ORAZI, D. y BAGNI, N. (1989): Polyamines in

- primary walls of carrot cells: endogenous content and interactions. *J. Plant Physiol.*, 135: 508-510.
- MARTIN, C. y MARTIN-TANGUY, J. (1981): Polyamines conjuguées et limitation de l'expansion virale chez les végétaux. *C.R. Acad. Sci. Paris (Sér. III)*, 293: 249-251.
- MARTIN-FALQUINA, A. y LEGAZ, M.E. (1984): Purification and properties of the constitutive arginase of *Evernia prunastri*. *Plant Physiol.*, 76: 1065-1069.
- MARTIN-TANGUY, J., DESHAYES, A., PERDRIZET, E. y MARTIN, C. (1979): Hydroxycinnamic acid amides in *Zea mays*. Distribution and changes with cytoplasmic male sterility. *FEBS Lett.*, 108: 176-178.
- MARTIN-TANGUY, J., MARTIN, C. y GALLET, M. (1973): Presence de composés aromatiques liés à la putrescine dans divers *Nicotiana viroses*. *C.R. Acad. Sci. Paris (Sér. D)*, 276: 1433-1440.
- MARTIN-TANGUY, J., MARTIN, C., PAYNOT, M. y ROSSIN, N. (1988): Effect of hormone treatment on growth bud formation and free amine and hydroxycinnamoyl putrescine levels in leaf explant of *Nicotiana tabacum* cultivated in vitro. *Plant Physiol.*, 88: 600-604.
- MCDONALD, R.E. y KUSHAD, M.M. (1986): Accumulation of putrescine during chilling injury of fruits. *Plant Physiol.*, 82: 324-326.
- McFARLANE, J.D. y KERSHAW, K.A. (1982): Physiological-environmental interactions in lichens. XIV. The environmental control of glucose movement from alga to fungus in *Peltigera polydactyla*, *P. rufescens* and *Collema furfuraceum*. *New Phytol.*, 91: 93-101.
- MACHOLAN, L. y MINAR, J. (1974): The depression of the synthesis of pea diamine oxidase due to light and the verification of its participation in growth processes using competitive inhibitors. *Biol. Plant.*, 16: 86-93.
- MEIJER, E.G.M. y SIMMONDS, J. (1988): Polyamine levels in relation to growth and somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* L. *J. Exp. Bot.*, 203: 787-794.
- MENGOLI, M., BAGNI, N. y BIONDI, S. (1987): Effect of α -difluoromethylornithine on carrot cell cultures. *J. Plant Physiol.*, 129: 479-485.

- MENGOLI, M., PISTOCCHI, R. y BAGNI, N. (1989): Effect of long-term treatment of carrot cell cultures with millimolar concentrations of putrescine. *Plant Physiol. Biochem.*, 27 (1): 1-8.
- METCALF, B.W., BEY, P., DANZIN, C., JUNG, M.J., CASARA, P. y VEVERT, J.P. (1978): Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17) by substrate and product analogues. *J. Amer. Chem. Soc.*, 100: 2551-2553.
- MIKITZEL, L.J. y KNOWLES, N.R. (1989): Polyamine metabolism of potato seed-tuber during long-term storage and early sprout development. *Plant Physiol.*, 91: 183-189.
- MITCHELL, J.L.A. y WILSON, J.M. (1983): Polyamine-stimulated alteration of the ornithine decarboxylase molecule in *Physarum polycephalum*. *Biochem. J.*, 214: 345-351.
- MIZRAHI, Y. y HEIMER, Y.M. (1982): Increased activity of ornithine decarboxylase in tomato ovaries induced by auxin. *Physiol. Plant.*, 54: 367-368.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., MOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1971): p-Coumaroylputrescine, caffeoylputrescine and feruloylputrescine from callus tissue culture of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 10: 1347-1350.
- MIZUSAKI, S., TANABE, Y., NOGUCHI, M. y TAMAKI, E. (1973): Changes in the activities of ornithine decarboxylase, putrescine N-methyltransferase and N-methylputrescine oxidase in tobacco roots in relation to nicotine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, 14: 103-110.
- MONTAGUE, M.J., ARMSTRONG, T.A. y JAWORSKI, E.G. (1979): Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. II. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.*, 63: 341-345.
- MONTAGUE, M.J., KOPPENBRINK, J.W. y JAWORSKI, E.G. (1978): Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in arginine decarboxylase activity. *Plant Physiol.*, 62: 430-433.
- MORRIS, D. y HARADA, J.J. (1980): The participation of polyamines in the proliferation of bacterial and animal cells. En: *Polyamines in Biomedical Research*, Gaugas, J.M. (ed.), Wiley, New York, p 1-16.
- MUHITCH, M.J., EDWARDS, L.A. y FLETCHER, J.S. (1983): Influence of diamines and polyamines on the senescence of plant

- suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 2: 82-84.
- MUSSELL, H., OSMELOSKI, J., WETTLAUFER, S.H. y WEINSTEIN, L. (1987): Suppression of *Verticillium* wilt of tomato by difluoromethylornithine a suicidal inhibitor of polyamine biosynthesis. *Plant Disease*, 71: 313-316.
- MUKHOPADHYAY, A. y GHOSH, B. (1986): Protein synthesis and loss of viability of rice seeds: effect of polyamines on *in vitro* translation. *Physiol. Plant.*, 68: 441-445.
- NEGREL, J. (1989): The biosynthesis of cinnamoylputrescine in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 28 (2): 477-481.
- NIEBOER, E., PUCKETT, K.J. y GRACE, B. (1976): The uptake of nickel by *Umbilicaria muhlenbergii*: a physicochemical process. *Can. J. Bot.*, 54: 724-733.
- ORUS, M.I. y ASCASO, C. (1982): Localización de hifas líquénicas en los tejidos conductores de *Quercus rotundifolia* Lam. *Collect. Bot. (Barcelona)*, 13: 325-338.
- ORUS, M.I., ESTEVEZ, M.P. y VICENTE, C. (1981): Manganese depletion in chloroplasts of *Quercus rotundifolia* during chemical simulation of lichen epiphytic states. *Physiol. Plant.*, 52: 263-266.
- PALAVAN, N. (1987): Polyamine metabolism in the roots of *Phaseolus vulgaris*-interaction of the inhibitors of polyamine biosynthesis with putrescine in growth and polyamine biosynthesis. *Plant Cell Physiol.*, 28: 565-572.
- PALAVAN, N. y GALSTON, A.W. (1982): Polyamine biosynthesis and titer during various developmental stages of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 55: 438-444.
- PANAGIOTIDIS, C.A., GEORGATSOS, J.G. y KYRIAKIDIS, D.A. (1982): Superinduction of cytosolic and chromatin bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Lett.*, 146: 193-196.
- PARKER, M.W., HENDRICKS, S.B., BORTHWICK, H.A. y WENT, F.W. (1949): Spectral sensitivities for leaf and stem growth of etiolated pea seedlings and their similarity to action spectra for photoperiodism. *Am. J. Bot.*, 36: 194-204.

- PEGG, A.E. (1988): Perspectives in cancer research: polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer Res.*, 48: 759-774.
- PISTOCCHI, R., BAGNI, N. y CREUS, J.A. (1986): Polyamine uptake, kinetics, and competition among polyamines and between polyamines and inorganic cations. *Plant Physiol.*, 80: 556-560.
- PISTOCCHI, R., BAGNI, N. y CREUS, J.A. (1987): Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant Physiol.*, 84: 374-380.
- PISTOCCHI, R., KELLER, F., BAGNI, N. y MATILE, P. (1988): Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles. *Plant Physiol.*, 87: 514-518.
- PLANELLES, V. y LEGAZ, M.E. (1987): Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci.*, 51: 9-16.
- POHJANPELTO, P. (1976): Putrescine transport is greatly increased in human fibroblasts initiated to proliferate. *J. Cell Biol.*, 68: 512-520.
- POLYA, C.M. y MICUCCI, V. (1985): Interaction of wheat germ Ca^{2+} -dependent protein kinases with calmodulin antagonists and polyamines. *Plant Physiol.*, 79: 968-972.
- POPOVIC, R.B., KYLE, D.J., COHEN, A.S. y ZALIK, S. (1979): Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.*, 64: 721-726.
- PORTER, L. (1917): On the attachment organs of the common corticolous *Ramalinae*. *Proc. Roy. Irish Acad. Sect. B*, 34: 205-211.
- PRAKASH, L., DUTT, M. y PRATHAPASENAN, G. (1988): NaCl alters contents of nucleic acids, protein, polyamines and the activity of agmatine deiminase during germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Aust. J. Plant Physiol.*, 15: 769-776.
- PRAKASH, L. y PRATHAPASENAN, G. (1988): Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of germination and early seedlings growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Aust. J. Plant Physiol.*, 15: 761-767.

- PUCKETT, K.J., NIEBOER, E., GORZYNSKI, M.J. y RICHARDSON, D.H.S. (1973): The uptake of metal ions by lichens: a modified ion-exchange process. *New Phytol.*, 72: 329-342.
- QUIGLEY, G.J., TEETER, M.M. y RICH, A. (1978): Structural analysis of spermine and magnesium binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 64-68.
- RABITI, A.L., PISTOCCHI, R. y BAGNI, N. (1989): Putrescine uptake and translocation in higher plants. *Physiol. Plant.*, 77: 225-230.
- RAJAM, M.V. (1989): Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitors of polyamine metabolism. *Plant Sci.*, 59: 53-56.
- RAJAM, M.V., WEINSTEIN, L.H. y GALSTON, A.W. (1985): Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6874-6878.
- RAMAKRISHNA, S., GUARINO, L. y COHEN, S.S. (1978): Polyamines of *Anacystis nidulans* and metabolism of exogenous spermidine and spermine. *J. Bacteriol.*, 134: 744-750.
- RAMAKRISHNAN, S. y SUBRAMANIAN, S.S. (1966): Amino acids of *Lobaria subisidiosa*, *Umbilicaria postulata*, *Parmelia nepalensis* and *Ramalina sinensis*. *Curr. Sci.*, 35: 124-128.
- REDMOND, J.W. y TSENG, A. (1979): High pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.*, 170: 479-481.
- REMO, R. y BERTANI, A. (1989): Effect of decreasing oxygen concentration on polyamine metabolism in rice and wheat shoots. *J. Plant Physiol.*, 135: 375-377.
- RICHARDS, F.J. y COLEMAN, R.G. (1952): Occurrence of putrescine in potassium deficient barley. *Nature*, 170: 460.
- RINALDI, A., FLORIS, G. y GIARTOSIO, A. (1985): Plant amine oxidases. En: *Structure and Function of Amine Oxidases*, Mondovi, B. (ed.), CRC Press, Boca Raton, p 51-62.
- ROBERTS, D.R., DUMBROFF, E.B. y THOMPSON, J.E. (1986):

- Exogenous polyamines alter membrane fluidity in bean leaves: a basis for potential misinterpretation of their true physiological role. *Planta*, 167: 395-401.
- ROBERTS, D.R., WALKER, M.A., THOMPSON, J.E. y DUMBROFF, E.B. (1984): The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant Cell Physiol.*, 25 (2): 315-322.
- RODRIGUEZ-GARAY, B., PHILLIPS, G.C. y KUEHN, G.D. (1989): Detection of norspermidine and norspermine in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Plant Physiol.*, 89: 525-529.
- RUSSELL, H.D. (1981): Post-translational modification of ornithine decarboxylase by its product putrescine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 1167-1172.
- SAFTNER, R. (1989): Effects of organic amines on α -aminoisobutyric acid uptake into the vacuole and on ethylene production by tomato pericarp slices. *Physiol. Plant.*, 75: 485-491.
- SAKAI, T.T. y COHEN, S.S. (1976): Effects of polyamines on the structure and reactivity of rRNA. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 17: 15-42.
- SCHOPFER, P. (1977): Phytochrome control of enzymes. *Annu. Rev., Plant Physiol.*, 28: 223-252.
- SCHUBER, F. y LAMBERT, C. (1974): Metabolism of ornithine and arginine in Jerusalem artichoke tuber tissue. Relationship with the biosynthesis of polyamines. *Physiol., Vég.*, 12 (4): 571-584.
- SEILER, N., BOLKENIUS, F.N. y KNÖDGEN, B. (1985): The influence of catabolic reactions on polyamine excretions. *Biochem. J.*, 225: 219-226.
- SEILER, N. y KNÖDGEN, B. (1979): Determination of the naturally occurring monoacetyl derivatives of di- and polyamines. *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.)*, 164: 155-168.
- SEILER, N., KNÖDGEN, B. y EISENBEISS, K. (1978): Determination of di- and polyamines by high-performance liquid chromatographic separation on their 5-dimethylaminophthalene-1-sulphonyl derivatives. *J. Chromatogr. (Biomed. Appl.)*, 145 Z: 29-39.

- SEN, K. y GHOSH, B. (1984): Effect of polyamines on ribonuclease activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Phytochemistry*, 23 (8): 1583-1585.
- SEPULVEDA, G. y SANCHEZ DE JIMENEZ, E. (1988): Polyamine distribution among maize embryonic tissues and its relation to seed germination. *Biomed. Biophys. Res. Commun.*, 153 (2): 881-887.
- SERAFINI-FRACASSINI, D. (1984): Effects of polyamines and polyamine inhibitors on growth, differentiation and organogenesis in plant tissue culture. En: *Advances in Polyamines in Biomedical Sciences*, Caldarera, C. y Bachrach, U. (eds.), CLUEB Bologna, Italy, p 189-196.
- SERAFINI-FRACASSINI, D. y ALESSANDRI, M. (1983): Polyamines and morphogenesis in *Helianthus tuberosus* explants. *Adv. Polyamine Res.*, 4: 419-426.
- SERAFINI-FRACASSINI, D., DEL DUCA, S. y D'ORAZI, D. (1988): First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymatic activity in plants. *Plant Physiol.*, 87: 757-761.
- SERAFINI-FRACASSINI, D., TORRIGIANI, P. y BRANCA, C. (1984): Polyamines bound to nucleic acids during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.*, 60: 351-357.
- SHEN, H. y GALSTON, A.W. (1985): Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedlings roots. *Plant Growth Regulation*, 3: 353-363.
- SINDHU, R.K. y COHEN, S.S. (1984): Subcellular localization of spermidine synthesis in the protoplasts of Chinese cabbage leaves. *Plant Physiol.*, 76: 219-223.
- SINSKA, I. (1988): Stimulation of dark germination of light-sensitive lettuce seeds by polyamines. *Acta Physiol. Plant.*, 10 (1): 11-16.
- SLOCUM, R.D., BITONTI, A.J., McCANN, P.P. y FEIRER, R.P. (1988): DL- α -Difluoromethyl [3,4- ^3H] arginine metabolism in tobacco and mammalian cells. Inhibition of ornithine decarboxylase activity after arginase-mediated hydrolysis of DL- α -difluoromethylarginine to DL- α -difluoromethylornithine. *Biochem. J.*, 225: 197-202.
- SLOCUM, R.D. y GALSTON, A.W. (1985a): Arginase-mediated

- hydrolysis of DFMA to DFMO *in vitro*. *Plant Physiol. Suppl.*, 77: 45.
- SLOCUM, R.D. y GALSTON, A.W. (1985b): *In vivo* inhibition of polyamine biosynthesis and growth in tobacco ovary tissues. *Plant Cell Physiol.*, 26 (3): 1519-1526.
- SLOCUM, R.D. Y GALSTON, A.W. (1985c): Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiol.*, 79: 336-343.
- SLOCUM, R.D., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, 235 (2): 283-303.
- SMITH, D.C. (1974): Transport from symbiotic algae and symbiotic chloroplasts to host cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 28: 437-508.
- SMITH, D.C. (1975): Symbiosis and the biology of lichenized fungi. *Sym. Soc. Exp. Biol.*, 29: 373-405.
- SMITH, D.C. (1980): Mechanism of nutrient movement between the lichen symbionts. En: *Cellular Interactions in Symbiosis and Parasitism*, Cook, C.B., Pappas, P.W. y Rudolph, E.D. (eds.), Ohio State University Press, Columbia, p 197-227.
- SMITH, L.L. (1985): The identification and characterization of a polyamine-accumulation system in the lung. *Biochem. Soc. Trans.*, 13: 332-334.
- SMITH, T.A. (1970): Putrescine, spermidine and spermine in higher plants. *Phytochemistry*, 9: 1479-1486.
- SMITH, T.A. (1973): Amine levels in mineral deficient *Hordeum vulgare* leaves. *Phytochemistry*, 12: 2093-2100.
- SMITH, T.A. (1976): Polyamine oxidase from barley and oats. *Phytochemistry*, 15: 633-636.
- SMITH, T.A. (1981): Amines. En: *The Biochemistry of Plants, Secondary Plant Products*, vol. 7, Conn, E.E. (ed.), Academic Press, New York, p 249-268.
- SMITH, T.A. (1982): The function and metabolism of polyamines in higher plants. En: *Plant Growth Substances*, Wareing, P.F. (ed.), Academic Press, New York, p 463-472.

- SMITH, T.A. (1984): Putrescine and inorganic ions. *Adv. Phytochem.*, 18: 7-54.
- SMITH, T.A. (1985a): Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 117-143.
- SMITH, T.A. (1985b): The di- and polyamine oxidases of higher plants. *Biochem. Soc. Transac.*, 13 (2): 319-322.
- SMITH, T.A. (1985c): Polyamine in plants. En: *Polyamine in Plants*, Galston, A.W. y Smith, T.A. (eds.), Martinus Nijhoff, Dr. y Junk, W. Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, p VII-XXI.
- SMITH, T.A. y BEST, G.R. (1977): Polyamines in barley seedlings. *Phytochemistry*, 16: 841-843.
- SMITH, T.A. y BEST, G.R. (1978): Distribution of the hordatines in barley. *Phytochemistry*, 17: 1093-1098.
- SMITH, T.A., BEST, G.R., ABBOTT, A.J. y CLEMENTS, E.D. (1978): Polyamines in Paul's Scarlet rose suspension cultures. *Planta*, 144: 63-68.
- SMITH, T.A., BROWN, D., CAVENDER, R.W. y SARGINSON, C. (1974): Polyamine oxidation by enzymes from barley and pea. *Biochem. Soc. Transac.*, 2: 99-101.
- SMITH, T.A., CROKER, S.J. y LOEFFLER, R.S.T. (1986): Occurrence in higher plants of 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium and pyrroline: products of polyamine oxidation. *Phytochemistry*, 25: 683-689.
- SMITH, M.A. y DAVIES, P.J. (1985a): Separation and quantification of polyamines in plant tissues by higher performance liquid chromatography of their dansyl derivatives. *Plant Physiol.*, 78: 89-91.
- SMITH, M.A. y DAVIS, P.J. (1985b): Effect of photoperiod on polyamines metabolism in apical buds of G2 peas in relation to the induction of apical senescence. *Plant Physiol.*, 79: 400-405.
- SMITH, M.A., DAVIES, P.J. y REID, J.B. (1985): Role of polyamines in gibberellin-induced internode growth in peas. *Plant Physiol.*, 78: 92-99.
- SMITH, D.C. y DREW, E.A. (1965): Studies in the physiology of lichens, V. Translocation from the algal layer to the medula in *Peltigera polydactyla*. *New Phytol.*, 64: 195-200.

- SMITH, T.A., NEGREL, J. y BIRD, C.R. (1983): The cinnamic acid amides of the di- and polyamines. *Adv. Polyamine Res.*, 4: 347-370.
- SOLORZANO, L. (1969): Determination of ammonio in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanology*, 14: 799-801.
- SPERANZA, A. y BAGNI, N. (1977): Putrescine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* and in normal and crown gall tissues of *Scorzonera hispanica*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 226-233.
- SRIVASTAVA, S.K., PRAKASH, V. y NAIK, B.I. (1977): Regulation of diamine oxidase activity in germinating pea seeds. *Phytochemistry*, 16: 185-187.
- SRIVASTAVA, S.K. y RAJBABU, P. (1983a): Effect of amines and guanidines on ATPase from maize scutellum. *Phytochemistry*, 22: 2675-2679.
- SRIVASTAVA, S.K. y RAJBABU, P. (1983b): Effect of amines and guanidines on peroxidase from maize scutellum. *Phytochemistry*, 22: 2681-2686.
- SRIVENUGOPAL, K.S. y ADIGA, P.R. (1981): Enzymatic conversion of agmatine to putrescine in *Lathyrus sativus*. *J. Biol. Chem.*, 256: 9532-9541.
- SUTTLE, J.C. (1981): Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry*, 20: 1477-1480.
- SUGIURA, T., HAYASHI, T., KAWAI, S. y OHNO, T. (1975): High-speed liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.*, 110: 385-388.
- SURESH, M.R., RAMAKRISHNA, S. y ADIGA, P.R. (1978): Regulation of arginine decarboxylase and putrescine levels in *Cucumis sativus* cotyledons. *Phytochemistry*, 17: 57-63.
- SUZUKI, Y. y YANGISAWA, H. (1980): Purification and properties of maize polyamine oxidase: a flavoprotein. *Plant Cell Physiol.*, 21: 1085-1094.
- TABOR, C.W. y TABOR, H. (1966): Transport systems for 1,4-diaminobutane, spermidine and spermine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 241 (16): 3714-3723.
- TABOR, C.W. y TABOR, H. (1976): 1,4-Diaminobutane (putrescine),

- spermidine and spermine. *Ann. Rev. Biochem.*, 45: 285-306.
- TABOR, C.W. y TABOR, H. (1984): Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.*, 53: 749-790.
- TABOR, C.W. y TABOR, H. (1985): Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.*, 49: 81-99.
- TABOR, C.W., TABOR, H. y TYAGI, A.K. (1983): Biochemical and genetics studies of polyamines in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Polyamine Res.*, 4: 467-478.
- TERANO, S. y SUZUKI, Y. (1978a): Formation of β -alanine from spermine and spermidine in maize shoots. *Phytochemistry*, 17: 148-149.
- TERANO, S. y SUZUKI, Y. (1978b): Biosynthesis of γ -aminobutyric acid from spermine of maize seedlings. *Phytochemistry*, 17: 550-551.
- TIBURCIO, A.F. y GALSTON, A.W. (1986): Arginine decarboxylase as the source of putrescine for tobacco alkaloids. *Phytochemistry*, 25 (1): 107-110.
- TIBURCIO, A.F., GENDY, C.A. y TRAN THANH VAN, K. (1989): Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: putrescine as marker of root differentiation. *Plant Cell, Tissue and Organs Culture*, 19: 43-54.
- TIBURCIO, A.F., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1986): Polyamine metabolism and osmotic stress. II. Improvement of oat protoplast by an inhibitor of arginine decarboxylase. *Plant Physiol.*, 82: 375-378.
- TIBURCIO, A.F., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1988): Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissues cultures. *Plant Cell Physiol.*, 29 (7): 1241-1249.
- TIBURCIO, A.F., KAUR-SAWHNEY, R., INGERSOLL, R.B. y GALSTON, A.W. (1985): Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. *Plant Physiol.*, 78: 323-326.
- TIBURCIO, A.F., MASDEU, M.A., DUMORTIER, F.M. y GALSTON, A.W. (1986): Polyamine metabolism and osmotic stress. I. Relation to protoplast viability. *Plant Physiol.*, 82: 369-374.
- TORRIGIANI, P., SCOCCIANTI, V. y BAGNI, N. (1988): Polyamine

- oxidase activity and polyamine content in maize during seed germination. *Physiol. Plant.*, 74: 427-432.
- TORRIGIANI, P. y SERAFINI-FRACASSINI, D. (1980): Early DNA synthesis and polyamines in mitochondria from activated parenchyma of *Helianthus tuberosus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 97: 353-359.
- TORRIGIANI, P., SERAFINI-FRACASSINI, D. y BAGNI, N. (1987): Polyamine biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.*, 84: 148-152.
- TORRIGIANI, P., SERAFINI-FRACASSINI, D., BIONDI, S. y BAGNI, N. (1986): Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J. Plant Physiol.*, 124: 23-29.
- TORRIGIANI, P., SERAFINI-FRACASSINI, D. y FARA, A. (1988): Putrescine catabolism in *Helianthus tuberosus* tuber. En: *Perspectives in Polyamine Research*, Perin, A., Scalabrino, G., Sessa, A. y Ferioli, M.E. (eds.), Wichtig Editore, Milano, Italy, p 93-97.
- TORRIGIANI, P., SERAFINI-FRACASSINI, D. y FARA, A. (1989): Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiol.*, 89: 69-73.
- TRAN THANH VAN, K. (1973): Direct flower neoformation from superficial tissues of small explant of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 115: 87-92.
- VALLE, T., FERNANDEZ, J.J. y NICOLAS, G. (1989): Effect of difluoromethylarginine and difluoromethylornithine on seed germination and on epicotyl growth in *Cicer arietinum*. *Plant Physiol. Biochem.*, 27 (1): 113-117.
- VALLEE, J.C., VANSUYT, G., NEGREL, J., PERDRIZET, E. y PREVOST, J. (1983): Mise en évidence d'amines liées à des structures cellulaires chez *Nicotiana tabacum* et *Lycopersicum esculentum*. *Physiol. Plant.*, 57: 143-148.
- VICENTE, C. y LEGAZ, M.E. (1981): Purification and properties of L-arginine decarboxylase of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Physiol.*, 22 (6): 1119-1123.
- VICENTE, C. y LEGAZ, M.E. (1982): Purification and properties of agmatine amidinohydrolase of *Evernia prunastri*.

- Physiol. Plant., 55: 335-339.
- VICENTE, C. Y LEGAZ, M.E. (1983): Regulation of urea production in *Evernia prunastri*: effects of L-arginine metabolites. Z. Pflanzenphysiol., 111: 123-131.
- VILLANUEVA, V.R. (1981): Polyamines in *Euglena gracilis*. Adv. Polyamine Res., 3: 389-395.
- WALKER, M.A., ELLIS, B.E., CHAPPLE, C.C.S. y DUMBROFF, E.B. (1987): Subcellular localization of amines and activities of their biosynthetic enzymes in p-fluorophenylalanine resistant and wild-type tobacco cell cultures. Plant Physiol., 85: 78-81.
- WALKER, M.A., ROBERTS, D.R. y DUMBROFF, E.B. (1988): Effects of cytokinin and light on polyamines during the greening response of cucumber cotyledons. Plant Cell Physiol., 29 (2): 201-205.
- WALTER, H.J.P. y GEUNS, J.M.C. (1987): High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. Plant Physiol., 83: 232-234.
- WALTERS, D.R. (1986): The effects of a polyamine biosynthesis inhibitor on infection of *Vicia faba* L. by the rust fungus *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schroet. New Phytol., 104: 613-619.
- WEINSTEIN, L.H., KAUR-SAWHNEY, R., RAJAM, M.V., WETTLAUFER, S.H. y GALSTON, A.W. (1986): Cadmium-induced accumulation of putrescine in oat and bean leaves. Plant Physiol., 82: 641-645.
- WILLIAMS-ASHMAN, H. y SCHENONE, A. (1972): Methylglyoxal-bis-(guanyl-hydrazone) as a potent inhibitor of mammalian and yeast S-adenosylmethionine decarboxylases. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46: 288-295.
- WINER, L. y APELBAUM, A. (1986): Involvement of polyamines in the development and ripening of avocado fruits. J. Plant Physiol., 126: 223-233.
- YAGÜE, E., ORUS, M.I. y ESTEVEZ, M.P. (1984): Extracellular polysaccharidases synthesized by the epiphytic lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. Planta, 160: 212-216.
- YAN, T.F. y TAO, M. (1982): Purification and characterization of a wheat germ protein kinase. J. Biol. Chem., 257: 7037-7043.
- YANAGISAWA, H., KATO, A., HOSHIAI, S., KAMIYA, A. y TORII, N.

- (1987): Polyamine oxidase from water hyacinth. *Plant Physiol.*, 85: 906-909.
- YOST, R.W., ETTRE, L.S. y CONLON, R.D. (1980): Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica. Perkin-Elmer.
- YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1983a): Putrescine and acid stress. Induction of arginine decarboxylase activity and putrescine accumulation by low pH. *Plant Physiol.*, 71: 767-771.
- YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1983b): Are polyamine transported in etiolated peas? *Plant Physiol.*, 73: 912-914.
- YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1984): Physiological control of arginine decarboxylase activity in potassium deficient oat shoots. *Plant Physiol.*, 76: 331-335.