

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL
U.D.I. DE FISILOGIA VEGETAL

**CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DEL PAPEL DE LAS
POLIAMINAS EN EL DESARROLLO DEL FRUTO DE LA PLATANERA.**

**ESTUDIO DE LAS IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE ESTAS
SUSTANCIAS SOBRE EL CRECIMIENTO “IN VITRO” DE LOS TEJIDOS
DEL OVARIO.**

Autor:

ARMANDO JORGE CARMONA

al

Memoria presentada para optar

grado de Doctor en Biología

La Laguna, 12 de Septiembre de 1997

JOSE ROBERTO LORENZO MARTIN, DOCTOR EN BIOLOGIA
Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA.

CERTIFICA:

Que **D. ARMANDO JORGE CARMONA** ha realizado en el
Departamento de Biología Vegetal (U.D.I. de Fisiología Vegetal), bajo
mi dirección los trabajos experimentales que han conducido a la
realización de su Tesis Doctoral titulada:

**“CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DEL PAPEL DE LAS
POLIAMINAS EN EL DESARROLLO DEL FRUTO DE LA PLATANERA.
ESTUDIO DE LAS IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE ESTAS
SUSTANCIAS SOBRE EL CRECIMIENTO “IN VITRO” DE LOS TEJIDOS
DEL OVARIO”.**

Laguna, 12 de septiembre de 1997

Dr. J.R. Lorenzo Martín
Profesor Titular de Biología Vegetal

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que por su inestimable colaboración me han permitido realizar el presente trabajo.

A todos los componentes del Departamento de Biología Vegetal, (U.D.I. de Fisiología Vegetal), con mención especial hacia mi Director José Roberto Lorenzo Martín por toda la ayuda prestada a lo largo de este trabajo y el gran apoyo moral.

A Gaspar Siverio Grillo por su estrecha colaboración en el montaje y puesta a punto de las técnicas analíticas y el tratamiento estadístico de los resultados.

Al Departamento de Fruticultura Tropical del Centro de Investigación y Tecnología Agraria (C.I.T.A.) por su buena disponibilidad a cedernos el material objeto de este estudio.

A los Departamentos de Tecnología Farmacéutica y Química Analítica por permitirnos el uso de su infraestructura científica, fundamental para el desarrollo del trabajo.

El presente trabajo de investigación ha sido subvencionado por la Consejería de Educación del Gobierno Autónomo de Canarias.

A todos ¡Muchas Gracias!

A Macu, Héctor y Rebeca

INDICE

ABREVIATURAS	8
OBJETIVO DEL TRABAJO	9
INTRODUCCION	12
1. Consideraciones generales sobre el desarrollo del fruto	13
1.1. Regulación hormonal del desarrollo del fruto	16
2. Generalidades sobre poliaminas en plantas	22
2.1. Antecedentes históricos	24
2.2. Características químicas de las poliaminas	27
2.2.1 Poliaminas típicas: formas libres y conjugadas	27
2.2.2. Poliaminas inusuales o poco comunes	29
2.3. Biosíntesis	31
2.3.1. Biosíntesis de putrescina	31
2.3.2. Biosíntesis de espermidina y espermina	35
2.3.3. Rutas alternativas para la biosíntesis de la espermidina y la espermina	36
2.3.4. Biosíntesis de poliaminas poco comunes	37
2.4. Inhibidores de la biosíntesis	40
2.5. Degradación	42
2.6. Mecanismo de acción y función fisiológica de las poliaminas	46
3. Las poliaminas y el desarrollo del fruto	51

MATERIAL

1. Características biológicas de la platanera	58
2. Estructura y desarrollo del fruto	62
3. Desarrollo de la pulpa	63
4. Material experimental	66

METODOS

1. Técnicas de cultivo "in vitro"	68
1.1. Recolección y preparación del material vegetal	67
1.2. Medios de cultivo	69
1.3. Técnicas de esterilización	71
1.4. Realización de las siembras	72
1.5. Condiciones de incubación	72
2. Análisis de poliaminas	73
2.1. Extracción	73
2.2. Dansilación	73
2.3. Cromatografía	74
2.4. Valoración cuantitativa	74
3. Evaluación del crecimiento de los tejidos	75
4. Análisis estadístico de los resultados	76

RESULTADOS.

1. Efecto de la aplicación exógena de poliaminas sobre el crecimiento "in vitro" de los tejidos de la pulpa	80
1.1. Acción individual de las poliaminas	80
1.2. Acción combinada de las poliaminas y los reguladores	80
1.3. Discusión	85
2. Estudios de correlación entre contenidos endógenos de poliaminas y crecimiento "in vitro" de los tejidos de la pulpa	88
2.1. Crecimiento	88
2.2. Contenido endógeno en poliaminas	89

2.3. Acción temporal de los reguladores del crecimiento en la cronología del desarrollo de los tejidos	95
2.3.1. Tratamiento hormonal en estadios iniciales del desarrollo de los tejidos	96
2.3.2. Tratamiento hormonal en estadios no iniciales del desarrollo de los tejidos	101
2.4. Discusión	109
3. Efecto de los inhibidores de la síntesis de espermidina y espermina sobre el desarrollo de los tejidos	115
3.1. Efecto de la aplicación exógena del CHA sobre el crecimiento.....	116
3.2. Efecto de la aplicación exógena del CHA sobre el contenido endógeno de poliaminas	120
3.3. Efecto de la aplicación exógena del MGBG sobre el crecimiento	124
3.4. Efecto de la aplicación exógena del MGBG sobre el contenido endógeno de poliaminas	127
3.5. Discusión	131
4. Efecto de los inhibidores de la síntesis de putrescina	137
4.1. Influencia del DFMO y el DFMA sobre el contenido endógeno de poliaminas y el crecimiento de los tejidos de la pulpa cultivados sobre un medio sin reguladores de crecimiento	137
4.2. Influencia del DFMO y el DFMA sobre el contenido endógeno de poliaminas y el crecimiento de los tejidos de la pulpa cultivados sobre un medio suplementado con reguladores de crecimiento	140
4.3. Acción temporal de los inhibidores en la cronología del desarrollo de los tejidos y su correlación con los niveles endógenos de poliaminas	147
4.3.1. Efecto de los inhibidores en estadios iniciales del desarrollo	
4.3.2. Efecto de los inhibidores en estadios no iniciales del desarrollo	
4. 4. Aplicación exógena de putrescina a cultivos tratados con DFMO y DFMA	156
4.4.1. Efecto de distintas concentraciones de putrescina exógena	

sobre el crecimiento en discos tratados con DFMO y DFMA	156
4.4.2. Estudio cinético del crecimiento y la acumulación de poliaminas en discos tratados con DFMO y DFMA suplementados o no con putrescina exógena	159
4.4.3. Efecto de la putrescina exógena sobre discos tratados con distintas concentraciones de DFMO y DFMA	169
4.5. Efecto de los precursores de la síntesis de putrescina sobre el crecimiento de los tejidos y el contenido endógeno de poliaminas	178
4.5.1. Efecto de la aplicación exógena de ornitina en combinación con DFMO y DFMA sobre el contenido endógeno de poliaminas	183
4.6. Discusión	185
5. CONCLUSIONES	190
6. BIBLIOGRAFIA	195

ABREVIATURAS

- AIA: Acido indol-3-acético (auxina natural).
- AIB: Acido indol-3-butírico (sustancia de tipo auxínico).
- ACC: Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.
- ADC: Arginina descarboxilasa (enzima de la biosíntesis de la putrescina).
- AG: aminoguanidina (inhibidor de la degradación de las poliaminas)
- ANA: Acido naftalenacético (sustancia de tipo auxínico).
- BA: Benciladenina (sustancia de tipo citoquinina).
- CAD: Cadaverina.
- CHA: Ciclohexilamina (inhibidor de la síntesis de espermidina).
- DAO: Diamino oxidasa (enzima que interviene en la degradación de las diaminas).
- DFMA: α -Difluorometilarginina (inhibidor de la síntesis de putrescina).
- DFMO: α - Difluorometilornitina (inhibidor de la síntesis de putrescina).
- GABA: Acido γ -Aminobutírico.
- α -KMB: α -ceto-metiltiobutirato.
- MGBG: Metilglioxal-*bis*-guanilhidrazona (inhibidor de la síntesis de espermidina).
- MTA: 5-Metiltioadenosina.
- MTR: 5-Metiltioribósido.
- ODC: Ornitina descarboxilasa (enzima de la biosíntesis de la putrescina).
- PCA: Acido perclórico.
- PAL: Fenil-alanina-amonio-liasa.
- PAO: Poliamina oxidasa (enzima que interviene en la degradación de las poliaminas).
- PUT: Putrescina.
- SAM: S-adenosilmetionina.
- SAMdc: S-adenosilmetionina descarboxilasa.
- SAMdo: S-adenosilmetionina descarboxilado.
- SPD: Espermidina.
- SPD sintasa: Espermidina sintasa (enzima de la síntesis de espermidina)
- SPM: Espermina.

OBJETIVO

OBJETIVO

La platanera (*Musa acumina Colla AAA*) es el principal cultivo de las Islas Canarias con una producción anual que supera las 350.000 Tm. A pesar de su importancia, este cultivo ha experimentado un importante retroceso en los últimos años, a raíz de la incorporación de nuestro país a la Unión Europea y la agresiva competencia de los productores centroamericanos controlados por poderosas empresas multinacionales de comercialización. A estas razones se le une la perspectiva de la desaparición de la reserva del mercado nacional destinada tradicionalmente al plátano canario.

Estas circunstancias plantean la necesidad de desarrollar programas de investigación en todos los ámbitos de la cadena productiva desde la mejora tecnológica de los sistemas tradicionales de cultivo (mayor producción a menor coste), mejora de la calidad del fruto, optimización de las condiciones de transporte, maduración, conservación y comercialización.

A lo largo del presente siglo se han realizado numerosas investigaciones en relación con la fisiología de la fructificación y la post-cosecha, las cuales han contribuido de manera decisiva al conocimiento general sobre la biología del desarrollo del fruto y a la mejora de los sistemas productivos.

La mayoría de los trabajos de investigación en el campo de la regulación hormonal del desarrollo del fruto se han centrado en las hormonas clásicas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico), pero muy poca atención se le ha prestado a las poliaminas, sin duda, por tratarse de sustancias cuya potencialidad reguladora sobre el crecimiento y desarrollo vegetal se ha descubierto en los últimos años.

La abundante bibliografía existente sobre poliaminas en plantas, acreditan la presencia de estas sustancias en la mayoría de las especies estudiadas y su implicación en la regulación de numerosos procesos fisiológicos entre los que se incluyen los específicos al desarrollo del fruto (establecimiento o cuajado, crecimiento, maduración, senescencia, etc.). Sin embargo, no existen datos

bibliográficos en los que se planteen investigaciones sobre el papel de las poliaminas en el desarrollo del fruto de la platanera.

Trabajos preliminares realizados en nuestro laboratorio en relación con la fisiología del desarrollo del fruto de la platanera, nos han permitido poner a punto una metodología de trabajo de gran interés para este tipo de investigaciones, basándonos en las técnicas generales de cultivo "in vitro" de tejidos, adaptadas y optimizadas a nuestro material. Mediante el uso de estas técnicas hemos podido estudiar la influencia sobre el crecimiento de los tejidos de diversos factores de tipo nutricional, hormonal, así como las interacciones fisiológicas existentes entre los distintos tejidos.

Una de las conclusiones de estos trabajos reflejan el papel decisivo de las sustancias hormonales, cuya presencia en los tejidos en la combinación y concentración adecuada, constituye el requisito fundamental para el desarrollo óptimo y equilibrado de éstos.

El presente trabajo se plantea con el objetivo de continuar las investigaciones previas sobre la regulación hormonal del desarrollo del fruto de la platanera, centrándonos en el estudio del papel fisiológico de las poliaminas. Este trabajo se integra en un proyecto de investigación subvencionado por la Consejería de Educación del Gobierno de Canarias en el cual se plantean diversas estrategias experimentales, combinando estudios de laboratorio basados en la metodología del cultivo "in vitro" cuyos resultados se recogen en la presente Memoria, y estudios de campo.

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

En el presente capítulo tiene como objetivo revisar los aspectos mas fundamentales en relación con algunos de los acontecimientos fisiológicos que tienen lugar durante el desarrollo del fruto, haciendo especial hincapié en la de regulación hormonal.

Seguidamente, nos centraremos en el estudio de las características químicas y fisiológicas de las poliaminas, su bioquímica y los datos mas recientes en cuanto a sus mecanismos de acción.

En último término, se incluye un apartado en el que se recogen las aportaciones mas relevantes de diversos autores en relación con el papel fisiológico de las poliaminas en el desarrollo del fruto.

CAPITULO: 1.

1. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL DESARROLLO DEL FRUTO.

Desde un punto de vista fisiológico se ha considerado al fruto como una entidad estructural constituida por todos aquellos tejidos que rodean los óvulos y cuyo desarrollo está ligado estrechamente a los cambios fisiológicos que ocurren en ellos (Nitsch, 1952). Este concepto trata de integrar estructuras con un origen morfológico tan diverso como el ovario en la cereza, el receptáculo en la fresa y la manzana o el eje floral en la piña tropical. Tal concepto pudiera ser válido incluso para frutos sin semilla (partenocárpicos). Esta idea es apoyada por Coombe (1976) al constatar que el que distintos frutos tengan orígenes morfológicos diferentes, no forzosamente implica que existan diferencias en cuanto a la fisiología de su desarrollo. El aumento de volumen, la acumulación de agua y de compuestos orgánicos y la participación de las sustancias hormonales en la

regulación del crecimiento y desarrollo, son factores comunes a todos ellos.

En la vida de un fruto pueden distinguirse varias etapas que adquieren grados de importancia diferente en función de las distintas especies:

- formación del primordio floral y desarrollo antes de la antesis.
- antesis, polinización y fecundación.
- establecimiento del fruto o “cuajado” y crecimiento.
- maduración.
- senescencia.

Información detallada sobre estos acontecimientos y otros aspectos generales del desarrollo del fruto puede encontrarse en diversas revisiones bibliográficas de Nitsch (1952, 1970), Gustafson (1961), Crane (1964), Bollard (1970), Coombe (1976), Goodwin (1978), Grange (1993) entre otros.

La formación de los tejidos del fruto se inicia tardíamente durante el proceso de morfogénesis floral. Es una etapa muy activa de divisiones celulares que repercute decisivamente en el tamaño final del fruto al estar éste condicionado en gran medida al número de células existente en el ovario antes de la antesis o apertura de la flor (Owen y Aung, 1990; Ho, 1992; Scorza y col., 1991; Lai y col., 1990).

Los mecanismos que causan las diferencias entre el número de células antes de la antesis en las distintas especies y variedades no se conocen, aunque parece claro que estas diferencias dependen de factores genéticos. Sin embargo, los cambios medio-ambientales que tienen lugar durante el desarrollo vegetal también modulan el crecimiento del ovario. Así, en ciertas especies dioicas como *Lychnis dioica*, el desarrollo del ovario depende de la presencia de un determinado tipo de cromosoma sexual, en cambio en otras especies, el carácter sexual puede ser modificado por ciertos factores ambientales. En especies monoicas, particularmente algunas curcubitáceas, el desarrollo de los tejidos del ovario está profundamente influenciado por la temperatura y las horas de iluminación. En general, días largos y temperaturas elevadas reprimen,

mientras que días cortos y temperaturas bajas favorecen el desarrollo de flores con ovarios, como se ha demostrado en *Cucurbita pepo* y *Cucumis sativus*.

Con la antesis se abre el camino hacia la polinización, acontecimiento que es considerado por muchos autores como el primer paso, en sentido estricto, del desarrollo del fruto y que marca el final en la etapa de desarrollo floral. Aunque algunos frutos puedan desarrollarse sin necesidad de ser polinizados (frutos partenocárpicos), para otros, la deposición del grano de polen sobre el estigma, su germinación y el crecimiento del tubo polínico pueden ser causa suficiente para reactivar, al menos temporalmente, el crecimiento del ovario.

En las angiospermas, tras la polinización y la fecundación se inicia la formación de las semillas las cuales se convertirán en los centros de control del desarrollo del fruto. Esta afirmación está fundamentada por numerosas evidencias experimentales:

- En determinados frutos como por ejemplo, *Vitis vinífera* (Muller-Thurgau, 1898), *Cheiranthus cheiri* (Ulrich, 1936), tomate (Monselise, 1978) o el manzano (Lai y col., 1990), el peso final es proporcional con frecuencia al número de semillas desarrolladas.
- El tamaño y la forma de algunos frutos puede presentar ciertas alteraciones como consecuencia del aborto de algunas semillas y el desarrollo deficiente de los tejidos próximos a ellas. En algunos casos, el aborto masivo de las semillas ha dado lugar a una caída prematura de los frutos.

Tras la antesis y la polinización se presenta una segunda fase de divisiones celulares cuya duración varía con las especies y dentro de un mismo fruto según las distintas zonas. Oscilará entre menos de una semana como en el fruto de *Cucurbita moschata* (Kano y col., 1957), tres o cuatro semanas en el plátano (Mohan Ram y col., 1962), la manzana (Bain y Robertson, 1951) y la ciruela (Sterling, 1953) o prolongarse hasta el estado de madurez como en el aguacate (Schroeder, 1953) y la fresa (Havis, 1943). En la fresa, las divisiones celulares se detienen en el córtex después de la antesis, pero continúan en la

médula durante todo el desarrollo (Ho, 1992).

Las divisiones celulares únicamente se vuelven a activar de manera definitiva, cuando se ha producido la fecundación del óvulo, o como ocurre en muchos frutos partenocárpico, por estímulos generados “in situ” o provenientes de otras parte de la planta, o de manera experimental mediante la aplicación de reguladores del crecimiento. Solamente cuando las células del ovario vuelven a dividirse activamente, iniciando el crecimiento del fruto, se considera que el fruto ha “cuajado”.

Además de las divisiones celulares, el crecimiento y tamaño final del fruto estará condicionado por el grado de expansión celular. En los frutos carnosos, con un elevado contenido de agua la elongación o expansión celular adquiere un extraordinario protagonismo. Un ejemplo típico de ello es la uva, en la cual el número de células formadas a partir de la anthesis se incrementa en dos veces, la densidad celular en cuatro y el volumen en 300 veces o más (Crane, 1964). Durante esta fase, cuya duración suele ser bastante larga, se produce importantes cambios metabólicos que afectan a la composición química del fruto, así como una gran acumulación de agua, compuestos orgánicos y minerales. Este periodo ha sido de los más estudiadas, debido a que afecta directamente a la producción y a la calidad del fruto y a que es el periodo que mejor se puede controlar experimentalmente.

El crecimiento del fruto es estimado normalmente mediante la determinación de algunos parámetros tales como la longitud, diámetro, volumen, peso de la materia fresca o de la materia seca, siendo estos tres últimos, los mas ampliamente utilizados en la mayoría de los estudios fisiológicos.

1.1. Regulación hormonal del desarrollo del fruto

Numerosos estudios han demostrado que el proceso de desarrollo del fruto, ya sea partenocárpico o seminífero, se halla regulado de manera precisa por una sucesión de estímulos de naturaleza hormonal. No se han observado

diferencias respecto al tipo de sustancias hormonales que intervienen en el proceso de fructificación entre las especies seminíferas y partenocárpicas (plátano, piña tropical, algunas variedades de naranja, etc.) aunque como es lógico pensar su origen, la evolución de su concentración y las complejas interacciones que existen entre ellas pueden ser diferentes (Luckwill, 1957; Nitsch, 1952, 1970).

Desde muy temprano, en su etapa inicial previa a la antesis, los tejidos del ovario son muy susceptibles a las sustancias reguladoras del crecimiento aplicadas exógenamente, ya sean auxinas (Laibach y Kribben, 1949; Galun, 1952), citoquininas (Negi y Olmo, 1966) o giberelinas (Mitchel y Wittwer, 1962). Este hecho constituye una evidencia indirecta de la participación en el proceso de las sustancias hormonales.

Según se va aproximando el momento de la antesis el contenido de las sustancias hormonales en el ovario, por lo general, tiende a descender, siendo esta circunstancia la que probablemente determina la detención del crecimiento operada en sus tejidos justo antes de producirse la antesis de la flor. Con posterioridad el crecimiento no se reanuda a menos que tenga lugar la polinización o que la flor reciba algún otro estímulo equivalente. De no ser así, la flor puede sufrir un proceso de abscisión o marchitarse sobre la propia planta.

Durante la polinización y el cuajado del fruto se producen cambios complejos en los contenidos hormonales. Desde los experimentos pioneros de Fitting (1909), se demostró que la polinización podía ser reemplazada por la aplicación sobre el estigma de un extracto de polen, constituyeron una prueba fehaciente de que los granos de polen introducían en el ovario alguna sustancia química capaz, por sí sólo o a través de un complejo sistema de reacciones enzimáticas acontecidas durante el crecimiento del tubo polínico, de evitar la abscisión de la flor e inducir el desarrollo del fruto.

Este tipo de observaciones han inducido a que muchos investigadores hayan ensayado la aplicación exógena de reguladores del crecimiento a flores y frutos con el fin de determinar su importancia en el inicio y mantenimiento del crecimiento del fruto (Hedden y Hoad, 1985; Monselise, 1978). Existen diversas

observaciones que demuestran que las auxinas y las citoquininas son efectivas sobre la inducción del cuajado y el desarrollo de los frutos partenocárpicos. En 1936, Gustafson obtuvo por primera vez frutos partenocárpicos perfectamente desarrollados al tratar ovarios de *Lycopersicon esculentum*, *Petunia hybrida* y *Salpiglossus variabilis* con diversas sustancias de naturaleza auxínica, en concreto, ácido indol-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB), ácido indol-propiónico y ácido fenil-acético mezclados con pasta de lanolina. Este descubrimiento dio pie en años sucesivos a la realización de estudios similares con otras especies y con sustancias químicas muy diversas.

En numerosos trabajos se ha demostrado la participación en el proceso de otras hormonas como es el caso de las giberelinas, en el tomate (Wittwer y col., 1957; Mapelli y col., 1979; Bohner y col., 1988), la pera (Gil y col., 1972), la manzana (Davidson, 1960), el guisante (García-Martínez, 1980; Carbonell y Navarro, 1989); o las citoquininas como ocurre en el higo (Crane, 1965), la uva (Weaver y col., 1965), el pepino (Takeno y col., 1992), el tomate (Bohner y Bangerth, 1988).

Los resultados obtenidos del análisis en frutos polinizados y no polinizados y de los tratamientos exógenos con auxinas, sugieren que el ácido indol-acético (AIA) desempeña una función importante en la estimulación del crecimiento inicial del fruto (Grange, 1993). El desarrollo partenocárpico puede inducirse mediante aplicaciones de AIA o sus análogos químicos, e incluso de inhibidores del transporte de auxinas, tales como el ácido triiodo-benzoico (Palevitch y col., 1972), la morfactina (Robinson y col., 1971) o el naftalam (Quebedeaux y Beyer, 1972). Los autores de estos trabajos sostienen la hipótesis de que tales sustancias actuarían a nivel del pedúnculo del ovario, bloqueando la salida de sustancias de naturaleza auxínica y produciendo con ello una acumulación en el ovario suficiente para disparar el crecimiento partenocárpico del fruto.

La respuesta de las distintas especies a la aplicación de las sustancias reguladoras del crecimiento puede ser muy variada y bastante compleja. Tan importante como la sustancia en sí es el momento de su aplicación, ya que el grado de sensibilidad mostrado por la planta frente a una sustancia determinada puede ser diferente a lo largo del tiempo. En muchas ocasiones una sustancia

puede actuar indirectamente, facilitando la síntesis o la metabolización de otras cuya acción puede resultar mucho mas directo.

Una vez que ha comenzado el desarrollo de las semillas, éstas adquieren un extraordinario protagonismo sobre la regulación del crecimiento y el desarrollo del fruto. En muchos frutos se ha demostrado la existencia de una relación lineal entre número y tamaño de las semillas con la tasa del crecimiento, el tamaño y peso final del fruto, tal como se comentó anteriormente. Este efecto es debido en gran medida a la intensa actividad de biosíntesis de sustancias hormonales localizada en ellas.

Una estrecha relación parece establecerse entre la producción de AIA, giberelinas y citoquininas por parte de las semillas y el crecimiento del fruto. Este hecho sugiere que las semillas ejercen una profunda influencia en el desarrollo de los tejidos del fruto, y que regulan su crecimiento hormonalmente, es decir, por las sustancias de crecimiento que poseen, y que son limitantes en los tejidos del fruto.

La síntesis "in situ" de tales sustancias ha podido demostrarse mediante la utilización de precursores radiactivos (Khalifah, 1967; Bourbouloux y Bounemian, 1973; Grochowska, 1974) o, mediante cultivo "in vitro" de frutos enteros o tejidos de frutos sobre medios de cultivo desprovistos de sustancias reguladoras del crecimiento. La extracción de sustancias hormonales a partir de los tejidos cultivados en estas condiciones constituye una prueba fehaciente de que su síntesis tiene lugar "in vitro".

Sin embargo, todavía desconocemos cuales son los mecanismos mediante los que las hormonas ejercen su acción en los diferentes acontecimientos que se suceden al lo largo de la vida del fruto. Algunos investigadores defienden la idea de que la hormonas pueden influir indirectamente sobre el crecimiento y desarrollo de los frutos dirigiendo el flujo de nutrientes hacia sus tejidos. Es conocido que al desarrollarse, los frutos se convierten en centros metabólicos muy activos hacia los cuales fluye una gran cantidad de nutrientes. Esta movilización de nutrientes es prácticamente nula en el momento de la antesis y aumenta sensiblemente con posterioridad a la

fecundación (Linck y Swanson, 1960).

La relación entre la bioquímica de la semilla y el crecimiento del fruto es compleja, aunque se complica aún más en los frutos partenocárpicos carentes de semillas (Grange, 1993). A pesar de la estrecha correlación existente entre el crecimiento del fruto y el número de semillas, éste puede desarrollarse independientemente de las semillas si se produce el estímulo hormonal adecuado en los primeros momentos del proceso de desarrollo. El origen del estímulo hormonal puede variar, ya sea sintetizado "in situ" en los propios tejidos del ovario, procedente de las partes vegetativas de la planta o por la aplicación exógena de reguladores del crecimiento. Sin embargo, el crecimiento del fruto, incluso en las condiciones anteriores, todavía depende de las hormonas producidas en los propios tejidos del fruto, o de los cambios en la sensibilidad a otras fuentes de regulación hormonal (Browning, 1989).

Por otro lado, diversas investigaciones han puesto de manifiesto que los óvulos desempeñan un papel crucial en los procesos de fructificación, ejerciendo una influencia decisiva sobre el desarrollo de los tejidos del ovario que les circundan. Esta potenciabilidad de los óvulos fue sugerida originariamente por Dollfus (1936) al observar que, tanto en ellos como en la placenta, existía un contenido en sustancias promotoras del crecimiento muy superior al de los restantes tejidos del ovario. Experimentos posteriores realizados por este investigador demostraron que en aquellos ovarios a los que se extirparon los óvulos y la placenta se producía una interrupción del crecimiento, el cual, sin embargo, volvía a reactivarse tras ser sustituidos los óvulos por pasta de lanolina y AIA. Resultados similares fueron obtenidos por Browning (1989) en guisante, al comprobar que la destrucción de los óvulos detiene el crecimiento de la vaina si ésta no es tratada con giberelinas.

Basándose en sus propios experimentos Dollfus sugirió la idea de que los óvulos podrían producir algún tipo de sustancia con capacidad para promover el crecimiento del ovario. Esta hipótesis fue apoyada posteriormente por Nitsch (1952) afirmando que uno de los posibles efectos de las sustancias reguladoras del crecimiento aplicadas sobre el ovario sería la estimulación del desarrollo de los óvulos, los cuales a su vez, promoverían el desarrollo del fruto.

En las variedades comestibles de platanera, cuyos frutos son todos partenocárpicos, los óvulos presentan en el momento de la antesis, un tamaño sensiblemente superior al observado en las variedades seminíferas con las que están genéticamente emparentadas (Simmonds, 1953). La tasa de crecimiento de los óvulos durante las dos semanas siguientes a la antesis, es también en las variedades partenocárpicas superior a las seminíferas, estableciéndose una correlación muy estrecha entre el crecimiento de los óvulos y el del ovario. En base a estas observaciones Simmonds sugiere la posibilidad de que los óvulos estimulen el crecimiento del ovario, pero no descarta que el crecimiento de ambos pudiera estar regulado por un mismo proceso.

Trabajos preliminares de nuestro grupo (Lorenzo-Martín, 1985), nos han permitido poner a punto una metodología óptima para el cultivo "in vitro" de los tejidos del fruto de la platanera. Con esta tecnología los tejidos de la pulpa se desarrollan favorablemente en un entorno experimental perfectamente controlado, sobre un medio de cultivo que debe contar de manera ineludible con un suplemento de sustancias reguladoras del crecimiento de tipo auxínico (*2,4-diclofenoxiacético*) y citoquininas (*benciladenina*). En estas condiciones se ha observado, una relación estrecha entre el grado de desarrollo alcanzado por los óvulos y el crecimiento de la pulpa. Así, un aumento de volumen de los óvulos en los primeros días de cultivo y el mantenimiento de su viabilidad coincide con una intensa proliferación de los tejidos generadores de la pulpa. Este hecho sugiere un posible papel de los óvulos como centro productor de algún estímulo que actuaría sobre el crecimiento del ovario y que sería sintetizado una vez que ellos mismos fuesen estimulados.

CAPITULO: 2

2. GENERALIDADES SOBRE POLIAMINAS EN PLANTAS.

El término poliaminas se emplea, en sentido estricto, para designar a una familia de compuestos orgánicos, ya sean alifáticos, aromáticos o heterocíclicos cuya principal característica es la de poseer a lo largo de su esqueleto carbonado varios grupos de naturaleza amínica (Smith, 1977; Evans y Malmberg, 1989; Flores, 1990).

Dependiendo del número de grupos aminos de la molécula y su disposición lineal o ramificada se distinguen varias categorías o tipos de poliaminas alifáticas (Tabla I). De ellas, la **putrescina** y la **espermidina** son ubíquas, es decir, se encuentran en todos los organismos eucariotas y procariotas mientras que la **espermina** parece estar asociada casi exclusivamente a células eucariotas (Smith, 1982; Galston, 1983). Además de estas poliaminas, consideradas **típicas**, también se han descubierto otras no tan comunes.

Las poliaminas **inusuales o poco comunes** se detectaron inicialmente en ciertas bacterias, hongos y algunas especies vegetales en las que frecuentemente, su acumulación en los tejidos es inducida por determinadas condiciones de estrés (Smith, 1991a,b; Rodríguez-Garay, 1989; Kuehn y col. 1990a,b). Algunos investigadores han sugerido que estas poliaminas podrían tener un importante valor quimiotaxonómico para distinguir las briofitas de las pteridofitas, así como un valor filogenético en plantas superiores y hongos (Hamana y Matsukati, 1985).

En cuanto a su función fisiológica, el papel específico de estos compuestos es escasamente conocido, aunque sí se conoce participan en numerosos procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Valen como soporte a esta idea los siguientes argumentos:

1. Las poliaminas más comunes -putrescina, espermidina y espermina- se encuentran prácticamente en todas las células de las plantas en niveles que van de 10 μM a casi 1 mM, junto a las enzimas reguladoras de su metabolismo.
2. Sus niveles endógenos son muy sensibles a las condiciones externas como la luz, la temperatura y varios agentes promotores de estrés ya sean de naturaleza física, química o biológica.
3. En una gran variedad de sistemas vegetales en los que se ha apreciado una buena correlación entre tasa de crecimiento y nivel de poliaminas, la interrupción de su biosíntesis por inhibidores específicos induce alteraciones en los patrones de crecimiento, muchas de las cuales sólo pueden ser revertidas mediante la aplicación de las correspondientes poliaminas.
4. La aplicación de poliaminas exógenas a plantas enteras o alguna de sus partes puede producir efectos visibles sobre el crecimiento y desarrollo, tales como la prevención de la senescencia en hojas cortadas, la formación de embriones en ciertos cultivos de tejidos vegetativos, la maduración del fruto, el aumento de longevidad de los óvulos y del polen, respuestas de tipo defensivo, iniciación floral, etc...

Por otra parte, se ha observado que ciertos microorganismos mutantes que carecen de la capacidad para sintetizar poliaminas son incapaces de crecer y desarrollarse normalmente a menos que éstas le sean suministradas exógenamente (Tabor y Tabor, 1984).

El hecho de que algunas de las funciones atribuidas a las poliaminas sean similares a las ejercidas por otras hormonas, ha suscitado diversas discusiones teóricas relativas a su consideración como un nuevo tipo de hormona vegetal. Así, algunos autores les asignan el mismo rango de importancia sobre la regulación

de los procesos fisiológicos en las plantas que a otras sustancias hormonales, si bien, sus funciones y mecanismos de acción habrán de ser precisados en el futuro (Bagni y col, 1982; Bagni y Pistocchi, 1988; Davies, 1988; Galston, 1990). Otros, sin embargo, (Evans y Malmberg, 1989) han mantenido ciertas reservas considerando que estas sustancias se encuentran en las células frecuentemente a niveles significativamente mayores que las hormonas típicas y, en muchos casos, la concentración necesaria para que surtan efectos biológicos es del orden milimolar a diferencia de los niveles micromolares a los que normalmente surten efecto las hormonas típicas. En cualquier caso, dichas reservas parecen lógicas en el estado actual de conocimiento de estas sustancias, ya que la mayoría de los datos experimentales disponibles se basan casi exclusivamente en estudios de tipo correlativo y aún se desconocen los mecanismos moleculares específicos a través de los que ejercen su control sobre determinados eventos fisiológicos.

Se espera que la introducción de las técnicas de biología y genética molecular en este campo de investigación nos puedan aportar pruebas directas e inequívocas de las implicaciones fisiológicas y los mecanismos de acción de las poliaminas en el desarrollo de las plantas.

2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS:

Aunque la mayoría de las referencias bibliográficas sobre poliaminas en plantas han sido publicadas en las dos últimas décadas, el conocimiento de estas sustancias se remonta a más de 300 años (Smith, 1991a).

Antoni Van Leeuwenhoek en 1678 hizo una primera reseña de estas sustancias, al observar con su primitivo microscopio la presencia en el esperma humano de unos cristales de fosfato a cuyo componente básico se le denominó **espermina** (Ladenburg y Abel, 1888). Sin embargo, la composición química correcta de esta sustancia así como su estructura molecular no se conoció hasta comienzos del presente siglo (1926), en la misma época en que también se descubrió la **espermidina**.

Durante bastante tiempo, las poliaminas atrajeron el interés exclusivamente de los químicos y bioquímicos quienes las consideraron como metabolitos secundarios con escaso o nulo significado fisiológico para las plantas. Sin embargo, a comienzos de la década de los setenta un libro publicado por Cohen (1971) llamó bastante la atención sobre su posible importancia biológica tanto en sistemas animales como vegetales y estimuló muchas investigaciones en diversas áreas incluyendo la Fisiología Vegetal y la Medicina.

En el campo de la Medicina las poliaminas despertaron durante algún tiempo un gran interés, especialmente en las investigaciones sobre el cáncer, al revelarse que los pacientes con procesos tumorales en estado de metástasis avanzada excretaban cantidades muy elevadas de poliaminas (especialmente formas conjugadas de la putrescina). Este hecho contribuyó de manera decisiva al avance rápido de los conocimientos generales sobre la biosíntesis, bioquímica y metabolismo de las poliaminas en plantas dado que existe bastante semejanza con lo observado en sistemas animales.

La idea de que las poliaminas podrían ejercer una acción reguladora sobre el crecimiento y desarrollo en los vegetales fue sugerida por vez primera en 1973 a través de una comunicación presentada a un Simposium celebrado en Tokio sobre hormonas vegetales por Nello Bagni y Serafini-Fracassini (1974) de la Universidad de Bolonia (Italia).

Inicialmente las investigaciones sobre poliaminas en plantas se centraron fundamentalmente en tres laboratorios en: Inglaterra (Smith y col.), Italia (Bagni y col.) y USA (Galston y col.). En la actualidad son muchos los investigadores o grupos de investigación que están interesados en este tipo de moléculas y continuamente se aportan nuevos datos al conocimiento general sobre estas sustancias en relación con su bioquímica, metabolismo e implicaciones fisiológicas.

Tabla I. POLIAMINAS ALIFATICAS DE CADENA LINEAL

TIPO	FORMULA EMPIRICA	NOMBRE VULGAR	ABREVIATURA
DIAMINAS	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	-----	DAP
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	PUTRESCINA	PUT
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-NH}_2$	Cadaverina	CAD
TRIAMINAS	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	ESPERMIDINA	SPD
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	<i>nor</i> -espermidina	Nor-SPD
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	<i>homo</i> -espermidina	Homo-SPD
TETRAMINAS	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	ESPERMINA	SPM
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	Termoespermina	Termo-SPM
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	<i>nor</i> -espermina	Nbor-SPM
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	Canavalmina	----
	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-HN-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_2$	<i>homo</i> -espermina	----
PENTAMINAS	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	Caldopentamina	----
HEXAMINAS	$\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-HN-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH}_2$	Caldohexamina	----

2. CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LAS POLIAMINAS:

2.2.1. POLIAMINAS TÍPICAS: FORMAS LIBRES Y CONJUGADAS.

Las poliaminas pueden presentarse en forma libre (Tabla 1) o conjugadas a compuestos fenólicos del tipo del ácido cinámico y sus derivados (Martín-Tanguy, 1985), a otros compuestos de bajo peso molecular (péptidos, ácidos grasos) o a macromoléculas tales como proteínas (Icekson y Apelbaum 1987; Moseti y col., 1987; Apelbaum y col., 1988; Mizrahi y col., 1989; Signorini y col., 1991), ligninas y ácidos nucleicos (Guilfoyle y Hanson, 1973; Basso y Smith, 1974; Flink y col., 1975).

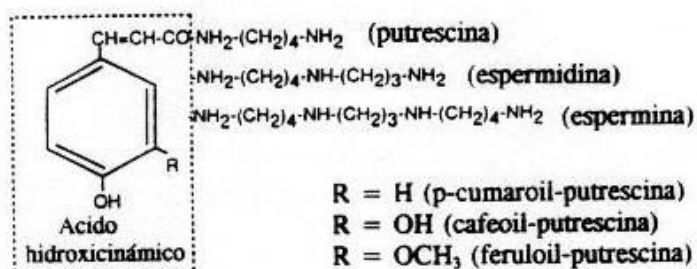
En vegetales las formas conjugadas mejor conocidas son las asociadas a compuestos fenólicos (Fig. 1), también conocidas como amidas del ácido cinámico y sus derivados (hidroxicinámico, cumárico, caféico, ferúlico, ..).

En función de su solubilidad se distinguen dos tipos principales de conjugados:

1. Solubles en agua con al menos un grupo amino libre. Se incluyen di- y poliaminas alifáticas (putrescina, espermidina y espermina)
2. Insolubles en agua en las cuales todos los grupos amino primarios o secundarios han sido combinados. Se incluyen aminas alifáticas y aromáticas (tiramina, dopamina, serotonina, octopamina, triptamina, etc...)

FORMAS DE CONJUGACION ENTRE POLIAMINAS ALIFATICAS Y DERIVADOS DEL ACIDO HIDROXICINAMICO.

I. COMPUESTOS SOLUBLES EN AGUA.



II. COMPUESTOS INSOLUBLES EN AGUA.

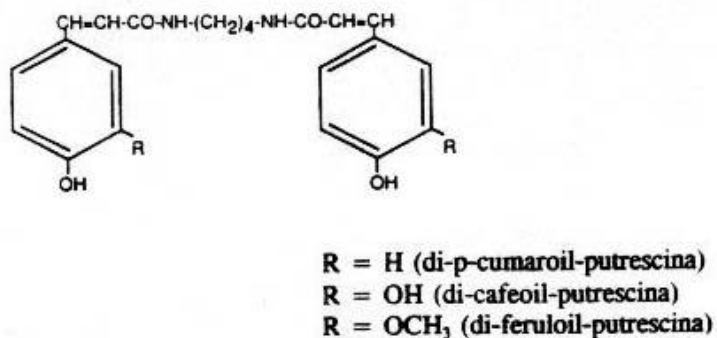


Fig. 1. Formas de conjugación entre poliaminas típicas y derivados del ácido hidroxicinámico. Los compuestos se califican con el prefijo hidroxicinamoil- mas el nombre de la poliamina correspondiente.

Se sabe muy poco acerca de la biosíntesis y conjugación de los cinamoil derivados y las correspondientes di- y poliaminas. El ácido cinámico y sus derivados se originan a partir de la ruta de los fenilpropanoides en la cual está implicada una enzima clave en el metabolismo secundario, *la fenilalanina amonio-liasa* (PAL). Por lo que respecta a la síntesis de la mitad poliamínica del conjugado se tienen dudas si ésta se verifica de acuerdo con la ruta típica para la biosíntesis de las formas libres. Algunos resultados experimentales apuntan la posibilidad de que estas se lleven a cabo en distintos compartimentos celulares y/o a través de rutas metabólicas diferentes (ver apartado BIOSÍNTESIS).

En cuanto a su significado biológico los conocimientos generales resultan igualmente muy escasos. Mientras que algunos autores opinan que podrían actuar como formas de almacenamiento o reservorios a partir de los que podría liberarse una fracción importante de las poliaminas libres, otros autores le atribuyen a las formas conjugadas funciones específicas durante el crecimiento y desarrollo (Flores y Martin-Tanguy, 1991).

En muchas ocasiones el contenido endógeno de las formas conjugadas sobrepasa ampliamente el contenido de poliaminas en forma libre. Tal es el caso de las semillas de *Amaranthus* en que la putrescina se encuentra casi exclusivamente en forma conjugada al igual que la espermidina (89%) y la espermina (60%).

2.2.2. POLIAMINAS INUSUALES O POCO COMUNES.

Bajo la denominación de "poco comunes" se agrupan diversas poliaminas cuya distribución en la naturaleza está bastante más limitada que las poliaminas típicas (putrescina, espermidina y espermina). Algunos de estos compuestos se representan en la Tabla 1: **1,3-diaminopropano, cadaverina (CAD), nor-espermidina (o termina), homo-espermidina, termoespermina, nor-espermina (o caldina), homo-espermina, canavalmina, caldopentamina y caldohexamina**. Las sustancias con el prefijo *nor-* y *homo-* se caracterizan

por su simetría molecular y presentar únicamente grupos aminopropilo las primeras, y grupos aminobutilo las segundas.

La *nor*-espermidina y *nor*-espermina fueron detectadas inicialmente en bacterias termófilas y metanógenas (Oshima, 1978 y 1983) tales como *Vibrio*, *Cyanobacteria*, *Acetobacteria*, *Rhizobium*, y *Lactobacilli*. Su presencia ha sido confirmada asimismo en ciertas algas, líquenes y hongos (Hamana y Matsuzaki (1982 y 1985a) al igual que en plantas superiores tales como *Medicago sativa* (Rodríguez-Garay y col., 1989); *Gossypium hirsutum* y *G. barbadense* (Kuehn y col., 1990b). En semillas de *Canavalia gladiata* se aisló por primera vez la Canavalmina (Fujihara y col., 1982), posteriormente se confirmó su presencia en *C. ensiformis* y *C. brasiliensis*, y en la mayor parte de las especies del género *Canavalia*. En especies de Leguminosas (*Vicia faba*, *V. sativa*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Phaseolus coccineus*, *Trifolium pratense*) se han identificado asimismo diversos tipos de poliaminas alifáticas tanto de cadena lineal como ramificadas todas ellas representadas en la Tabla 1 (Hamana y col., 1991 y 1992).

La función de estos compuestos es escasamente conocida, si bien, se le han atribuido papeles de protección específicos tanto en bacterias como en plantas adaptadas a ambientes extremos. Así, plantas de alfalfa tolerantes a la sequía y expuestas a condiciones de déficit hídrico acumulan importantes cantidades de *nor*-espermidina y *nor*-espermina en los tejidos meristemáticos. Este mismo fenómeno se aprecia en cultivos celulares de algodón tolerantes al calor y expuestos a altas temperaturas. En este último caso, además de las poliaminas anteriormente citadas se acumula caldopentamina (Flores y col., 1989; citado por Kuehn y col., 1990a).

En sistemas bacterianos, las tetraminas cumplen funciones protectoras de las membranas contra la lisis osmótica. Las largas cadenas de poliaminas poco comunes son esenciales en bacterias termófilas para la síntesis "in vitro" de proteínas a elevada temperatura (Oshima, 1978 y 1979).

2.3. BIOSÍNTESIS.

2.3.1. Biosíntesis de la putrescina:

Las plantas superiores comparten con las bacterias la existencia de dos vías alternativas para la síntesis de la putrescina y las restantes poliaminas. Esta diamina se origina a partir de dos aminoácidos básicos, arginina y ornitina, mediante procesos de descarboxilación catalizados por dos enzimas claves en la regulación de su biosíntesis como son *la arginina descarboxilasa* (ADC) y *la ornitina descarboxilasa* (ODC). En definitiva, se consideran dos posibles rutas para la síntesis de la putrescina: una directa (**vía de la ODC**) y otra indirecta (**vía de la ADC**).

Como se observa en la Fig. 2, en la vía ODC la putrescina se origina a partir de la ornitina mediante una única reacción de descarboxilación catalizada por la Ornitina descarboxilasa (ODC).

La vía de la ADC resulta más compleja y requiere la formación de varios compuestos intermediarios previamente a la putrescina. El primer intermediario es la **agmatina**, producida por descarboxilación de la arginina mediante la acción de la enzima *arginina descarboxilasa* (ADC). En el siguiente paso la agmatina es hidrolizada para formar **N-carbamoilputrescina** con liberación de amoniaco, estando mediada dicha reacción por la *Agmatina iminohidrolasa*. En última instancia, la N-carbamoilputrescina dará lugar a **putrescina** por la acción de la enzima *N-Carbamoilputrescina amidohidrolasa*.

Se ha de tener en cuenta que existen vías de interconversión entre los aminoácidos, arginina y ornitina. La transformación de la arginina en ornitina es una vía directa, muy activa en plantas y está mediada por la *arginasa* y en ella se libera urea. La transformación en sentido contrario, sin embargo, es mas compleja, menos activa e implica de la realización de una serie de reacciones que en su conjunto se define como “ciclo de la ornitina”.

La importancia de cada una de estas vías (ADC y ODC) y su contribución

relativa al pool endógeno de putrescina en las plantas superiores ha sido objeto de cierta controversia, debido en gran medida a la ausencia de un modelos experimentales adecuados que permitan obtener conclusiones definitivas. No obstante, actualmente se considera que la contribución relativa de cada una de estas vías en la síntesis de putrescina depende del tipo de tejido, del estado fisiológico de dichos tejidos y de la naturaleza del proceso de desarrollo que las poliaminas pueden regular.

La ADC ha sido vinculada principalmente a respuestas fisiológicas inducidas por estrés, tejidos en fase de crecimiento por alargamiento celular y procesos metabólicos secundarios como la biosíntesis de alcaloides, aunque actividad ADC también ha sido encontrada en tejidos con una alta actividad mitótica, tal como ha sido citado por Palavan y Galston (1982) en *Phaseolus vulgaris*.

La ODC, en cambio, ha sido vinculada a procesos de división celular en tejidos con un crecimiento activo, así como en la biosíntesis de poliaminas conjugadas (Heimer y col., 1979; Koetje y col., 1993).

Estas observaciones soportan la hipótesis de que ambas vías se activan de manera diferente en función de la naturaleza del proceso que opera en cada momento y, al mismo tiempo, presupone la existencia de una localización celular diferente para ambos sistemas enzimáticos, los cuales estarían sujetos a modelos de regulación también diferente. Esto implicaría que las poliaminas podrían actuar de manera diferente sobre procesos metabólicos o fisiológicos compartimentados en distintos orgánulos celulares.

Además de su presencia citoplasmática, estas enzimas también han sido aisladas de otras fracciones celulares. Rusell y Durie (1978) así como Panagiotis (1982) citan la existencia de actividad ODC en el núcleo, mientras que Torrigiani y Serafini-Fracassini (1980), pusieron de manifiesto la presencia de putrescina, espermidina y espermina en las mitocondrias de *Helianthus tuberosus*. Para clarificar si estas poliaminas eran sintetizadas "in situ" o eran transportadas hasta allí, estos mismos autores (1986), midieron las actividades ADC, ODC y SAMdc, en las distintas fracciones celulares y pusieron de manifiesto la presencia

de estas enzimas en las mitocondrias de *Helianthus tuberosus* y los cloroplastos de *Pinus radiata*. Estos resultados sirven de argumento para sospechar que las poliaminas pueden ser sintetizadas en estos orgánulos.

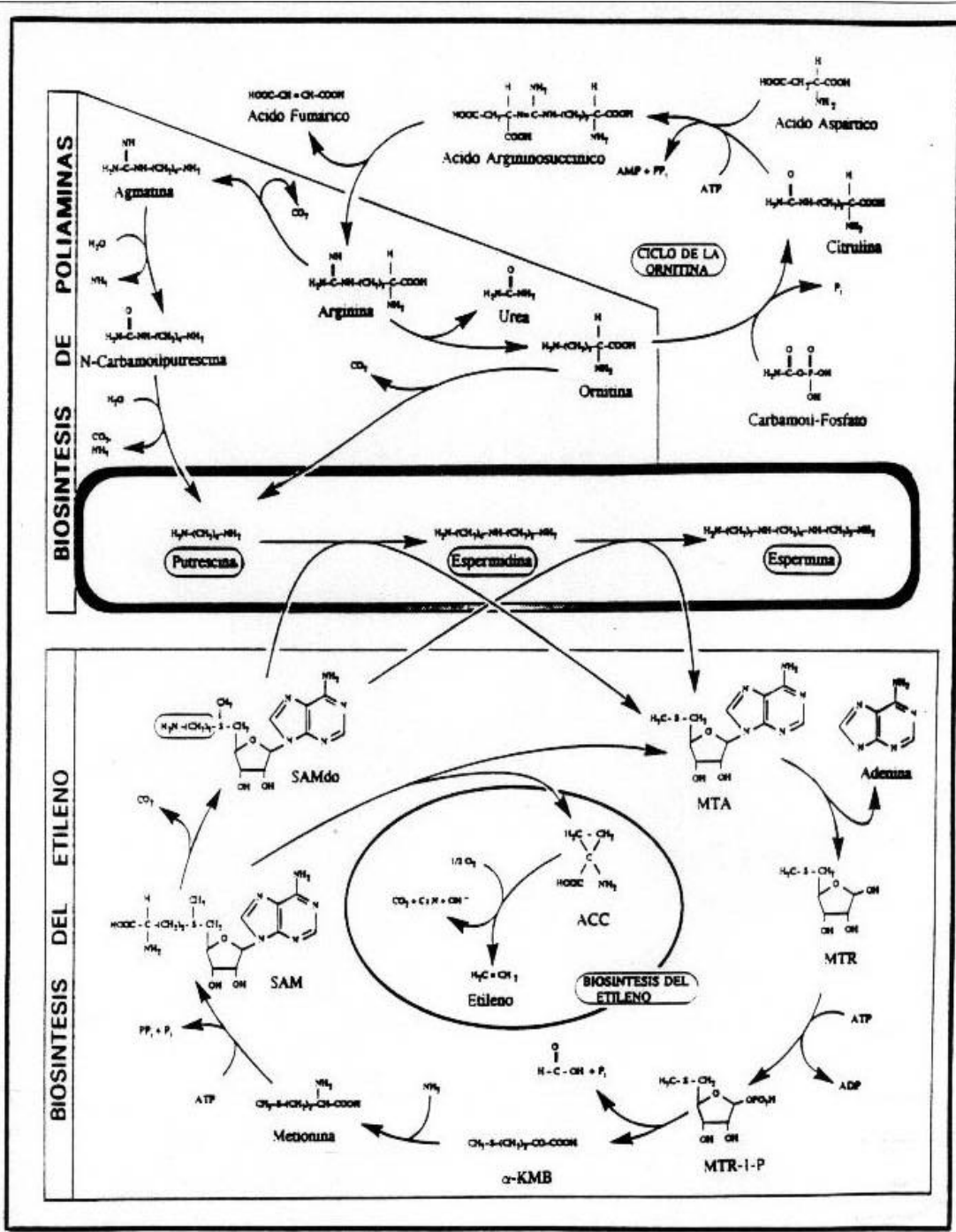


Fig. 2. Biosíntesis de poliaminas típicas y etileno (Flores, 1990, modificado)

2.3.2. Biosíntesis de espermidina y espermina.

La biosíntesis de la espermidina y la espermina, es llevada a cabo mediante la adición sucesiva de grupos propilamino a los extremos de la molécula de putrescina en sendas reacciones que estarían catalizadas por aminopropiltransferasas específicas. El donador de los grupos propilamino es el **S-adenosilmetionina descarboxilado (SAMdo)**, el cual se deriva de la **S-adenosilmetionina (SAM)** por acción del enzima **S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdc)**. No se conoce otra reacción fisiológica en la que el SAMdo pueda participar, hallándose a muy baja concentración y constituyendo, por tanto, el factor limitante en la síntesis de la espermidina y espermina (Tiburcio y col., 1993b).

La biosíntesis de la espermidina se verifica por la acción del enzima *Espermidina sintasa* y en ella se lleva a cabo la transferencia del grupo propilamino terminal de la molécula del SAMdo a la molécula de putrescina.

La biosíntesis de espermina ocurre de una manera análoga a la anterior con la intervención de una segunda aminopropiltransferasa, la *Espermina sintasa*, la cual transfiere el grupo propilamino del SAMdo a la espermidina.

Es de resaltar que las poliaminas se relacionan en cuanto a su biosíntesis con el etileno por medio del SAM (Fig. 2). El uso común del SAM hace sospechar que la metabolización de dicho compuesto puede representar un punto clave en la regulación de ambas rutas biosintéticas. En un estudio de Lee y Park (1991) realizado con trazadores radioactivos sobre tejidos jóvenes de *Nicotiana tabacum* en proceso de división activa, se demuestra que parte del SAM se dirige hacia la formación de poliaminas vía SAMdo. Esto confirma los resultados que habían obtenido anteriormente otros autores como Slocum y col. (1984).

Por contra, en tejidos de frutos maduros en los que no existe divisiones celulares, el metabolismo del SAM se dirige preferentemente hacia la formación de ácido 1-Aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y posteriormente a la formación de etileno, el cual parece ser necesario para la maduración del fruto

(Adams y Yang (1977).

De esta manera, los inhibidores que bloquean la conversión de SAM en ACC tienen un efecto directo sobre la biosíntesis de poliaminas y viceversa. Habitualmente, cuando los inhibidores de la síntesis de poliaminas se aplican a tejidos de plantas, se observa un fuerte incremento en la producción de etileno (Roberts y col., 1984).

En definitiva, la utilización del SAM ya sea para la síntesis de poliaminas o del etileno va a depender del tipo de tejido, del estado de desarrollo y de las condiciones de crecimiento (Kushad y Dumbroff, 1991). Durante los periodos de división celular activa, los niveles de poliaminas y su tasa de biosíntesis son generalmente mayores que en los periodos en que la división celular ha cesado y durante la senescencia de los tejidos. Así por ejemplo el nivel de poliaminas y la actividad de sus enzimas biosintéticas se incrementa durante la embriogénesis somática en cultivos celulares de zanahorias (Feirer y col., 1984), en las hojas en fase de crecimiento de *Phaseolus vulgaris* (Palavan y Galston, 1982), en los tejidos meristemáticos de yemas de patata (Kaur-Sawhney y col., 1982) y durante el desarrollo de los ovarios de tomate y aguacate (Kushad y col., 1988). Por el contrario, la producción de etileno en esas circunstancias es muy limitada, aunque aumenta de manera muy notoria cuando los tejidos entran en fase de senescencia (Abeles, 1973).

2.3.3. Rutas alternativas para la biosíntesis de espermidina y espermina.

La posibilidad de una ruta alternativa para la formación de la espermidina y espermina, diferente a la ruta típica comentada en el apartado anterior, ha sido propuesta por Lee y Park (1991) en *Nicotiana tabacum*. En base a sus resultados, estos autores consideran viable la existencia de rutas alternativas que parecen ser activas en alguna de las siguientes circunstancias: 1) en los momentos en que la planta requiere de un mayor aporte en estas sustancias, 2) cuando se presenta alguna deficiencia a nivel de los precursores (arginina y ornitina), 3) cuando el suministro de SAM es limitado o 4) cuando no existe actividad SAMdc.

Lee y Park en su trabajo con trazadores radioactivos, han puesto de manifiesto que en cultivos en suspensión de células de tabaco, bajo condiciones en las que la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMdc) es inhibida por el MGBG, se activan vías metabólicas alternativas o compensatorias para la biosíntesis de las poliaminas, las cuales toman como sustrato el ácido aspártico o la homoserina.

Resultados similares han sido obtenidos en *Lathyrus sativus* (Adiga y Prasad, 1985) en cuyo caso pueden coexistir la ruta normal a través de SAMdc y otra en la que L-aspartico- β -semialdehído actúa como donador de grupos propilamino para la formación de carboxiespermidina, la cual es posteriormente descarboxilada a espermidina. Otras evidencias que apoyan igualmente la existencia de esta ruta alternativa han sido obtenidas en bacterias *Micrococcus denitrificans* y *Rhodopseudomonas spheroides* en las cuales no se detecta actividad SAMdc (Tait, 1976).

Como conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el aspartato o la homoserina, podrían ser utilizados en condiciones naturales de forma eficaz como precursores complementarios para la biosíntesis de poliaminas, fundamentalmente espermidina, con el fin de compensar un posible flujo de SAM hacia la formación de etileno.

2.3.4. Biosíntesis de poliaminas poco comunes.

La ruta biosintética de las poliaminas poco comunes se esquematiza en la Fig. 3. Dicha ruta es especulativa y se basa en los trabajos de De Rosa y col. (1986); Cacciapuoti y col. (1986); Rodríguez-Garay y col. (1989); Kuehn y col. (1990a) en base a sus investigaciones con bacterias y plantas superiores. Un producto de la degradación de la espermidina y la espermina **-el 1,3-diaminopropano (DAP)-** actuaría como precursor primario para la biosíntesis de las diferentes poliaminas poco comunes, involucrando también al SAMdo como donador de grupos propilamino con la participación de

aminopropiltransferasas específicas. Ver apartado: DEGRADACION.

Una ruta alternativa, aunque no se recoge en la Fig. 3, podría utilizar L-aspártico- β -semialdehido como donador de los grupos propilamino (Bagga y col., 1991) en cuyo caso el 1,3-diaminopropano y el L-aspártico- β -semialdehido se condensarían para formar carboxi-norespermidina, y ésta daría lugar a *nor*-espermidina, tras un proceso de descarboxilación.

Por lo que respecta a la **cadaverina** ésta se origina a partir de la lisina mediante un proceso de descarboxilación llevado a cabo por la *Lisina descarboxilasa*.

Finalmente, la biosíntesis de la *homo*-espermidina toma como precursor a la putrescina, pero su ruta se diferencia bastante de lo considerado con anterioridad. En primer lugar la putrescina sufre un proceso de oxidación mediada por NAD^+ y se forma el 4-aminobutiraldehido con desprendimiento de NH_3 . Seguidamente se lleva a cabo la formación de una base de Schiff entre el 4-aminobutiraldehido y la putrescina. Y por último, con la intervención del poder reductor en forma de NADH, se produce la *homo*-espermidina (Smith, 1985).

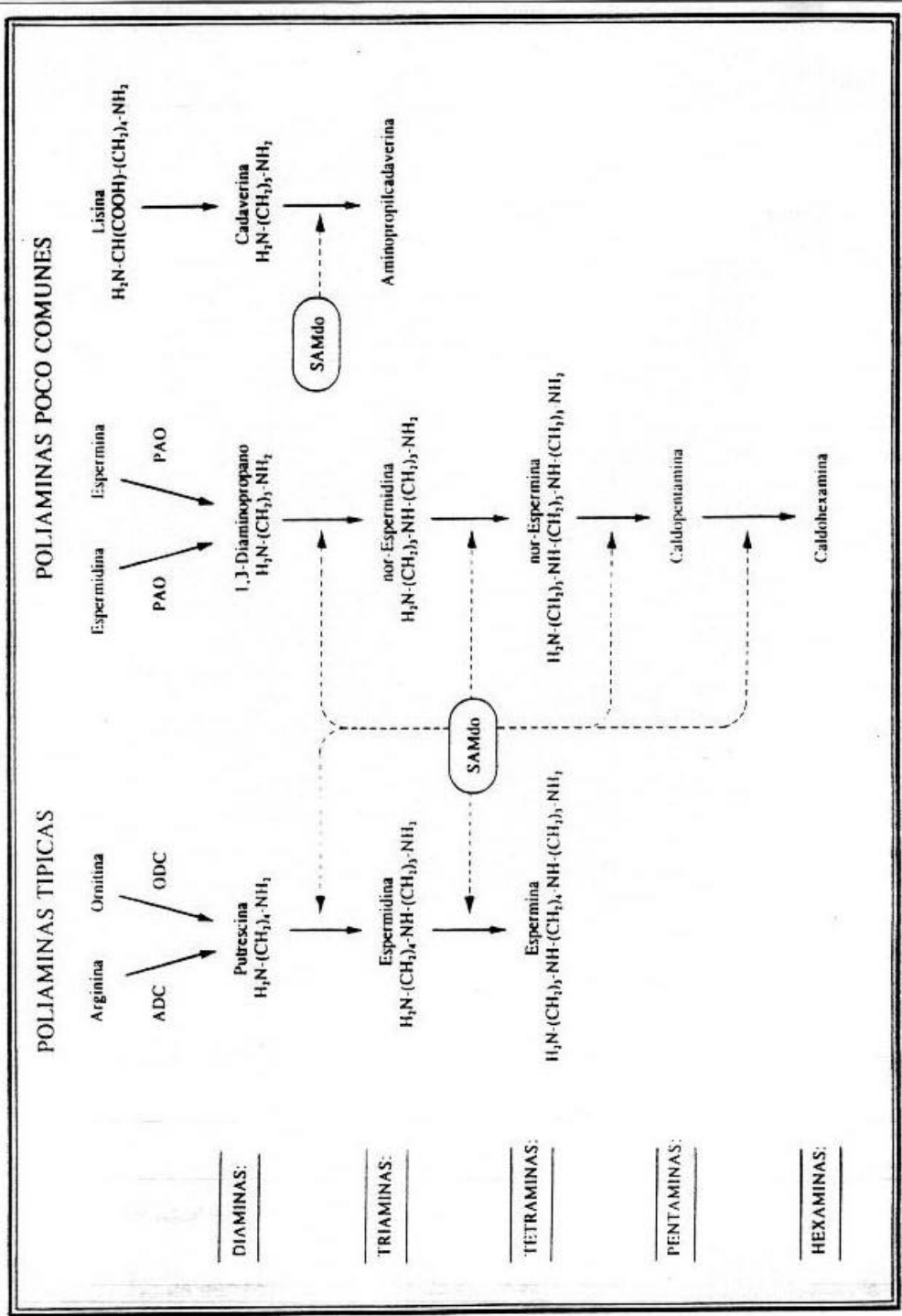


Fig.3. Representación esquemática de las rutas biosintéticas para diferentes tipos de poliaminas

2. 4. INHIBIDORES DE LA BIOSINTESIS DE POLIAMINAS.

Una herramienta muy poderosa para las investigaciones sobre la bioquímica y fisiología en el campo de las poliaminas, lo constituye el grupo de inhibidores más o menos específicos para casi todas las enzimas que intervienen en las rutas de biosíntesis y degradación (Slocum y Galston, 1987; Pegg, 1987). Al no existir mutantes de plantas superiores deficientes en poliaminas, la única forma reducir el contenido de poliaminas y estudiar sus consecuencias sobre el desarrollo, se deriva del uso de compuestos que puedan bloquear la síntesis de estas sustancias.

En un principio, se usaron los análogos estructurales de la arginina y ornitina (L-canavalina y L-canalina) o sus inhibidores competitivos reversibles (D-arginina, DL- α -metilarginina y DL- α -metilornitina). Sin embargo, la mayoría de estos compuestos son inespecíficos o pueden interferir con otros procesos (Altman y col., 1983). El uso de inhibidores específicos de estas enzimas no fue posible hasta que se sintetizaron los denominados inhibidores irreversibles, tipo "suicida": DL- α -difluorometilornitina (Metcalf y col., 1978) y DL- α -difluorometilarginina (Kallio y col., 1981).

1. **α -Difluorometilarginina (DFMA)** es el inhibidor de la ADC y presenta las siguientes características:
 - 1.1. Altísima especificidad sobre la arginina descarboxilasa (ADC).
 - 1.2. Unión irreversible por la formación de un enlace covalente con el enzima.
 - 1.3. Baja toxicidad relativa.
2. **α -Difluorometilornitina (DFMO)**, es el inhibidor de la ODC y presenta las mismas características que el anterior.

3. **Metilgloxal-bis-guanilhidrazona (MGBG)**, es un inhibidor de la SAMDC. Sus características son las siguientes:

- 3.1. No es específico para la SAMdc, ya que también inhibe un enzima de la ruta de degradación de las poliaminas: *la Diamino oxidasa (DAO)*.
- 3.2. La unión al enzima es reversible.
- 3.3. Presenta una alta toxicidad.
- 3.4. La SAMdc es inhibida fuertemente por el SAMdo.

4. **Ciclohexilamina (CHA)** es un potente inhibidor de la *espermidina sintasa*. Presenta las siguientes características:

- 4.1. Es un inhibidor específico para la *espermidina sintasa*.
- 4.2. El tipo de inhibición es competitiva con el sustrato putrescina y su unión con la enzima parece ser reversible (Shirahata y Samajima, 1990).

Muchos de los estudios bioquímicos y fisiológicos sobre poliaminas en plantas se han basado en el uso de estos inhibidores (ver esquema de la página 45). DFMA y DFMO no están disponibles comercialmente y su uso está condicionado a la donación de los laboratorios Merrel-Dow (Cincinnati, USA).

Si bien es cierto que estos inhibidores tienen un valor inestimable para muchas investigaciones, es necesaria una interpretación correcta de los datos obtenidos mediante su uso. No todos los estudios han demostrado que un efecto biológico particular promovido por el inhibidor es revertido por la adición junto al inhibidor de la poliamina apropiada.

2. 5. DEGRADACION.

Aunque de manera general, la degradación de poliaminas en plantas está menos estudiada que su biosíntesis, el proceso supone una desaminación oxidativa a través de amino oxidasas (Fig. 4).

Hasta el momento se conocen dos de los enzimas implicados de forma directa en el catabolismo de las diaminas y las poliaminas: La **Diamina Oxidasa (DAO)** y la **Poliamina Oxidasa (PAO)**. Ambas enzimas han sido reseñados en las siguientes familias: *Leguminoseae*, *Gramineae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Ponteraceae* y *Solanaceae* (Flores, 1991a).

La DAO es una cuproproteína dimérica que usa como cofactor pirroloquinolina quinona (Glatz y col., 1987) y cuya actividad se centra fundamentalmente sobre los grupos amino primarios de las diaminas (putrescina y cadaverina) aunque, en algunos casos, también puede actuar sobre las poliaminas (espermidina y espermina a nivel de sus grupos amino terminales. Con la excepción de *Oryza*, todas las DAOs conocidas contienen dos átomos de cobre (Cu^{+2}) por dímero. Por técnicas citoquímicas y microscopía electrónica se ha demostrado en guisante (*Pisum sativum*) que la DAO se localiza exclusivamente en la pared celular, donde parece participar en la biosíntesis de lignina (Slocum y Furey, 1991; Federico y Angeline, 1986). Algunos estudios, sin embargo, parecen indicar una localización citosólica para esta enzima en tejidos de lenteja (Federico y col., 1985) y en tubérculos de *Helianthus tuberosus*, lo que podría hacer pensar en un posible papel de esta enzima en la regulación endógena de la concentración de poliaminas, así como en el control de los procesos de crecimiento (Scoccianti y col., 1991).

La putrescina por acción de la DAO, con liberación de NH_3 y H_2O_2 , da lugar a la formación de Δ -pirrolina y ésta por acción de la γ -aminobutiraldehido deshidrogenasa al ácido γ -aminobutírico (GABA). Este compuesto, en última instancia se metaboliza a succinato (Smith 1985).

Esta enzima parece ser regulada tanto por la acción hormonal como por factores ambientales tales como la luz y el estrés anóxico (Federico y col., 1985; Maccarrone y col., 1991).

Por su parte, la PAO es una flavoproteína cuya acción se centra sobre los grupos amino secundarios (Suzuki y Yanagisawa, 1980). Este enzima no tiene acción sobre diaminas tales como putrescina y cadaverina (Bagga y col., 1991). En el maíz (*Zea mays*) y con la misma técnica descrita anteriormente, Slocum y Furey (1991) han puesto de manifiesto que este enzima se localiza exclusivamente en las paredes celulares al igual que la DAO, sin embargo, en cebada la presencia citosólica también ha sido detectada (Li y McCurie, 1989).

La espermidina por acción de la PAO produce Δ -pirrolina, que sigue la vía ya descrita hasta succinato y 1,3-diaminopropano (DAP), el cual puede dar lugar a β -alanina.

Por otra parte, la espermina por acción de la PAO produce 1,3-Diaminopropano, que sigue la misma vía anterior hasta β -alanina, y 1-(3-aminopropil)-pirrolina.

Cabe señalar, por último, que en algunas plantas o tejidos, aunque existen evidencias de un posible catabolismo, no se ha logrado encontrar actividad amino-oxidasa. Esto hace pensar a algunos investigadores en la existencia de rutas catabólicas alternativas (Flores y Filner., 1985; Rastogi y Davies., 1990). En otros casos, el nivel de poliaminas libres podría ser regulado vía formación de conjugados más que por un catabolismo oxidativo (Bagni y Biondi., 1987).

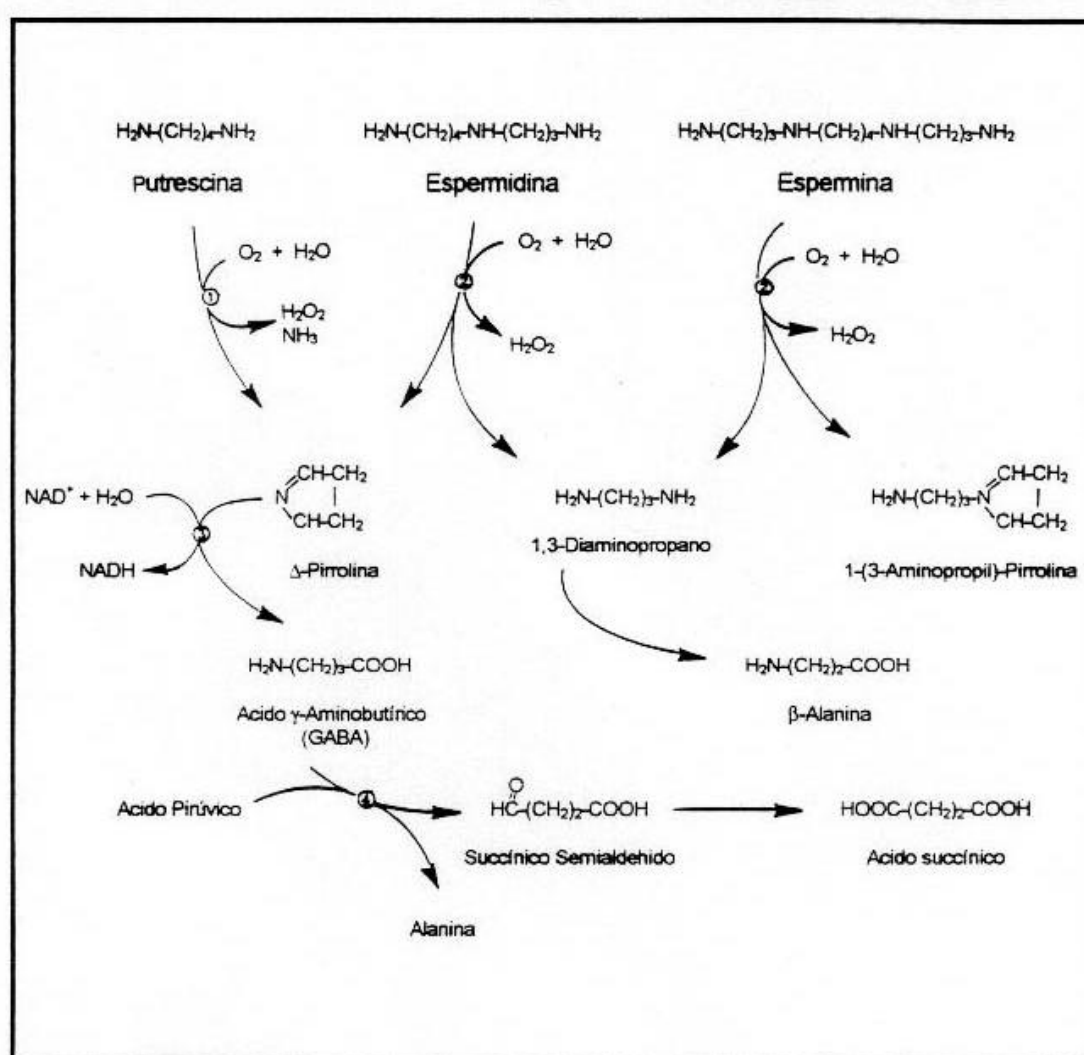
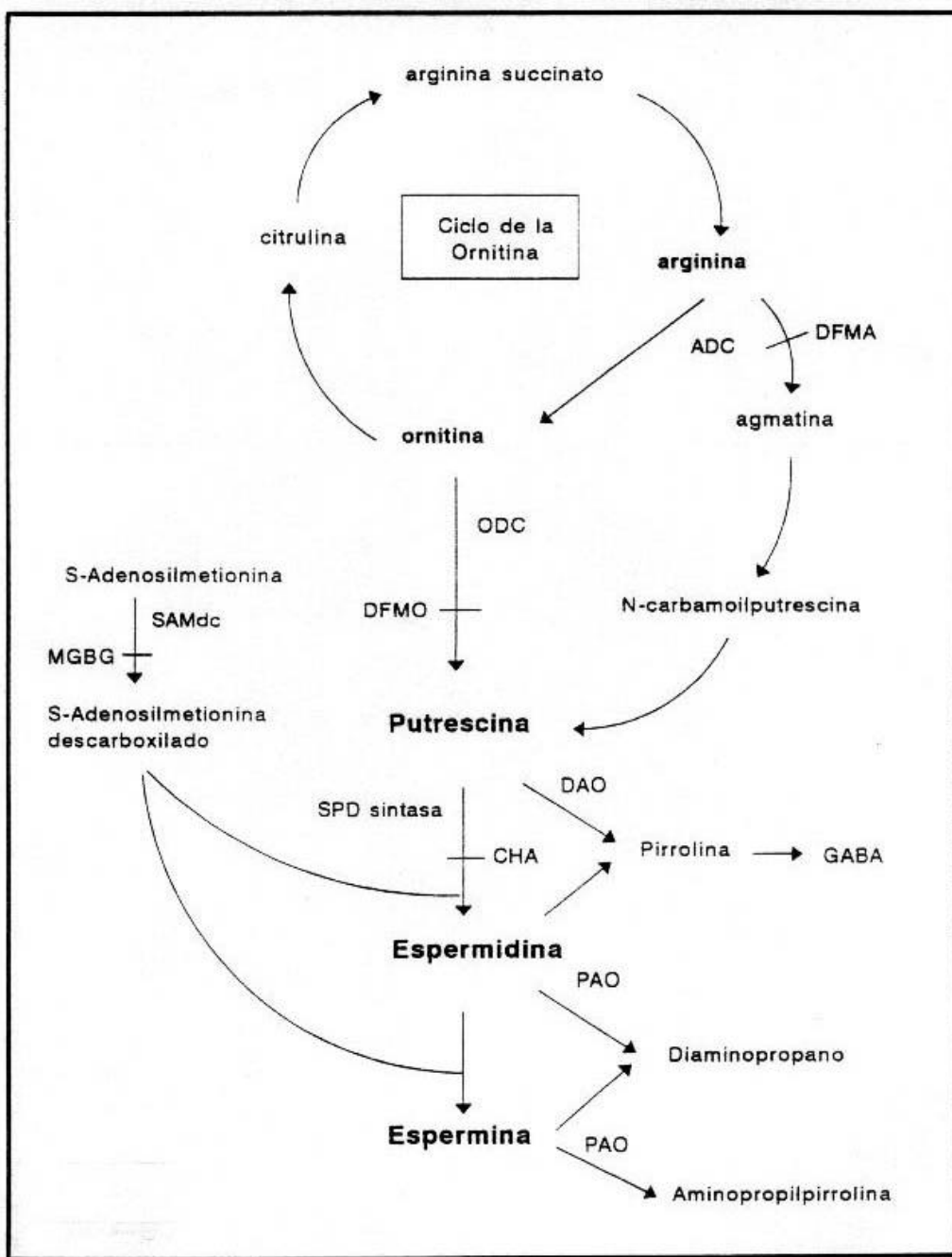


Fig. 4. Ruta degradativa de las poliaminas típicas. ¹Diamino oxidasa; ² Poliamino oxidasa; ³ γ -Aminobutiraldehido deshidrogenasa; ⁴GABA transaminasa (Flores, 1990).



Esquema representativo de las rutas biosintéticas y degradativas de las poliaminas típicas con indicación de las enzimas y sus inhibidores.

2.6. MECANISMO DE ACCION Y FUNCION FISIOLÓGICA DE LAS POLIAMINAS

La naturaleza ubiquista y la importancia fisiológica de las poliaminas en los sistemas vivos ha sido establecida claramente mediante una gran cantidad de estudios de tipo correlativo y funcional, tanto desde el punto de vista bioquímico como biofísico. Una extensa colección de estrategias experimentales han confirmado la participación de las poliaminas en numerosos procesos celulares que se reflejan en diversos eventos fisiológicos tales como la división celular, la floración, el desarrollo del fruto, mecanismos de estrés y senescencia, etc..

Aunque recientemente la investigación en el campo de las poliaminas está dando un giro importante, con estudios de ingeniería genética que pueden contribuir de forma decisiva a conocer el mecanismo por el que estos compuestos regulan el desarrollo vegetal, todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las poliaminas a nivel molecular, aunque está generalmente aceptado que la interacción de las poliaminas con componentes subcelulares constituye el principal mecanismo por el cual estas aminas protonadas ejercen su función a nivel celular (Tassoni y col., 1996; Marton y Morris., 1987). Así, los datos disponibles actualmente sugieren que las poliaminas pueden controlar diversos rangos de eventos bioquímicos que dependen de cambios específicos en el mantenimiento de la conformación molecular.

Su naturaleza policationica a pH fisiológico, permite su unión a constituyentes celulares de carácter aniónico tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas de membrana, así como a sustancias pécticas de las paredes celulares (Tassoni y col., 1996). Se ha demostrado asimismo, la existencia de interacciones, tanto "in vivo" como "in vitro", con ADN, ARNt y ARNr (Bagni y col., 1982; Igarashi y col., 1982; Feuerstein y Marton., 1989). Estas interacciones parecen tener un efecto básico en la síntesis de estas moléculas y de ahí su posible implicación en los procesos de división celular.

Por otro lado, muchas de las funciones fisiológicas de las poliaminas se basan en su potencial estabilizador sobre el mantenimiento de la integridad de las membranas celulares así como modular la actividad de las ribonucleasas y proteasas y la pérdida de clorofila durante los procesos de senescencia y estrés.

Es conocido que la senescencia es un proceso programado en el desarrollo de la planta que ocurre por medio de una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de manera secuencial o simultánea en los tejidos que envejecen. En hojas, material experimental muy utilizado en este tipo de estudios, la senescencia está correlacionada con un brusco incremento en la actividad ribonucleasa y proteasa, lo cual conduce a una degradación de los ácidos nucleicos y proteínas seguido por una pérdida en la estructura de la clorofila y la integridad de las membranas (Kaur-Sawhney y Galston., 1991).

Tanto en los procesos de senescencia como en determinadas respuestas de estrés, se pueden generar ciertos radicales, como el anión superóxido (O_2^-) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) los cuales pueden reaccionar entre sí en las membranas celulares y generar radicales hidroxilo (OH^\cdot). Estos radicales pueden causar la peroxidación de los lípidos, desnaturalización de proteínas y mutaciones en el ADN (Tudela y Tadeo, 1993).

El probable mecanismo por el cual las poliaminas ejercen su acción antisenescente podría estar relacionado con la unión de éstas a la membrana, previniendo de ese modo la peroxidación de los lípidos y los ataques proteolíticos, e inhibiendo la síntesis de etileno, hormona implicada en los procesos de senescencia, a través de la inhibición de la *ACC sintasa* (Besford y col., 1991). Las poliaminas se han asociado con la supresión de la peroxidación de los lípidos y la inhibición de los pasos terminales en la biosíntesis de etileno, en los cuales estarían involucrados radicales libres intermedios, actuando como potenciales captadores ("scavengers") de dichos radicales (Dumbroff., 1991) o inhibiendo las lipoxigenasas, enzimas implicadas en estos procesos (Borrell y col., 1997). Drolet y col., (1986) han sugerido, asimismo, que las poliaminas podrían secuestrar los radicales superóxidos generados en ambos sistemas

químicos y enzimáticos.

Por otro lado, en las plantas sometidas a distintos tipos de estrés, se ha observado una acumulación de poliaminas, principalmente putrescina. Sin embargo, el significado fisiológico de esta acumulación parece ser diferente dependiendo del tipo de estrés. En los denominados estrés ambientales (O_3 , altas temperaturas, etc) las poliaminas podrían actuar, al igual que en los procesos de senescencia, como captadores de radicales libres y estabilizadores de las membranas celulares, mientras que en los estrés iónicos (ácidos, osmóticos, deficiencia en K^+ , nutrición NH_4^+ , etc.), las poliaminas parecen estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular, vía regulación del pH intracelular, o formando parte de un mecanismo para la detoxificación del NH_4^+ que se genera cuando los tejidos son sometidos a estrés salino o estrés producido por una nutrición mineral deficiente (Flores, 1991b; Slocum y Weisstein, 1990).

Otra posible función de las poliaminas relacionada con la membrana celular es su posible papel en la transducción de señales y segundos mensajeros. Mientras que en células animales se conocen los mecanismos de transducción de señales a través de la membrana plasmática, en las que están implicadas las rutas AMPc y fosfoinositídica, en plantas tales mecanismos no son del todo conocidos. Aunque el AMPc ha sido identificado en plantas, no existen evidencias fisiológicas de que tal sustancia ejerza un papel similar al realizado en sistemas animales. Más evidencias existen de la posible implicación de la ruta fosfoinositídica (Berridge, 1987; Tiburcio y col., 1993a; Scherer, 1996).

En la transducción de señales mediante la ruta fosfoinositídica, en células animales, están implicados ciertos fosfolípidos de membrana. En concreto, el fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2), que representa entre el 2 y el 8% de los lípidos de membrana en las células eucariotas, contiene en su estructura tres mensajeros químicos diferentes que pueden ser liberados tras el estímulo apropiado: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), el 1,2-diacilglicerol y el ácido araquidónico. Estos segundos mensajeros son liberados en respuesta a hormonas que se unen a receptores específicos localizados en la membrana. En

este proceso intervienen las proteínas G y los iones Ca^{++} . El IP_3 es posteriormente transformado en inositol 1,4-difosfato (IP_2) y éste, a su vez, en inositol-1-fosfato para finalmente generar inositol que es utilizado de nuevo para la formación de PIP_2 , cerrando así el ciclo del fosfatidil inositol (Rawn, 1989).

Varios componentes de esta ruta han sido identificados en células vegetales (Lehle, 1990; Sandelius y Sommarin, 1990). Este hecho ha abierto un debate sobre la posibilidad de que las hormonas vegetales utilicen este ciclo para la transducción de señales (Tiburcio y col., 1993a). Recientemente ha sido investigado en hipocotilos de *Brassica*, el efecto de la aplicación exógena de hormonas vegetales y espermidina a nivel de este mecanismo. Los resultados obtenidos sugieren que las poliaminas y las hormonas pueden actuar en diferentes niveles de este ciclo. Así, las auxinas y citoquininas actuarían principalmente a nivel de la PIP_2 induciendo la rotura en IP_2 y IP_3 , mientras que la espermidina podría estimular las PIP-quinasas manteniendo así niveles altos de PIP_2 (Dureja-Munjaj y col., 1992).

Por otra parte, también se ha sugerido que las poliaminas, por si mismas, podrían actuar como segundos mensajeros del efecto hormonal en células vegetales (Galston y Kaur-Sawhney, 1982), sin embargo, parece prematuro asignar a estas moléculas este papel en el momento actual, sin contar con una mayor información a nivel de los mecanismos moleculares de la transducción de señales (Tiburcio y col., 1993a).

Las poliaminas también pueden participar en los procesos de crecimiento y desarrollo, a través de su catabolismo, proporcionando grupos amino para la síntesis de glutamato y aspartato que posteriormente se incorporarían a distintas vías metabólicas. Así, durante el ciclo celular de *Helianthus tuberosus*, la putrescina parece ser necesaria como precursor de GABA, para suministrar ácidos orgánicos al ciclo de Krebs y aminoácidos para la síntesis de proteínas (Serafini-Fracassini., 1991). Recientemente también se ha asociado el catabolismo de las poliaminas con la síntesis de clorofila mediante la transferencia de grupos amino desde la putrescina al α -cetoglutamato formándose así glutamato, el cual es un precursor de las porfirinas que forman

parte de la molécula de clorofila (Kotzabasis., 1996).

Igualmente, algunos investigadores (Gaspar y col., 1996) han sugerido que las poliaminas podrían participar en ciertos eventos morfogénéticos, tales como el enraizamiento, controlando la actividad peroxidasa ya que el catabolismo de las poliaminas, vía GABA, puede generar succinato que a su vez es un precursor de la síntesis de compuestos con estructura tetrapirrólica tales como las peroxidasas. Esta vía ha sido demostrada recientemente en ciertas condiciones de estrés (Shelp y col., 1995).

La aplicación reciente de las técnicas de la genética molecular al estudio de las poliaminas ha abierto una nueva vía de investigación que quizás permita en un futuro próximo conocer su modo de acción. Así, ya han sido clonados y caracterizados genes implicados en la biosíntesis de estas sustancias (Bell y Malmberg, 1990; Taylor y col., 1992; Rastogi y col., 1993; Pérez-Amador y col., 1995b). Esto ha hecho posible el desarrollo de nuevas estrategias que permiten manipular los niveles endógenos de poliaminas en plantas y de esta forma obtener mayor y mas precisa información sobre sus funciones en diferentes procesos fisiológicos.

CAPITULO: 3

3. LAS POLIAMINAS Y EL DESARROLLO DEL FRUTO

Uno de los primeros trabajos en que se relaciona a las poliaminas con el desarrollo del fruto se debe a Heimer y col., (1979), quienes describieron que la actividad ODC en ovarios de tomate se incrementaba unas 10 veces a los 3-4 días después de la antesis, coincidiendo con los periodos de máxima actividad mitótica.

Posteriormente, Mizrahi y Heimer (1982) observaron que flores de tomate inducidas a desarrollarse partenocárpicamente por tratamientos con auxinas, exhibían una alta actividad ODC en comparación con los frutos no polinizados. Además, la aplicación de inhibidores de la ODC a los frutos polinizados, inhibía el crecimiento del fruto. Esta inhibición podía ser solventada por la aplicación exógena de putrescina, lo que sugiere un papel de esta enzima en el desarrollo del fruto de tomate (Cohen y col., 1982) a través de la biosíntesis de poliaminas, cuya presencia en estos tejidos parece ser un prerequisite para el crecimiento (Mizrahi y Heimer, 1982).

Estos trabajos realizados en el tomate, animaron a otros investigadores en el campo de la bioquímica y la fisiología del fruto a orientar sus líneas de trabajo hacia el estudio de las implicaciones fisiológicas de estas aminas en los distintos estadios del desarrollo del fruto. Muchos de estos estudios se basan en la aplicación exógena de estas sustancias en las fases iniciales del desarrollo del fruto, durante el cuajado o en los estadios finales de senescencia y maduración, mientras que otros, tienen como finalidad relacionar los cambios observados en los niveles endógenos de poliaminas y en la actividad de las enzimas implicadas en su metabolismo, con los cambios de carácter morfológico, bioquímico y celular que se manifiestan en las distintas etapas de la vida del fruto.

En muchos frutos los niveles endógenos de poliaminas son altos en las

etapas iniciales de su desarrollo comparado con otros estadios, e incluso con otros tejidos de la planta con una alta actividad mitótica (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991). Después de este periodo inicial, caracterizado generalmente por una alta tasa de divisiones celulares, los niveles endógenos en estas aminos decrecen en la mayoría de los frutos estudiados.

En el momento de la antesis y en el periodo inmediatamente posterior, se han detectado altas concentraciones de poliaminas en manzana (Biasi y col., 1988; 1991), tomate (Heimer y col., 1979; Cohen y col., 1982), mandarinas (Nathan y col., 1984), guisante (Palavan y col., 1982; Carbonell y Navarro, 1989), tabaco (Slocum y Galston, 1985a), coincidiendo por lo general, con estadios de máxima actividad mitótica en los tejidos. En el aguacate los niveles endógenos de poliaminas en el momento de la antesis son más bajos que en los frutos anteriores, incrementándose después de la apertura total de las flores (Kushad y col., 1988). Sin embargo, el aguacate es una planta especial ya que el porcentaje de flores que cuajan entre los miles de flores de cada grupo es muy bajo.

Paralelamente al contenido endógeno en poliaminas, también se ha constatado incrementos en la actividad de sus enzimas biosintéticos (ADC y ODC) durante las fases iniciales del desarrollo en frutos de tomate (Heimer y col., 1979; Cohen y col., 1982; Teitel y col., 1985), naranja mandarina (Nathan y col., 1984), tabaco (Slocum y Galston, 1985a), aguacate (Apelbaum, 1986; Kushad col., 1988) y manzana (Biasi y col, 1991).

En ovarios de tomate (Heimer y col., 1979) y tabaco (Slocum y Galston, 1985a,b) la actividad ODC es baja durante la antesis y se incrementa durante los estadios de máxima actividad mitótica, mientras que los cambios observados en la actividad ADC son mínimos. Esta correlación entre la actividad ODC y la división celular en estos tejidos ha sugerido que la ODC es la principal enzima implicada en la regulación de la biosíntesis de poliaminas durante las etapas iniciales del desarrollo de estos frutos.

Sin embargo, existen otros frutos en los que la ADC muestra una mayor actividad que la ODC. En naranjas mandarinas se ha observado un incremento en la actividad ADC y ODC durante la antesis y un pequeño pico inmediatamente

después de la polinización. La actividad ODC decrece después del cuajado del fruto más rápidamente que la ADC, lo que implica un incremento en la tasa ADC/ODC (Nathan y col., 1984). Asimismo, en *Phaseolus vulgaris*, tanto la actividad ADC como la ODC son altas durante las fases iniciales del desarrollo del fruto, sin embargo, la actividad ADC es mayor que la ODC, descendiendo drásticamente cuando el tamaño del fruto se incrementa (Palavan y Galston, 1982). Así pues, como norma general, la relación ADC/ODC varía considerablemente dependiendo de las especies, los tejidos y el estado fisiológico en que estas se encuentran (Smith, 1985; Pérez- Amador y Carbonell, 1995a).

En ovarios de guisante no polinizados y cuyo desarrollo partenocárpico es inducido por la aplicación de ácido giberélico, se detecta una alta actividad ADC. En cambio, estos tejidos no muestran actividad ODC (Pérez-Amador y Carbonell, 1995), al contrario de lo que se observa en frutos de tomate donde predomina una alta actividad en esta enzima (Egea-Cortines y col., 1993). La ausencia de actividad ODC en guisante parece estar correlacionada con la ausencia de divisiones celulares, ya que como ha descrito Vercher y col., (1984) el desarrollo del fruto de guisante se debe principalmente al alargamiento de las células del mesocarpio y a la diferenciación de las células del endocarpo, a diferencia de los frutos de tomate en los que se observa una mayor actividad mitótica.

En la mayoría de los frutos estudiados se ha observado que la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de poliaminas después del periodo de división celular es muy baja comparado con los estadios iniciales del fruto, y permanecen bajas en los estadios posteriores, incluyendo la maduración.

Por otra parte, la aplicación exógena de poliaminas tiene un efecto positivo para la mayoría de los parámetros estudiados por distintos investigadores en relación con el crecimiento y desarrollo de los frutos (peso, número de frutos por árbol, longevidad de los óvulos, cuajado,...). Así, Cohen y col. (1982), encontraron que la aplicación exógena de putrescina incrementa el peso fresco del ovario en tomate. Por otra parte, en el manzano, variedad *Ruby Spur*, la aplicación de poliaminas determina no solo un incremento en el número

de frutos por árbol, sino también un ligero aumento en el peso medio por fruto, mientras que el tratamiento con benciladenina o ácido giberélico, aumenta el número de frutos por árbol asociado a una reducción en el peso medio por fruto. Por otra parte, el efecto de las poliaminas sobre el crecimiento del fruto es mayor cuando los tratamientos tienen lugar en la fase inicial, coincidiendo con la existencia de divisiones celulares, que en estadios posteriores de alargamiento celular (Costa y Bagni, 1983).

En frutos de pera, variedad "*Comise*", la aplicación exógena de putrescina en el momento de la antesis, produce una mejora en el cuajado así como en el peso del fruto (Crisosto y col., 1988b). Resultados similares, en cuanto al cuajado del fruto, se han obtenido en olivos mediante la aplicación de altas dosis de putrescina durante la floración (Rugini y Mencuccini, 1985).

Igualmente en pera, la aplicación de putrescina a los óvulos amplía su longevidad y por tanto el periodo de polinización efectivo entre dos y cinco días (Crisosto y col., 1988a). Por otra parte en tejidos de la placenta y óvulos del fruto de la papa, se han observado cambios en los niveles endógenos de poliaminas en relación a los diferentes estados del desarrollo del gineceo. En la placenta, las concentraciones de putrescina, espermidina y espermina decrecen a medida que proliferan los tejidos en el proceso de formación de la pulpa. En los óvulos, si bien existe un descenso en la concentración total de las poliaminas libres con el desarrollo del endospermo, los niveles de putrescina y espermidina se incrementan antes del último estado de embriogénesis. Estos cambios en los niveles de poliaminas libres parecen estar asociados con los estados de mayor desarrollo caracterizados por un incremento en la actividad mitótica y de diferenciación (Olson y Nowak, 1988).

En la platanera, la presencia de poliaminas en el fruto ha sido detectada por nuestro grupo en investigaciones realizadas paralelamente al presente trabajo, observándose cambios notables en el contenido de putrescina y espermidina tanto en su formas libre como conjugadas a lo largo de las diversas etapas del desarrollo (Siverio Grillo, 1994). El nivel de poliaminas es elevado durante la fase inicial del crecimiento, coincidiendo con la antesis de la flor e inmediatamente después (4-5 semanas). Dicha etapa se corresponde con un

periodo de intensa actividad metabólica y múltiples divisiones celulares a nivel de los tejidos de la pulpa según se demuestra por el extraordinario incremento en la concentración de proteínas y ADN. El pico máximo en la acumulación de putrescina se observa hacia la tercera semana posterior a la antesis, anterior a un periodo de máxima actividad mitótica que tiene lugar hacia la quinta semana.

Asimismo, estas investigaciones preliminares en el fruto de la platanera ponen de manifiesto la existencia de un gradiente de concentración de poliaminas que alcanza su máximo valor en los tejidos más internos y disminuye hacia el exterior (óvulos - pulpa - piel). La mayor acumulación de poliaminas en los óvulos se inicia de manera brusca una semana antes de la antesis y alcanza su máxima concentración dos semanas más tarde, coincidiendo con el primer pico de actividad mitótica de los tejidos de la pulpa. A partir de la 5ª-6ª semana desciende la concentración de poliaminas en los óvulos asociado a una pérdida de su viabilidad, que coincide con una disminución transitoria de la actividad mitótica en los tejidos de la pulpa. Dado que la acumulación de poliaminas es anterior en los óvulos que en los restantes tejidos del fruto, no se descarta la posibilidad de que dichas sustancias puedan originarse en los óvulos y difundir a los demás tejidos.

Los resultados obtenidos en esta investigación (Siverio Grillo, 1994) plantean la hipótesis de que el estímulo partenocárpico estaría constituido por una combinación de diversas sustancias hormonales entre las cuales pueden ocupar un lugar importante las poliaminas. Su acción sería fundamental para el inicio de las divisiones celulares en los tejidos de la pulpa en combinación con otras sustancias hormonales. Estos resultados podrían dar pie para considerar a las poliaminas como sustancias reguladoras del crecimiento en los tejidos del fruto de la platanera.

Sin embargo, el papel de las poliaminas en el desarrollo del fruto en general no está del todo claro. El hecho de que la aplicación de nitrógeno a árboles de manzano antes de la antesis mejore el cuajado del fruto, sugiere que el efecto de las poliaminas exógenas en este evento fisiológico puede no ser específico como regulador, y en su lugar, servir como una fuente exógena de nitrógeno (Dennis, 1986).

Aunque en la actualidad son muy numerosas las citas bibliográficas que relacionan a las poliaminas con procesos del desarrollo de índole muy variada, existe un gran desconocimiento acerca de los mecanismos bioquímicos y moleculares a través de los que estas sustancias pueden ejercer su acción. Cabe preguntarse pues, si las poliaminas pueden actuar como inductores o como mediadores (mensajeros secundarios) en cadenas de respuesta inducidas otras sustancias hormonales, sin descartar un posible papel relacionado con el metabolismo del nitrógeno.

MATERIAL

MATERIAL

El presente trabajo de investigación se ha realizado utilizando como material experimental frutos de platanera, *Musa acuminata colla (AAA) cv. Dwarf. cavendish*, cultivar que por tradición y por superficie de cultivo presenta una gran importancia para Canarias.

Atendiendo al tipo de desarrollo presentado por el fruto, dentro del género *Musa* pueden distinguirse dos grupos de especies claramente diferenciadas: especies seminíferas y especies partenocárpicas. Las variedades seminíferas, por lo general silvestres, presentan a menudo un número elevado de semillas duras y de color negro, rodeadas por una cantidad más bien escasa de pulpa. Frecuentemente se trata de variedades no comestibles en las que la polinización es un requisito indispensable para su desarrollo, pues de no ocurrir ésta, los ovarios comienzan a marchitarse tras experimentar un ligero engrosamiento inicial (Dodds y Simmonds, 1948). Las variedades comestibles, entre las que se incluye el cultivar objeto del presente estudio, son partenocárpicas y no requieren el estímulo de la polinización.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA PLATANERA.

1. Descripción de la planta:

La platanera es una planta herbácea cuyo tallo verdadero es corto y permanece soterrado sin sobresalir del suelo hasta la época de la floración (Fig. 5). La denominación de este tallo subterráneo es algo confusa, pues mientras que Champion (1968) lo considera como un bulbo, Simmonds (1973) prefiere denominarlo "cormo" por considerar que se trata de un tallo subterráneo erecto y con poco crecimiento horizontal. Martin-Prevel (1979) considera en cambio, que el tallo presenta caracteres tanto de bulbo como de rizoma.

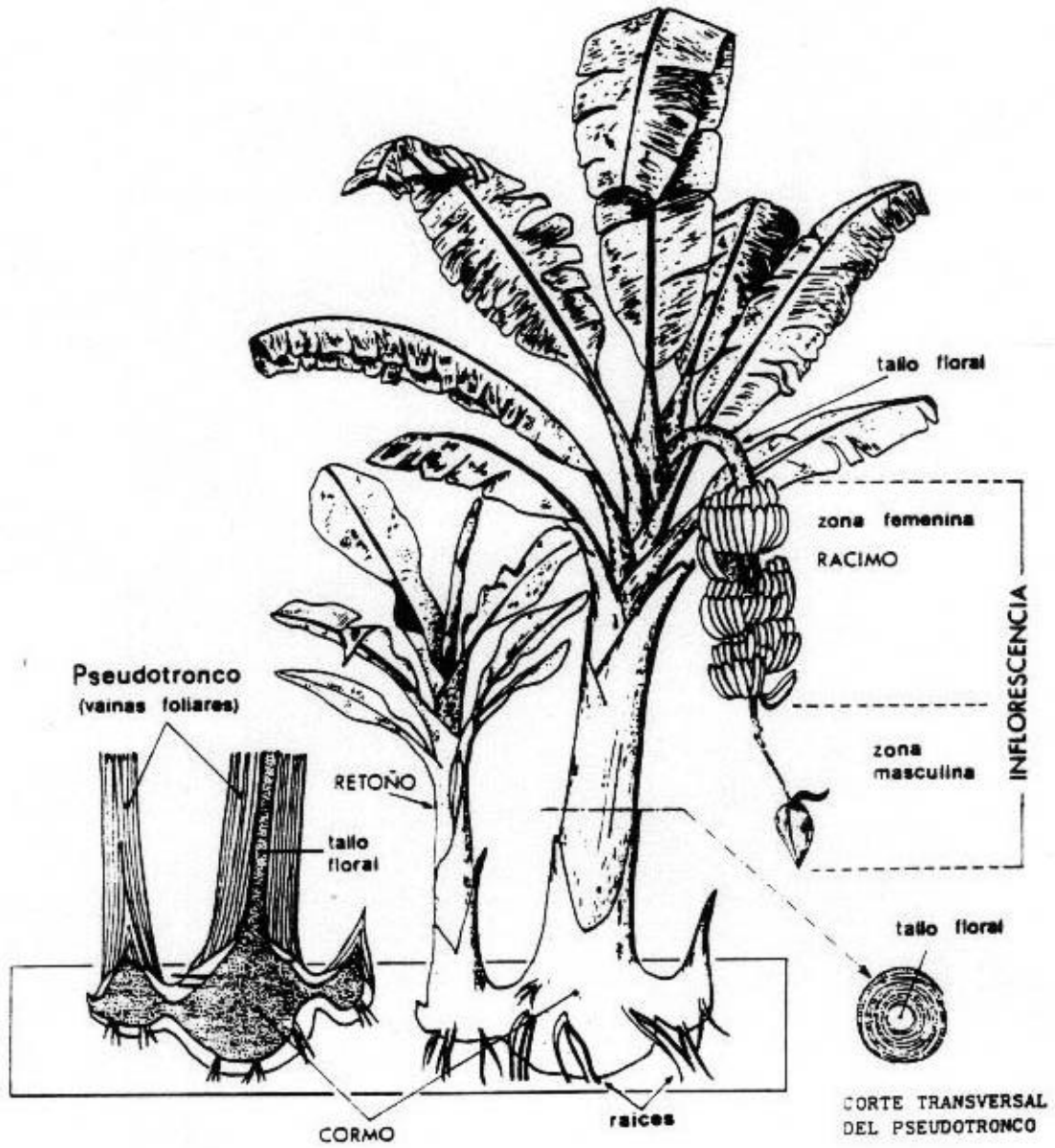


Fig. 5. Representación esquemática de una platanera en fase de fructificación. (Según Champion, 1968)

La multiplicación de la platanera se realiza por vía asexual, mediante la emisión de brotes o retoños que emergen lateralmente a la superficie del tallo subterráneo y que sustituirán a la planta madre una vez que ésta haya emitido el fruto y se haya completado el ciclo de desarrollo. El número de retoños emitidos es variable, pudiendo ser tantos como hojas adultas se hayan desarrollado; sin embargo, de todos ellos, el agricultor sólo selecciona uno o a lo sumo dos como sustitutos de la planta madre y procede a eliminar los restantes (Galán Sauco y col. 1984).

Cuando la planta ha adquirido un determinado grado de desarrollo y ha emitido al exterior un determinado número de hojas, variable según el cultivar y las condiciones del cultivo, el meristemo apical sufre una serie de transformaciones bioquímicas, fisiológicas y estructurales, que determinan su transición desde un estadio hasta entonces típicamente vegetativo, a otro de carácter reproductor. En ese momento, la diferenciación de primordios foliares se interrumpe y comienza la diferenciación de la inflorescencia. Casi simultáneamente se produce un gran crecimiento en longitud del eje central o tallo verdadero, el cual empujará hacia arriba a la inflorescencia por el interior del pseudotallo hasta su emergencia a través del conjunto de hojas.

En el momento de su salida al exterior ("momento de parición") la inflorescencia tiene forma de cono alargado, con un color rojo-púrpura y está constituida por un eje carnoso sobre el cual se hallan dispuestas en forma espiralada, un número indeterminado de brácteas coloreadas en forma de barquilla. En la axila de cada bráctea se localiza un conjunto de flores, ordenadas en dos hileras y dispuestas transversalmente al eje. A este conjunto de flores se le conoce vulgarmente con el nombre de "mano", mientras que por analogía cada una de las flores recibe el nombre de "dedo".

A partir de este momento la inflorescencia se curva hacia el suelo progresivamente. Una a dos semanas después de la emergencia, las brácteas se han levantado, se enrollan hacia su base y dejan al descubierto cada una de las manos que hasta ese momento cubrían completamente. Después de un cierto tiempo las brácteas caen al suelo, tras desarrollarse en su base de unión con el eje de la inflorescencia una zona de abscisión.

Estructuralmente todas las flores son hermafroditas, sin embargo, desde el punto de vista funcional y morfológico se aprecian diferencias bastante notorias entre algunas de ellas. Las primeras manos en quedar al descubierto, cronológicamente las primeras en diferenciarse, están constituidas por flores funcionalmente femeninas que se transformarán en frutos comestibles. El número de estas manos oscila por lo general entre 10 y 12, aunque dependiendo de las condiciones climáticas y edáficas del cultivo, este número puede ser más elevado. Inmediatamente por debajo de las flores funcionalmente femeninas van quedando al descubierto las manos de flores funcionalmente masculinas, en número muy elevado ya que el proceso de diferenciación de las mismas no se interrumpe a lo largo de todo el ciclo vital de la planta. Estas flores, a diferencia de las funcionalmente femeninas no se transforman en frutos y sufren abscisión por su zona de unión con el eje de la inflorescencia dejando sobre él unas cicatrices bien patentes.

Otro hecho que diferencia a ambos tipos de flores lo constituye la estructura y el desarrollo alcanzado por los respectivos verticilos florales. En las flores funcionalmente femeninas los estambres se atrofian, los filamentos están muy reducidos y no se forman anteras. Por contra, en las flores funcionalmente masculinas los estambres adquieren un gran desarrollo y presentan anteras morfológicamente bien desarrolladas aunque generalmente se hallan desprovistas de granos de polen. El ovario en las flores funcionalmente femeninas crece considerablemente, es trilobular y cada lóculo está recorrido longitudinalmente por dos hileras de óvulos. En las flores funcionalmente masculinas, en cambio, no existen cavidades locales y el ovario apenas se desarrolla.

A partir de la 4^a-5^a semana después de la emergencia pueden distinguirse en la inflorescencia dos zonas perfectamente definidas: una superior, cuyas manos están compuestas por flores funcionalmente femeninas bien desarrolladas que constituirán el "racimo" y otra inferior, cuyas manos están compuestas por flores funcionalmente masculinas muy poco desarrolladas y empaquetadas formando una estructura cónica de color rojizo. Separando ambas zonas existe una o dos manos cuyas flores presentan características intermedias. La estructura cónica terminal recibe vulgarmente el nombre de

"bellota" y es cortada por el agricultor habitualmente hacia la 5^a-7^a semana por razones fitosanitarias y para favorecer un mejor desarrollo del racimo.

2. Estructura y desarrollo del fruto.

Tal como ya se ha indicado con anterioridad, las únicas flores que poseen la capacidad para desarrollarse en fruto son las consideradas como funcionalmente femeninas, las cuales ocupan la posición más basal dentro de la inflorescencia (flores funcionalmente femeninas).

Tomando como referencia los trabajos realizados por Fahn y col. (1961), Mohan Ram y col. (1962), Lecuona (1975), Lorenzo-Martín (1985), la estructura histológica de los ovarios pertenecientes a las flores funcionalmente femeninas en el momento de la emergencia presenta las siguientes características:

En primer lugar y de fuera hacia adentro, se observa la existencia de una epidermis externa constituida por una sola capa de células pequeñas e isodiamétricas, provista de estomas y de una cutícula superficial bien definida. Por debajo de esta capa se localizan seis a once capas de células parenquimáticas, que contienen con cierta frecuencia rafidios. Ambas capas dan paso a su vez, a un parénquima muy vascularizado en el cual los haces vasculares se disponen longitudinalmente. Los haces más extremos presentan gran cantidad de fibras, mientras que en los más internos, el número de fibras decrece en favor de los elementos conductores del xilema. Interiormente a la zona de haces vasculares longitudinales se dispone otra zona también parenquimática que presenta una gran cantidad de espacios aéreos, cuyo origen según Lecuona (1975) parece ser de naturaleza esquizógena. Este conjunto de tejidos así dispuestos constituye la piel del ovario, la cual conserva prácticamente esta misma estructura a lo largo del desarrollo del fruto.

En la porción más interna de las paredes del ovario se localizan los tejidos generadores de la pulpa, constituidos por una serie de 5 a 7 capas de células isodiamétricas y tapizadas a su vez por una epidermis que bordea interiormente las cavidades loculares.

Las tres cavidades loculares se hallan delimitadas entre sí por los septos y el eje central. A nivel de cada septo puede observarse la existencia de una zona central de células parenquimáticas a través de la cual discurren algunos haces vasculares (radiales). A ambos lados de esta zona se disponen sendas capas de tejidos generadores de la pulpa, tapizadas como ya hemos dicho anteriormente, por una epidermis muy fina. El eje central se halla constituido por un tejido parenquimático esponjoso, recorrido por seis conjuntos de haces vasculares en sentido longitudinal, situados cada uno de ellos muy próximo a las zonas de implantación de los óvulos.

3. Desarrollo de la pulpa:

Durante las primeras semanas (1-2) después de la emergencia, la estructura anatómica del ovario no experimenta grandes cambios en relación con la descripción anterior, exceptuando quizás la existencia de un ligero alargamiento celular generalizado (Fig. 6).

A partir de la segunda semana, las células constituyentes de los tejidos generadores de la pulpa se ven sometidas a un proceso de división celular muy activo. Los septos comienzan a ensancharse como consecuencia también de la gran actividad mitótica a la que se ven sometidas las células generadoras de la pulpa localizadas en ellos. Los óvulos comienzan a marchitarse y arrugarse lentamente hasta el estado de diminutos puntos de color pardo reconocibles en el fruto maduro (Mohan Ram y col. 1962; Turner, 1970; Soto, 1990)

El incremento en el número de células de la pulpa continúa hasta aproximadamente las 4-5 semanas después de la emergencia, momento en el cual, el crecimiento del fruto se produce por alargamiento y expansión de las células ya existentes. En este momento los óvulos han degenerado prácticamente en su totalidad.

La actividad de división y alargamiento de las células generadoras de la pulpa no se produce de manera regular y uniforme a lo largo de toda la cavidad

locular, lo cual determina un llenado irregular de las cavidades, observable mediante cortes transversales y longitudinales del ovario.

A lo largo de las 4-5 primeras semanas, el fruto ha aumentado considerablemente de diámetro por el alargamiento celular en sentido tangencial que experimentan los tejidos constituyentes de la piel.

Entre la 8^a y 12^a semana el alargamiento y expansión celular es continuo, llenándose completamente de pulpa las cavidades loculares, al mismo tiempo que los septos y el eje central han alcanzado su máximo desarrollo.

Posteriormente, el parénquima aerífero situado en torno a la región de haces vasculares tangenciales (circulan en el seno de la pulpa) comienza a expandirse, siendo probablemente este proceso el responsable en gran medida del aumento de diámetro experimentado por el fruto a partir de entonces. Es a través de esta zona por la que se produce la rotura de la piel cuando el fruto es pelado en estado maduro .

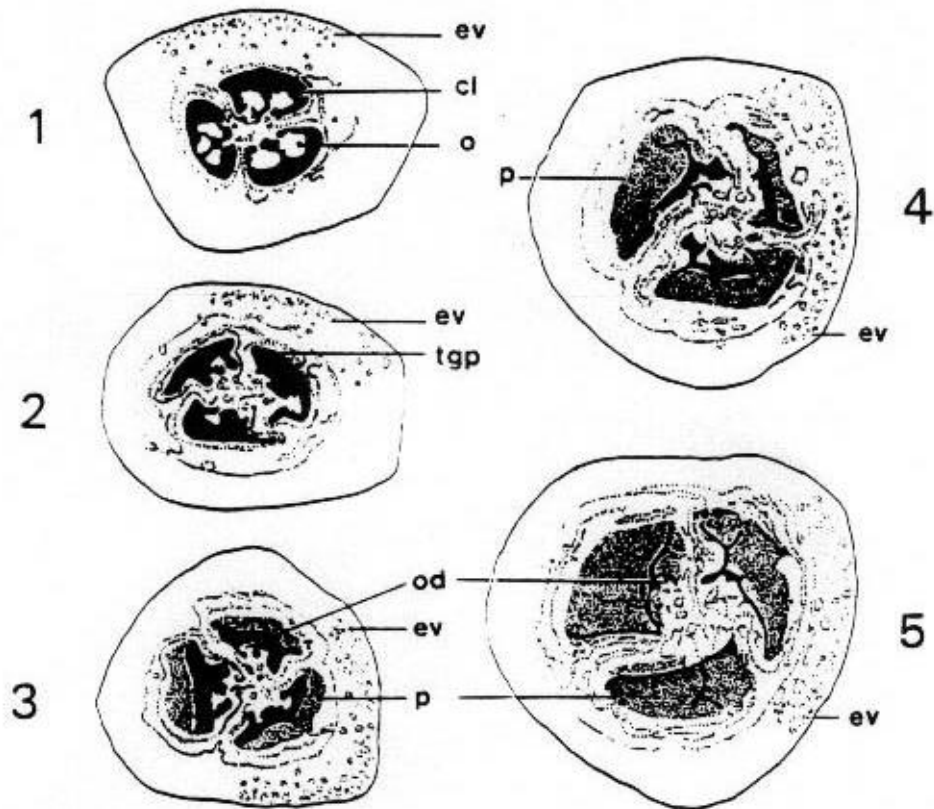


Fig. 6. Representación esquemática del desarrollo del fruto de la platanera. Diagramas representativos de secciones transversales del fruto a las 0, 2, 4, 8 y 12 semanas después de la emergencia (referido a *Musa acuminata* cv. *Pisang lilin*; según Mohan Ram y col., 1962).

(o: óvulo; cl: cavidades loculares; ev: elementos vasculares; tgp: tejidos generadores de la pulpa; p: pulpa; od: óvulos degenerados)

4. MATERIAL EXPERIMENTAL

Para el presente estudio se utilizaron ovarios pertenecientes a flores funcionalmente femeninas obtenidas a partir de las 5-6 primeras manos de la inflorescencia. La recolección de las inflorescencias se llevó a cabo en el momento de su emergencia o aparición en la parte superior del pseudotallo.

Las plantas fueron cultivadas en las fincas experimentales del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (I.C.I.A) dependiente de la Consejería de Agricultura, localizada en la zona de Pajalillo (Valle Guerra).

METODOS

METODOS

1. TECNICAS DE CULTIVO “IN VITRO”

Los métodos utilizados en este trabajo con respecto a las técnicas de cultivo “in vitro” y que pasamos a reseñar seguidamente, se basan en las técnicas generales optimizadas para la platanera por Lorenzo-Martín (1985) .

1.1. Recolección y preparación del material vegetal:

El material vegetal empleado para nuestras investigaciones han sido ovarios pertenecientes a flores funcionalmente femeninas obtenidas a partir de inflorescencias recolectadas en el momento justo de su emergencia o salida al exterior (“estadio de parición”).

La recolección de las inflorescencias se realiza seccionando el pseudotallo 30 a 40 cm. por debajo de la zona de emergencia para evitar posibles daños a la misma. Una vez realizada esta operación se procede a seccionar todas las hojas a nivel de su peciolo permaneciendo las vainas fuertemente empaquetadas en torno a la base de la inflorescencia.

En el laboratorio se eliminan los restos de las vainas, se limpian con alcohol cada una de las brácteas que rodean a la inflorescencia y se inicia la disección de las manos de flores basales, funcionalmente femeninas. Las brácteas que van quedando al descubierto se limpian con alcohol, y cada una de las manos una vez separadas del raquis son colocadas en placas de Petri previamente esterilizadas.

Debido al fuerte empaquetamiento al que están sometidas las flores por parte de las respectivas brácteas axilares, no se requiere una esterilización de las flores previamente a su puesta en cultivo.

Los explantes utilizados en nuestras experiencias han sido discos de ovarios con un grosor medio en torno a 1.5 mm obtenidos a partir de las 5-6 primeras manos. Una vez diseccionados los discos, se sumergen rápidamente en una disolución acuosa estéril de ácido ascórbico 10^{-3} M. con el objeto de limpiarlos de la gran cantidad de secreciones o exudados que se liberan por las zonas de corte. El tiempo de lavado oscila entre 30 y 45 minutos durante el cual se realizan agitaciones periódicas de la solución. Finalizado este proceso, los discos se colocan en placas de Petri para dejarles escurrir y se seleccionan los más homogéneos para su puesta en cultivo.

Todas estas operaciones así como las siguientes, encaminadas a la puesta en cultivo del material vegetal, se realizan en condiciones asépticas utilizando una cámara de flujo laminar vertical.

1.2. Medios de cultivo.

Todas las experiencias de cultivo "in vitro" se realizan sobre medios de cultivo solidificados con agar (0,5%) en cuya composición entran a formar parte sales minerales (macro- y micronutrientes), Fe-EDTA, vitaminas y una fuente de carbono (sacarosa, 30 gr./l) en las concentraciones propuestas por Murashige y Skoog (1962) y que se recogen en la Tabla II.

En la mayoría de nuestras experiencias el medio de cultivo anteriormente reseñado ha sido suplementado con las siguientes sustancias reguladoras del crecimiento: 2,4-D (0.1mg/l) y BA (1 mg/l). Este medio será identificado en lo sucesivo con la denominación de **medio óptimo**.

El medio de cultivo en los casos que se indican en el capítulo de Resultados estará suplementado con un aporte exógeno de poliaminas: *putrescina*, *espermidina* y *espermina* (SIGMA) y de inhibidores de la síntesis de poliaminas: *Ciclohexilamina* y *Metilglioxal-bis-guanilhidrazona* (SIGMA). Otros inhibidores: α -Difluorometilarginina y α -Difluorometilornitina, han sido donados para la presente investigación por MERREL-DOW (USA).

Tabla 2. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

A) Macronutrientes (mg/l.)

SO ₄ Mg . 7 H ₂ O	370
PO ₄ H ₂ K	170
Cl Ca. 2 H ₂ O	440
NO ₃ K	1900
NO ₃ NH ₄	1650

B) Micronutrientes (mg/l.).

SO ₄ Mn. 4 H ₂ O	22.3
SO ₄ Zn. 7 H ₂ O	8.6
SO ₄ Cu. 5 H ₂ O	0.025
Cl ₃ Al	0.025
IK	0.83
BO ₃ H ₃	6.2
MoO ₄ Na ₂ . 2 H ₂ O	0.025
SO ₄ Fe . 7 H ₂ O	27.85
EDTA. Na ₂	37.25

C) Compuestos orgánicos (vitaminas y aminoácidos) en mg/l.

Meso-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina-ClH	0.5
Tiamina-ClH	0.1
Glicina	2

Seguidamente, los medios de cultivo son dispensados en tubos de ensayo de 24 x 160 mm a razón de 20 ml. por cada tubo y se les tapa con capuchones de polycarbamato (MAGENTA) en espera de su esterilización posterior en autoclave. El pH de los medios se ajusta a valores comprendidos entre 5,6 y 5,8 mediante el empleo de soluciones de Cl H y NaOH.

En algunos casos, por las razones que posteriormente se expondrán se procede a dispensar los medios en erlenmeyer de 250 ml. para su posterior esterilización.

1.3. Técnicas de esterilización.

Los medios de cultivo, ya sea en tubos de ensayo o en erlenmeyer son esterilizados mediante autoclavado a una temperatura de 110°C (0,5 Kg/cm²) durante 20 minutos.

En los casos en que se adicionan al medio sustancias termolábiles como es el caso de los poliaminas y los inhibidores de su biosíntesis, las cuales pueden resultar alteradas por las elevadas temperaturas del autoclave, se procede a una esterilización por separado de dichas sustancias mediante filtración (MILLIPORE 0.22 μ) antes de su adición al medio. En tales ocasiones los constituyentes básicos se esterilizan en erlenmeyer de 250 ml. y una vez frescos (\pm 70°C) son suplementados con las correspondientes soluciones acuosas de las sustancias esterilizadas por filtración, se homogeneizan adecuadamente y se distribuyen en tubos de ensayo, operación que debe realizarse en cabina de flujo laminar.

Las soluciones de lavado, el material de vidrio y papel de filtro, los sistemas de filtración, etc... se esterilizan en autoclave a 130° C (1,5 Kg/cm²) durante 60 minutos.

El instrumental de disección así como las pinzas, es esterilizado mediante esterilizadores secos a 120° C (STERI 350, Keller, Suiza)

Por lo general, la preparación y esterilización de los medios de cultivo se realiza con una antelación de 12 a 24 horas al momento de la siembra.

1.4. Realización de las siembras.

La siembra o puesta en cultivo de los explantes (discos) se realiza de acuerdo con las recomendaciones generales, colocando los discos en posición vertical y sumergidos en el medio de cultivo 2/3 de su longitud.

1.5. Condiciones de Incubación

Una vez realizadas las siembras, los cultivos son mantenidos en cámaras de incubación bajo condiciones de iluminación y temperatura controlada durante 45 ó 60 días.

Las condiciones de iluminación se basan en ciclos diarios con fotoperiodos de 8 horas luz/16 horas oscuridad, empleando lámparas fluorescentes de color blanco (PHILIPS, TLD 36W/84) colocadas en la parte superior e inferior a los cultivos y con capacidad para producir una intensidad luminosa de 3000 a 4000 lux en torno a los recipientes.

La temperatura se ha mantenido en torno a los 25° C, mediante el empleo de grupos climatizadores. Para evitar el establecimiento de gradientes térmicos en relación a la altura, las cámaras de incubación están provistas de ventiladores cuya misión es forzar una circulación continua del aire interior.

METODOS ANALITICOS:

2. ANALISIS DE POLIAMINAS:

Se ha analizado el contenido endógeno de poliaminas libres y conjugadas mediante la técnica descrita por Flores y Galston (1982), aunque con ligeras modificaciones al objeto de adaptarla a las peculiaridades de nuestro material vegetal (ver pag. 77 y 78).

2.1. Extracción:

La extracción de las muestras de pulpa se realiza con ácido perclórico frío (PCA) al 5% a razón de 100 mg/ml, tomando al menos 5 discos por cada tratamiento experimental. Las muestras son homogeneizadas en un Ultra-Turrax durante 2 minutos, dejadas reposar en hielo durante 1 hora y a continuación centrifugadas 20 minutos a 27.000 g y 4° C (rotor SORVAL, SS-34). El sobrenadante obtenido se analiza inmediatamente, o bien se almacena en viales de plástico a -20° C para un posterior análisis. En estas condiciones las muestras pueden ser conservadas durante 6 meses.

2.2. Dansilación:

En un tubo de vidrio se añaden 400 ml. del sobrenadante anteriormente obtenido, 400 ml de carbonato sódico preparado a saturación y 800 ml de cloruro de dansilo (5 mg/ml acetona). Esta mezcla se agita vigorosamente en un vortex y se deja reposar durante 1 noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente se añaden 200 ml de prolina (100 mg/ml agua), se agita y se deja reposar 30 minutos con el fin de eliminar el posible exceso de dansilo.

Al mismo tiempo que las muestras, se preparan soluciones patrón de putrescina y espermidina (SIGMA) a una concentración de 10 mg/ml de PCA y se procede a su dansilación en los mismos términos ya descritos.

2.3. Cromatografía:

Tras la dansilación y sobre el mismo tubo se lleva a cabo una extracción de las poliaminas añadiendo 500 ml de benceno, se agita 30 segundos y se deja reposar hasta que se separen dos fases. Las poliaminas se localizan en la fase superior de benceno. Posteriormente, se realiza una cromatografía en capa fina sobre placas multicanal con zona de concentración (WHATMAN, LK6D) usando como solvente una mezcla de cloroformo:trietilamina (5:1). La cantidad de muestra aplicada es de 40 ml. y el tiempo necesario para desarrollar la cromatografía es de aproximadamente 1 hora. Cada muestra se realiza por triplicado.

Después de secas, las placas se visualizan a la luz ultravioleta al objeto de localizar en cada muestra las bandas correspondientes a la putrescina, espermidina y espermina mediante comparación de los valores de R_fs con los de los patrones puros de estas sustancias.

Posteriormente se lleva a cabo un raspado y recuperación de cada una de las bandas seleccionadas, las cuales se redisuelven en 3 ml de acetato de etilo, agitando dos veces a razón de 15 segundos. En última instancia, las muestras se centrifugan durante dos minutos para precipitar el gel de sílice y el sobrenadante se somete a valoración cuantitativa.

2.4. Valoración cuantitativa:

La concentración de putrescina y espermidina en cada una de las muestras se obtiene interpolando sus valores de fluorescencia en una recta de calibrado preparada con patrones de putrescina y espermidina. Las medidas de fluorescencia se realizan en un espectrofluorímetro (PERKIN-ELMER LS-2B)

utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$) y una longitud de onda de emisión de 495 nm ($\lambda_{\text{em}} = 495 \text{ nm}$).

Este es el protocolo a seguir para la determinación del contenido endógeno de poliaminas libres. Para el análisis de las poliaminas conjugadas el procedimiento es el mismo con la salvedad de que previamente a la dansilación debe realizarse una hidrólisis ácida del sobrenadante (ver pag. 76 y 77). Dicha hidrólisis se lleva a cabo mezclando 500 ml de muestra y 500 ml de ácido clorhídrico 12 N en ampollas de vidrio selladas a la llama y calentadas a 110° C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla es filtrada a través de lana de vidrio, se toma una alícuota de 800 ml y se trasvasa a un tubo de vidrio y se seca mediante corriente de aire en baño de María. A continuación, se resuspende en 400 ml de PCA y se somete a dansilación. El resto del protocolo coincide con el descrito para las poliaminas libres.

Todas las experiencias y los análisis para los distintos tratamientos experimentales han sido repetidos al menos dos veces; los datos recogidos en las gráficas que ilustran el capítulo de Resultados corresponden a un análisis representativo. Cuando se comparan experimentos repetidos el patrón de respuesta se ajusta a modelos similares aunque pueden existir diferencias en los niveles absolutos.

3. EVALUACION DEL CRECIMIENTO DE LOS TEJIDOS.

La evaluación del crecimiento se ha realizado mediante la estimación de los contenidos en materia fresca y materia seca respectivamente. Para este propósito se procede en primer lugar a diseccionar y separar los tejidos de la piel y de la pulpa, en los discos de ovario que se han mantenido en cultivo, mediante un bisturí. Los tejidos de la pulpa se pesan por separado (*peso fresco*), se depositan en sobres de aluminio y se introducen en una estufa a 70 °C durante siete días. Transcurrido este tiempo, los sobres son trasvasados a un desecador

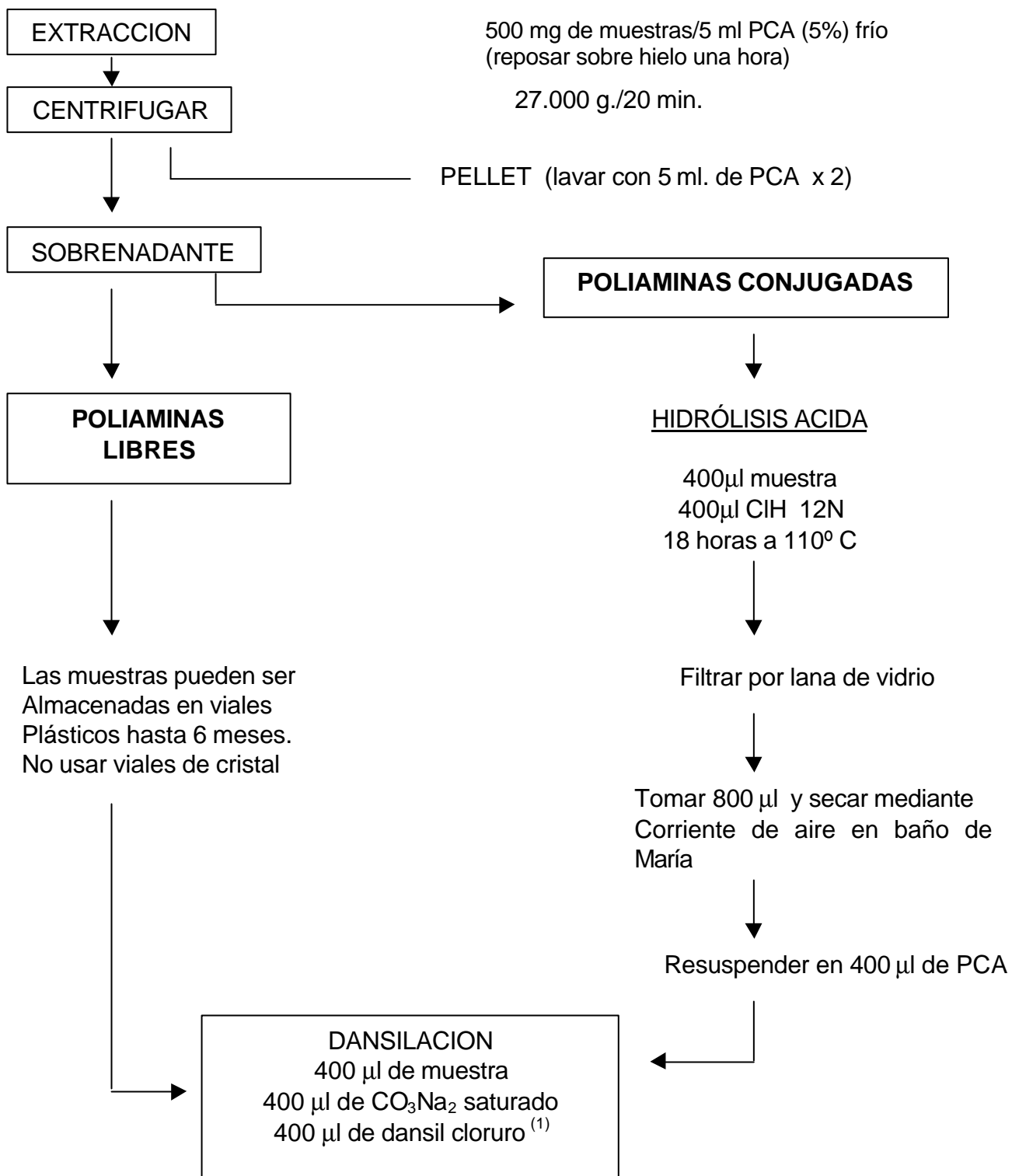
con gel de sílice donde se les deja enfriar para seguidamente proceder a la estimación del *peso seco*.

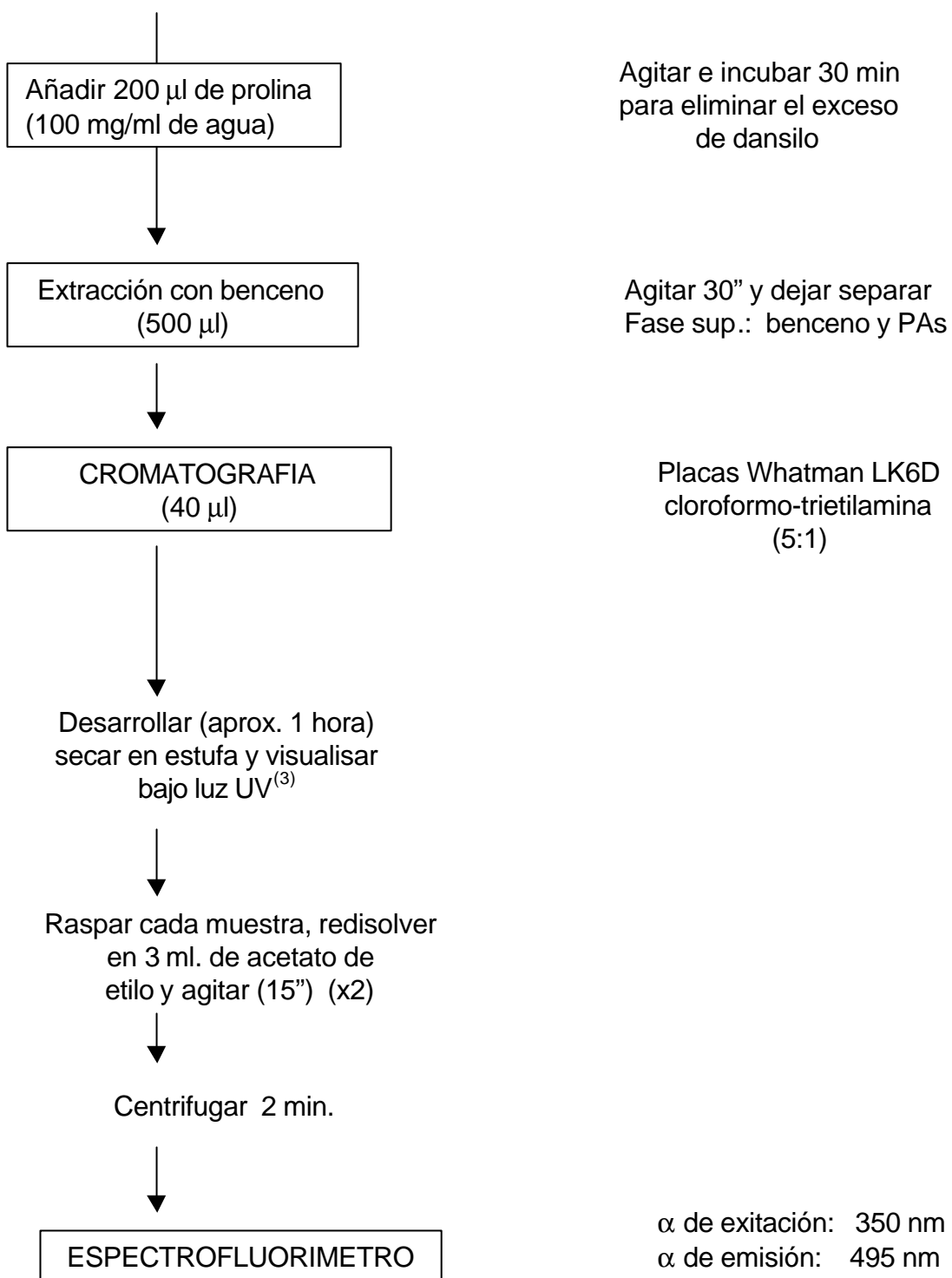
4. ANALISIS ESTADISTICO.

Todas las experiencias que contemplan la evaluación del peso fresco o peso seco como indicadores del crecimiento, fueron tratadas estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de rango múltiple de Duncan, a un nivel de significación del 1%, en el programa informático *Costat*.

El número de discos muestreados para las estimaciones de peso fresco y peso seco fue igual a doce para las curvas de crecimiento y veinte cuando se evaluó el peso final (45-60 días). Los experimentos se repitieron 2 ó 3 veces.

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION, SEPARACION Y
ANALISIS DE POLIAMINAS EN PLANTAS
Adaptado de Flores y Galston (1982)





- (1) Dansil cloruro (5 mg/ml acetona). La preparación debe ser reciente
- (2) Los extractos dansilados son viables aproximadamente 1 mes en tubos de cristal, conservados a -20° C.
- (3) El análisis cuantitativo de los dansil-derivados debe realizarse de forma inmediata para evitar una pérdida de fluorescencia.

RESULTADOS

CAPITULO: 1

1. EFECTO DE LA APLICACION EXOGENA DE POLIAMINAS SOBRE EL CRECIMIENTO “IN VITRO” DE LOS TEJIDOS DE LA PULPA.

El presente estudio se plantea con la finalidad de investigar los efectos de la aplicación exógena de las poliaminas sobre el desarrollo “in vitro” de los tejidos de la pulpa y su repercusión sobre el crecimiento inducido por los reguladores de crecimiento (2,4-D/BA). Con este propósito hemos procedido a cultivar discos de ovario en medios suplementados con distintas concentraciones de putrescina, espermidina y espermina, ya sea de manera individual, o combinadas con 2,4-D y BA.

1.1. Acción individual de las poliaminas.

Tal como muestra la Fig. 7., la aplicación exógena de las poliaminas, a los discos de ovario cultivados sobre un medio desprovisto de reguladores, carece de efecto sobre el crecimiento de los tejidos, lo cual viene a significar que su mera presencia en el medio de cultivo es insuficiente como sustituto de otros reguladores considerados básicos para el desarrollo de los tejidos de la pulpa (2,4-D/BA). En cualquiera caso, y con independencia de la concentración, la respuesta de los tejidos a las poliaminas es equivalente a la observada en un medio sin reguladores (*medio cero*), y viene a significar entre un 60 y 80% de reducción en el crecimiento en contenido de materia fresca o materia seca respecto a los cultivos mantenidos en 2,4-D/BA (*medio óptimo*).

1.2. Acción combinada de las poliaminas y los reguladores

Los resultados de la aplicación exógena de estas sustancias en combinación con 2,4-D, BA o ambos (2,4-D/BA) se muestran en las tablas 3, 4 y 5. Como se puede apreciar, la aplicación de putrescina a los cultivos que se

desarrollan en un medio con 2,4-D ó BA, no presenta diferencias significativas, en cuanto a su peso fresco, con respecto al control sin putrescina. Sí se observa, en cambio, un incremento significativo en el peso fresco con respecto al control cuando la putrescina, a la concentración más alta (6.2 mM) se ensaya conjuntamente con 2,4-D/BA (Tabla 3).

Cuando la poliamina ensayada es la espermidina (Tabla 4), se observa una clara inhibición del crecimiento a concentraciones de 0,38 mM y 3,8 mM, en todas las condiciones estudiadas, acentuándose dicha inhibición a medida que aumenta la concentración de la poliamina. A concentraciones menores a las citadas, la espermidina no muestra efectos significativos sobre el crecimiento con la salvedad de los cultivos en los que la espermidina (0,1 mM) se combina con el 2,4-D solo, en cuyo caso se aprecia una cierta inhibición.

En los cultivos tratados con espermina (Tabla 5)., se observa igualmente una inhibición generalizada del crecimiento aún mas notoria que en los precedentes en cualquiera de las concentraciones y combinaciones ensayadas.

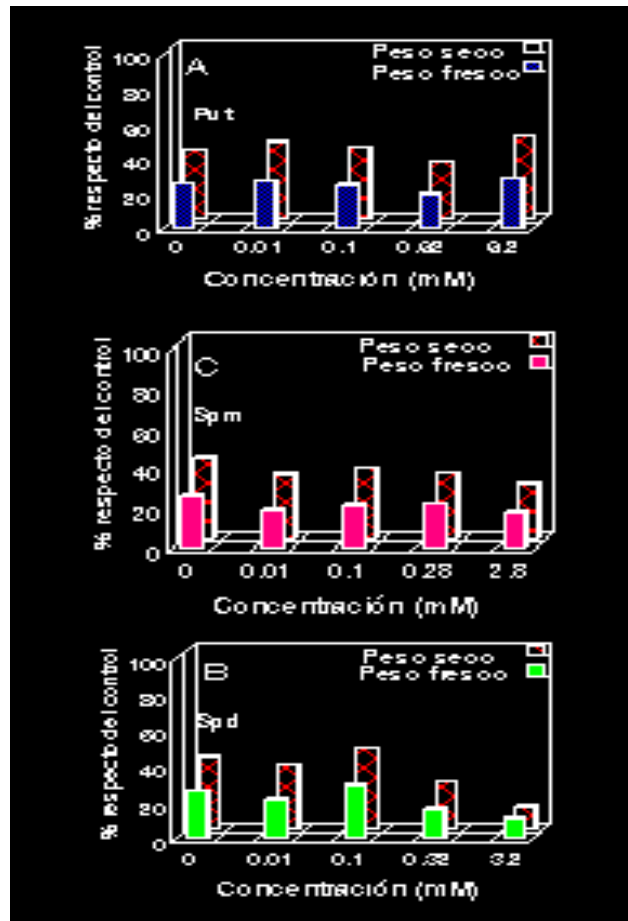


Fig. 7. Efecto de la aplicación exógena de putrescina (A), espermidina (B) y espermina (C), en ausencia de otros reguladores sobre el crecimiento de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados “in vitro” durante 55 días. Se representa el porcentaje de crecimiento en peso fresco (barras) y en peso seco (líneas) respecto al control con 2,4-D/BA.

PUT (mM)	2,4-D (0.1 mg/l)		BA (1 mg/l)		2,4-D/BA	
	0	1066 a	(100)	1003 ab	(100)	1163 b
0.062	1066 a	(100)	1070 a	(107)
0.1	1202 b	(103)
0.62	938 a	(92)	886 b	(87)	1193 b	(103)
1	1261 ab	(108)
6.2	1080 a	(101)	1060 a	(108)	1341 a	(115)

Tabla 3. Efecto de la aplicación exógena de **putrescina** sobre el crecimiento, evaluado como peso fresco de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados "in vitro" durante 55 días. Se muestra la acción combinada de distintas concentraciones de PUT. con 2,4-D, BA y 2,4-D/BA. Los valores seguidos de la misma letra para cada columna no difieren estadísticamente a un nivel de significación del 1% según el test de Duncan. Los valores dentro del paréntice representan el porcentaje de crecimiento respecto al control sin putrescina.

SPD (mM)	2,4-D (0.1 mg/l)		BA (1 mg/l)		2,4-D/BA	
	0	1037 a	(100)	691 a	(100)	1093 a
0.001	929 ab	(89)	738 a	(107)	1177 a	(108)
0.01	872 ab	(84)	717 a	(104)	1007 a	(92)
0.1	793 bc	(76)	732 a	(106)	1078 a	(99)
0.38	691 c	(66)	579 b	(83)	852 b	(78)
3.8	498 d	(48)	223 c	(32)	539 c	(49)

Tabla 4. Efecto de la aplicación exógena de **espermidina** sobre el crecimiento en peso fresco de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados “in vitro” durante 55 días. Se muestra la acción combinada de la SPD con 2,4-D, BA y 2,4-D/BA a las concentraciones indicadas. Los valores seguidos de la misma letra en cada columna no difieren estadísticamente a un nivel de significación del 1% de acuerdo con el test de Duncan. Los valores dentro del paréntice representan el porcentaje de crecimiento con respecto al control sin espermidina.

SPM (mM)	2,4-D (0.1 m/l)		BA (1 mg/l)		2,4-D/BA	
	0	1037 a	(100)	691 a	(100)	1093 a
0.001	734 b	(71)	398 c	(57)	754 bc	(69)
0.01	685 b	(66)	495 b	(72)	813 b	(74)
0.1	611 bc	(59)	335 cd	(48)	604 c	(55)
0.28	714 b	(69)	324 cd	(47)	766 bc	(70)
2.8	559 c	(54)	259 d	(37)	600 c	(55)

Tabla 5. Efecto de la aplicación exógena de **espermina** sobre el crecimiento, en peso fresco de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados “in vitro” durante 55 días. Se muestra la acción combinada de la SPM con 2,4-D, BA y 2,4-D/BA a las concentraciones indicadas. Los

valores seguidos de la misma letra en la misma columna no difieren estadísticamente a un nivel de significación del 1% de acuerdo con el test de Duncan. Los valores dentro del paréntice representan el porcentaje de crecimiento con respecto al control sin espermina.

1.3. Discusión.

Tal como muestran los resultados obtenidos, ninguna de las poliaminas ensayadas sustituye el efecto de los reguladores (2,4-D y BA), a priori necesarios para el óptimo crecimiento y desarrollo de los tejidos, en las condiciones experimentales del presente trabajo. Por otra parte, cuando las poliaminas son ensayadas en combinación con los reguladores del crecimiento ya mencionados, se observa una tendencia inhibitoria por parte de las poliaminas sobre el crecimiento inducido por éstos últimos; solamente se percibe una ligera estimulación del crecimiento por efecto de las dosis mas altas de putrescina, cuando están presentes simultáneamente ambos reguladores (2,4-D y AB).

Estos resultados son similares a los obtenidos con anterioridad por Rastogi y col., (1990) al estudiar el desarrollo de yemas florales pertenecientes a dos líneas de tomates, una normal y otra mutante con esterilidad masculina por atrofia y/o pérdida de los estambres. En sus investigaciones, estos autores observaron que la aplicación exógena de putrescina, espermidina y espermina inhibe el crecimiento y desarrollo floral en ambos cultivos. Cuando las poliaminas fueron ensayadas en ausencia de reguladores del crecimiento, no se obtuvo crecimiento aparente en dichos cultivos. Por otra parte, la aplicación de poliaminas conjuntamente con otros reguladores (giberelinas y citoquininas) inhibe el crecimiento de las yemas florales inducido por estos últimos. El grado de inhibición depende de la poliamina ensayada, de la concentración de ésta, y la naturaleza del cultivar, sea tipo normal o mutante. En ambas líneas, el desarrollo de los estambres mostraba mayor sensibilidad a la putrescina y espermidina, y el gineceo a la espermina, que otros órganos florales. En ambos genotipos la mayor inhibición se obtuvo en presencia de espermina, circunstancia que también se observa en los tejidos de la pulpa del fruto de la platanera.

Idénticos resultados fueron obtenidos, asimismo, por Sánchez-Gras y col. (1988). Estos investigadores estudiaron el efecto de la espermidina sobre la

inducción de callos de *Sideritis angustifolia*, en presencia o ausencia de auxinas (ANA y AIA) y citoquininas (BA). En sus condiciones experimentales, el tratamiento con espermidina no reemplaza los efectos de dichos reguladores necesarios para la inducción del crecimiento. Además, cuando esta poliamina fue ensayada en combinación con ANA, AIA o BA, afectaba negativamente al crecimiento óptimo inducido por estas sustancias.

En sentido contrario se expresan los resultados obtenidos por otros autores. Así, Bagni y col., (1981) observan que la aplicación de putrescina, cadaverina, espermidina y espermina a concentraciones de 10^{-5} M, sustituía el efecto producido por el AIA sobre el crecimiento en tubérculos en reposo de *Helianthus tuberosus*.

Los datos bibliográficos existentes establecen una amplia variabilidad de efectos fisiológicos para las poliaminas en función de la especie vegetal, del grado de desarrollo y su estado fisiológico, de las características de los tejidos y la naturaleza de los procesos de desarrollo. Sobre este particular, Costa y Bagni (1983) en frutos de manzano de la variedad "*Ruby Spur*", han constatado que la aplicación de putrescina, espermidina y espermina incrementa el crecimiento del fruto cuando éstas sustancias son aplicadas en la etapa de división celular, pero no en las fases de alargamiento celular. Sin embargo, en manzanas de la variedad "*Golden Delicious*", la aplicación exógena de poliaminas es incapaz de estimular la división celular (Miller y col., 1988).

En base a los argumentos expuestos, la falta de respuesta de los tejidos a la aplicación exógena de las poliaminas habría que circunscribirla exclusivamente al estadio fisiológico en el que se realizaron los tratamientos. Una de las razones utilizadas por diversos autores (Miller y col., 1988 y Rastogi y col., 1990), para explicar la inhibición del crecimiento frente a los tratamientos con poliaminas lo atribuyen a un exceso en la acumulación de estas sustancias previo a los tratamientos o inmediatamente después, a riesgo de sobrepasarse el umbral fisiológico óptimo. En *Helianthus tuberosus*, el tratamiento con poliaminas sólo es efectivo sobre el crecimiento cuando el nivel endógeno de poliaminas es bajo (Bagni y col., 1981).

En nuestro caso particular, por investigaciones paralelas al presente trabajo en las que se ha estudiado la evolución de los contenidos endógenos de poliaminas en condiciones de campo, hemos podido constatar que los tejidos de la pulpa presentan sus niveles mas altos de espermidina, precisamente, en las etapas previas a la antesis de la flor, estadio que hemos tomado como punto de partida para la realización de este estudio.

CAPITULO: 2

2. ESTUDIOS DE CORRELACION ENTRE EL CONTENIDO ENDOGENO DE POLIAMINAS Y EL CRECIMIENTO “IN VITRO” DE LOS TEJIDOS.

Como ha quedado reflejado en la Introducción de esta Memoria y en el apartado de Métodos, los tejidos del ovario de la platanera requieren para su desarrollo “in vitro” en condiciones óptimas, un aporte exógeno de sustancias hormonales, siendo la asociación **2,4-D** (0.1 mg/l)/**BA** (1 mg/l), la mas favorable entre diversas combinaciones ensayadas.

En el presente capítulo pretendemos investigar la cinética de crecimiento de los tejidos y la posible interrelación que pudiera existir entre los reguladores citados, la acumulación de poliaminas y el crecimiento. Para este fin, se procede a cultivar “in vitro” discos de ovario en ausencia (*medio cero*) y en presencia de 2,4-D/BA (*medio óptimo*) por un periodo de tiempo de 50-60 días.

2.1. Crecimiento:

En la Fig. 8., se muestra el crecimiento de la pulpa en discos de ovario cultivados sobre un medio cero (*sin reguladores*) y el medio hormonal indicado (*medio óptimo*). En presencia de reguladores, la cinética de crecimiento de los tejidos describe una curva sigmoideal con tres etapas diferenciadas: una fase inicial de crecimiento relativamente lento con una duración aproximada entre 10 y 15 días; una etapa posterior de crecimiento exponencial que se prolonga hasta los 45 días aproximadamente, y una última etapa de crecimiento estacionario. Es de destacar el perfil de crecimiento prácticamente plano mostrado por los tejidos en ausencia de reguladores.

2.2. Contenido endógeno de poliaminas:

Como se observa en la Fig. 9., en presencia de los reguladores, las etapas iniciales del crecimiento se caracterizan por una síntesis muy activa de poliaminas, en especial **putrescina** y **espermidina**, las cuales exhiben perfiles cinéticos diferentes. Ambas sustancias aumentan su concentración durante los primeros 10 días coincidiendo con el periodo de crecimiento mas lento en el que presumiblemente dominan las divisiones celulares.

A partir de los 10-15 días, paralelamente al incremento en la tasa de crecimiento de los tejidos, se observa un comportamiento antagónico entre ambas sustancias, es decir, un descenso en la concentración de espermidina frente a un aumento en la de putrescina; esta última, muestra un segundo pico hacia los 35 días simultáneo con la disminución o interrupción del crecimiento (fase estacionaria). Superado este periodo se observa un descenso brusco en la concentración de putrescina.

El nivel endógeno de **espermina** sigue un perfil similar al de la espermidina, aunque a concentraciones mucho más bajas.

La Fig. 10., muestra los resultados del análisis de poliaminas en los cultivos con y sin aporte hormonal. Se constata que la ausencia de los reguladores determina siempre una mayor acumulación de putrescina, espermidina y espermina respecto a medios de cultivo suplementados con 2,4-D/BA.

La relación **Put/Spd** (Fig. 11) valorada por algunos autores como un indicador de la existencia de eventos de división y alargamiento celular, sigue un trazado similar al del crecimiento, incrementándose a medida que aumenta el desarrollo de los tejidos.

Por otra parte la relación Put/Spd en los cultivos que se han mantenido en un medio sin reguladores es superior durante los primeros días de cultivo, y cambia de manera brusca a partir de los 21-28 días, a favor de los discos

tratados hormonalmente (Tablas 6 y 7). El salto brusco en los valores absolutos de la relación Put/Spd entre la 3^a y 4^a semana del cultivo puede ser interpretada como un cambio en las características del crecimiento y desarrollo de los tejidos.

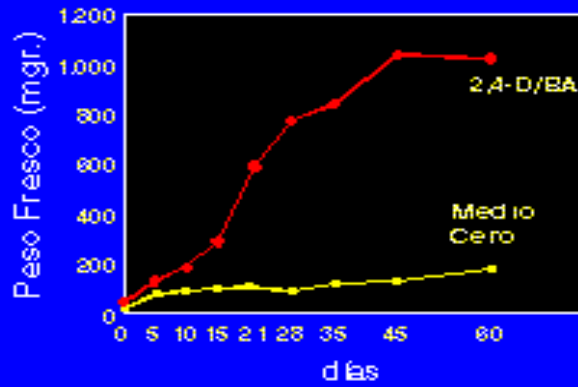


Fig. 8

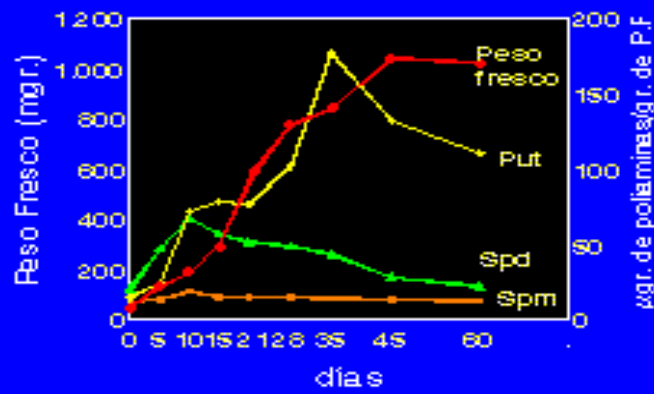


Fig. 9

Fig. 8. Cinética de crecimiento de los tejidos de la pulpa cultivados en un medio óptimo (con 2,4-D/BA) y en un medio cero (sin reguladores).

Fig. 9. Cinética de crecimiento y variación del contenido endógeno de putrescina, espermidina y espermina de los tejidos de la pulpa cultivados durante 60 días en un medio óptimo.

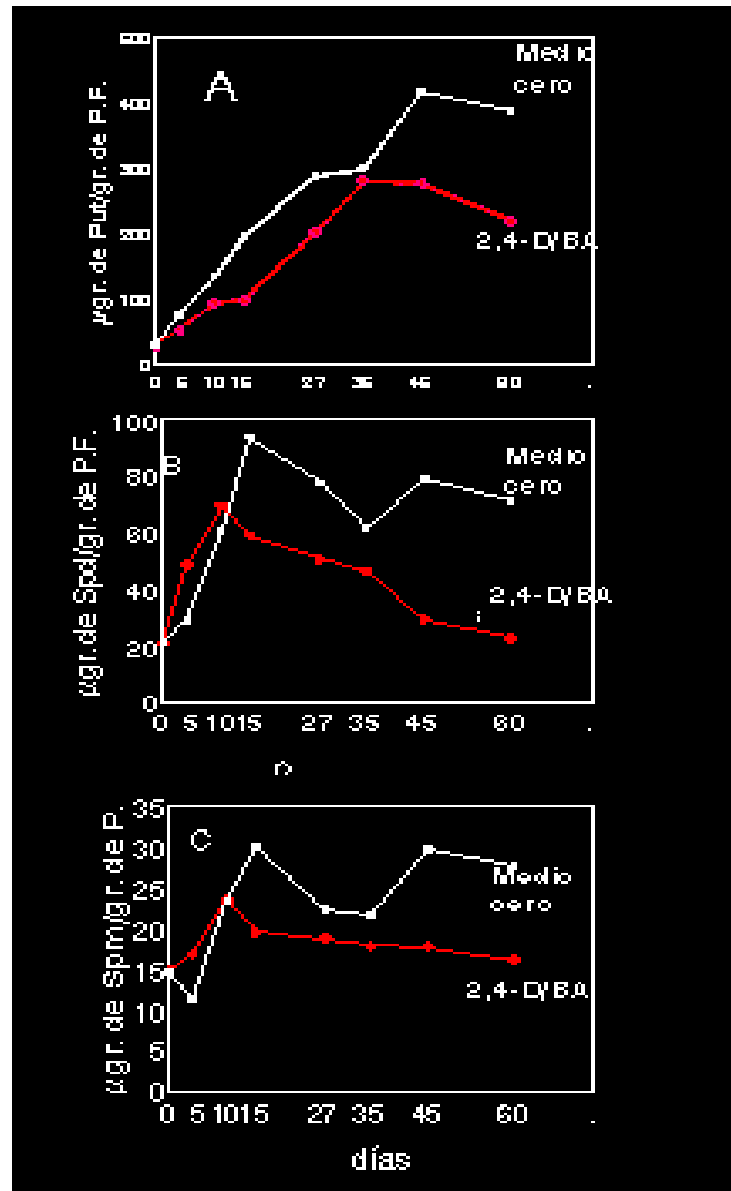


Fig. 10. Cambios en los niveles endógenos de putrescina (A), espermidina (B) y espermina (C) en los tejidos de la pulpa cultivados durante 60 días en presencia (2,4-D/BA) o en ausencia de reguladores (*medio cero*).

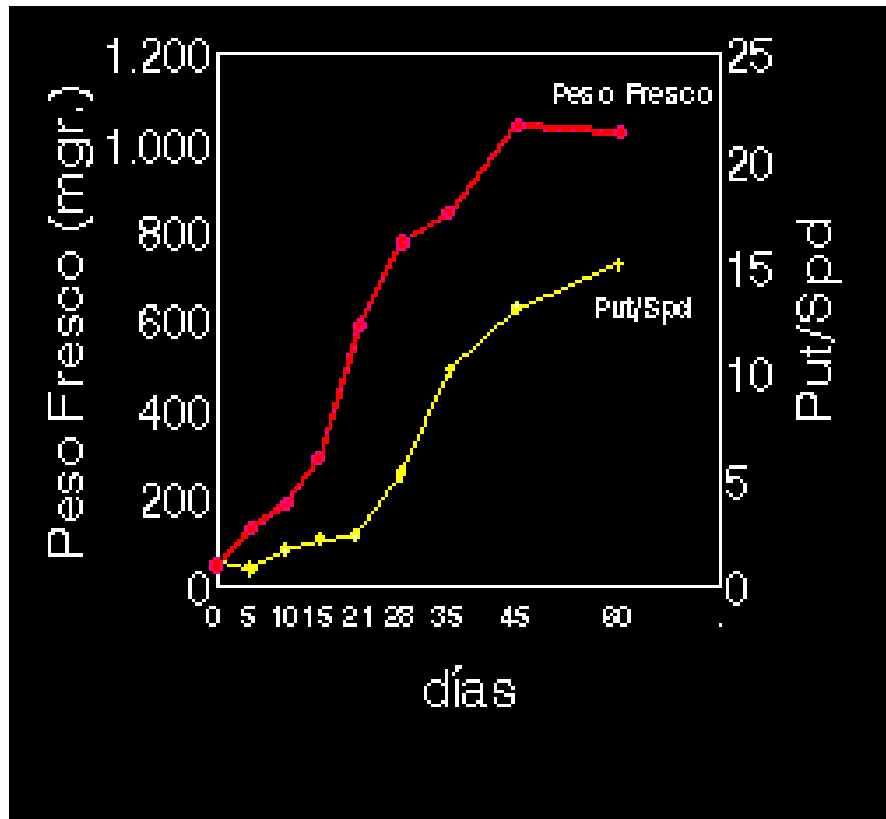


Fig. 11. Cinética de crecimiento y relación Put/Spd de los tejidos de la pulpa cultivados en un medio óptimo (2,4-D/BA).

	días de cultivo								
	0	5	9	14	21	28	35	42	49
medio cero	0.03	2.18	2.85	3.9	5.11	6.42	8.6	9.2	10.3
2,4-D/BA	0.03	1.5	2.77	2.74	3.2	8.08	9.88	10.1	12.3
discos iniciados en medio cero y transferidos a 2,4-D/BA									
T-5 días		2.18	1.87	2.93	3.84	7.78	8.27	12.0	10.4
T-9 días			2.85	3.26	3.34	6.24	7.71	10.5	11.1
T-14 días				3.9	3.67	4.5	8.0	9.69	11.5
T-21 días					5.11	6.45	5.92	6.2	6.57

Tabla 6. Relación Put/Spd en tejidos de la pulpa cultivados en un medio sin reguladores del crecimiento y transferidos a los 5, 9, 14 y 21 días respectivamente a medios frescos con hormonal (2,4-D/BA).

	días de cultivo								
	0	5	10	15	21	28	35	45	60
medio cero	1.36	1.54	2.99	3.66	5.61	6.39	8.88	9.49	8.94
2,4-D/BA	1.36	0.61	1.47	2.09	1.97	5.37	9.81	11.8	13.2
discos iniciados en un medio con 2,4-D/BA y transferidos a medio cero									
T-5 días		0.61	1.71	3.08	3.67	8.63	9.14	10.1	6.52
T-10 días			1.47	2.62	6.46	8.94	10.6	9.04	11.6
T-15 días				2.09	5.76	13.5	10.6	17.5	13.9
T-25 días							18.1	14.1	11.5

Tabla 7. Relación Put/Spd en cultivos iniciados en un medio con reguladores de crecimiento y transferidos a los 5, 10, 15 y 25 días respectivamente a medios frescos sin reguladores (*medio cero*).

2.3. ACCION TEMPORAL DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO SOBRE EL DESARROLLO DE LA PULPA.

Como ha quedado expuesto, el desarrollo óptimo de los tejidos del fruto está condicionado por la presencia de reguladores en el medio de cultivo; sin embargo, desconocemos 1) si esta necesidad se manifiesta por igual durante todo el periodo de cultivo, 2) si existe un umbral de tiempo mínimo para disparar el crecimiento de los tejidos, y 3) si el aporte de estas sustancias tiene las mismas consecuencias para el desarrollo durante las etapas iniciales en las que presumiblemente dominarían los acontecimientos de división celular o, si por el contrario, su acción es mas notoria en las etapas posteriores de alargamiento celular.

Los resultados anteriormente expuestos revelan que la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (*medio cero*) produce una mayor acumulación de poliaminas en los tejidos respecto al medio con 2,4-D/BA (*medio óptimo*), aunque desconocemos si este comportamiento se mantiene por igual cuando los tratamientos hormonales se realizan en periodos cortos de duración variable, en etapas iniciales o mas avanzadas durante el desarrollo de los tejidos.

Al objeto de aclarar éstas y otras incógnitas que se nos plantean en el conocimiento de los mecanismos de control hormonal del desarrollo del fruto y la posible implicación fisiológica de las poliaminas, se proponen las siguientes alternativas experimentales:

- 1) Tratamiento hormonal en la fase inicial del desarrollo de los tejidos.

Se procede a cultivar "in vitro" distintos lotes de discos de ovario sobre un medio óptimo con 2,4-D/BA en periodos de duración variable (5, 10, 15 y 25 días) tras lo cual se transfieren a medios frescos sin reguladores (*medio cero*). Se incluyen controles sin transferir y otros en que la

transferencia se lleva a cabo sobre un medio de igual composición con el fin de evaluar la posible contribución que va a significar la renovación del medio en sus distintos componentes (hormonas, sales minerales y compuestos orgánicos).

2) Tratamiento hormonal en estadios no iniciales del desarrollo de los tejidos.

Se procede a cultivar “in vitro” distintos lotes de discos de ovario sobre un medio sin reguladores (*medio cero*) y posterior transferencia a medios hormonales a los 5, 9, 14 y 21 días respectivamente.

2.3.1. Tratamiento hormonal en los estadios iniciales del desarrollo de los tejidos.

En la Fig. 12 A., se representa la cinética de crecimiento de los tejidos de la pulpa en discos que han estado expuestos a la acción hormonal durante 5 días previo a su transferencia a los nuevos medios con y sin reguladores.

Tal como podemos constatar, la transferencia a un nuevo medio de cultivo suplementado con 2,4-D/BA determina un incremento generalizado en contenido de materia fresca con respecto a los controles no transferidos (*cultivo continuo*) que alcanza su valor máximo a los 45 días de cultivo (36% de incremento). (Tabla 8).

Por el contrario, la transferencia a un nuevo medio sin el aporte hormonal induce en los tejidos una fuerte inhibición (53% en igual periodo). La inhibición es aún mayor (59%) si se toma como referencia el crecimiento de los tejidos en los discos transferidos a los medios suplementados con 2,4-D/BA (Tabla 8).

Las Fig. 12 A y B, muestran las variaciones en el contenido endógeno para la putrescina y espermidina, respectivamente, en las condiciones experimentales anteriores. Los resultados revelan un aumento apreciable en los niveles endógenos de ambas sustancias respecto al control desde el mismo

instante en que se suprime el aporte de sustancias hormonales. Sin embargo, cuando la transferencia se realiza sobre un medio con 2,4-D/BA se produce una respuesta contraria, con disminución de la concentración, especialmente relevante en el caso de la putrescina (Fig. 12 A).

Cultivo inicial en medios con 2,4-D/BA (días)	Transfer a un medio sin reguladores (mg)	Transfer a un medio con 2,4-D/BA (mg)
5	486 f	1413 a
10	772 e	1162 b
15	910 d	1113 bc
25	1046 c	1135 bc
Cultivo continuo		
Medio cero (mg)		Medio con 2,4-D/BA (mg)
333 g		1040 c

Tabla 8. Crecimiento de la pulpa (mg. peso fresco) en discos que han sido expuestos a la acción hormonal durante periodos de tiempo variable (5, 10, 15 y 25 días) antes de ser transferidos a nuevos medios con o sin reguladores. Se comparan estadísticamente los resultados mediante el test de Duncan. Los valores seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas ($p= 0.01$).

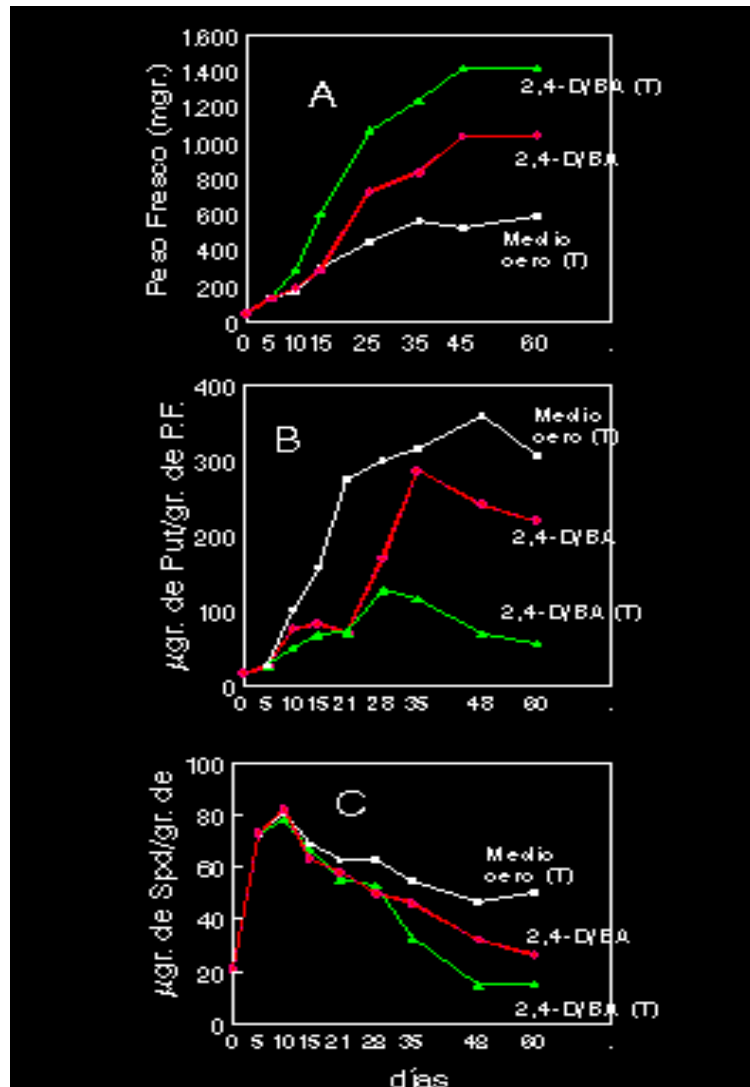


Fig. 12. Cinéticas de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en tejidos de la pulpa expuestos durante 5 días a la acción de los reguladores de crecimiento y posteriormente transferidos a nuevos medios, ya sea con igual composición (2,4-D/BA-T) o sin hormonas (medio cero-T). La condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en el mismo medio.

Los resultados representados en la Fig. 13., hacen referencia a la respuesta de los discos expuestos a la acción hormonal durante 10 días. El crecimiento de la pulpa sigue una pauta similar con respecto al análisis anterior, aunque los porcentajes de estimulación e inhibición son sensiblemente inferiores (Tabla 8). La estimulación del crecimiento en los discos transferidos a 2,4-D/BA con respecto al control en cultivo continuo alcanza un 12%, mientras que los discos transferidos a un medio sin reguladores muestran una inhibición del 26%, siendo aún mayor (34%) si se compara con los discos transferidos a un medio suplementado con reguladores.

Al igual que en el caso anterior, dicha estimulación o inhibición del crecimiento va acompañada por un descenso o aumento, respectivamente, de los niveles endógenos de poliaminas (Fig. 13B y C).

A medida que se prolonga el periodo inicial de exposición a los reguladores, los nuevos aportes hormonales asociados a la renovación de los medios de cultivo, ejercen una influencia sobre el crecimiento que tiende a minimizarse con el tiempo, si bien, su presencia en el medio sigue siendo necesaria para obtener un crecimiento equiparable al observado en la condición control (*cultivo continuo con 2,4-D/BA*). Como se aprecia en la Fig. 14A., y en la Tabla 8., tras un periodo mínimo de 15 días de exposición hormonal no se producen diferencias significativas en el crecimiento de los tejidos por efecto de la renovación del medio de cultivo. Sin embargo, la eliminación de los reguladores supone aún una pequeña inhibición del crecimiento en torno al 12%, no observable cuando el tratamiento hormonal se ha prolongado por espacio de 25 días.

Los niveles endógenos de poliaminas evolucionan de forma similar a lo observado en periodos de exposición mas breve a la acción de los reguladores (Fig. 14B y C). El contenido endógeno de putrescina presenta una escasa diferencia entre discos mantenidos en cultivo continuo y los transferidos a un nuevo medio con reguladores (*2.4-D/BA-T*). Sí se observan, en cambio, diferencias cuando los cultivos son desprovistos de los reguladores (Fig. 14B).

La relación Put/Spd (Tabla 6) aumenta a medida que transcurre el tiempo de cultivo en todas las condiciones estudiadas. Cuando los cultivos son transferidos, la presencia de reguladores en el medio disminuye dicha relación en los días posteriores al transfer con respecto a los cultivos donde dichos reguladores están ausentes.

2.3.2. Tratamiento hormonal en estadios no iniciales del desarrollo de los tejidos.

A la vista de los resultados anteriores se nos plantean varias incógnitas:

1. ¿Qué ocurriría si los tejidos son expuestos a un medio de cultivo sin reguladores durante periodos de tiempo variable y posteriormente se les transfiere a un nuevo medio con reguladores?
2. ¿Existe posibilidad de recuperación del crecimiento tras la incorporación de los reguladores o se pierde esta capacidad con el tiempo?

En el siguiente experimento se analizan los resultados en cuanto a crecimiento y acumulación de poliaminas en los tejidos de la pulpa, tras haber cultivado los discos de ovario en medios desprovistos de reguladores (*medio cero*) durante periodos de tiempo variable (5, 9, 14 y 21 días) y posteriormente transferirlos a medios con 2,4-D/BA. Los resultados de este estudio se representan en las Fig. 15-18 y en la Tabla 9.

Tal como se puede observar en las Fig. 15-18 A, la presencia de reguladores en el medio de cultivo desencadena el crecimiento de los tejidos de manera inmediata, si bien, a medida que transcurre el tiempo la capacidad de recuperación del crecimiento disminuye notablemente. Tras 21 días sin aporte hormonal alguno, los tejidos pierden casi por completo su capacidad de

respuesta y recuperación del crecimiento (Fig. 18A). El crecimiento alcanzado por la pulpa en los discos transferidos a los 5 días no presenta diferencias significativas con respecto al control en cultivo continuo con 2,4-D/BA. Sin embargo, cuando el transfer se realizó a los 9 y 14 días, la inhibición del crecimiento alcanzó valores de 27% y 49% respectivamente (Tabla 9).

La estimulación del crecimiento aparece asociada a un descenso generalizado en el contenido endógeno de putrescina inmediatamente después de la incorporación de los reguladores (Figs. 15-18 B).

De igual manera ocurre cuando analizamos el contenido en espermidina, observándose un descenso de su contenido en todos los cultivos transferidos (Figs. 15-18 C), especialmente patente a partir de los 28 días de cultivo.

En cuanto a la relación **Put/Spd**, se observa una disminución en los días siguientes al transfer con respecto a los cultivos que se mantienen en cultivo continuo sin el aporte hormonal, aunque en las últimas semanas de cultivo dicha relación es superior en los cultivos transferidos, posiblemente debido al descenso en el contenido en espermidina (Tabla 6).

Los resultados de este estudio (apartado 2.3) en su conjunto revelan la existencia de una relación inversa entre el crecimiento y la acumulación de poliaminas. Las condiciones menos favorables para el crecimiento de los tejidos (*ausencia de reguladores*) se corresponden con niveles altos de poliaminas y viceversa. Asimismo, se refleja el requisito imprescindible de un aporte hormonal, especialmente crítico durante las primeras etapas del crecimiento coincidiendo con la fase supuestamente mas activa de divisiones celulares.

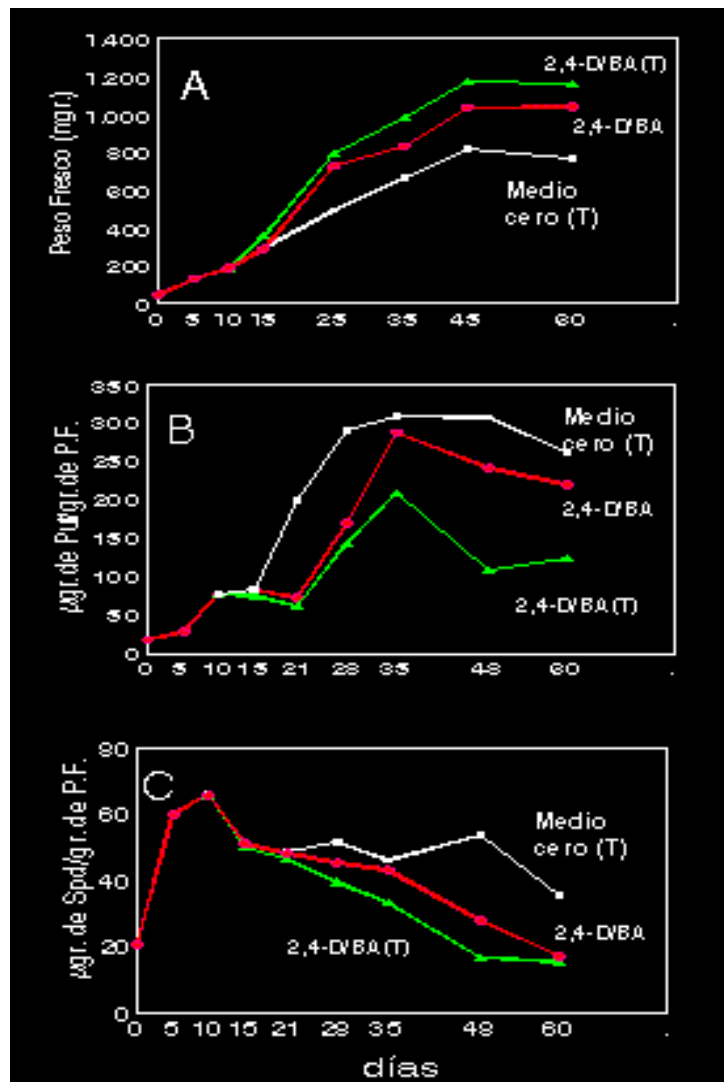


Fig. 13. Cinéticas de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en tejidos de la pulpa expuestos durante 10 días a la acción de los reguladores de crecimiento y posteriormente transferidos a nuevos medios, ya sea con igual composición (2,4-D/BA-T) o sin hormonas (*medio cero-T*). La condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en el mismo medio.

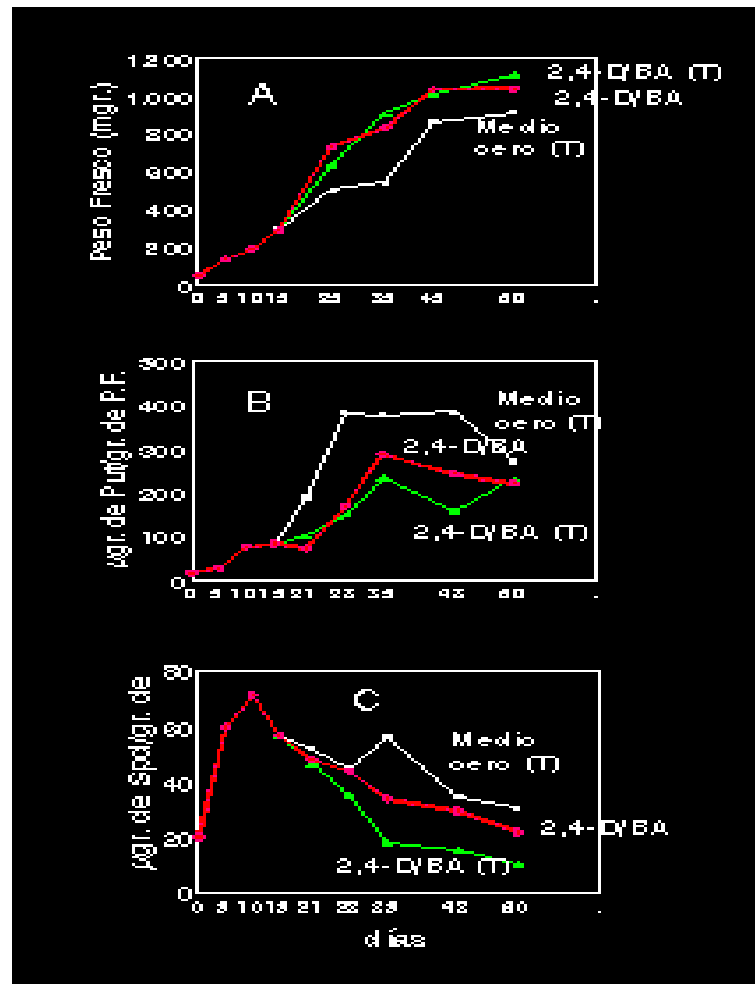


Fig. 14. Cinéticas de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en tejidos de la pulpa expuestos durante 15 días a la acción de los reguladores de crecimiento y posteriormente transferidos a nuevos medios, ya sea con igual composición (2,4-D/BA-T) o sin hormonas (medio cero-T). La condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en el mismo medio.

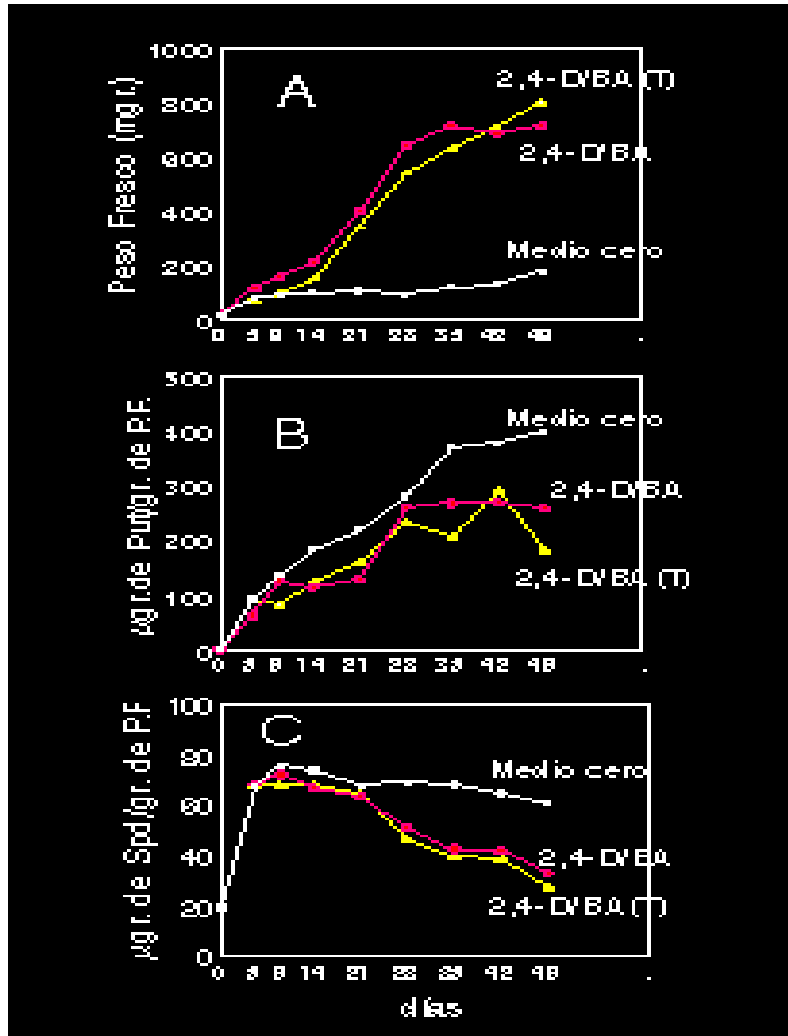


Fig. 15. Cinética de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en los tejidos de la pulpa expuestos durante **5 días** a un medio sin reguladores de crecimiento (*medio cero*) y transferidos a un medio con reguladores (2,4-D/BA-T). La condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en un medio con reguladores de crecimiento.

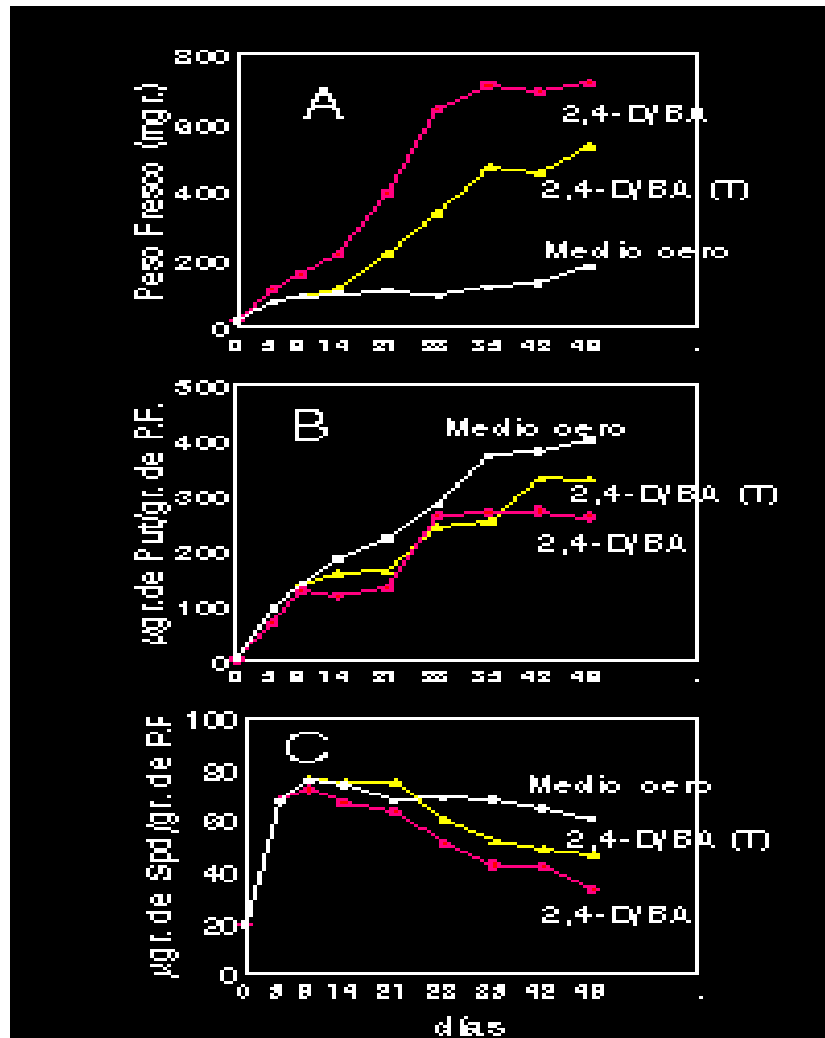


Fig. 16. Cinética de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en los tejidos de la pulpa expuestos durante 9 días a un medio sin reguladores de crecimiento (*medio cero*) y transferidos a un medio con reguladores (2,4-D/BA-T). La condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en un medio con reguladores de crecimiento.

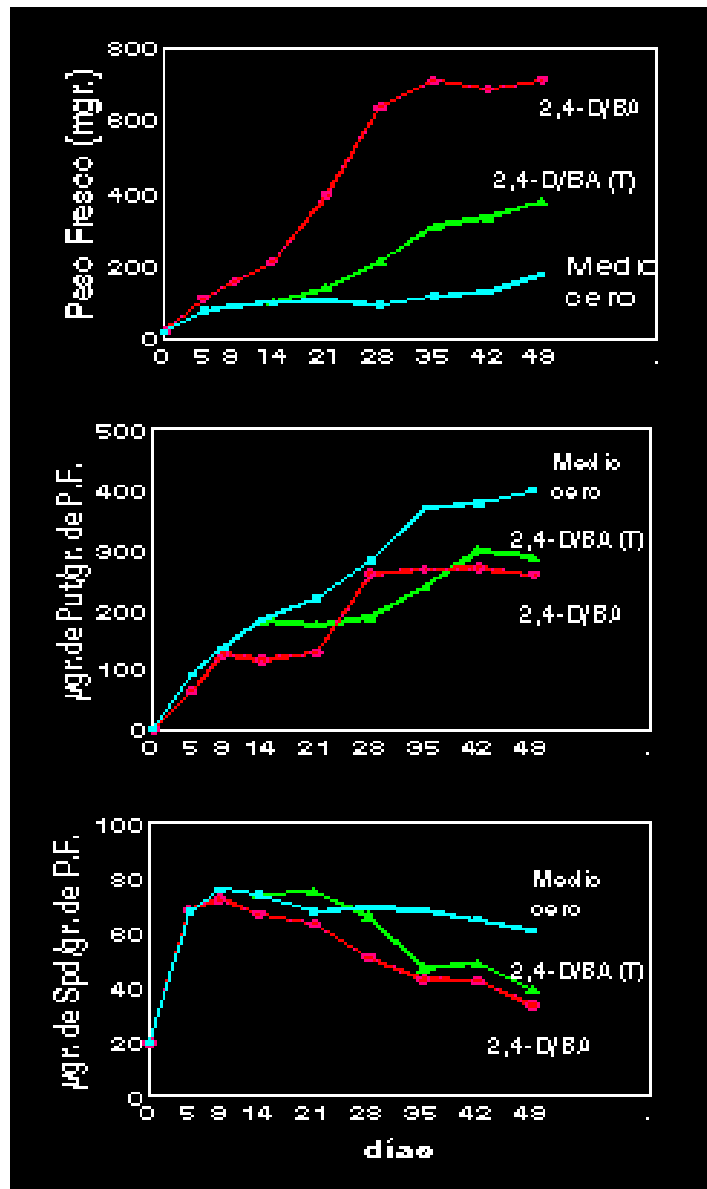


Fig. 17. Cinética de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en los tejidos de la pulpa expuestos durante 14 días a un medio sin reguladores de crecimiento (*medio cero*) y transferidos a un medio con reguladores (2,4-D/BA-T). La

condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en un medio con reguladores de crecimiento.

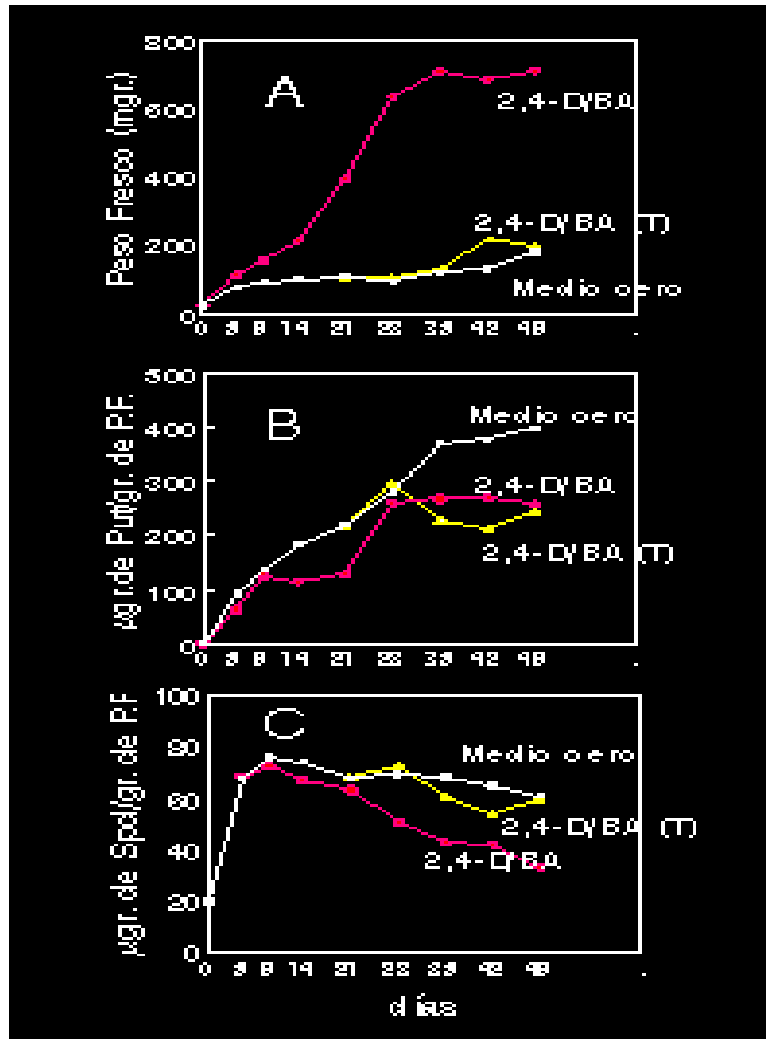


Fig. 18. Cinética de crecimiento (A) y acumulación de putrescina (B) y espermidina (C) en los tejidos de la pulpa expuestos durante 21 días a un medio sin reguladores de crecimiento (*medio cero*) y transferidos a un medio con reguladores (2,4-D/BA-T). La

condición 2,4-D/BA hace referencia a los discos que se han mantenido durante todo el periodo de cultivo en un medio con reguladores de crecimiento.

Cultivo inicial en un medio sin reguladores (días)	Transfer a un medio con 2,4-D/BA (mg)
5	831 a
9	540 b
14	379 c
21	195 d
Cultivo continuo	
Medio cero (mg)	Medio con 2,4-D/BA (mg)
186 d	737 a

Tabla 9. Crecimiento de la pulpa (mg. peso fresco) en discos que han sido cultivados durante un periodo de tiempo variable sobre un medio sin reguladores y posteriormente se transfirieron a nuevos medios con 2,4-D/BA. Se comparan estadísticamente los resultados mediante el test de Duncan. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente ($p= 0.01$).

2.4. Discusión

Los resultados del presente capítulo corroboran claramente que los tejidos de la pulpa pueden desarrollarse “in vitro” sobre un medio de cultivo óptimo suplementado con sustancias reguladoras de crecimiento (Lorenzo-Martín, 1985). En estas condiciones, la cinética de crecimiento se adapta a un modelo sigmoideal con tres fases diferenciadas que concuerda, a grandes rasgos, con las observaciones de otros autores en referencia al desarrollo del fruto de la platanera (Mohan Ram y col., 1962; Lassoudiere, 1978; Soto, 1990), los cuales describen la existencia de varias etapas caracterizadas por una sucesión de procesos de división celular, alargamiento celular, maduración y senescencia, si bien, la cronología del desarrollo en condiciones de campo es diferente.

Existen gran cantidad de evidencias que apoyan la hipótesis de que el crecimiento del fruto está controlado por una sucesión de estímulos de naturaleza hormonal cuyo origen puede ser muy diverso (óvulos, semillas, estructuras vegetativas de la planta, etc.), en el que estarían involucrados los distintos tipos de hormonas conocidas (auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico). Estas sustancias ejercen una acción pleiotrópica sobre los diversos acontecimientos fisiológicos que tienen lugar en la vida de cualquier fruto. Los cambios cualitativos y cuantitativos entre estas sustancias y, las variaciones en la sensibilidad de los tejidos a ellas, constituyen el eje fundamental sobre el que se sustentan los distintos modelos teóricos que tratan de dar explicación al complejo esquema del desarrollo del fruto. En alguno de estos modelos se ha propuesto la mediación de las poliaminas (Galston, 1983; Evans y Malmberg, 1989, Bagni, 1989; Altman, 1989). Numerosas investigaciones han demostrado que la administración de cualquiera de las hormonas estimulantes del crecimiento, a tejidos específicos, da como resultado un incremento en los niveles de poliaminas y sus enzimas biosintéticos (Tiburcio y col., 1993b).

Con carácter general, las poliaminas han sido relacionadas con numerosos procesos del crecimiento y desarrollo tales como la división y el alargamiento celular, el desarrollo de la flor y el fruto, la senescencia, etc. (Evans y Malmberg, 1989; Bagni, 1989, Tiburcio y col., 1990). En frutos como la manzana

(Biasi y col., 1991), tomate (Heimer y col., 1979), naranjas mandarinas (Nathan y col., 1984), y tabaco (Slocum y Galston, 1985a), los niveles endógenos de poliaminas son altos al comienzo del desarrollo del fruto coincidiendo con estadios de una alta actividad mitótica.

En el fruto de la platanera, la presencia de poliaminas ha sido constatada por investigaciones paralelas al presente trabajo, observándose cambios en su contenido endógeno a lo largo de las distintas etapas de su desarrollo (Siverio-Grillo, 1994). Niveles altos de poliaminas libres se han encontrado durante la fase inicial de crecimiento, etapa que coincide con un periodo de intensa actividad metabólica y múltiples divisiones celulares a nivel de los tejidos de la pulpa, según se demuestra por un extraordinario incremento en la concentración de proteínas y ADN.

Estas observaciones parecen apoyar la hipótesis defendida por muchos investigadores en el campo de las poliaminas de que elevadas concentraciones de estas aminas parecen estar asociados a procesos de división celular (Kaur-Sawhney y Applewhite, 1993; Evans y Malmberg, 1989; Bachrach y Heimer, 1989).

Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran una síntesis muy activa de putrescina y espermidina a lo largo de todo el periodo de cultivo, aunque sus patrones cinéticos presentan cierto antagonismo. Ambas sustancias aumentan su concentración durante los primeros 10 días, coincidiendo con una primera etapa de crecimiento de los tejidos, donde presuntamente tiene lugar una alta actividad mitótica. A partir de ese momento, 10-15 días, la concentración de espermidina disminuye, no así la putrescina, la cual aumenta aún más su concentración a partir de la tercera semana hasta alcanzar su nivel más alto hacia los 35 días.

Es conocido que altos niveles de espermidina son típicos de zonas meristemáticas y tejidos sin alargamiento celular, lo que podría explicar la existencia de los mayores niveles de esta poliamina es los estadios iniciales. El incremento posterior de putrescina, hasta los 35 días, podría estar relacionado

con los procesos de alargamiento celular, ya que el contenido endógeno en esta amina parece incrementarse en esta fase (Galston, 1983; Galston y Flores, 1991; Martín-Tanguy y Carre, 1993). El descenso en el contenido endógeno en putrescina en la etapa final de crecimiento podría estar asociado a fenómenos de maduración celular y senescencia, incluyendo la expansión de la pared celular, proceso que parece inducir un descenso en el contenido endógeno en esta sustancia (Phillips y col. 1987, 1988).

En algunos sistemas vegetales la relación Put/Spd varía en función de la actividad mitótica de los tejidos. Así, en tejidos de raíz de maíz, un valor bajo en la relación Put/Spd es característico de la zona apical con una actividad mitótica elevada, mientras en zonas subapicales de elongación y diferenciación se observa un nivel mas alto (Dumortier y col, 1983; Gamarnik y Frydman, 1991).

De acuerdo con la idea anterior, la baja tasa de Put/Spd encontrada en los tejidos del ovario al inicio del cultivo y su posterior incremento, podría ser explicado por la existencia de una etapa inicial de gran actividad mitótica previa a una etapa posterior donde el alargamiento celular adquiere un mayor protagonismo. Igualmente, cuando los cultivos son transferidos desde un medio sin aporte hormonal y crecimiento nulo, a un nuevo medio suplementado con 2,4-D/BA, se aprecia un descenso en dicha relación correlacionado con una estimulación del crecimiento

Los resultados obtenidos en un medio óptimo de crecimiento parecen seguir la tónica general observada en otros sistemas vegetales, donde los tejidos con una gran actividad de crecimiento presentan contenidos altos en poliaminas, al contrario de otros tejidos con poca actividad, los cuales presentan bajos niveles en estas sustancias (Slocum y col., 1984).

Basándonos en estas observaciones, cabría esperar de aquellos tejidos que se desarrollan en un medio sin reguladores (medio cero), donde el crecimiento es prácticamente nulo, que presenten niveles endógenos de poliaminas inferiores a los cultivos que se desarrollan en un medio óptimo. Los resultados del análisis nos revelan, sin embargo, una relación inversa entre crecimiento y acumulación de poliaminas. Las condiciones menos favorables

para el crecimiento (ausencia de reguladores), se corresponden con niveles mas altos de poliaminas y viceversa. ¿Cómo explicar esta acumulación de poliaminas en unos tejidos donde el crecimiento es inhibido?.

Es conocido que la acumulación de poliaminas en ciertos tejidos vegetales, no solamente está relacionado con procesos de crecimiento, sino que también puede estar asociado a una amplia variedad de condiciones de estrés. Se ha observado que los niveles de putrescina aumentan en plantas sometidas a condiciones de deficiencia en potasio y magnesio (Basso y Smith; 1974), estrés osmótico (Flores, 1990), estrés ácido (Smith, 1983; Smith y Sinclair, 1967; Young y Galston, 1983), altas concentraciones de amonio (Le Redulier y Goas, 1975; Preibe y col., 1978; Tonin y col., 1991).

La acumulación de poliaminas en los tejidos cultivados en un medio cero podría ser consecuencia del estrés producido por las condiciones poco favorables para su desarrollo a que son sometidos dichos tejidos en un medio con niveles salinos relativamente altos. Sin embargo, se desconoce si esta acumulación de putrescina es debida a una reacción de tipo protector para los tejidos de la planta, integrada en un mecanismo de defensa frente al estrés, o bien es una respuesta metabólica que produce efectos tóxicos para los tejidos (Masgrau y col., 1996). Algunos investigadores han sugerido que la acumulación de putrescina como respuesta a altos niveles del ion amonio podría ser una respuesta a la producción de H^+ que se generan durante la asimilación de NH_4^+ (Smith y Sinclair, 1967; Young y Galston, 1983; Galston y Kaur-Sawhney, 1987; Flores y col., 1989) ya que su naturaleza policatiónica parece proveer a la planta de cierta capacidad para regular su medio intracelular (Altman y Levin, 1993). Para otros investigadores (Strogonov y col. 1972) el estrés producido por las altas concentraciones salinas podría incrementar la fuerza iónica intracelular a un nivel en el cual la actividad *diamina oxidasa* (DAO) pudiera ser inhibida y, simultáneamente, se liberaría putrescina y cadaverina desde componentes intracelulares. Esta acumulación consiguiente de putrescina podría tener consecuencias tóxicas para las células y tejidos causando daño a nivel de las membranas (Di Tomaso y col., 1989).

Esta acumulación de poliaminas, principalmente putrescina, podría estar asociada a un bloqueo en su metabolismo, a una reducción en su tasa de degradación y/o bien a una estimulación de su síntesis.

Se ha demostrado que la regulación del metabolismo de las poliaminas por estrés se realiza principalmente a nivel de la enzima ADC. Así, por ejemplo, en plántulas de avena se ha observado un rápido incremento en la actividad ADC como respuesta a una deficiencia en K^+ (Young y Galston, 1984). Por otro lado, la acumulación de putrescina en hojas de avena sometidas a estrés osmótico es el resultado no solo de una activación de la ADC, sino también consecuencia de un descenso en la *actividad espermidina sintasa* (Tiburcio y col., 1993c).

Por otra parte se ha constatado que la actividad DAO está altamente influenciada por muchos factores hormonales y ambientales, tales como el 2,4-D y el GA_3 y la luz (Federico y Angeline., 1991). En este sentido, tratamientos con giberelinas a semillas de guisante durante la imbibición incrementa la actividad DAO en los cotiledones (Srivastava y col., 1977). En *Helianthus tuberosus* la presencia de actividad DAO se puso de manifiesto en rodajas de tubérculos durante el comienzo del ciclo celular inducido por la aplicación de 2,4-D, e igualmente durante la primera fase de la formación de tubérculos. En particular, durante el ciclo celular, se observó un paralelismo entre la actividad DAO y las enzimas implicadas en la biosíntesis de putrescina, sugiriéndose un posible papel para esta enzima en el control de los niveles endógenos de poliaminas, así como en los procesos de crecimiento. En estos tejidos, la actividad DAO parece estar correlacionada con estados fisiológicos que se caracterizan por un intenso metabolismo, momentos de gran actividad mitótica y durante los periodos de alargamiento celular que preceden a la entrada en reposo de dichos tejidos (Torrighiani y col., 1989).

Nuestros resultados muestran en su conjunto una correlación entre la estimulación del crecimiento y el descenso en el contenido endógeno en poliaminas, situación que se manifiesta cuando los tejidos mantenidos en un medio cero son transferidos a un medio suplementado con 2,4-D/BA, o cuando

se da la situación contraria, transferencia desde un medio de cultivo con contenido hormonal a un medio cero.

CAPITULO: 3

LOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE POLIAMINAS Y SU REPERCUSION EN EL DESARROLLO DE LOS TEJIDOS.

3. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE LA ESPERMIDINA Y LA ESPERMINA.

En experiencias anteriores hemos observado que los niveles mas altos de espermidina se correlacionan con estadios iniciales del crecimiento de la pulpa, periodo en que la actividad mitótica es supuestamente mayor y, descienden en etapas posteriores en los que predominan los acontecimiento de alargamiento celular.

Dado que los niveles de espermidina son igualmente elevados en las etapas iniciales del desarrollo del fruto de la platanera en condiciones naturales, según hemos podido constatar por investigaciones paralelas al presente trabajo (Siverio Grillo, 1994), hemos considerado conveniente investigar el papel de la espermidina sobre el desarrollo de los tejidos generadores de la pulpa, mediante el empleo de los inhibidores que bloqueen su biosíntesis. Con este procedimiento, al tiempo que se evalúa su repercusión sobre el desarrollo, analizaremos también la capacidad de atenuación o reversibilidad de las posibles alteraciones fisiológicas promovidas por el inhibidor, mediante su incorporación exógena.

Entre los diversos inhibidores citados en la bibliografía haremos uso de la Ciclohexilamina (**CHA**) y el Metilglioxal-*bis*-guanilhidrazona (**MGBG**), inhibidores que interfieren en la síntesis de espermidina bloqueando la *espermidina sintasa* y la *SAM descarboxilasa*, respectivamente. Ver capítulo de Introducción.

El estudio de los efectos fisiológicos de estas sustancias se ha desarrollado en varios niveles de actuación:

1. Realización de un test de la actividad de cada inhibidor sobre el crecimiento en función de la concentración.
2. Realización de un estudio cinético del crecimiento y de la acumulación de putrescina y espermidina en sus formas libre y conjugadas en los discos tratados con cada sustancia.
3. Aplicación exógena de la espermidina en combinación con los inhibidores, para estudiar reacciones de atenuación o reversión fisiológica.

3.1. Efecto de la aplicación exógena de CHA sobre el crecimiento.

En la Tabla 10 y la Fig. 19., se muestran los resultados de los tratamientos con CHA sobre el crecimiento de la pulpa en discos de ovario tras 60 días de cultivo utilizando diversas concentraciones del inhibidor, ya sea individualmente o asociado con la espermidina a la concentración 0.1 y 1 mM.

Como se puede apreciar CHA ejerce un potente efecto inhibidor sobre el crecimiento, tanto en términos de peso fresco como en peso seco, y en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Su actividad depende de la concentración y alcanza su grado máximo a 10 mM (88% de inhibición en peso fresco).

El tratamiento de espermidina en ausencia de CHA carece de efecto sobre el crecimiento a la dosis inferior (0.1 mM) (Fig. 19A), pero resulta inhibidora a la concentración 1 mM (Fig. 19B). La presencia de la espermidina conjuntamente con CHA repercute sobre el crecimiento en función de la concentración empleada. Mientras que la dosis mas baja (0.1 mM) no modifica los valores de inhibición de la CHA (Fig. 19A), usada a la concentración 1 mM

incrementa aún mas, y de manera significativa, el carácter inhibitor de la CHA (Fig. 19B).

Por lo que respecta al estudio cinético del crecimiento (Fig. 20) en discos tratados con CHA (1 mM) tanto de manera aislada como asociada a la espermidina (1 mM), se aprecia que la presencia del inhibidor induce un descenso generalizado del crecimiento a lo largo de todo el periodo de cultivo, siendo aún mayor cuando coinciden simultáneamente CHA y espermidina. Este comportamiento se manifiesta por igual cuando la estimación del crecimiento se hace en términos de peso fresco y peso seco.

La relación peso seco/peso fresco es similar en los tratamientos con el inhibidor individualmente o asociado a la espermidina, pero superior a lo observado en la condición control a partir de los 28 días del cultivo. El análisis de la relación peso seco/peso fresco podría interpretarse en sintonía con la existencia de un mayor nivel de hidratación en los tejidos que se han cultivado en ausencia del inhibidor.

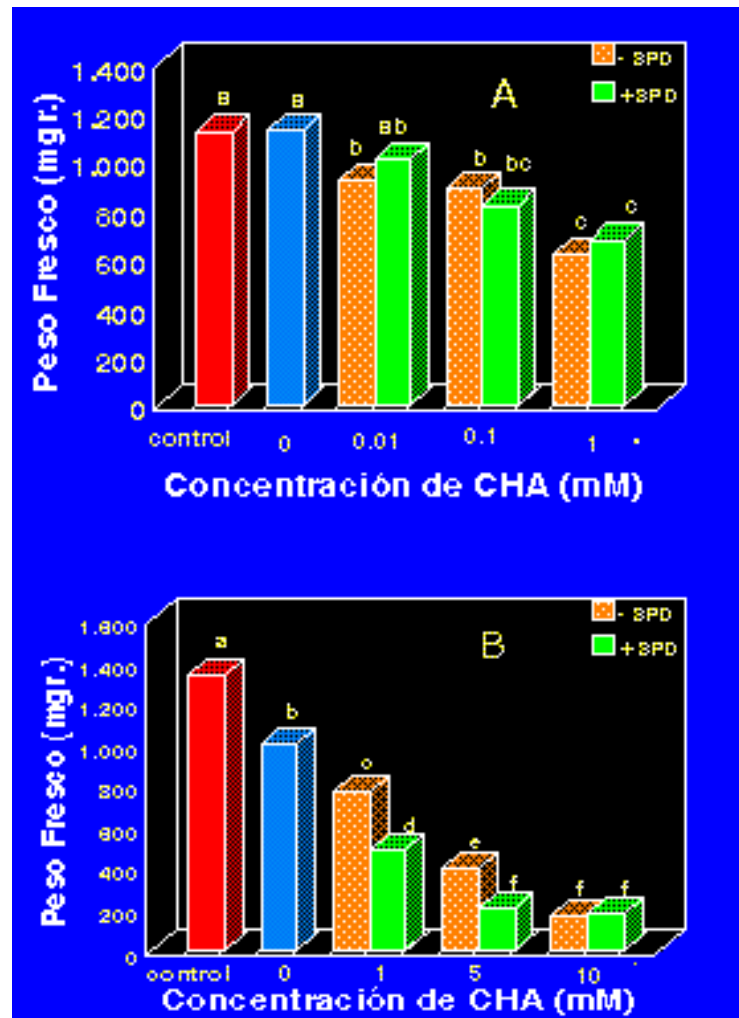


Fig. 19. Efecto del CHA, a distintas concentraciones, sobre el crecimiento de la pulpa en discos de ovario después de 55 días de cultivo. Se evalúa asimismo la posibilidad de revertir los efectos del CHA mediante la aplicación exógena de espermidina a concentraciones de 0.1 mM (A) y 1 mM (B) respectivamente. Todos los medios de cultivo han sido suplementados con 2,4-D/BA y los resultados se han analizado estadísticamente de acuerdo al test de Duncan ($p=0,01$). El *control* hace referencia al medio óptimo sin inhibidores ni espermidina.

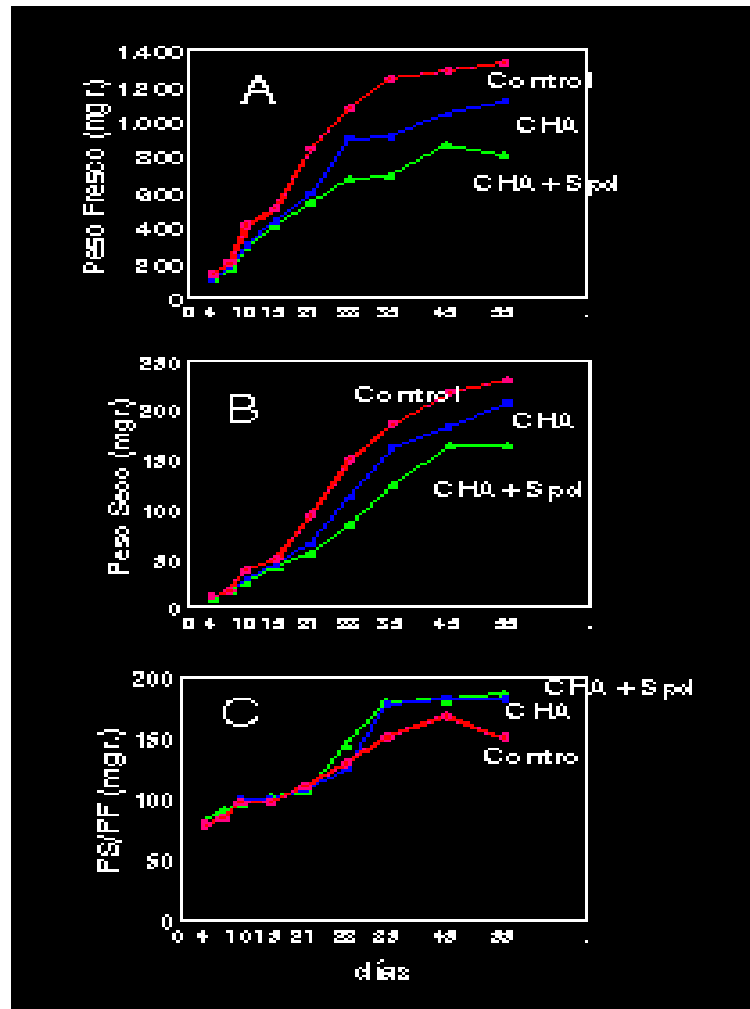


Fig. 20. Efecto del CHA (1 mM) sobre el crecimiento de la pulpa a lo largo de 55 días de cultivo, estimado como peso fresco (A) o peso seco (B). Se evalúa la posibilidad de reversibilidad del inhibidor por la aplicación simultánea de Spd (1 mM). La relación peso seco/peso fresco para cada una de las condiciones experimentales se representa en C.

3.2. Efecto de la aplicación exógena de CHA sobre el contenido endógeno de poliaminas.

En la Fig. 21., se muestran los resultados del estudio cinético sobre la acumulación de putrescina y espermidina en sus formas libres y conjugadas tras un tratamiento con CHA (1 mM) ya sea individualmente o asociada a la espermidina exógena (1 mM).

Tal como se aprecia en las Fig. 21C y D., como era de esperar, la presencia del inhibidor reduce sensiblemente los niveles endógenos de espermidina en relación al control durante las primeras semanas, aunque esta respuesta se minimiza a partir de la tercera semana del cultivo. El perfil de acumulación es similar para las formas libre y conjugadas de la espermidina, aunque la concentración de estas últimas es netamente inferior.

Contrariamente a lo señalado para la espermidina, ocurre con la putrescina (Fig. 21A), en cuyo caso la aplicación de CHA determina un incremento de sus niveles endógenos especialmente en la forma libre con respecto al control. En cambio, el contenido de putrescina conjugada (Fig. 21B), presenta una cinética de acumulación diferente, con niveles inferiores al control en la mayor parte del tiempo, a excepción del día 15, donde se observa un valor superior y en los estadios finales en que ambos niveles son semejantes.

En cuanto al uso combinado del CHA y la espermidina, de manera inmediata tras su aplicación, se produce un incremento notorio en los contenidos endógenos tanto de la putrescina (Fig. 21A y B) como de la espermidina (Fig. 21C y D). La mayor acumulación de ambas poliaminas se observa en forma libre.

Por otro lado la relación Put/Spd, respecto a las formas libres, se incrementa a lo largo del cultivo en todos los tratamientos, siendo más elevada cuando el inhibidor es ensayado solo, y obteniéndose valores mínimos en presencia de espermidina (Fig. 21E). Para las formas conjugadas (Fig. 21F), los

valores del control son más elevados en los diez primeros días y hacia el día 21, obteniéndose valores inferiores a los tratamientos con CHA en los restantes días evaluados. La presencia de espermidina, al igual que para las formas libres, disminuye dicha relación con respecto a los demás tratamientos a partir de los 10 días de cultivo (Fig. 21F).

CHA (mM)	SPD (mM)	PESO FRESCO (mgr.)		PESO SECO (mgr.)	
---	---	1122 a	(100)	210	(100)
0.01	---	920 b	(82)	190	(95)
	0.1	1006 ab	(90)	193	(96)
0.1	---	892 b	(80)	194	(97)
	0.1	817 bc	(73)	173	(86)
1	---	617 c	(56)	154	(77)
	0.1	676 c	(60)	154	(77)
---	0.1	1124 a	(100)	181	(92)
---	---	1335 a	(100)	208	(100)
1	---	768 c	(58)	156	(75)
	1	485 d	(35)	92	(44)
5	---	397 e	(30)	71	(34)
	1	198 f	(15)	38	(18)
10	---	166 f	(12)	32	(15)
	1	181 f	(14)	34	(16)
---	1	1000 b	(75)	155	(75)

Tabla 10. Efecto de la aplicación exógena del CHA aislada y combinada con la espermidina (SPD) sobre el crecimiento de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados "in vitro" durante 55 días. Los valores dentro del paréntice representan el porcentaje de crecimiento con respecto al control (**) no tratado con estas sustancias. Se analizan estadísticamente los resultados mediante el test de Duncan ($\rho= 0.01$).

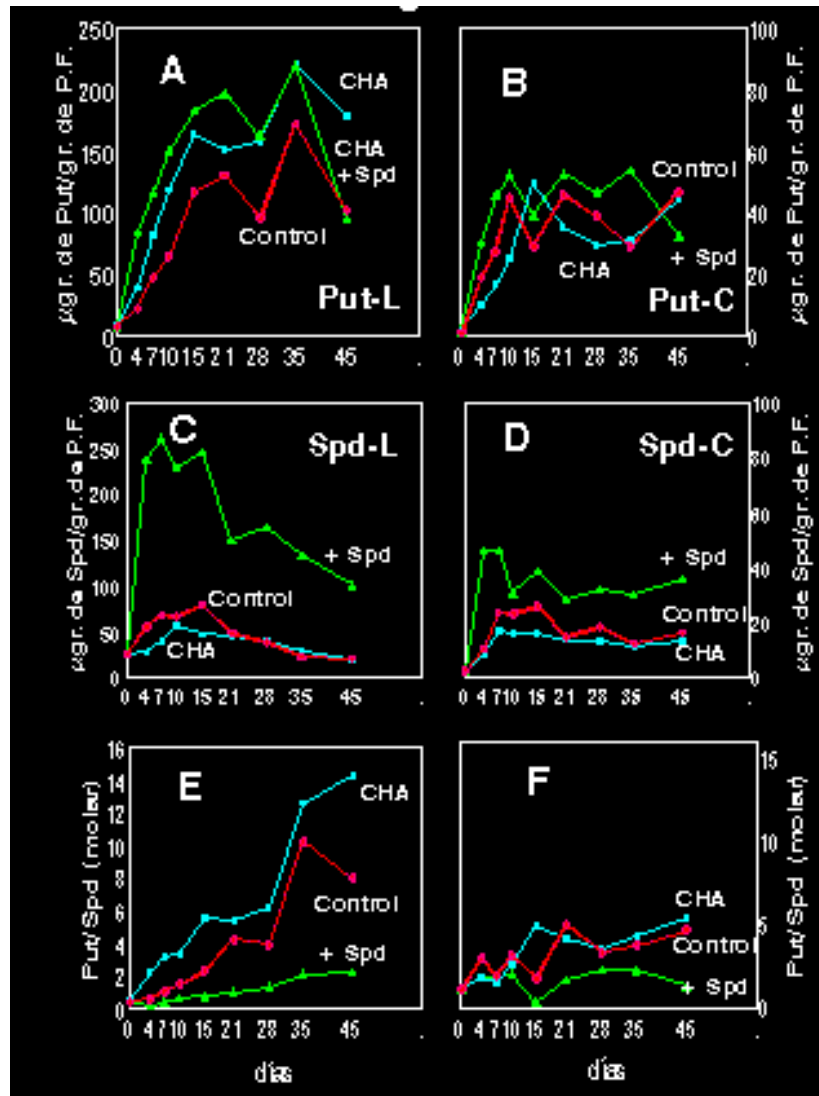


Fig. 21. Efecto del CHA sobre la acumulación endógena de putrescina (A,B), espermidina (C,D) y relación Put/Spd (E, F) en sus formas libre y conjugada. El CHA es usado de manera individual (1 mM) o asociado con la Spd (1 mM). El medio de cultivo en todas las condiciones, incluido el *control*, ha sido suplementado con 2,4-D/BA (*medio óptimo*).

3.3. Efecto de la aplicación exógena del MGBG sobre el crecimiento.

El efecto de la aplicación exógena de MGBG sobre el crecimiento sigue unas pautas similares a las obtenidas cuando el inhibidor utilizado es el CHA. Tal como se puede observar en la Fig. 22 y la Tabla 11., la presencia del MGBG en el medio de cultivo determina una disminución en el peso fresco y peso seco a concentraciones superiores a 0.1 mM, alcanzándose valores de inhibición superiores al 50% cuando la dosis de inhibidor es de 1 mM. Las concentraciones superiores (5 y 10 mM), datos no reflejados en la Tabla, provocan una necrosis de los tejidos.

La aplicación exógena de espermidina a los cultivos tratados con MGBG no determina diferencias significativas con respecto al uso individual del inhibidor. En ningún caso se observa reversibilidad del efecto inhibidor para cualquiera de las condiciones estudiadas (Tabla 11 y Fig. 22A y B).

El estudio cinético del crecimiento (Fig. 23) en los discos tratados con MGBG (0.5 mM) pone de manifiesto que la inhibición se ejerce de manera inmediata tras su aplicación y se generaliza a todo el periodo de cultivo. El efecto de inhibición se refleja en mayor medida cuando la estimación se hace en peso seco. La incorporación de la espermidina al medio conjuntamente con el MGBG inhibe aún más el crecimiento

MGBG (mM)	SPD (mM)	PESO FRESCO (mgr.)		PESO SECO (mgr.)	
A --- **	---	1122 a	(100)	182	(100)
0.01	---	1057 ab	(94)	183	(100)
	0.1	874 bc	(78)	180	(99)
0.1	---	746 c	(68)	162	(89)
	0.1	846 c	(75)	178	(98)
1	---	510 d	(45)	103	(57)
	0.1	514 d	(46)	101	(55)
---	0.1	1158 a	(103)	184	(101)
B --- **	---	1272 a	(100)	208	(100)
0.5	---	882 bc	(69)	135	(65)
	1	827 c	(65)	129	(62)
1	---	558 d	(44)	101	(49)
	1	599 d	(47)	108	(52)
---	1	1035 b	(81)	180	(87)

Tabla 11. Efecto de la aplicación exógena del **MGBG** aislado y combinado con la espermidina (SPD) sobre el crecimiento de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados “in vitro” durante 55 días. Los valores dentro del paréntice representan el porcentaje de crecimiento con respecto al control (**) no tratado con estas sustancias. Se analizan estadísticamente los resultados mediante el test de Duncan ($p= 0.01$) en cada una de las experiencias **A** y **B**.

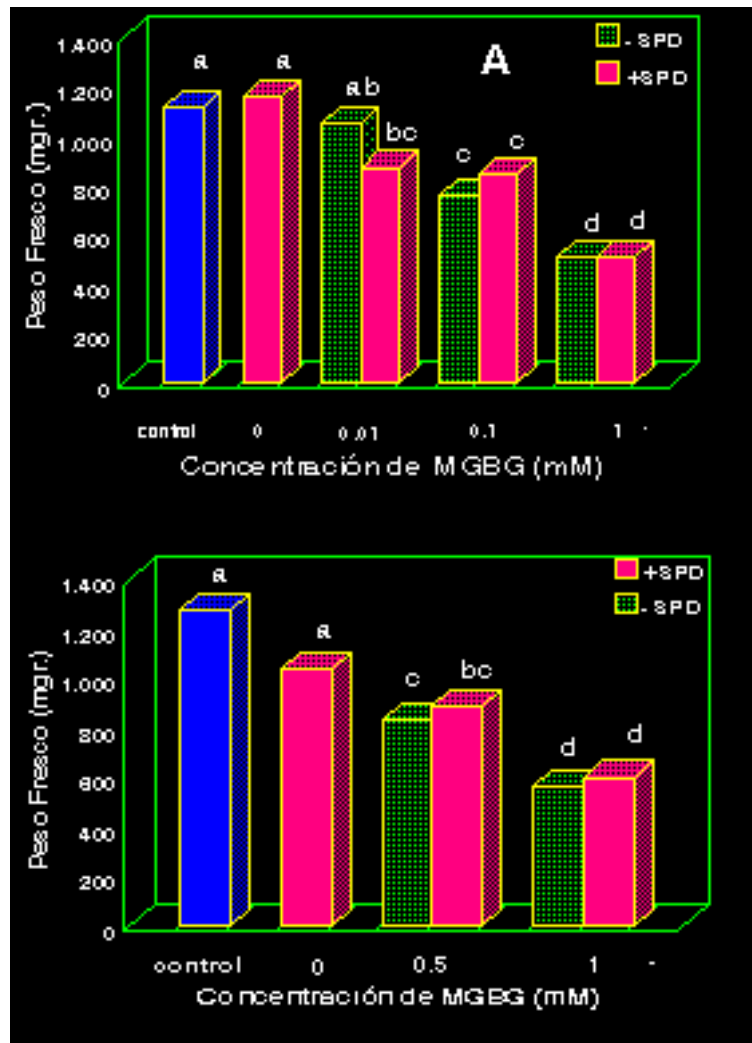


Fig. 22. Efecto del **MGBG**, a diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de la pulpa en discos de ovario tras 55 días de cultivo. Se evalúa asimismo la posibilidad de revertir los efectos del MGBG mediante la aplicación exógena de espermidina a concentraciones de 0.1 mM (**A**) y 1 mM (**B**) respectivamente. Todos los medios de cultivo han estado suplementados con 2,4-D/BA y los resultados se han analizado estadísticamente de acuerdo al test de Duncan ($p=0.01$). El *control* hace referencia al medio óptimo sin inhibidores ni espermidina.

3.4. Efecto de la aplicación exógena de MGBG sobre el contenido endógeno de poliaminas.

En la Fig. 24., se muestran los resultados del estudio cinético sobre la acumulación de putrescina y espermidina en sus formas libres y conjugadas tras un tratamiento con MGBG (0.5 mM) de manera aislada y asociada a la espermidina exógena (1 mM).

Tal como se puede observar en la Fig. 24A., la aplicación del MGBG produce un incremento en la concentración de putrescina libre con respecto al control. En cambio los niveles de putrescina conjugada, al igual que en los tratamientos con CHA, presentan unos perfiles inferiores o similares al control salvo a los 21 y 45 días donde dichos niveles parecen ser superiores (Fig. 24B).

En cuanto al contenido endógeno de espermidina, el tratamiento con MGBG, -a diferencia del otro inhibidor (CHA)- no induce diferencias importantes con respecto al control, tanto si se evalúan las formas libres como las conjugadas (Fig. 24C y D).

La aplicación de espermidina (1 mM) a los cultivos tratados con MGBG incrementa el contenido endógeno de putrescina libre a lo largo del cultivo (Fig. 24A). El contenido en putrescina conjugada presenta un acusado incremento hacia la segunda y tercera semana de cultivo, para presentar escasa diferencias a partir de los 28 días (Fig. 24B).

La evaluación de los niveles endógenos de espermidina en las condiciones experimentales anteriores, muestra un importante incremento en cuanto a la forma libre y algo menor en las conjugadas, a diferencia de lo reseñado en los cultivos tratados con MGBG de manera individual respecto al control (Fig. 24C y D).

La relación Put/Spd en sus formas libres presenta valores superiores al control en los tratamientos con el inhibidor solo, y disminuye sensiblemente cuando la espermidina es añadida al medio de cultivo, ya sea sola o asociada al

inhibidor (Fig. 24E). Para las formas conjugadas, en cambio, dicha relación es inferior en los cultivos tratados con MGBG que en aquellos otros en los que el inhibidor está ausente, con la excepción del día 21 (Fig. 24F). La presencia de espermidina parece disminuir, al igual que en las formas libres, dicha tasa con la salvedad del día 15, donde esta parece ser mayor que para los demás tratamientos.

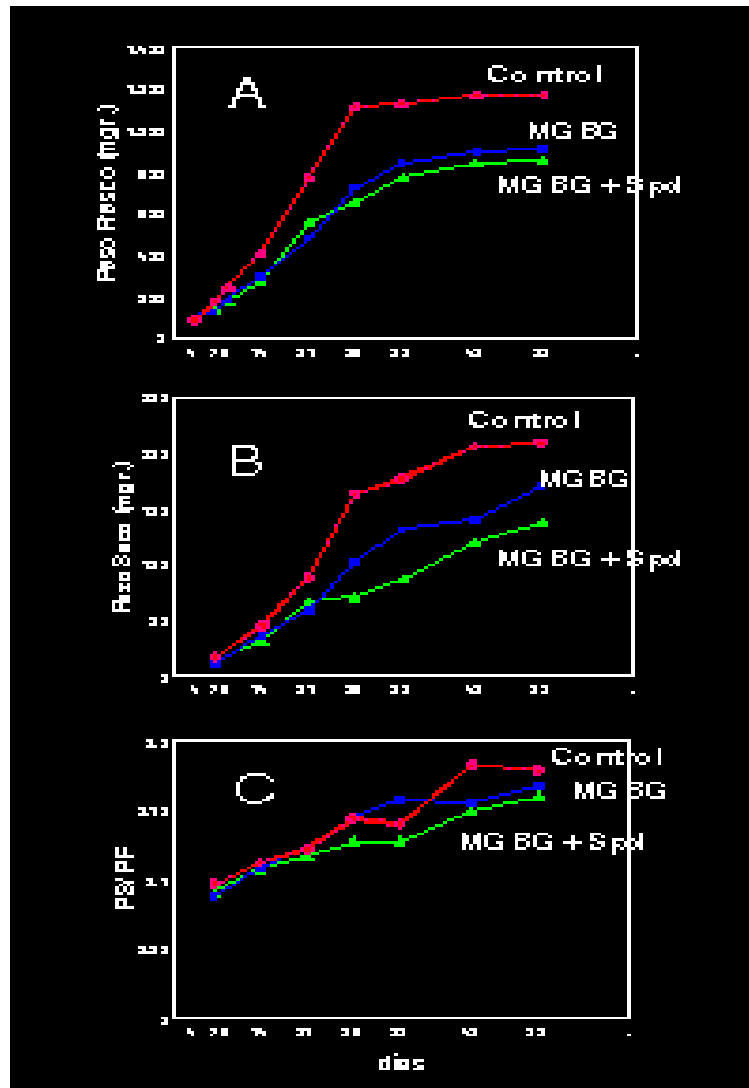


Fig. 23. Efecto del **MGBG** (0.5 mM) sobre el crecimiento de la pulpa a lo largo de 55 días de cultivo, estimado como peso fresco **(A)** o peso seco **(B)**. Se evalúa la posibilidad de reversibilidad del inhibidor por la aplicación simultánea de Spd (1 mM). La relación peso seco/peso fresco para cada una de las condiciones experimentales se representa en **C**.

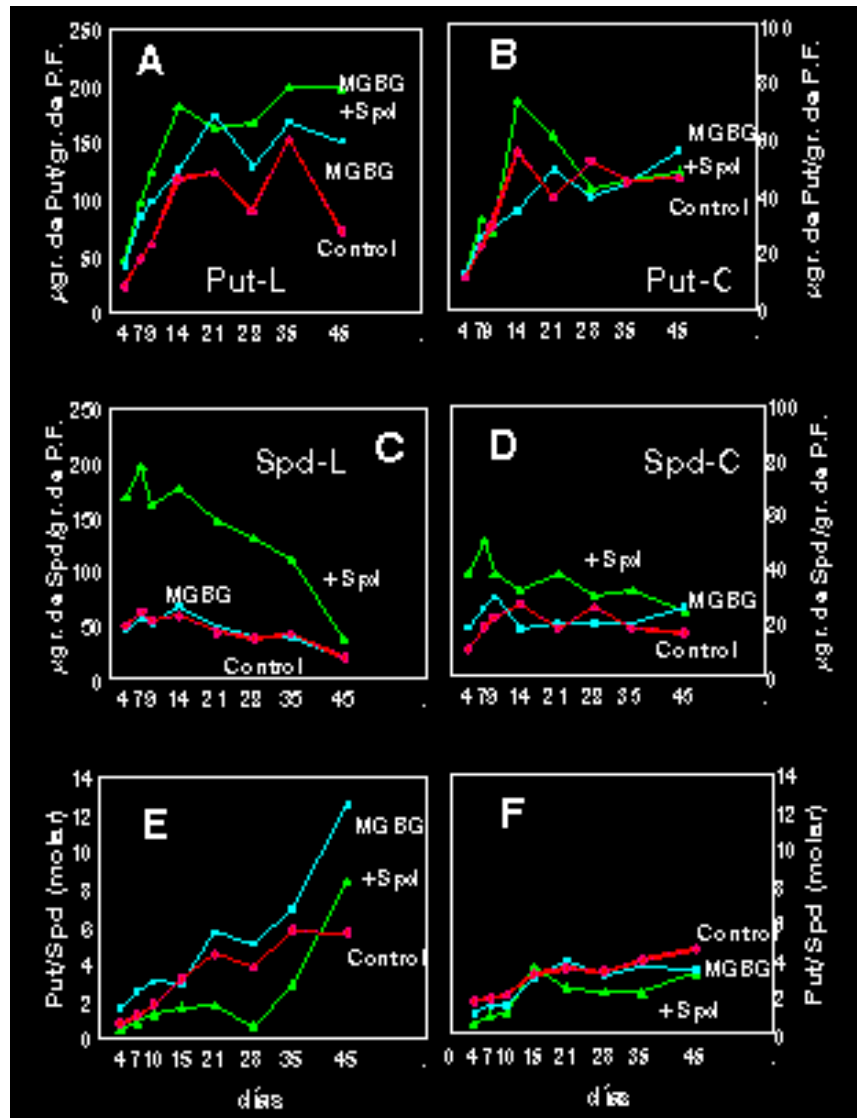


Fig. 24. Efecto del **MGBG (0.5 mM)** sobre la acumulación endógena de putrescina **(A, B)**, espermidina **(C, D)** y relación Put/Spd **(E, F)** en sus formas libres y conjugadas. El MGBG es usado de manera individual o asociado con Spd **(1 mM)**. El medio de cultivo en todas las condiciones, incluido el *control*, ha sido suplementado con 2,4-D/BA (*medio óptimo*).

3.5. Discusión

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la aplicación exógena de MGBG y CHA inhibe el crecimiento de los tejidos de la pulpa en cualquiera de las concentraciones ensayadas, al tiempo que se observa un incremento en los niveles de putrescina, sobre todo en su forma libre. En cambio, los niveles endógenos de espermidina están en función del inhibidor. Mientras que el CHA produce un descenso en el contenido en espermidina durante los primeros días del cultivo, el MGBG no parece tener efecto sobre el contenido endógeno de dicha poliamina. Los aportes exógenos de espermidina (1 mM) a los cultivos, ya sea de manera individual, o asociados al inhibidor para compensar el previsible bloqueo de la síntesis endógena, aunque determinan incrementos notorios en su concentración endógena, reducen sensiblemente el crecimiento de los tejidos.

Resultados similares han sido obtenidos en semillas de *Acer saccharum* en proceso de germinación, en cuyo caso, concentraciones del orden de 1-10 mM de MGBG reducen fuertemente el crecimiento de la raíz y el índice mitótico. Los aportes exógenos suplementarios de espermidina (0,1 y 0,01 mM) incrementan aun más dicha inhibición (Walker y col., 1985). La inhibición del crecimiento se acompaña al mismo tiempo por un incremento en la concentración de putrescina, aunque no se observan variaciones significativas en el contenido de espermidina.

Estos resultados, al igual que los obtenidos por nosotros, parecen seguir una tónica general en los tratamientos con CHA y MGBG sobre tejidos vegetales, es decir, un incremento en los niveles de putrescina, tanto en su forma libre como conjugada, acompañado o no por un descenso en los niveles de espermidina y espermina (Altamura y col., 1991; Biondi y col., 1986)

En tejidos de ovarios de tabaco, el tratamiento con MGBG (1 mM) produce un descenso significativo en el peso fresco con respecto al control (Slocum y Galston, 1985a,b), aunque a diferencia de lo observado en nuestras condiciones experimentales, la inhibición del crecimiento revierte parcialmente

tras la aplicación exógena de espermidina (1 mM), a los cultivos tratados con el inhibidor.

Es conocido que los tratamientos con CHA y MGBG, promueven generalmente efectos inhibidores sobre el crecimiento y los procesos morfogénicos en diferentes sistemas vegetales. Así, en cultivos de raíz de *Hyoscyamus muticus*, los tratamientos con CHA (5 mM) y MGBG (1mM) inhiben significativamente el crecimiento y la formación de raíces laterales (Biondi y col., 1993). Resultados similares se obtuvieron en cultivos de berenjenas donde la aplicación de MGBG inhibe los procesos de embriogénesis somática y el crecimiento (Fobert y Webb, 1988). En tomates, la aplicación de MGBG y CHA a cultivos "in vitro" de yemas florales de un genotipo mutante con estambres estériles, y de un genotipo normal, produce una inhibición del desarrollo de los órganos florales en ambos genotipos, aunque se observa una mayor sensibilidad a estas sustancias por parte del genotipo normal (Rastogi y Kaur-Sawhney, 1990). Sin embargo, este comportamiento contrasta con lo observado cuando se aplica CHA sobre brotes de chopo obtenidos "in vitro" y sometidos a un medio de enraizamiento, libre de auxinas, en cuyo caso se incrementa la formación de raíces en un 36% con respecto al control (Hausman y col., 1994)

Estos y otros datos bibliográficos son el reflejo de que no siempre existe una relación clara entre crecimiento y la acumulación o no de poliaminas en los tejidos por efecto de los inhibidores. En este sentido, en cultivos de ovario de tabaco, la inhibición del crecimiento producido por la aplicación de MGBG se ve acompañado por una disminución en la concentración de putrescina, posiblemente por la inhibición de la ADC y ODC (Slocum y Galston, 1985a,b). Una respuesta semejante se ha observado en cultivos de embriones de *Hevea brasiliensis* donde la aplicación de MGBG reduce el potencial embriogénico, acompañado por un descenso en el contenido de putrescina y una inhibición de la ADC y ODC en un 81% y 84%, respectivamente (El Hadrami y D'Auzac, 1992). En radículas de *Acer saccharum* la aplicación de MGBG produce asimismo un ligero descenso en el contenido de putrescina y espermidina, coincidiendo con una inhibición del crecimiento (Walker y col., 1985).

Sin embargo, en otros sistemas vegetales, tales como embriones somáticos de *Picea abies*, cultivados "in vitro", la aplicación exógena de MGBG aunque reduce los niveles de ambas poliaminas no parece afectar a su desarrollo (Santanen y Simola, 1992). En cultivos celulares de zanahoria, la embriogénesis somática resulta inhibida por la presencia del MGBG, al tiempo que disminuye la concentración de espermidina y espermina, pero el contenido endógeno de putrescina es superior al de los cultivos no tratados. La actividad ADC resulta asimismo, inhibida por la presencia de esta sustancia (Minocha y col., 1991b).

Tal como apunta Torrigiani y col., (1993), el MGBG induce o no la acumulación de putrescina dependiendo del estado del cultivo, del tipo de órgano, de la concentración del inhibidor así como de la presencia o no de la *diamina oxidasa* (DAO).

Por otra parte, en relación con los efectos del CHA sobre los tejidos del fruto de la platanera, la acumulación de putrescina y el descenso en el contenido de espermidina, son respuestas similares a las observadas por otros investigadores en diferentes sistemas vegetales de los cuales citaremos algunos ejemplos. En cultivos de células de zanahoria tratados con CHA, disminuyen los niveles de espermidina, mientras se incrementan los de putrescina, así como la actividad ADC (Khan y col., 1991). En raíces de *Hyoscyamus muticus* cultivados "in vitro" y tratados con este inhibidor se produce igualmente un aumento en el contenido endógeno en putrescina, libre y conjugadas, con una inhibición en los niveles de espermidina (Biondi y col., 1993). Asimismo, la presencia de CHA en los cultivos de brotes de chopo expuestos a un medio de enraizamiento estimula igualmente la acumulación de putrescina (Hausman y col., 1994).

La acumulación de poliaminas, principalmente putrescina, en los tejidos vegetales podría ser debido en algunos casos a un bloqueo en su catabolismo o degradación, o bien, a la estimulación de su biosíntesis. Es conocido que el MGBG es un potente inhibidor de la DAO (Pegg., 1983; Pegg y McCan., 1982). En tejidos de guisante la acumulación de putrescina cuando se aplica MGBG se debe a la inhibición de la *diamina oxidasa* por parte de esta sustancia (Yanagisawa y col., 1981).

Sin embargo, en otros sistemas vegetales, como tiras epidérmicas de tabaco, sistema muy utilizado en estudios morfogénéticos, la aplicación de MGBG parece estimular la actividad ADC y ODC (Torrighiani y col., 1993). Por contra, en otros tejidos la presencia del MGBG parece inhibir la actividad ADC (Minocha y col., 1991b). Estos datos podrían servir de argumento para explicar la acumulación de putrescina observada en nuestros cultivos al aplicar MGBG, es decir, una posible inhibición de la diamina oxidasa y/o una estimulación de la ADC.

La misma argumentación podría ser válida en relación con el CHA. Es decir, la acumulación de putrescina en los cultivos tratados con CHA podría obedecer a un bloqueo en la transformación de putrescina a espermidina por la presencia del inhibidor, lo cual explicaría el descenso en el contenido de espermidina. Algunos investigadores también han propuesto una inhibición por parte de esta sustancia sobre la *diamina oxidasa* para explicar la posible acumulación de putrescina en tejidos tratados con CHA (Gallardo y col., 1994). Los datos actuales de nuestra investigación no nos permiten decantarnos con absoluta certeza por alguna de estas alternativas, para la cual será necesario realizar estudios complementarios de actividades enzimática en relación con las enzimas claves del metabolismo y degradación de las poliaminas.

La correlación inversa ya señalada entre la inhibición del crecimiento y la acumulación de putrescina, inevitablemente nos plantea una serie de interrogantes ¿Es esta acumulación de putrescina una respuesta metabólica de los tejidos a la inhibición del crecimiento, o por el contrario, es la causa de la ausencia de crecimiento en estos tejidos?.

El catabolismo de la putrescina es valorado por algunos autores como un requisito para el desarrollo de ciertos procesos morfogénéticos. Hausman y col., (1994) han estudiado los efectos del CHA y la aminoguanidina (AG), un inhibidor de la DAO, sobre la rizogénesis en brotes de chopo cultivados "in vitro" y observaron que cuando el CHA es añadido a un medio libre de hormonas, resulta estimulado el enraizamiento de forma similar a los tratamientos con putrescina exógena. En cambio, la aplicación de AG reduce dicho proceso. En opinión de

los autores, el efecto similar de la putrescina y el CHA sobre el enraizamiento, contrariamente al efecto inhibitorio de la AG, sugiere que la putrescina y su catabolismo vía pirrolina juegan un papel esencial en la inducción de las raíces. El CHA, como inhibidor de la *espermina sintasa*, posiblemente promueve el enraizamiento como resultado del incremento en el contenido de putrescina (Altamura y col., 1991; Biondi., 1993). Cuando la putrescina no es convertida a espermidina cabe la posibilidad de que exista una desviación o canalización hacia la formación de pirrolina. La AG, inhibe dicha ruta al igual que inhibe el enraizamiento, dando pie a considerar que la putrescina está involucrada en los procesos de enraizamiento a través de su catabolismo (Hausman y col., 1994).

El incremento en los niveles de putrescina en cultivos tratados con espermidina exógena en presencia de los inhibidores es un hecho recogido en la literatura (Altamura y col., 1991). Algunos investigadores defienden la hipótesis de que la espermidina exógena es probablemente transformada a putrescina, aunque no se conoce la ruta (Bagni y Speranza, 1977; Altamura y col., 1991).

En general, altos niveles de espermidina son característicos de tejidos meristemáticos jóvenes y tejidos con escaso alargamiento celular, mientras que los niveles de putrescina se incrementan durante la elongación y el envejecimiento celular (Galston, 1983). En segmentos meristemáticos de raíz de maíz, se ha observado una relación Put/Spd baja (Dumortier y col., 1983, Gamarnik y Frydman., 1991), mientras que resulta elevada en las zonas de elongación y diferenciación subapical (Schwartz y col., 1986). De igual manera, en cultivos de raíces de *Hyoscyamus muticus*, un índice Put/Spd alto, paralelo con un descenso en el pool de putrescina, producía una inhibición en el crecimiento (Biondi y col., 1993).

En el contexto anterior, la alta relación Put/Spd observada en nuestros cultivos cuando se aplica MGBG o CHA, podría explicar la inhibición del crecimiento. Sin embargo, la aplicación exógena de espermidina disminuye dicha tasa, y sin embargo, el crecimiento resulta inhibido aún en mayor grado. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de estas sustancias en nuestro caso no guarda relación con este ratio.

Existen dificultades para enjuiciar con precisión el efecto de ambos inhibidores (CHA y MGBG) en la biosíntesis de las poliaminas, pues como ha quedado patente en la bibliografía parecen existir efectos inespecíficos de estas sustancias poco conocidos (Nikula y col., 1984; Pleshkewych y col., 1983). Existen evidencias de que el MGBG compite con la espermidina uniéndose a la membrana e interfiriendo en el transporte de esta poliamina (Pleshkewych y col., 1983) y por consiguiente dificultando los procesos celulares dependientes de la espermidina. Se ha citado la posibilidad de que estos inhibidores actúen a niveles no relacionados estrictamente con el metabolismo de las poliaminas tales como en la síntesis de RNA (Bagni y col., 1981b).

CAPITULO: 4

4. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE PUTRESCINA.

Como ha quedado reseñado en el apartado 2.4 de la Introducción, una de las estrategias experimentales más utilizadas en el estudio de la implicación de las poliaminas en diferentes eventos fisiológicos es el empleo de inhibidores de su síntesis. Así, desde el descubrimiento de **DFMA** y **DFMO**, inhibidores específicos e irreversibles de la **ADC** y **ODC** respectivamente, el uso de estas sustancias es de gran utilidad en los estudios donde las poliaminas parecen estar implicadas.

4.1. Influencia del DFMO y DFMA sobre el contenido endógeno de poliaminas en tejidos de la pulpa cultivados sobre un medio sin reguladores de crecimiento.

Con el fin de investigar 1) si las altas concentraciones de putrescina y espermidina observadas en las condiciones poco favorables para el crecimiento (*medios sin reguladores*), ejerce efectos tóxicos o negativos para el crecimiento de la pulpa, -circunstancia que ha sido descrita en la bibliografía-, y 2) si este incremento en los niveles de poliaminas se produce como consecuencia de una estimulación de su biosíntesis o si obedece a otras causas, se plantea el uso de inhibidores de la biosíntesis tales como el DFMO y DFMA, inhibidores competitivos de la ODC y ADC respectivamente.

De los resultados experimentales de este estudio se desprenden las siguientes observaciones:

- 1) La presencia de los inhibidores, a pesar de que reducen sensiblemente el contenido de putrescina y espermidina (Fig. 25B y C) no influyen significativamente sobre el crecimiento (Fig. 25A).
- 2) La acumulación de poliaminas en estos tejidos responde a un incremento de su biosíntesis vía ADC, hecho que se demuestra cuando está presente el DFMA en el medio de cultivo (Fig. 25B y C). El DFMO de manera individual, no afecta de manera significativa a la biosíntesis de putrescina.

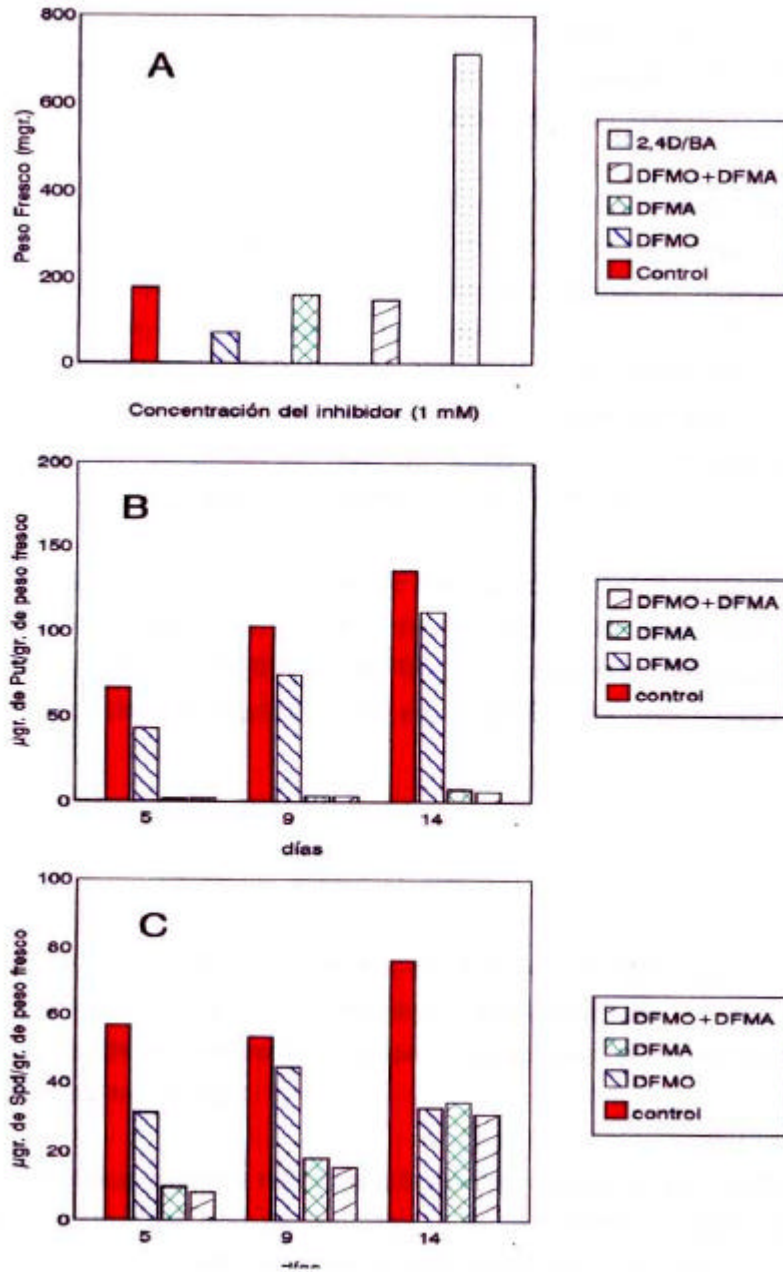


Fig. 25. Efecto de la aplicación de **DFMA**, **DFMO** y **DFMA+DFMO** sobre el crecimiento (**A**) y contenido endógeno en putrescina (**B**) y espermidina (**C**) en los tejidos de la pulpa cultivados en un medio sin reguladores de crecimiento (*medio cero*).

4.2. Influencia del DFMO y DFMA sobre el contenido endógeno de poliaminas y el crecimiento de los tejidos de la pulpa cultivados sobre un medio suplementado con reguladores de crecimiento.

Tal como muestran los resultados del apartado 2.2. de los Resultados, parece existir una correlación entre los niveles endógenos de putrescina y la cinética de crecimiento, similar a lo encontrado en otros sistemas vegetales; sin embargo, el hecho de que en el *medio cero* donde no existe crecimiento, los niveles endógenos de esta sustancia sean superiores a los observados en un medio con reguladores, nos plantea la duda si esta sustancia está realmente implicada en el desarrollo de los tejidos, o si se acumula independientemente de una posible implicación en dicho proceso.

Con la finalidad de buscar una posible explicación a estas incógnitas, se procede a cultivar discos de ovarios de platanera en presencia de diferentes concentraciones de **DFMA y/o DFMO**, analizando su repercusión sobre el crecimiento de los tejidos y la acumulación de **putrescina y espermidina**.

Crecimiento:

En la Fig. 26., se muestran los efectos del DFMA y DFMO, usados de manera individual o combinados y a distintas concentraciones, sobre la cinética de crecimiento de los tejidos de la pulpa (A,B,C) y el crecimiento final (D) después de 60 días en cultivo.

Los resultados nos revelan notorias diferencias de actividad sobre el crecimiento dependientes del tipo de inhibidor y la concentración utilizada. Como norma general, el DFMO presenta mayor grado de actividad que el DFMA.

A concentración 0.1 y 1 mM, en todos los tratamientos se aprecia una inhibición clara con relación al control, siendo aún mas acusada en presencia de el DFMO (1 mM). Sin embargo, a la concentración mas baja (0.01 mM), mientras que el DFMA, no repercute significativamente sobre el crecimiento, el DFMO lo inhibe. Cuando ambas sustancias se ensayan asociadas, curiosamente, el

DFMA manifiesta un efecto atenuador sobre el DFMO (Fig. 26D). Concentraciones superiores a 1 mM producen signos de toxicidad.

Contenido endógeno de poliaminas:

Tal como se aprecia en la Fig. 27., el contenido endógeno de poliaminas experimenta cambios notables y antagónicos en función del tipo de inhibidor utilizado. La aplicación de DFMO produce, sorprendentemente, un incremento en el contenido endógeno de **putrescina** (Fig. 27A), en relación directa con la concentración. A las dosis más elevadas (0,1 y 1 mM) los niveles de putrescina son significativamente superiores al control a los 15 y 28 días de cultivo. Sin embargo, a concentraciones bajas (0,01 mM) los niveles endógenos de putrescina son similares al control, salvo a los 15 días de cultivo.

Por contra, cuando el inhibidor utilizado es el DFMA (Fig. 27C), o una combinación de ambos inhibidores (Fig. 27E), los niveles de putrescina descienden drásticamente con respecto al control en todas las concentraciones utilizadas. Esta inhibición alcanza valores superiores al 90% a las dosis más altas (0.1 y 1 mM). La presencia de DFMA en combinación con DFMO (Fig. 27E) produce un efecto contrario sobre la acumulación de putrescina al observado en la acción individual de este último (Fig. 27A), lo cual viene a significar un efecto predominante del primero sobre el segundo.

En cuanto a la **espermidina**, los resultados obtenidos no parecen tan claros. De cualquier manera, la presencia del DFMO incrementa ligeramente el contenido endógeno de espermidina a la concentración 0.1 mM del inhibidor (Fig. 27B). Por contra, en los cultivos tratados con DFMA, ya sea individualmente (Fig. 27D) o combinado con DFMO (Fig. 27F), se observa un ligero descenso en el contenido endógeno, mayor a altas concentraciones (1 mM).

La relación **Put/Spd** está representada en la Fig. 28. Se observa que dicha relación es similar al control en los tratamientos con DFMO a concentraciones 0,1 y 0,01 mM, siendo superior a la concentración 1 mM (Fig. 28A). En cambio,

cuando el inhibidor ensayado es el DFMA o DFMO+DFMA, la relación Put/Spd es muy inferior al control en todas las concentraciones utilizadas (Fig. 28B y C).

La Fig. 29., representa de manera conjunta la influencia de los inhibidores sobre el crecimiento de los tejidos (A) y sobre la relación Put/Spd (B). Nos llama la atención que existen condiciones experimentales con efectos semejantes sobre el crecimiento (*control, tratamiento con DFMA, tratamiento con DFMA+DFMO*) cuya relación Put/Spd es diferente, y por el contrario, condiciones experimentales con efectos diferentes sobre el crecimiento (*control, tratamiento con DFMO*), muestran una relación Put/Spd semejante. Este dato, contrariamente, a lo argumentado por otros autores, no parece ser del todo relevante para el desarrollo de los tejidos.

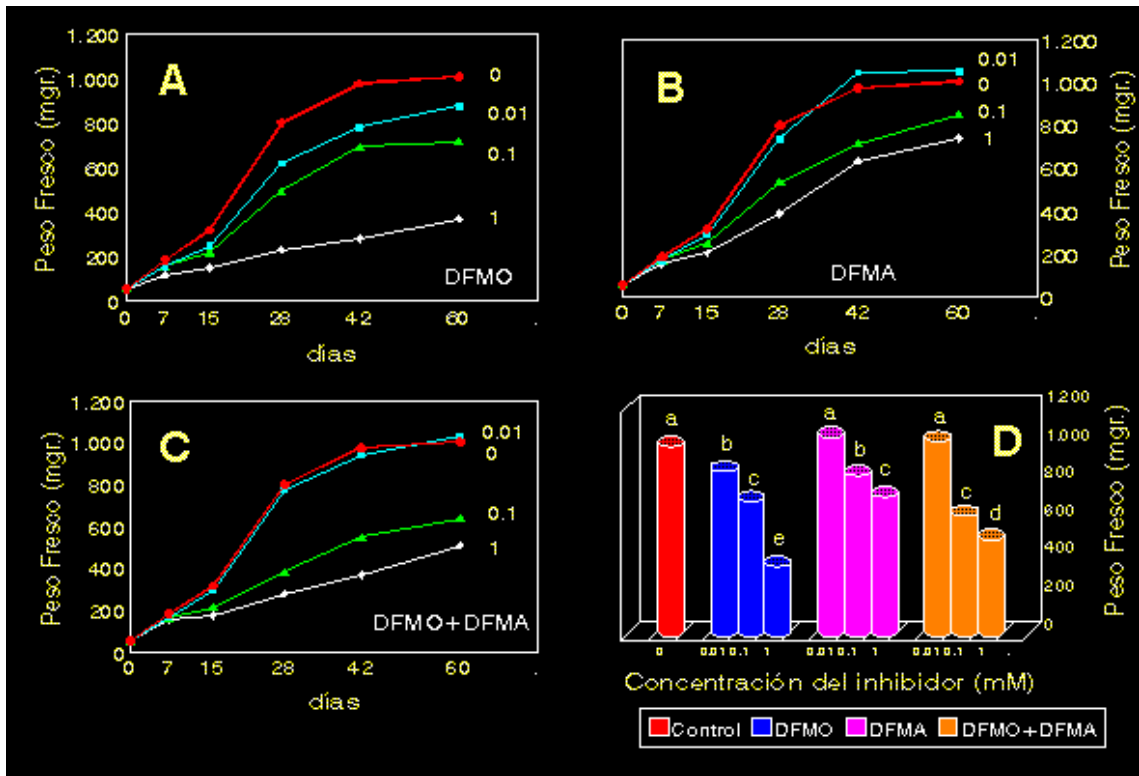


Fig. 26. Cinética de crecimiento de los tejidos de la pulpa en discos de ovario tratados con distintas concentraciones milimolares de DFMO (A), DFMA (B) y DFMO+DFMA (C). Se muestra el crecimiento final a los 60 días (D) y se comparan los resultados estadísticamente según el test de Duncan. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p=0.01$).

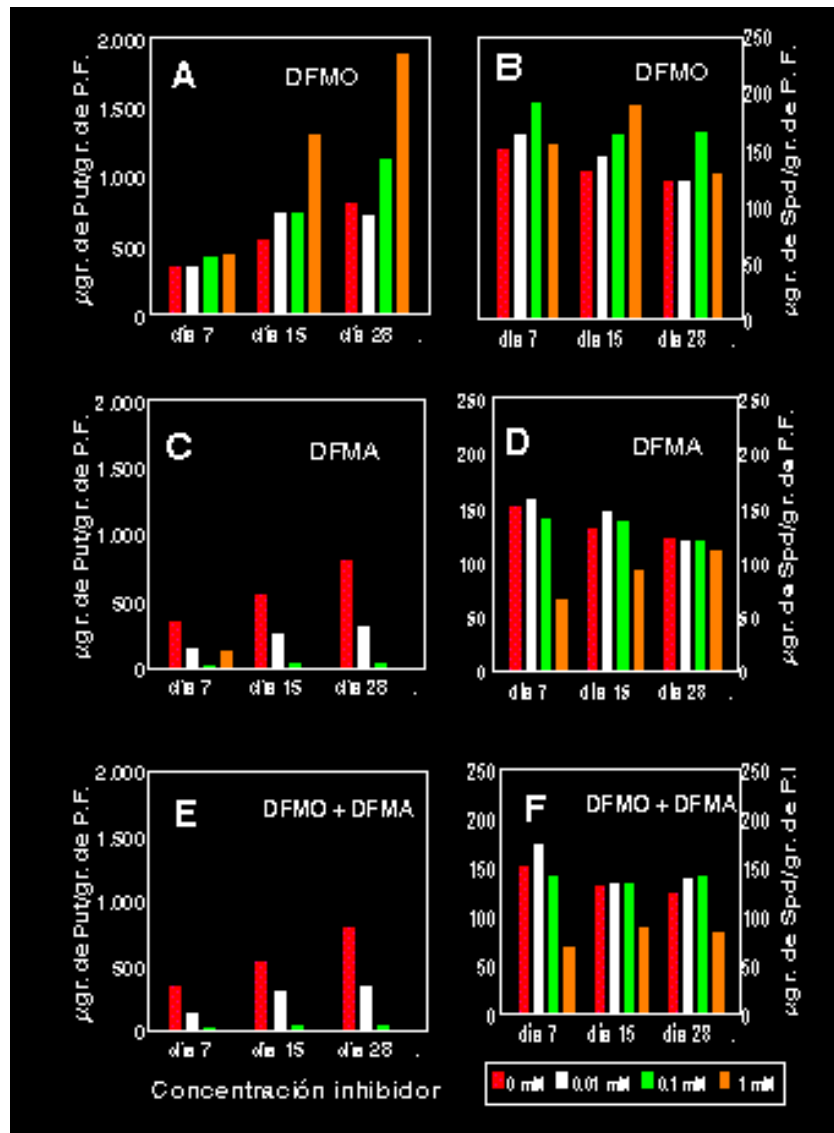


Fig. 27. Efecto de los inhibidores de la síntesis de **putrescina** sobre la acumulación de putrescina (**A, C y E**) y espermidina (**B, D y F**) en los tejidos de la pulpa. Se ensayan distintas concentraciones de inhibidor y se analizan los resultados a los 7, 15 y 28 días.

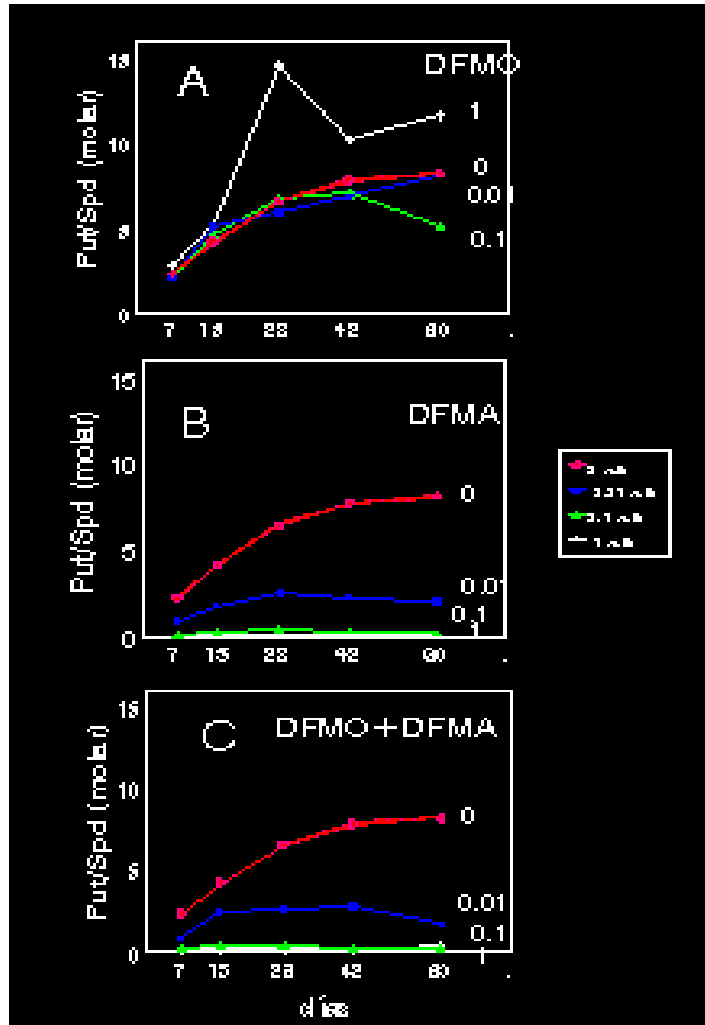


Fig. 28. Influencia de los inhibidores (DFMO y DFMA) a distintas concentraciones sobre la relación putrescina/espermidina (Put/Spd) en los tejidos de la pulpa.

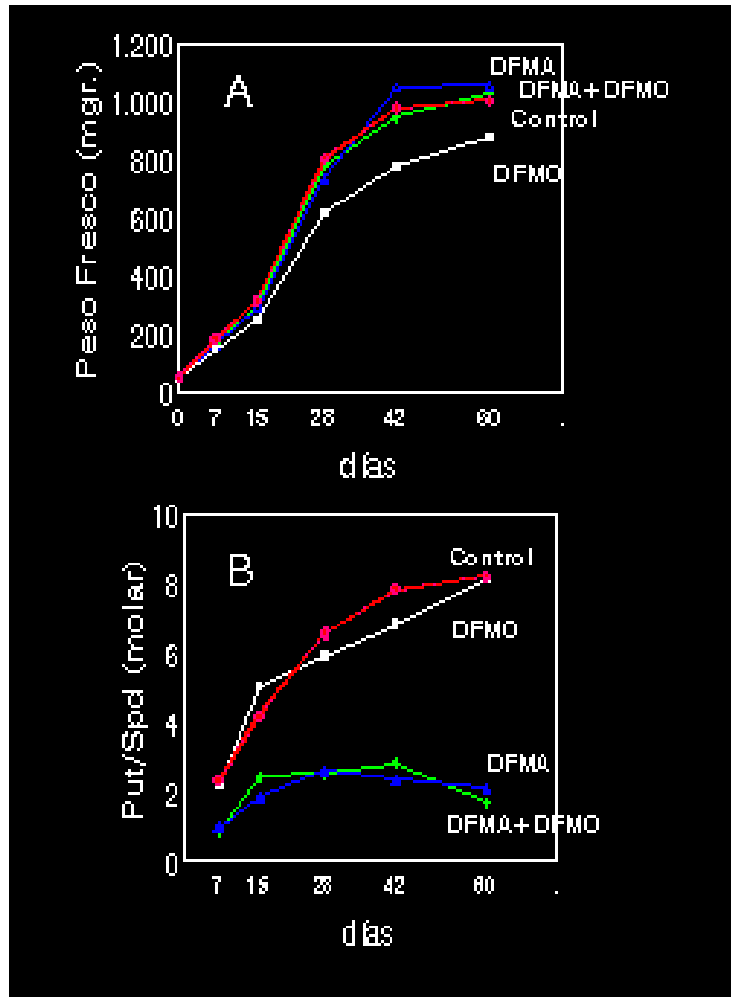


Fig. 29. Influencia de los inhibidores de la síntesis de putrescina (0.01 mM) sobre el crecimiento de los tejidos de la pulpa y la relación Put/Spd.

4.3. Acción temporal de los inhibidores de la síntesis de putrescina sobre el desarrollo de los tejidos de la pulpa y su correlación con los niveles endógenos en poliaminas.

Tal como ha quedado expuesto en el apartado anterior, la aplicación del DFMA y DFMO, produce una inhibición en el crecimiento de los tejidos de la pulpa. Con el propósito de investigar si la presencia de estas sustancias produce el mismo efectos estando presentes de manera permanente en el medio de cultivo o en periodos de tiempo mas breve, durante los estadios iniciales o avanzados del desarrollo cuando presumiblemente dominan los acontecimientos de división celular y alargamiento respectivamente, se plantean las siguientes experiencias:

1. Tratamiento con inhibidores durante los primeros 15 días de cultivo (*tratamiento temprano*). Transcurrido este tiempo los discos se transfieren a nuevos medios de cultivo sin inhibidores (*medio óptimo*).
2. Tratamiento con inhibidores a partir del 15^o día de cultivo (*tratamiento tardío*). El cultivo de los discos se inicia en un medio óptimo y a los 15 días se les transfiere a nuevos medios con inhibidores.

4.3.1. Efecto de los inhibidores de la síntesis de putrescina en estadios iniciales del desarrollo.

En la Fig. 30., se representa la cinética de crecimiento y el peso fresco final alcanzado por la pulpa (60 días) en discos de ovario tratados durante 15 días con DFMO y DFMA, de manera individual (A, B) y combinados (C). Se comparan los resultados con dos controles, uno en el que los discos no han sido expuestos a los inhibidores, y otro, en el que se mantuvo el tratamiento con los inhibidores durante 60 días.

A la vista de las experiencias preliminares en que se testaron diferentes concentraciones de inhibidor, hemos optado para estas experiencias por una concentración intermedia (0.1 mM), descartando el uso de concentraciones mas bajas por su escasa o nula actividad y mas elevadas, por un excesivo carácter inhibidor.

De los resultados obtenidos se desprende que los efectos de ambos inhibidores sobre el crecimiento son diferentes. Cuando el inhibidor utilizado es el DFMO (Fig. 30A y D), su eliminación del medio a partir del 15^o día permite una recuperación parcial del crecimiento con respecto a los discos en tratamiento continuo con el inhibidor aunque sin llegar a alcanzar el peso mostrado por el control

Una respuesta similar a la anterior se obtiene en los cultivos tratados con los dos inhibidores simultáneamente (Fig. 30C y D). Sin embargo, cuando el inhibidor utilizado es el DFMA, su eliminación del medio no supone recuperación alguna del crecimiento respecto a los discos que se mantuvieron permanentemente en DFMA (Fig. 30B y D).

En cuanto a los niveles endógenos de **poliaminas**, en los discos tratados con DFMO (Fig. 31A), la eliminación del inhibidor provoca de manera inmediata un notable descenso en los niveles endógenos de **putrescina** respecto a los cultivos en tratamiento continuo (+DFMO). Los niveles de **espermidina** disminuyen ligeramente tras la eliminación del inhibidor con respecto a los cultivos en tratamiento continuo (Fig. 31B), principalmente en los días posteriores al transfer (Fig. 31B).

Por contra, en los discos tratados con DFMA ya sea de manera individual o combinada con DFMO, su eliminación permite cierta recuperación en el nivel de **putrescina** respecto al control y a los cultivos en tratamiento continuo con DFMA (Fig. 31C y E). En relación a la acumulación de **espermidina**, la eliminación del inhibidor no repercute significativamente en comparación a los cultivos mantenidos en las condiciones iniciales (Fig. 31D y F).

En la Fig. 32., se representa la relación **Put/Spd** en los distintos tratamientos, observándose un descenso en dicha relación en los cultivos tratados inicialmente con DFMO y transferidos a un medio sin inhibidor, en comparación a los tratamientos de larga duración (Fig. 32A). En los cultivos tratados con DFMA o DFMO+DFMA, en cambio, dicha relación aumenta (Fig. 32 B y C).

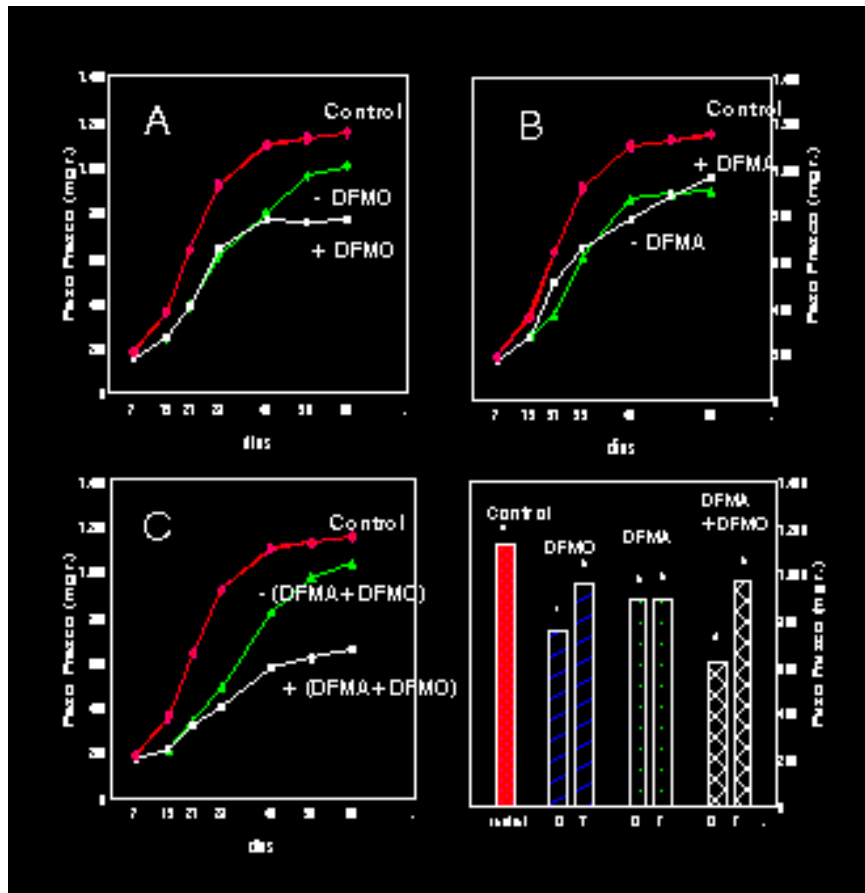


Fig. 30. Efecto de los inhibidores (0.1 mM) sobre el crecimiento de la pulpa. Los discos de ovario fueron cultivados durante 15 días en presencia de **DFMO** (A), **DFMA** (B) o **DFMO+DFMA** (C), y posteriormente transferidos a nuevos medios con (+) o sin (-) inhibidores. En el apartado D se muestra el peso final (60 días) para cada uno de los tratamientos (C: tratamiento continuo con inhibidor; T: Tratamiento interrumpido a los 15 días). El control hace referencia a discos que no han sido expuestos a los inhibidores (*barra sólida*). Los resultados son analizados estadísticamente mediante el test de Duncan ($p=0.01$).

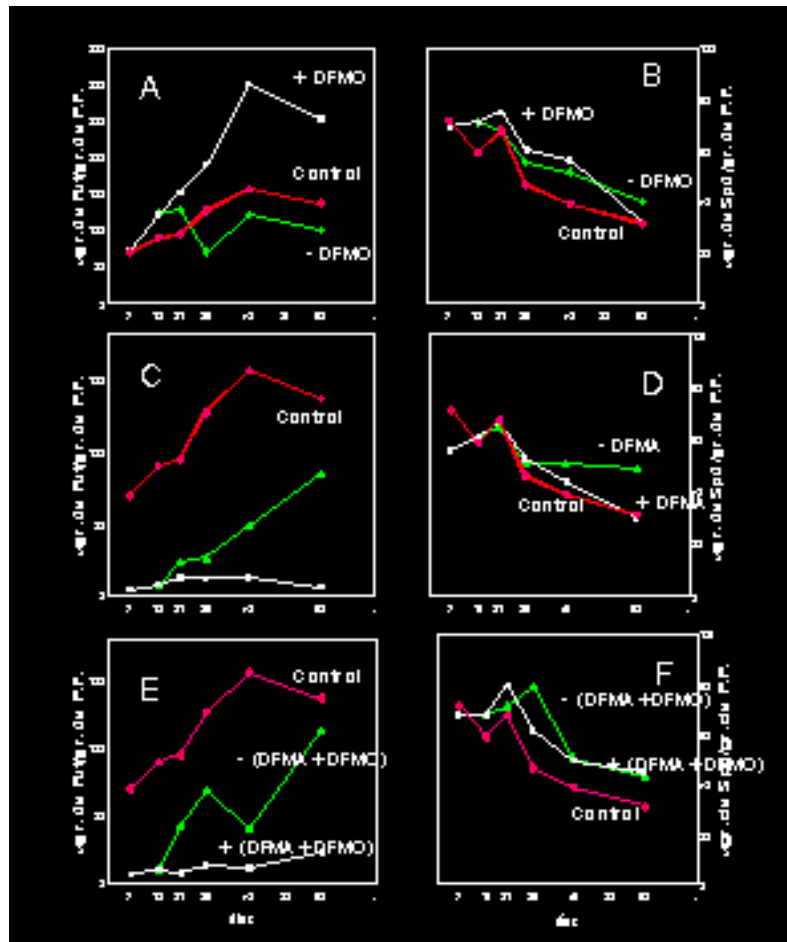


Fig. 31. Contenido endógeno de putrescina y espermidina en tejidos de la pulpa tratados durante 15 días con **DFMO** (A, B), **DFMA** (C, D) y una combinación de **ambos** inhibidores (E, F) y transferidos posteriormente a nuevos medios con (+) y sin (-) inhibidores. El *control* hace referencia a los discos no tratados con inhibidores.

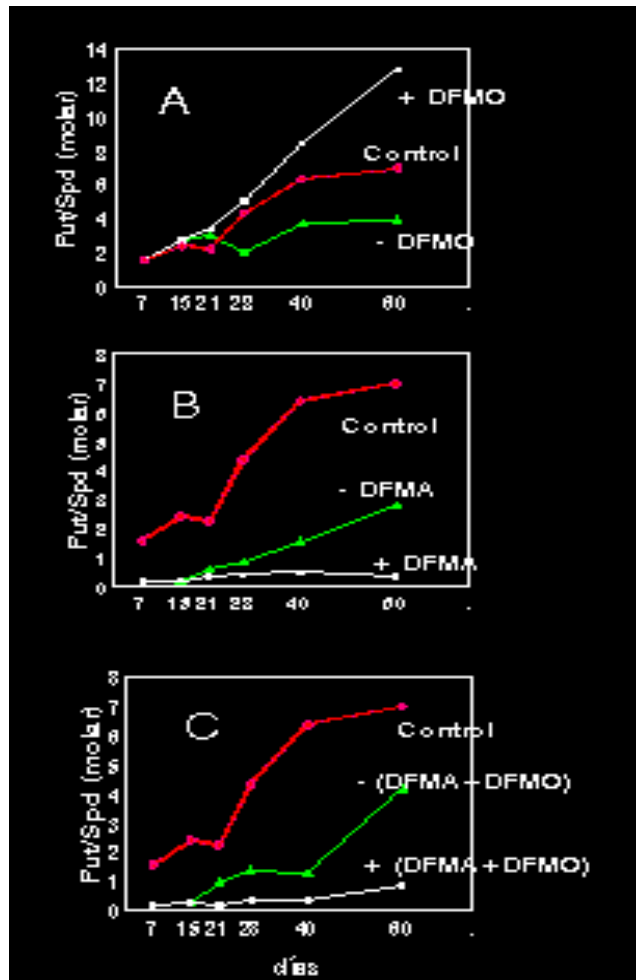


Fig. 32. Relación putrescina/espermidina (Put/Spd) en tejidos de la pulpa cultivados en presencia de **DFMO** (A), **DFMA** (B) o **una combinación de ambos** (C) durante 15 días y posteriormente transferidos a nuevos medios con (+) y sin (-) inhibidores. El control hace referencia a discos no tratados con inhibidores.

4.3.2. Efecto de los inhibidores de la síntesis de poliaminas en estadios no iniciales del desarrollo.

En la Fig. 33., se muestran los resultados relativos a la acumulación de poliaminas y el crecimiento de la pulpa en discos de ovario sometidos a un tratamiento con inhibidores a partir del 15^o día del cultivo. El cultivo de los discos es iniciado en un medio óptimo sin inhibidores y posteriormente (15^o día) se les transfiere a nuevos medios con DFMO, DFMA o una combinación de ambos. Se comparan los resultados frente a dos controles sin inhibidores: discos en medio óptimo sin transferir (*control*) y, los transferidos a un medio de igual composición (*control-T*). Se intenta así evaluar la repercusión relativa por parte de los restantes componentes del medio de cultivo (sales minerales, reguladores de crecimiento, carbohidratos, etc...) sobre la respuesta de los tejidos.

Los resultados obtenidos nos muestran, al igual que en las experiencias anteriores, un comportamiento desigual de los tejidos en función del inhibidor. La presencia de DFMO de manera individual o en combinación con DFMA promueve un descenso significativo en el crecimiento con relación a ambos controles. Sin embargo, no se aprecian diferencias cuando los discos son tratados con DFMA individualmente (Fig. 33D).

En los tratamientos con DFMO, la inhibición del crecimiento se acompaña además con un incremento en los niveles endógenos de **putrescina y espermidina** a partir del momento del transfer (Fig. 33A y B). Por contra, en los tratamientos con DFMA se aprecia un descenso en los niveles de **putrescina**, siendo especialmente patente cuando el DFMA es utilizado de manera individual (Fig. 33A).

Para la **espermidina**, su contenido endógeno depende de la presencia del DFMO. Mientras que en presencia del DFMA el nivel de esta poliamina es semejante al control, DFMO individualmente o combinado con DFMA estimula ligeramente su acumulación (Fig. 33B).

En la Fig. 33C., se puede observar como la relación **Put/Spd** en los cultivos transferidos a un medio con DFMO es superior al control, mientras que se obtienen valores inferiores en aquellos cultivos transferidos a DFMA o DFMO+DFMA . Es importante resaltar que cultivos con un crecimiento similar presentan distintos valores para dicha relación (Fig. 33C y D).

Las experiencias anteriores indican que la presencia de inhibidores de la síntesis de putrescina (DFMO y DFMA) inhiben el crecimiento de los tejidos de la pulpa, acentuándose dicha inhibición a medida que se incrementa la dosis del inhibidor. Sin embargo, esta inhibición no presenta correlación con los niveles endógenos de **poliaminas**. Así, mientras que el **DFMA** inhibe el crecimiento y al mismo tiempo la síntesis de **putrescina**, la inhibición producida cuando está presente el **DFMO** se acompaña, contrariamente al caso anterior, de un incremento en la concentración de esta sustancia. Por otra parte la presencia de este inhibidor en el medio de cultivo, independientemente del momento de su aplicación, dificulta el desarrollo de los tejidos; en cambio, cuando el inhibidor ensayado es el **DFMA** su acción sobre el crecimiento resulta mas efectiva en los primeros estadios del desarrollo. Por otra parte la relación **Put/Spd** tampoco parece ser determinante en el crecimiento de los tejidos de la pulpa como se ha comentado con anterioridad.

Los resultados dan pie inevitablemente a considerar la vía de la **ADC** como la mas importante en la de síntesis de la putrescina frente a la otra alternativa conocida (ODC).

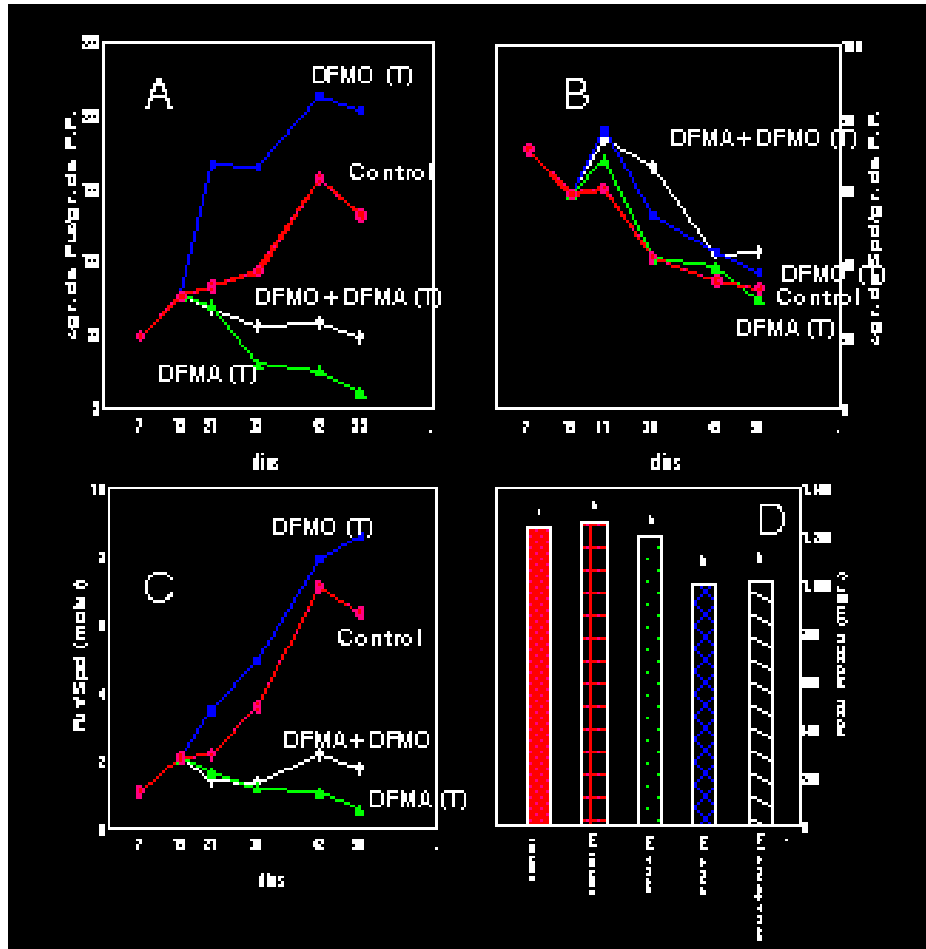


Fig. 33. Influencia del tratamiento tardío con inhibidores sobre la acumulación de putrescina (A) y espermidina (B), y el crecimiento final de la pulpa a los 50 días (D). Los discos se cultivaron durante 15 días en un medio sin inhibidores y posteriormente se transfirieron (T) a nuevos medios con DFMO, DFMA o una combinación de ambos (0.1 mM). Se comparan estadísticamente los valores de crecimiento mediante el test de Duncan ($p=0.01$). Control: cultivos sin inhibidores; Control-T: tratamiento con inhibidores a partir del 15º día.

APLICACION EXOGENA DE PUTRESCINA A CULTIVOS TRATADOS CON DFMO Y DFMA.

En los apartados anteriores, hemos analizado el efecto que producen diferentes concentraciones de DFMA y DFMO sobre el crecimiento y el contenido endógeno de putrescina y espermidina en los tejidos de la pulpa; ahora bien, el empleo de estos inhibidores en el estudio de la bioquímica y las implicaciones fisiológicas de las poliaminas en las plantas, debe ir acompañado de una aplicación exógena de putrescina con el fin de comprobar si las posibles alteraciones producidas por los inhibidores está motivado estrictamente por una disminución del contenido de esta diamina, y en consecuencia, existe posibilidad de recuperación por tratamientos exógenos con dicha sustancia, o son otras las implicaciones de estas moléculas a nivel de los tejidos.

Para adaptar este planteamiento a nuestro sistema experimental se han realizado diversas experiencias con los siguientes objetivos:

1. Evaluar el comportamiento de los tejidos en respuesta a la aplicación exógena de distintas concentraciones de putrescina sobre discos tratados simultáneamente con DFMA y DFMO.
2. Estudiar la cinética del crecimiento y la acumulación de poliaminas en discos tratados con DFMA y DFMO suplementados o no con putrescina exógena.

4.4.1. Efecto de distintas concentraciones de putrescina sobre el crecimiento en discos tratados con DFMO y DFMA.

Con el fin de comprobar si la inhibición del crecimiento producida por los inhibidores de la síntesis de putrescina es debida a un déficit de esta sustancia,

los cultivos tratados con DFMA y/o DFMO (0.1 mM) son suplementados simultáneamente con putrescina a dos concentraciones diferentes (0.1 ó 1 mM).

Tal como se observa en la Fig. 34, el crecimiento de la pulpa va a depender de la concentración de putrescina y del inhibidor utilizado. Cuando el inhibidor utilizado es el DFMO, el aporte exógeno de putrescina no tiene efectos significativos sobre el crecimiento. Sin embargo, se comprueba que en presencia del DFMA, la aplicación de putrescina ejerce una acción atenuante sobre la inhibición del crecimiento, hasta el punto de una total recuperación respecto al control no tratado con inhibidores a la dosis mas alta de putrescina (1 mM).

Cuando ambos inhibidores son ensayados simultáneamente, solamente se observa estimulación del crecimiento a la dosis 1 mM de putrescina, aunque no se alcanzan los niveles máximos de recuperación señalados con relación al uso del DFMA. La capacidad de recuperación del crecimiento en este caso está dificultada por el DFMO.

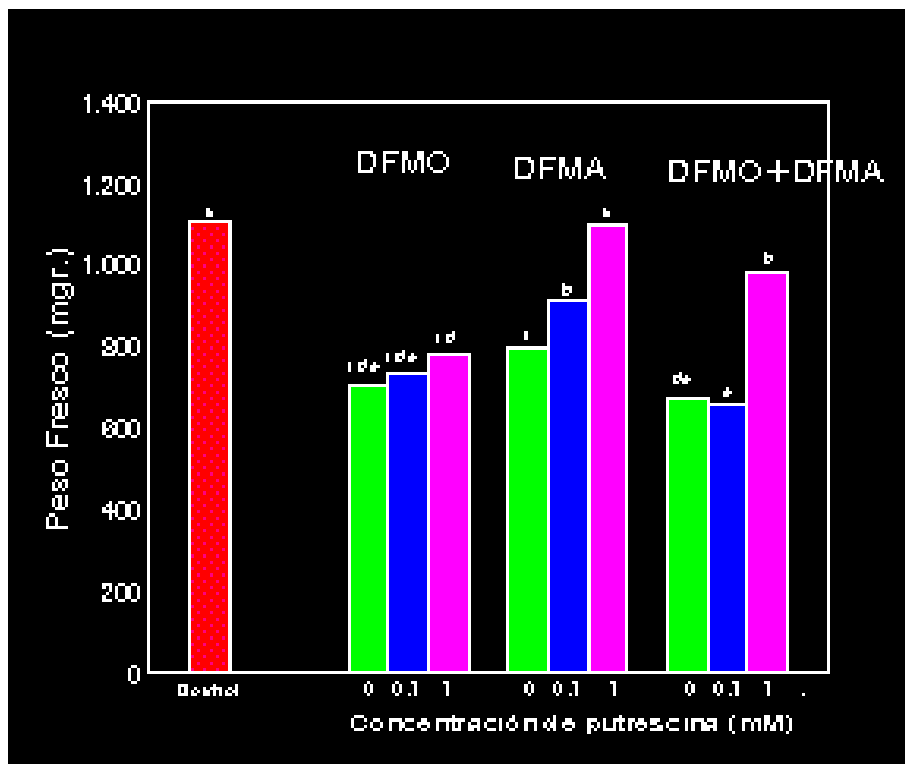


Fig. 34. Efecto de la aplicación exógena de putrescina sobre el crecimiento de la pulpa en discos tratados con **DFMO**, **DFMA** y **DFMO+DFMA (0.1 mM)**. Las barras con diferentes letras presentan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.01$) de acuerdo al test de Duncan.

4.4.2. Estudio cinético del crecimiento y la acumulación de poliaminas en discos tratados con DFMA y DFMO suplementados o no con putrescina exógena.

Se comentarán en primer lugar los resultados de la interacción entre la putrescina y el DFMO, y posteriormente los referidos a la interacción con DFMA y DFMO+DFMA, respectivamente.

En la Fig. 35., se muestra la cinética de crecimiento, en contenido de materia fresca y materia seca, así como las variaciones en los niveles endógenos de putrescina y espermidina, tanto en su forma libre como conjugada, en discos de ovario tratados con DFMO (0.1 mM) en presencia y ausencia de putrescina exógena. Se comparan los resultados respecto a un control sin tratamiento de inhibidores.

Tal como se puede observar la presencia del DFMO inhibe el crecimiento de una manera muy notoria, tanto si lo evaluamos en peso fresco o en peso seco. Dicha inhibición es irreversible o insensible al aporte exógeno de putrescina (Fig. 35A y B).

En relación con la acumulación de poliaminas, se percibe un aumento importante en la concentración de putrescina por el tratamiento con DFMO, en especial de su forma libre (Fig. 35C). La putrescina conjugada aumenta ligeramente durante los primeros días por efecto del inhibidor pero disminuye a partir de ese momento hasta un nivel equivalente o inferior al control (Fig. 35D). La adición de putrescina exógena conjuntamente con el inhibidor, induce una acumulación aún mayor de putrescina endógena tanto en forma libre o conjugada previsiblemente por un mecanismo de absorción (Fig. 35C y D).

Con respecto a la espermidina los resultados son algo más confusos. En ausencia de putrescina exógena, los discos tratados con DFMO, acumulan mayor concentración de espermidina libre que el control a lo largo de todo el cultivo; sin embargo, cuando la putrescina está presente, solamente en las dos primeras semanas se observa una mayor acumulación de esta poliamina (Fig. 35E). Los

niveles de espermidina conjugada son, al igual que para la putrescina, bastante inferiores al de las formas libres y no varían significativamente según esté o no presente la putrescina exógena (Fig. 35D y F).

Al contrario de lo ya reseñado para el DFMO, cuando el inhibidor utilizado es el DFMA, sus efectos sobre el crecimiento son anulados o revertidos completamente por la putrescina exógena. Como se puede observar en la Fig. 36A y B., el descenso en el peso fresco y peso seco debido a la presencia del inhibidor es compensado por el aporte de putrescina conjuntamente con el inhibidor.

Al mismo tiempo, el tratamiento con DFMA tiene un efecto muy potente sobre la síntesis de putrescina, pues tanto su forma libre (Fig. 36C) como la conjugada (Fig. 36D) descienden drásticamente respecto al control. El aporte de putrescina exógena, al tiempo que estimula el crecimiento eleva substancialmente los niveles endógenos de esta diamina durante las dos primeras semanas para, a partir de ese momento, disminuir gradualmente conforme transcurre el periodo de cultivo.

Por lo que respecta a la acumulación de espermidina, los tratamientos con DFMA, de manera individual o asociada a la putrescina exógena tienen una escasa incidencia; únicamente se observan variaciones significativas respecto al control durante los primeros días del cultivo en los que decae la concentración de espermidina libre (Fig. 36E). Para la forma conjugada (Fig. 36F), la presencia del inhibidor conlleva una ligera reducción respecto al control que es compensada parcialmente por la aportación de putrescina exógena.

Cuando ambos inhibidores son ensayados conjuntamente promueven un comportamiento de los tejidos en cuanto a crecimiento y acumulación de poliaminas, similar al observado cuando el inhibidor utilizado es el DFMA (Fig. 37 y 38). Sin embargo, la recuperación del crecimiento asociada al aporte exógeno de putrescina no alcanza los niveles observados en el control.

La presencia de los dos inhibidores provoca una disminución drástica en los niveles endógenos de putrescina tanto libre como conjugada con respecto al control, la cual es aliviada parcialmente por el tratamiento exógeno de putrescina al tiempo que se estimula el crecimiento (Fig. 37C y D).

El perfil de acumulación para la espermidina, es similar al expuesto anteriormente en relación con el DFMA, con niveles inferiores al control en los primeros días del cultivo y escasas diferencias a partir de ese momento (Fig. 37E y F).

Tal como ha quedado expuesto y se refleja en la Fig. 38., el comportamiento de los discos tratados con DFMA o con DFMO+DFMA sigue unas pautas similares. Sin embargo, la presencia del DFMO dificulta la recuperación total del crecimiento por efecto de la aplicación exógena de la putrescina, al tiempo que una mayor acumulación de esta sustancia es observada en los tejidos si lo comparamos con el tratamiento con DFMA. Los resultados nos llevan a la conclusión de que si bien ambos inhibidores interfieren claramente con el crecimiento de los tejidos de la pulpa, lo hacen a través de mecanismos de acción diferentes, en un caso se favorece la acumulación de putrescina (DFMO), y en otro, la impide (DFMA).

Por otra parte la incorporación de putrescina al medio de cultivo en ausencia de inhibidores (*medio óptimo*), produce un ligero incremento en el peso fresco, no así en el peso seco (Fig. 39A y B), coincidiendo además con un aumento en los niveles de putrescina libre (Fig. 39C). Respecto a la putrescina conjugada (Fig. 39D) únicamente se observan cambios de valor significativo en los primeros días cuando el aporte de putrescina exógena hace incrementar la concentración endógena. Ocurre algo parecido respecto a la espermidina cuyos niveles apenas se modifican por la incorporación de putrescina exógena (Fig. 39D y F).

En la Fig. 40., se muestra la relación peso seco/peso fresco en presencia a ausencia de putrescina en los distintos tratamientos objeto de estudio en este capítulo. Tal como se puede observar, la presencia de putrescina exógena hace

disminuir dicha relación en todos los tratamientos, lo cual parece indicar un aumento en el grado de hidratación de los tejidos por efecto de dicha sustancia.

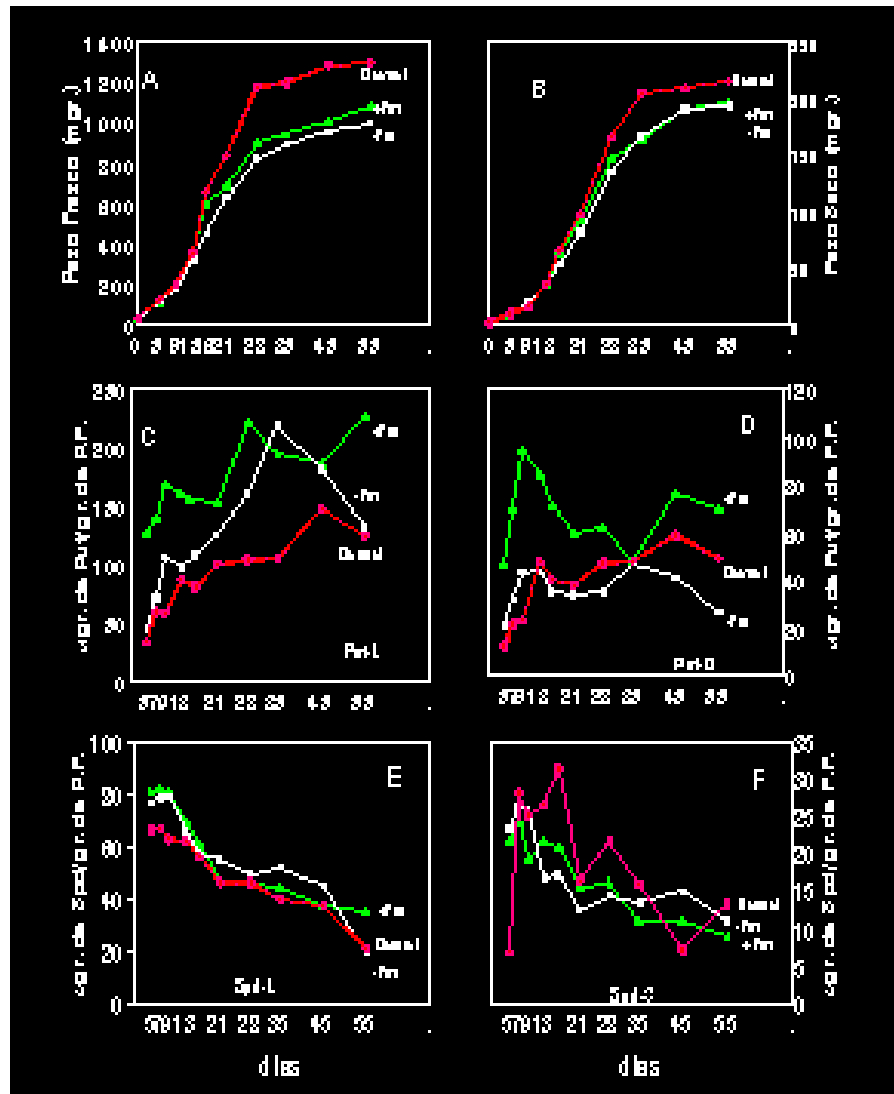


Fig. 35. Efecto de la aplicación de **putrescina** (1 mM) –color verde- sobre el crecimiento (**A, B**) y la acumulación de poliaminas en forma libre (**C, E**) y conjugada (**D, F**) en discos tratados con **DFMO** (0.1 mM) y sin Putrescina -color blanco-. El control –color rojo- hace referencia a los discos cultivados sobre un medio óptimo (*sin inhibidores ni putrescina*).

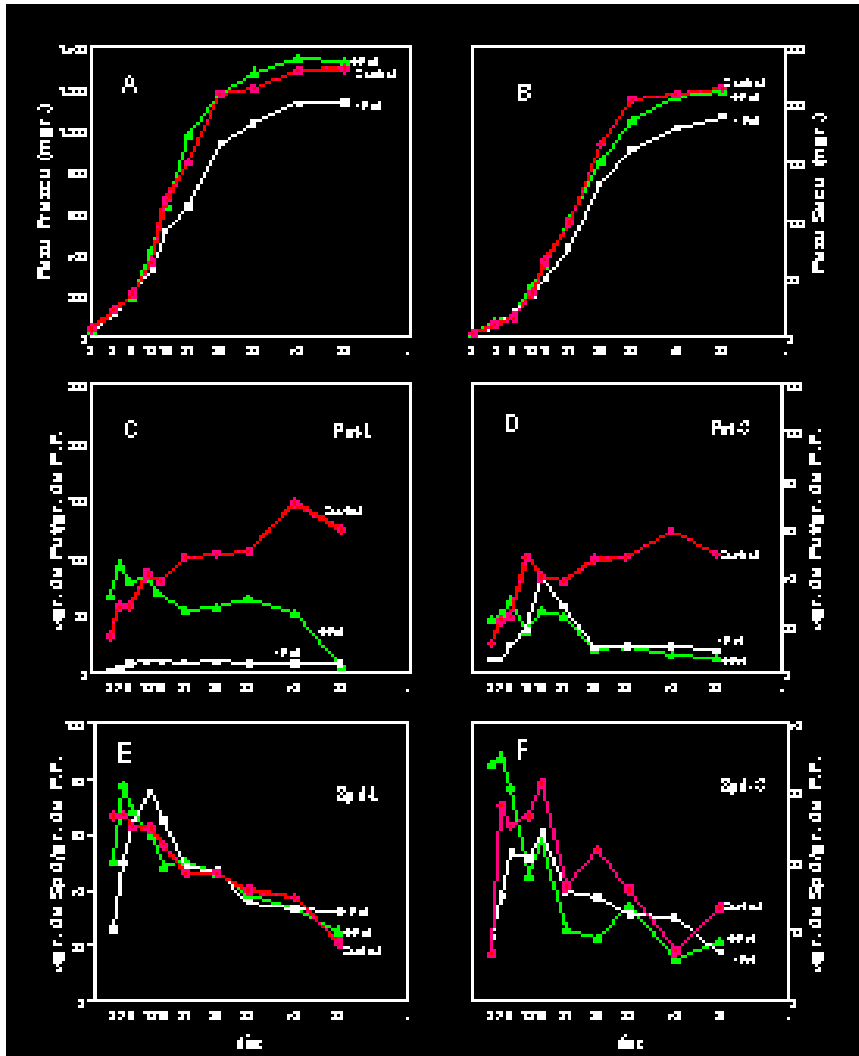


Fig. 36. Efecto de la aplicación de **putrescina** (1 mM) –color verde- sobre el crecimiento (A, B) y la acumulación de poliaminas en forma libre (C, E) y conjugada (D, F) en discos tratados con **DFMA** (0.1 mM) y sin Putrescina –color blanco-. El control –color rojo- hace referencia a los discos cultivados sobre un medio óptimo (sin inhibidores ni putrescina).

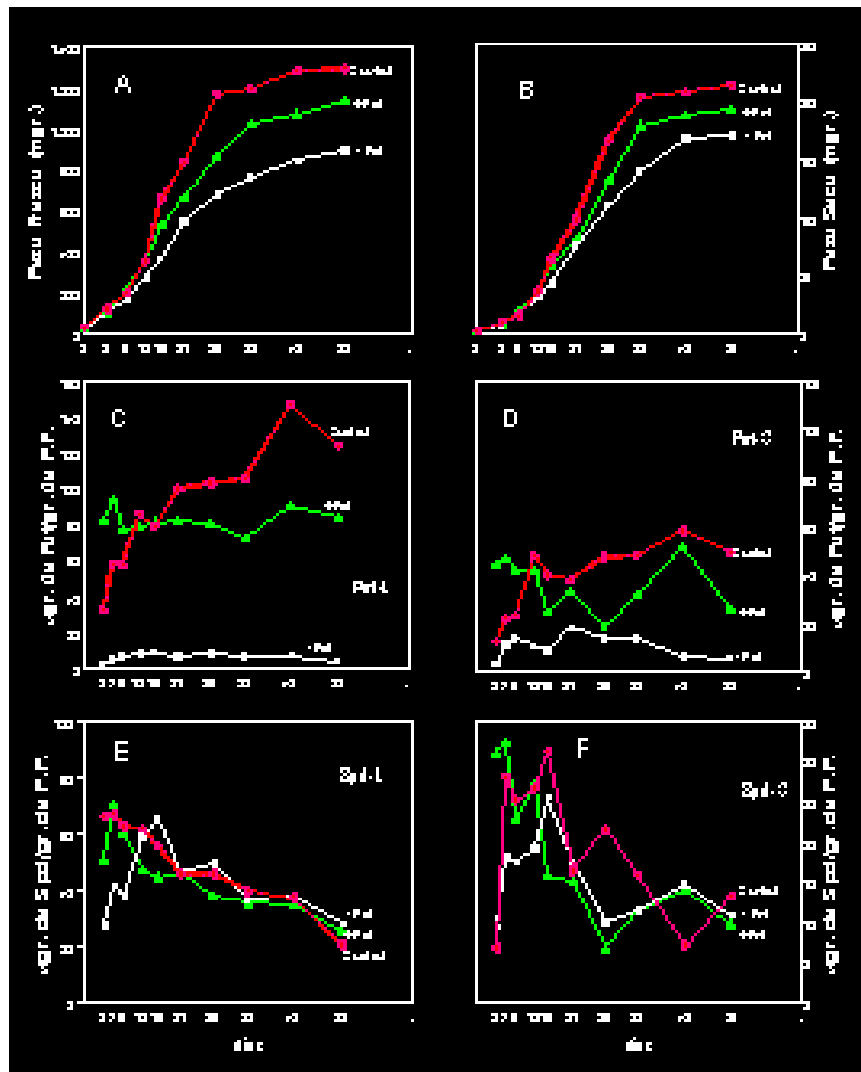


Fig. 37. Efecto de la aplicación de **putrescina** (1 mM) –color verde- sobre el crecimiento (A, B) y la acumulación de poliaminas en forma libre (C, E) y conjugada (D, F) en discos tratados con **DFMO+DFMA** (0.1 mM) y sin Putrescina -color blanco-. El control –color rojo- hace referencia a los discos cultivados sobre un medio óptimo (*sin inhibidores ni putrescina*).

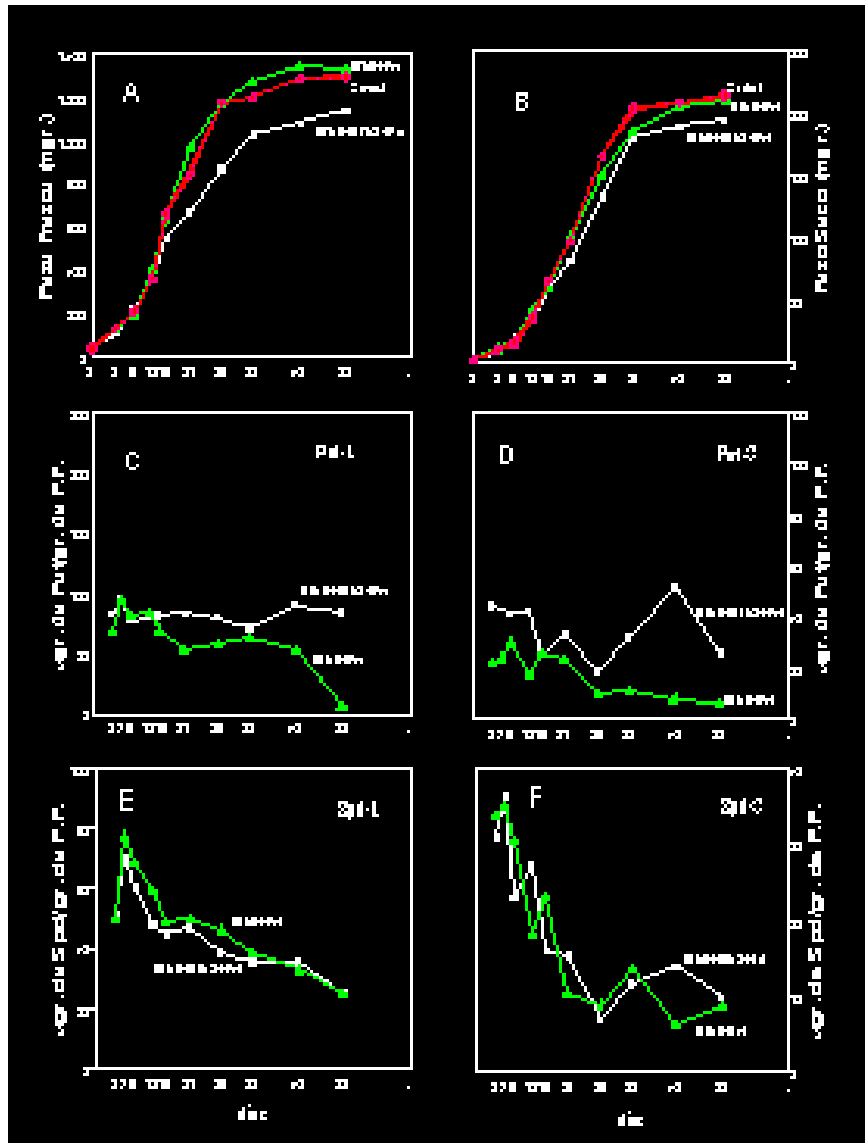


Fig. 38. Efecto de la aplicación de **putrescina** (1 mM) sobre el crecimiento (**A, B**) y la acumulación de poliaminas en forma libre (**C, E**) y conjugada (**D, F**) en discos tratados con **DFMA** –color verde– de manera individual y asociada al **DFMO** (0.1 mM) –color blanco–. El control –color rojo– hace referencia a los discos cultivados sobre un medio óptimo (*sin inhibidores ni putrescina*).

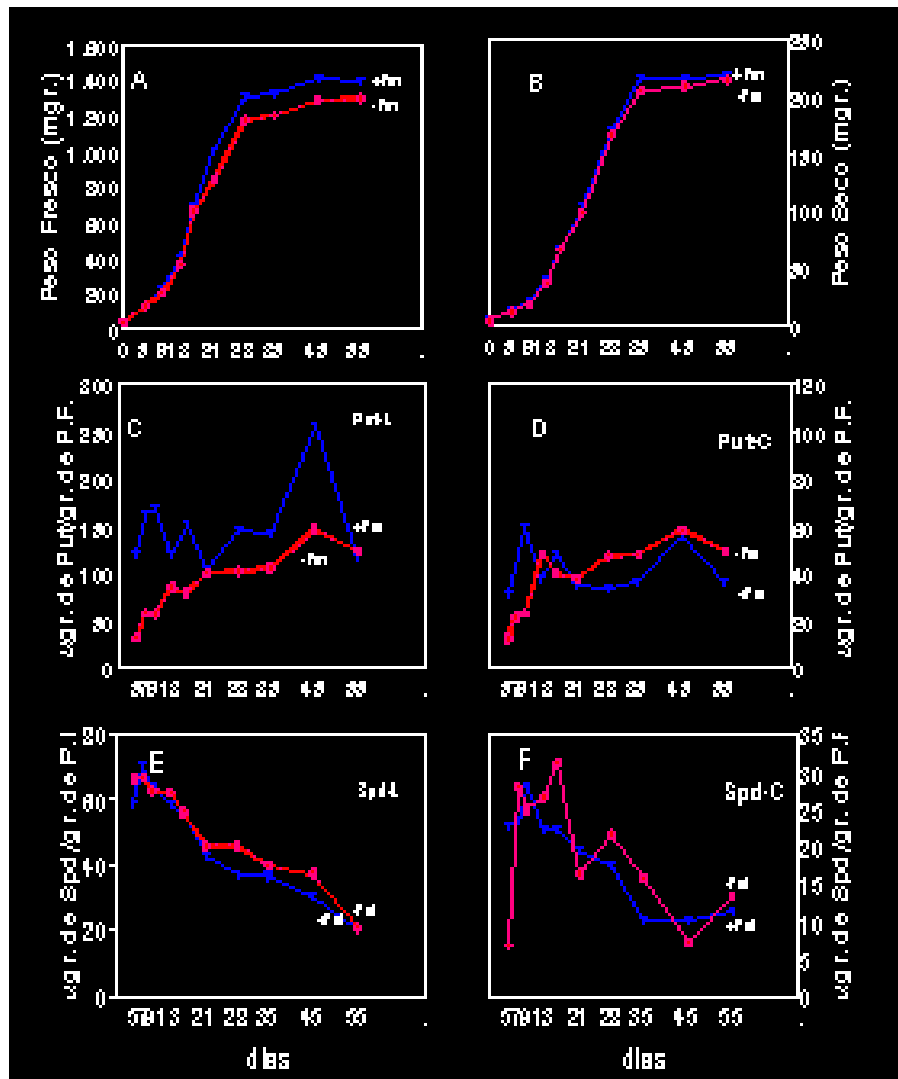


Fig. 39. Efecto de la aplicación exógena de **putrescina (1 mM)** -color azul- en un *medio óptimo* sobre el crecimiento **(A, B)** y la acumulación de poliaminas en forma libre **(C, E)** y conjugada **(D, F)**. Control sin Putrescina -color rojo-

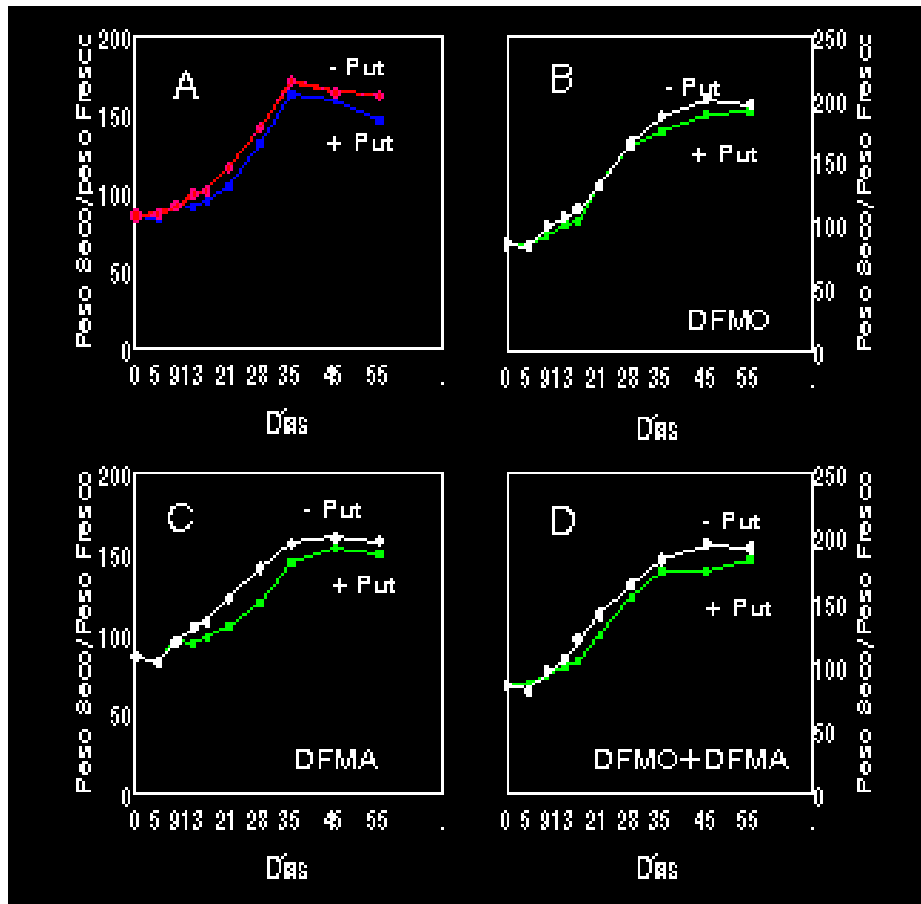


Fig. 40. Efecto de la aplicación de **putrescina** (1 mM) sobre la relación **peso seco/peso fresco** de los tejidos de la pulpa en discos de ovario cultivados sobre un **medio óptimo** (A), o suplementado con **DFMO** (B), **DFMA** (C) o una **combinación de ambos** (D).

4.4.3. Efecto de la putrescina exógena sobre discos tratados con distintas concentraciones de DFMO y DFMA.

En el apartado 4.4.2 hemos visto como la disminución del crecimiento producido por los inhibidores de la biosíntesis de poliaminas (DFMA y DFMO) puede ser revertida parcial o totalmente por un aporte exógeno de putrescina, estando condicionado el grado de respuesta de los tejidos a la concentración de putrescina y la presencia o no del DFMO. Mientras que los tejidos tratados exclusivamente con DFMA, recuperan totalmente el crecimiento con respecto al control, no ocurre igual cuando está presente el DFMO, ya sea combinado con DFMA en cuyo caso se observa una recuperación parcial del crecimiento, o aisladamente en que se pierde toda posibilidad de reversión. Por otra parte, la acumulación de putrescina en los tejidos presenta una relación antagónica con la recuperación del crecimiento.

Al objeto de comprobar si la respuesta de los tejidos a la putrescina exógena varía en función de la concentración de inhibidor, los discos de ovario son tratados con DFMA y/o DFMO a concentraciones 0.1 y 0.5 mM., suplementándolos o no con putrescina exógena a concentración 1 mM.

Crecimiento

En la Fig. 41., se representa el crecimiento en valores porcentuales respecto al control (*medio óptimo*) de los distintos tratamientos con inhibidores en presencia o ausencia de putrescina exógena. Los datos numéricos se recogen en las Tablas 12 y 13. Puede observarse que la respuesta de los tejidos a la aplicación de putrescina va a depender del inhibidor y su concentración.

Los discos tratados con DFMO a la concentración mas baja (0.1 mM) solamente muestran una ligera recuperación del crecimiento en peso fresco y peso seco por efecto de la putrescina exógena a los 15 días de cultivo (Fig. 41A y B). Con la dosis mayor del inhibidor (0.5 mM) no sólo se reduce aún mas el crecimiento sino que se pierde toda posibilidad de recuperación.

Resultados similares se obtienen cuando el DFMO esta asociado al DFMA a la mayor concentración (0.5 mM); de igual manera, la putrescina exógena carece de efecto (Fig. 41E y F). Sin embargo, sí existe estimulación clara del crecimiento a la concentración menor (0.1 mM).

Por otra parte, cuando el inhibidor empleado es exclusivamente el DFMA, los aportes de putrescina revierten por completo su acción inhibidora incluso a la mayor concentración, como lo prueba el hecho de que no existan diferencias significativas con relación al control en peso fresco o peso seco (Fig. 41C y D; Tabla 12 y 13).

En última instancia, es de resaltar que si bien la putrescina exógena estimula o revierte los efectos del DFMA, presumiblemente compensando el descenso del contenido endógeno de esta diamina, cuando es aplicada sobre un medio carente de inhibidores (*medio óptimo*) no supone mejoría alguna para el crecimiento (Tablas 12 y 13).

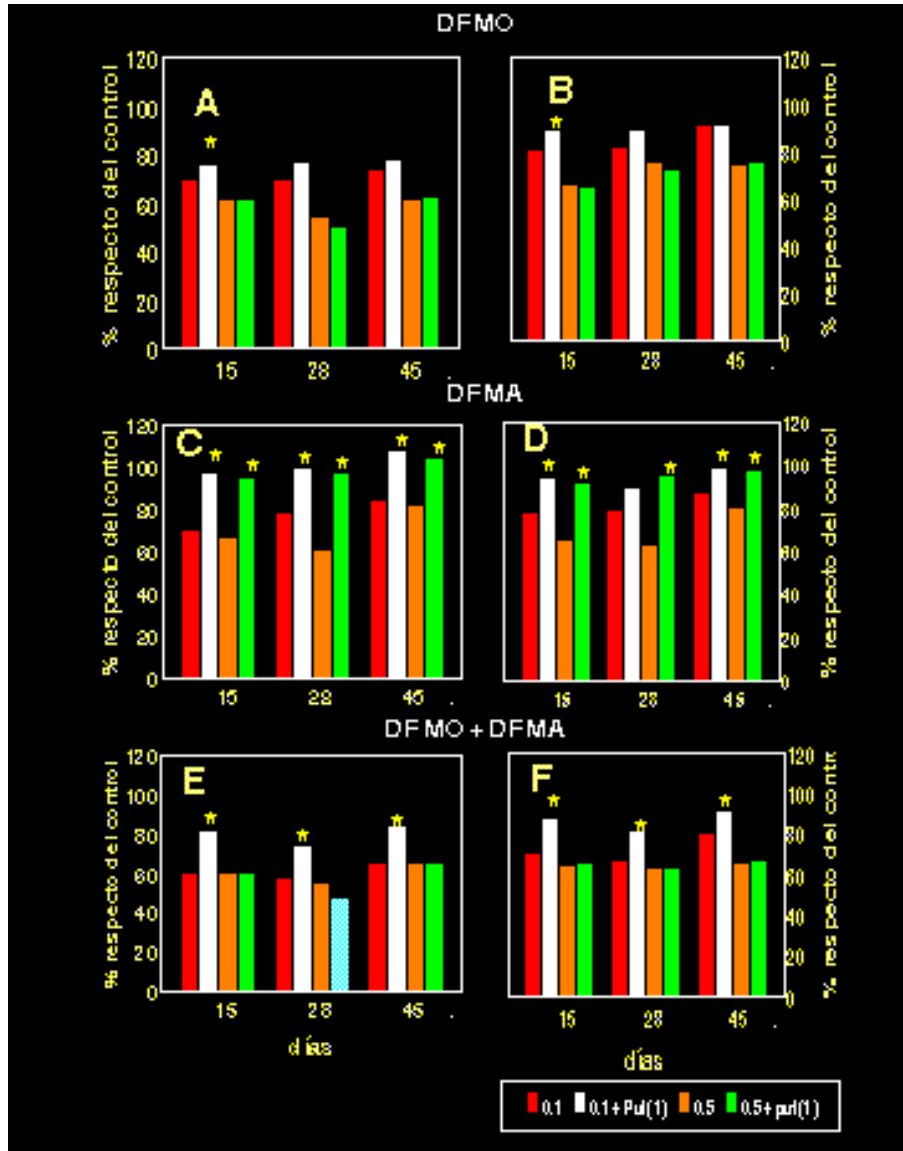


Fig. 41. Efecto de la putrescina exógena (1 mM) sobre el crecimiento de la pulpa en materia fresca y materia seca, en discos tratados con DFMO (A, B), DFMA (C, D), y DFMO+DFMA (E, F) a distintas concentraciones (0.1 y 0.5 mM). Se expresan los resultados en valores porcentuales respecto a un control en *medio óptimo*. Los valores marcados con asterisco en los tratamientos con putrescina difieren significativamente ($p=0.01$) de los tratamientos sin putrescina para cada una de las concentraciones del inhibidor.

Tratamiento	Dia 15				Dia 28				Día 45			
	Peso fresco		Peso seco		Peso fresco		Peso seco		Peso fresco		Peso seco	
Control	659 (100)	a	65 (100)	a	1177 (100)	b	166 (100)	a	1286 (100)	a	208 (100)	a
Control + Put	680 (103)	a	64 (97)	ab	1309 (111)	a	171 (103)	a	1400 (109)	a	215 (103)	a
DFMO	461 (70)	c	53 (81)	c	826 (70)	d	137 (82)	b	960 (74)	bc	192 (92)	bc
DFMO + Put	503 (76)	ab	58 (89)	ab	907 (77)	cd	147 (89)	b	1008 (78)	bc	191 (91)	bc
DFMA	459 (70)	c	51 (78)	cd	937 (79)	c	130 (79)	b	1097 (85)	b	181 (87)	cd
DFMA + Put	648 (98)	a	62 (94)	ab	1175 (100)	b	151 (90)	b	1399 (109)	a	207 (99)	a
DFMA + DFMO	392 (60)	c	46 (70)	d	982 (58)	e	110 (67)	c	856 (66)	c	168 (80)	d
DFMA + DFMO + Put	537 (82)	b	57 (88)	bc	876 (74)	cd	134 (81)	b	1081 (85)	b	190 (91)	c

Tabla 12. Efecto sobre el contenido de materia fresca y materia seca de la aplicación exógena de putrescina (**1 mM**) a cultivos tratados con **DFMA**, **DFMO** y **DFMA+DFMO (0.1 mM)**. Se representa el peso medio de 20 discos de ovario. Aquellos valores seguidos de la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0.01$). los valores dentro del paréntice representan el porcentaje con respecto al control.

	Dia 15				Dia 28				Día 45			
Tratamiento	Peso fresco		Peso seco		Peso fresco		Peso seco		Peso fresco		Peso seco	
Control	349	a	43	a	1066	a	141	a	1197	a	205	a
	(100)		(100)		(100)		(100)		(100)		(100)	
Control + Put	483	a	51	a	1174	a	148	a	1299	a	216	a
	(123)		(117)		(110)		(105)		(108)		(105)	
DFMO	243	c	29	c	587	bc	108	b	748	c	153	b
	(62)		(66)		(55)		(76)		(62)		(92)	
DFMO + Put	243	c	28	c	546	bc	102	bc	750	c	155	b
	(62)		(65)		(51)		(73)		(63)		(76)	
DFMA	264	c	29	c	653	b	90	c	879	b	165	b
	(67)		(66)		(61)		(63)		(82)		(80)	
DFMA + Put	373	b	40	b	1039	a	134	a	1250	a	202	a
	(95)		(92)		(97)		(95)		(104)		(98)	
DFMA + DFMO	236	c	28	c	582	bc	89	c	773	c	136	c
	(60)		(65)		(55)		(63)		(65)		(66)	
DFMA + DFMO + Put	240	b	29	c	515	c	89	c	783	b	137	c
	(61)		(66)		(48)		(63)		(65)		(67)	

Tabla 12. Efecto sobre el contenido de materia fresca y materia seca de la aplicación exógena de putrescina (**1 mM**) a cultivos tratados con **DFMA**, **DFMO** y **DFMA+DFMO (0.5 mM)**. Se representa el peso medio de 20 discos de ovario. Aquellos valores seguidos de la misma letra en cada columna no presentan diferencias significativas según el test de Duncan ($p=0.01$). los valores dentro del paréntice representan el porcentaje con respecto al control.

Niveles endógenos de putrescina y espermidina.

Tal como se observa en la Fig. 42., los tratamientos con DFMA, independientemente de su concentración, de manera individual (Fig. 42C y D) o combinada con DFMO (Fig. 42E y F), produce una disminución muy importante de los niveles endógenos de putrescina especialmente en su forma libre, no así cuando el inhibidor utilizado es el DFMO en cuyo caso se observa una acumulación de putrescina.

La repercusión del tratamiento con putrescina exógena sobre su metabolización y acumulación endógena va a depender de la presencia del DFMO y la concentración de éste. A medida que aumenta la concentración de este inhibidor, se estimula aun mas la acumulación de putrescina tanto en su forma libre como conjugada (Fig. 42A y B). El aporte adicional de putrescina exógena repercute en una mayor acumulación endógena como era de esperar por un mecanismo de absorción, pero llama la atención sobremanera que el incremento sea mayor cuando el inhibidor actúa a una dosis alta, lo cual apoyaría la existencia de un mecanismo de acción diferente, presumiblemente vinculado al metabolismo o catabolismo de la putrescina.

En cuanto a la espermidina, la concentración del inhibidor no parece tener relevancia en lo referente a su forma libre (Fig. 43A); sí la tiene en cambio, para sus formas conjugadas ya que el incremento en la concentración del inhibidor eleva también los niveles endógenos de esta poliamina (Fig. 43B).

Cuando el inhibidor utilizado es el DFMA, (Fig. 42C y D), el aporte exógeno de putrescina eleva ligeramente los contenidos endógenos aunque no parece haber diferencias significativas entre los cultivos tratados con 0,1 mM y los tratados con una dosis mas elevada (0.5 mM). Idénticos resultados se obtienen cuando se analiza el contenido en espermidina libre (Fig. 43C), no así para los niveles de espermidina conjugada, donde la presencia de DFMA (0,5 mM) parece incrementar ligeramente sus niveles endógenos (Fig. 43D).

Cuando el DFMA es ensayado, conjuntamente con el DFMO, en presencia de putrescina exógena, su acción sobre la acumulación de putrescina y espermidina va a depender de la concentración del inhibidor. En este sentido, al aumentar la dosis de los inhibidores se produce una mayor acumulación de putrescina, tanto en sus formas libre como conjugadas (Fig. 42E y F). En los mismos términos resulta afectada la acumulación de espermidina (Fig. 43E y F).

Los datos precedentes dejan constancia de que la presencia del DFMO en el medio de cultivo promueve una acumulación en exceso de putrescina paralelamente a la inhibición del crecimiento.

¿Pudiera ocurrir que la presencia de DFMO dificultara el posible catabolismo de la putrescina y que dicho catabolismo fuese necesario para el crecimiento de los cultivos?

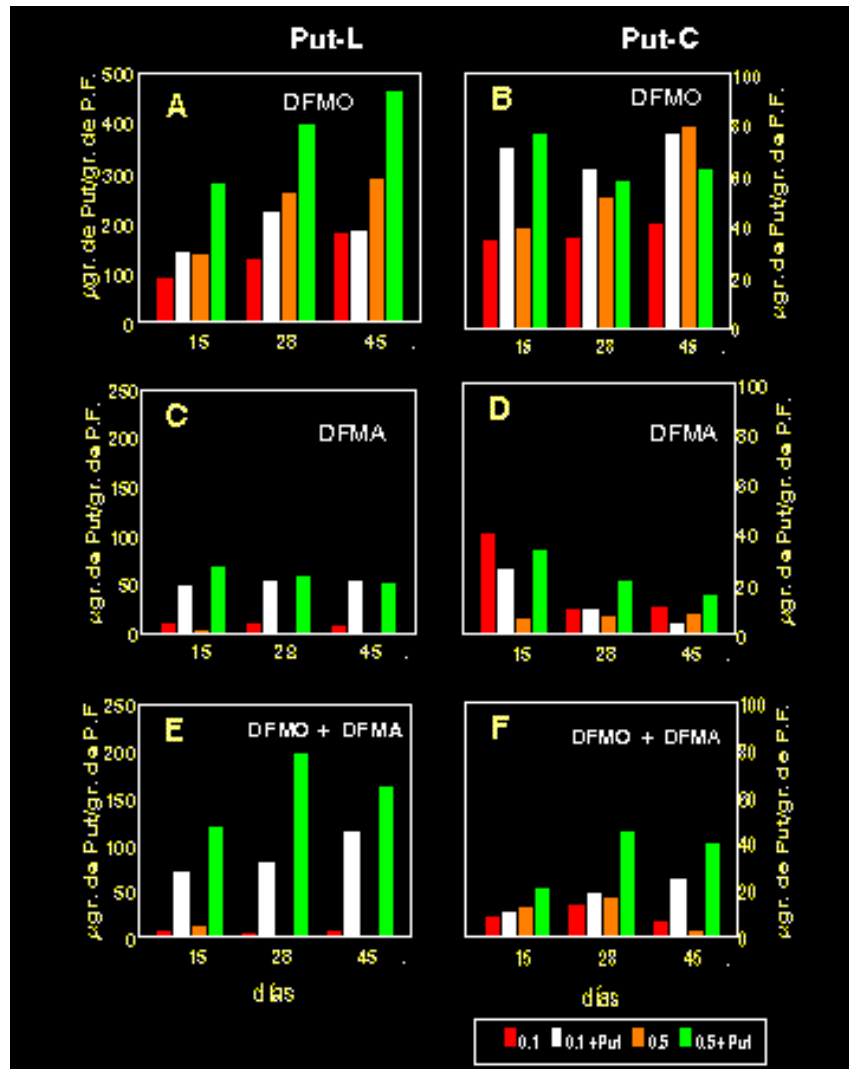


Fig. 42. Efecto de la putrescina exógena (1 mM) sobre la acumulación de putrescina endógena, libre y conjugada, en discos tratados con distintas concentraciones (0.1 y 0.5 mM) de DFMO (A, B), DFMA (C, D), o DFMO+DFMA (E, F).

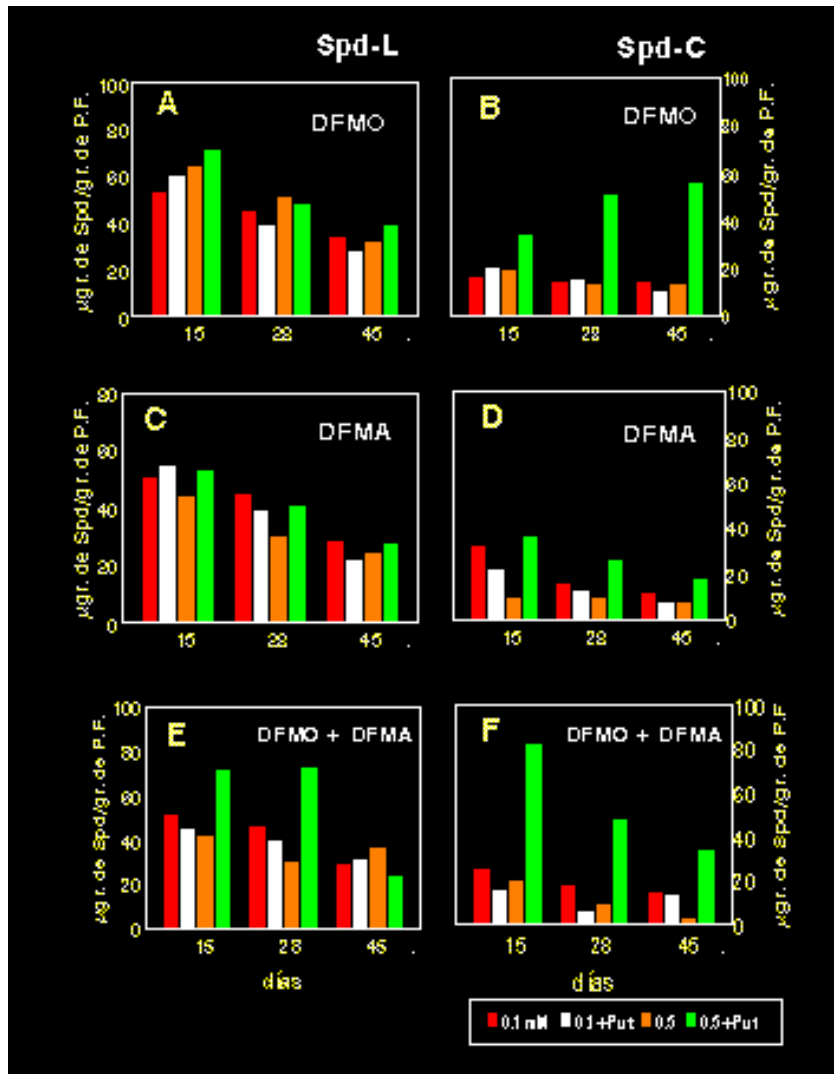


Fig. 43. Efecto de la putrescina exógena (1 mM) sobre la acumulación de espermidina endógena, libre y conjugada, en discos tratados con distintas concentraciones (0.1 y 0.5 mM) de DFMO (A, B), DFMA (C, D), o DFMO+DFMA (E, F).

4.5. EFECTO DE LA APLICACION EXOGENA DE ORNITINA Y ARGININA SOBRE EL CRECIMIENTO Y CONTENIDO ENDOGENA EN POLIAMINAS

Como ha sido reseñado en el capítulo de Introducción, en las plantas existen dos vías alternativas para la síntesis de putrescina, una vía directa catalizada por la *ornitina descarboxilasa* (ODC) que utiliza como sustrato a la **ornitina**, y otra vía indirecta que parte de la **arginina**. En esta segunda vía el primer paso en la cadena de reacciones que llevan a la putrescina es catalizada por la *arginina descarboxilasa* (ADC).

En la presente experiencia pretendemos evaluar la influencia que estos dos aminoácidos, precursores de la síntesis de putrescina, ejercen sobre el crecimiento y el contenido endógeno de putrescina y espermidina. Con este propósito, diferentes concentraciones de ornitina y arginina (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mM) son añadidas al medio de cultivo y se valoran sus efectos sobre el crecimiento a los 45 días (Fig. 44). El análisis de las poliaminas se realiza a los 15, 28 y 45 días (Fig. 45).

Tal como se observa en la Fig. 44., el aporte de ornitina carece de efecto sobre el crecimiento, peso fresco y peso seco, a las bajas concentraciones (0.1 y 0.5 mM). Sin embargo, a una concentración mayor (1 mM), se produce una disminución en el peso fresco y peso seco con valor significativo respecto al control. En lo que respecta a la arginina, su presencia carece asimismo de efecto alguno sobre el crecimiento en las concentraciones que se recogen en la gráfica. Concentraciones mayores (5 y 10 mM) tienen efectos tóxicos sobre los tejidos y determinan su necrosamiento a los pocos días de iniciado el cultivo.

En cuanto a la síntesis de poliaminas, es interesante resaltar que la presencia de ornitina estimula la acumulación de putrescina (Fig. 45B) durante los primeros 15 días del cultivo en todas las concentraciones estudiadas. Sin embargo, a partir del 15º día las diferencias respecto al control se minimizan

en las condiciones con bajas concentraciones del aminoácido; sólo se mantienen altas a la concentración 1 mM, en especial hacia los 45 días del cultivo, curiosamente cuando el crecimiento es menor. En presencia de arginina (Fig. 45A), las diferencias respecto al control en cuanto al contenido de putrescina son aún menores y al contrario de lo señalado para el otro aminoácido, el mayor crecimiento en peso fresco de los tejidos (1 mM de arginina) se correlaciona con una disminución en el contenido de putrescina a los 45 días.

En relación a la acumulación de espermidina, los aportes de arginina (Fig. 45C) y ornitina (Fig. 45D) repercuten de manera leve durante los primeros 15 días del cultivo, y adquiere un poco más de relevancia, en el caso de la ornitina.

En la Tabla 14, se observa como la relación Put/Spd se va incrementando a lo largo del cultivo en todos los tratamientos estudiados, siendo superior al control en todas las concentraciones a los 15 y 28 días.

Estos resultados ponen de manifiesto, un vez más, la existencia de una correlación entre inhibición del crecimiento e incremento de los niveles endógenos en poliaminas, en especial la putrescina, tal como queda reseñado en los tratamientos de los cultivos con ornitina 1 mM.

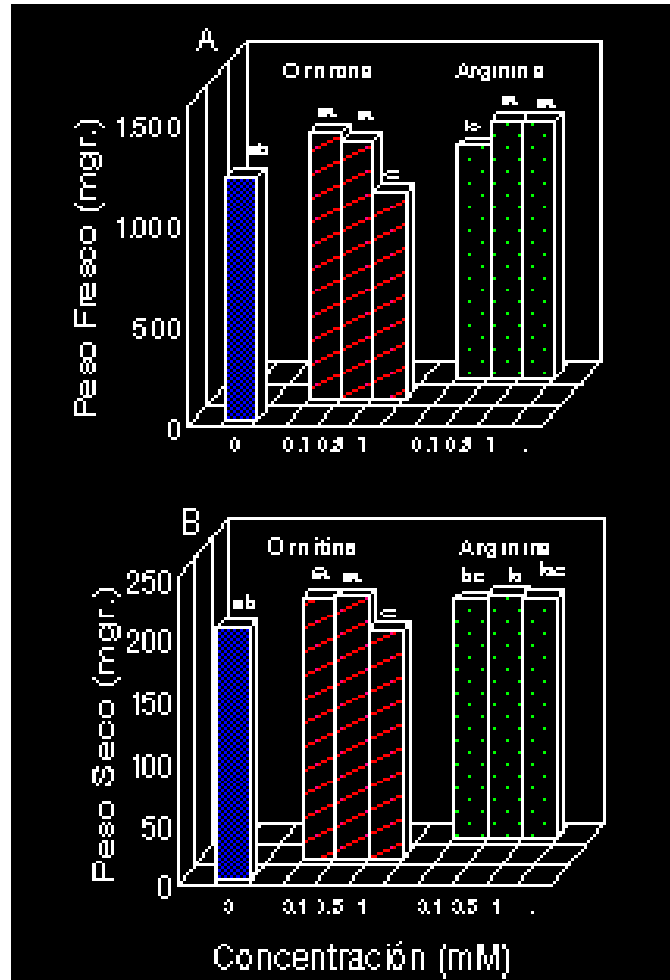


Fig. 44. Efecto de distintas concentraciones de **ornitina** y **arginina** sobre el crecimiento en materia fresca y materia seca de los tejidos de la pulpa. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p=0.01$) de acuerdo con el test de Duncan.

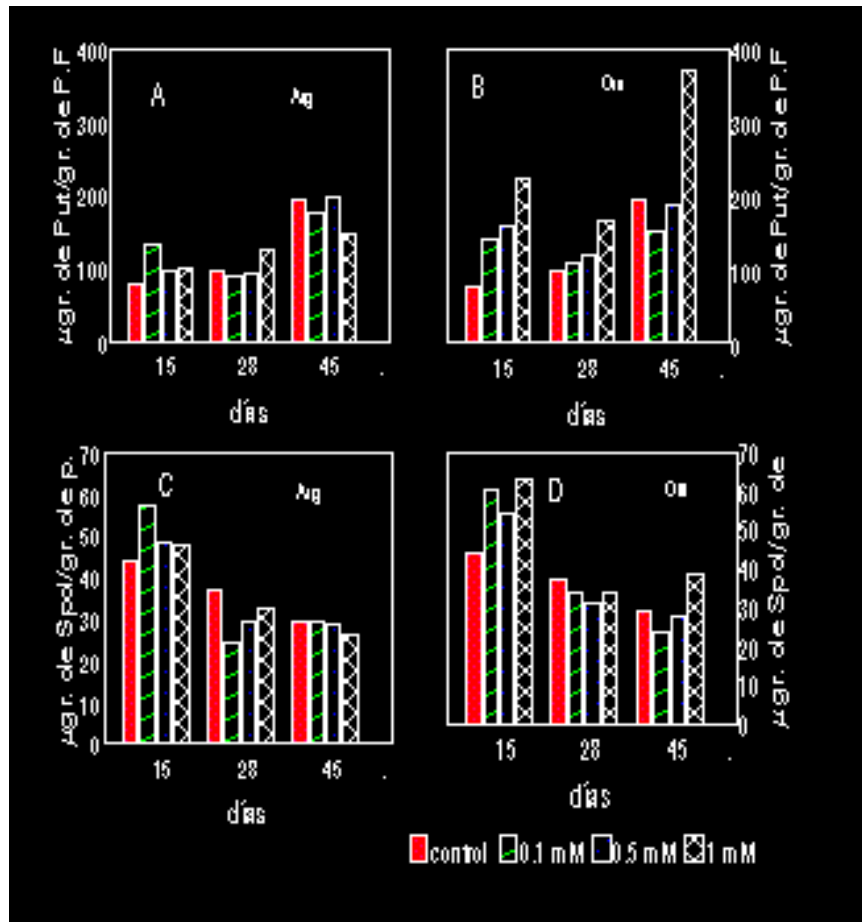


Fig. 45. Efecto de distintas concentraciones de **ornitina** y **arginina** sobre la acumulación de putrescina (**A, B**) y espermidina (**C, D**). Se valora el efecto de distintas concentraciones de cada aminoácido y se comparan los resultados respecto al control a los 15, 28 y 45 días de cultivo.

Tratamiento	días		
	15	28	45
Control	Put/Spd		
	2.53	4.18	10.55
Ornitina (mM)			
0.1	3.64	5.20	9.61
0.5	4.61	5.95	10.54
1	5.63	7.72	15.26
Arginina (mM)			
0.1	3.72	5.84	9.40
0.5	3.10	5.07	10.87
1	3.36	5.95	8.79

Tabla 14. Efecto de la aplicación exógena de distintas concentraciones de (0.1, 0.5 y 1 mM) de **arginina** y **ornitina** sobre le relación Put/Spd en los tejidos de la pulpa de discos de ovario cultivados "in Vitro". La condición control hace referencia a los discos cultivados en un medio óptimo.

4.5.1. Efecto de la aplicación exógena de ornitina, DFMA y DFMO sobre contenido endógeno en poliaminas.-

Como ha quedado expuesto en el apartado anterior, el aporte de ornitina, especialmente a una concentración 1 mM., estimula la acumulación de poliaminas, principalmente putrescina. Por otro lado, en experiencias anteriores ha quedado patente que la vía más probable para la síntesis de putrescina en nuestro material experimental es la vía ADC. Sin embargo, la ornitina es el precursor directo de la síntesis de putrescina vía ODC; cabe preguntarse por lo tanto, si el incremento en los niveles endógenos de putrescina en los cultivos tratados con ornitina tiene lugar vía ODC o por el contrario esta acumulación es independiente de esta ruta metabólica.

Para tratar de dar respuesta a esta pregunta, discos de ovario fueron tratados con ornitina (1 mM) en combinación con inhibidores de la síntesis de putrescina, DFMA o una mezcla de DFMA+DFMO (0.1 mM). Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 46.

Tal como se puede observar en la Fig. 46A y B, la presencia de ornitina tanto en los tratamientos con DFMA como cuando ambos inhibidores son ensayados conjuntamente, produce un descenso considerable en los niveles endógenos de putrescina libre y conjugadas en comparación al control sin inhibidores. Para la espermidina la presencia o no de inhibidores no parece ser determinante en cuanto al contenido endógeno de esta poliamina (Fig. 46C y D) con respecto a los cultivos no tratados.

Estos resultados parecen indicar que la acumulación de putrescina en los cultivos tratados con ornitina se debe a la activación de la vía ADC y no a la ODC como podría parecer más lógico, ya que los niveles endógenos en poliaminas son similares cuando se bloquea la ruta ADC con el DFMA que cuando ambas rutas están bloqueadas con DFMA y DFMO. Incluso cuando ambos inhibidores están presentes en el medio de cultivo se observa un ligero incremento en los niveles de putrescina libre, no así en las formas conjugadas donde el contenido es inferior (Fig. 46C y D).

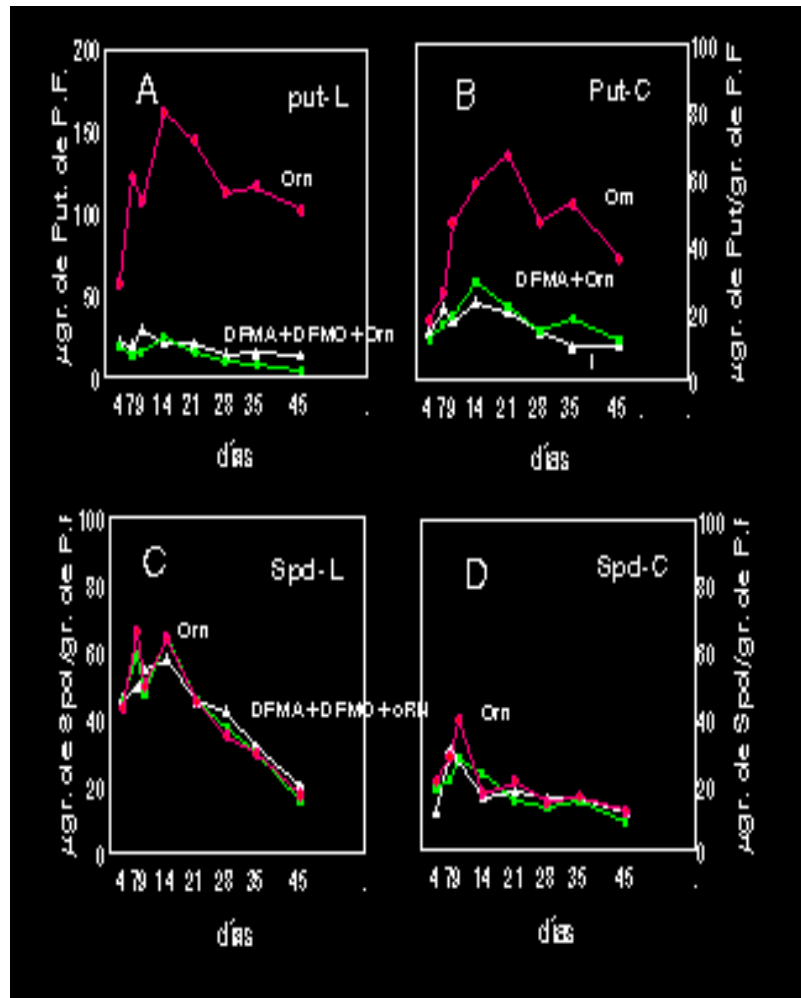


Fig. 46. Influencia de la **ornitina (0.1 mM)** en combinación con **DFMA** y **DFMA+DFMO (0.1 mM)** sobre la acumulación de putrescina y espermidina en forma libre (A, C) y conjugada (B,D).

4.6. Discusión

La aplicación de DFMA a los tejidos del ovario de platanera cultivados "in vitro" produce una inhibición del crecimiento, tanto en contenido de materia fresca como materia seca, que varía en función de la concentración del inhibidor. Dicha inhibición se correlaciona además con un descenso en los niveles endógenos de poliaminas. Cuando a estos cultivos se les añade putrescina exógena, se observa una recuperación del peso fresco y peso seco hasta el punto de equipararse en valores absolutos con respecto al control sin inhibidores. Estos resultados sirven de soporte para argumentar que estas sustancias podrían ser necesarias para el crecimiento y desarrollo de los tejidos.

Es conocido que las poliaminas parecen jugar un papel regulador en los procesos morfogénéticos que preceden al cuajado o establecimiento del fruto y en los diversos eventos que tienen lugar durante el desarrollo de este órgano. Así, se han observado niveles altos de poliaminas durante el cuajado del fruto, superiores a los encontrados en otras etapas del desarrollo o incluso mayores a los registrados en otras estructuras vegetativas con índices elevados de actividad mitótica (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991). Asimismo, se han citado niveles altos de poliaminas en ovarios pertenecientes a plantas con un alto porcentaje de cuajado, tales como tabaco (Slocum y Galston, 1985a), naranja mandarina (Nathan y col., 1984) o tomate (Egea-Cortines y col., 1990), a diferencia de otras plantas cuyos niveles de cuajado son más bajos, caso del aguacate (Kushad y col., 1988). Este hecho sugiere que puede existir una correlación directa entre niveles altos de poliaminas y mayores porcentajes de cuajado (Egea-Cortines y Mizrahi, 1991).

Por otra parte, los tratamientos con DFMO sobre los tejidos del ovario de la platanera, aunque promueven también una clara inhibición del crecimiento, contrastan, paradójicamente, con lo observado en relación al uso del DFMA, produciéndose un incremento en los niveles endógenos de poliaminas. Cuando ambos inhibidores son ensayados conjuntamente, con la intención de anular las dos rutas fundamentales para la biosíntesis de la putrescina, los niveles endógenos de poliaminas no varían substancialmente

respecto al tratamiento con DFMA solo. Sin embargo, el crecimiento, principalmente cuando se evalúa el peso fresco, es menor .

La acumulación de poliaminas en los cultivos tratados con DFMO podría ser debida a una estimulación de su biosíntesis por parte del inhibidor, o bien a una posible interferencia en su catabolismo.

La estimulación de la síntesis de poliaminas por DFMO ha sido descrita por varios investigadores. Así, en cultivos de protoplastos de petunia Kaur-Sawhney y col., (1989), señalaron que la utilización de este inhibidor incrementaba el contenido de putrescina y espermidina en un 65% y 50%, respectivamente, con relación al control. Otros investigadores han demostrado que el DFMO, al tiempo que inhibe la ODC, incrementa simultáneamente la actividad ADC (Flores y Galston, 1982; Altman y col., 1982; Fallon y Phillip, 1988; Robie y Minocha, 1989). Sin embargo, el mecanismo por el cual el DFMO causa dicho efecto no parece estar claro (Minocha y col., 1991a).

La idea de una posible metabolización de las poliaminas, durante el desarrollo del fruto ha sido propuesta por diversos investigadores. En tomate, el desarrollo del fruto puede ser inducido por una proceso natural de polinización o por medio de un tratamiento con ANA. En ambos casos, los niveles de poliaminas disminuyen drásticamente después del cuajado del fruto, a diferencia de los frutos no polinizados en los que se eleva considerablemente la concentración (Egea-Cortines y Mizrahi, 1993). Los tratamientos con DFMO sobre los frutos polinizados inhiben la división celular en un 70% con respecto al control, al tiempo que se produce un incremento en los niveles de poliaminas, principalmente en sus formas conjugadas y ligadas a macromoléculas. En los frutos inducidos por ANA, en cambio, la presencia del DFMO no parece inhibir la división celular a pesar de que disminuyan los niveles de poliaminas conjugadas y ligadas. La concentración de poliaminas en este caso, aun siendo baja, es superior a la observada en los tratamientos individuales con ANA. Este dato podría estar asociado con el incremento de la actividad ADC por efecto del DFMO en los frutos inducidos con ANA (Egea-Cortines y col., 1990). Estos investigadores sostienen la hipótesis de que las

poliaminas son metabolizadas durante la división celular para formar otros compuestos y que el DFMO, al tiempo que inhibe la división celular, podría inhibir también el metabolismo de las poliaminas (Egea-Cortines y Mizrahi, 1993).

En plantas, el metabolismo de las poliaminas ha sido estudiado solamente en unos pocos sistemas (Rastogi y Davies, 1990) y son raros los estudios en relación a su catabolismo. Kumar y Thorpe (1989) han estudiado el metabolismo de la putrescina en cotiledones de *Pinus radiata* sometidos a tratamientos de diferenciación de yemas y brotes, utilizando técnicas de marcaje radiactivo. En este sistema, la putrescina es metabolizada a GABA, glutamato y aspartato. El metabolismo de la putrescina es bajo al principio, se incrementa a medida que tienen lugar los procesos de división celular en el tejido epidérmico, y permanece relativamente alto en el estado de diferenciación de los nódulos meristemáticos. Estos autores sugieren que esta respuesta puede ser un requerimiento específico para la síntesis de aspartato y glutamato a partir de la putrescina, que guarda relación con la diferenciación de las yemas. El incremento en el metabolismo de la putrescina está correlacionado con el descenso de los niveles de putrescina libre en este estado del desarrollo (Kumar y Thorpe, 1989).

Asimismo, la conversión de putrescina a GABA también ha sido detectada en otros sistemas tales como plántulas de soja (Le Rudulier y Goas, 1977), brotes de guisante, mutantes de tabaco (Flores y Filner, 1985a, b) y pericarpio de tomate (Rastogi y Davies, 1990).

El posible papel de las enzimas implicadas en el catabolismo de las poliaminas ha sido estudiado en distintos sistemas vegetales. En semillas de leguminosas la actividad DAO, ausente en semillas secas, se hace patente durante los primeros días de la germinación, se incrementa posteriormente coincidiendo con los estadios de máxima proliferación y crecimiento de los tejidos y desciende durante la maduración (Federico y col., 1985; 1986; Suresh y col., 1981). Igualmente, en tejidos de *Helianthus tuberosus*, Torrigiani y col. (1989) han encontrado una alta actividad DAO en aquellos estadios fisiológicos caracterizados por un alto metabolismo, tales como las fases de división celular o los periodos de alargamiento celular que preceden

a la entrada en reposo de los tubérculos. En este último periodo, en el que tiene lugar un incremento en el contenido de proteínas, se observa una elevación paralela en la actividad ADC y en el contenido endógeno de putrescina, lo cual parece establecer una estrecha correlación entre la biosíntesis y la degradación de esta poliamina.

Resultados similares, en cuanto a una posible correlación entre la ADC y DAO, han sido obtenidos en frutos de guisante por Pérez Amador y Carbonell (1995a) asociado a los procesos de desarrollo y senescencia. Los ovarios no polinizados no se desarrollan adecuadamente, sin embargo, presentan dos fases bien diferenciadas. Una primera fase caracterizada por un crecimiento continuo como consecuencia de un aumento en longitud y peso fresco y que termina hacia los dos días después de la antesis, y una segunda fase caracterizada por procesos de senescencia que presenta alteraciones degenerativas en las estructuras del endocarpio y mesocarpio (Vercher y col., 1987; Vercher y Carbonell., 1991). Cuando estos ovarios son tratados con giberelinas, auxinas o citoquininas durante la primera fase, el fruto puede ser inducido a desarrollarse partenocápicamente, al tiempo que se observa un incremento en los niveles de putrescina, espermidina y espermina (García Martínez y Carbonell., 1980). Este desarrollo viene acompañado por un incremento en la actividad ADC y DAO tras los tratamientos con ácido giberélico.

Tal como describe Vercher (1984), el desarrollo del fruto de guisante se debe principalmente a un alargamiento de las células del mesocarpio, las cuales representan aproximadamente el 80% del volumen total del fruto, y por una diferenciación de las células del endocarpio. Este hecho podría explicar la ausencia de actividad ODC ya que esta enzima parece estar asociada a procesos de división celular que en el desarrollo del fruto de guisante parecen estar ausentes.

En sus trabajos, Pérez Amador y Carbonell (1995) concluyen que el incremento en la tasa de crecimiento del fruto va asociado a un incremento en la actividad ADC, y los cambios observados en esta enzima y en la DAO a lo largo del desarrollo del fruto, sugieren una estrecha correlación entre las

enzimas implicadas en la biosíntesis y el catabolismo de la putrescina, lo cual explicaría que en una primera fase del crecimiento del fruto se incrementen los niveles de ADC, disminuyendo posteriormente al comienzo de la senescencia del ovario, al tiempo que aumenta la actividad DAO. En opinión de estos autores, los datos obtenidos sugieren la posibilidad de una utilización de la putrescina para reciclar carbono y nitrógeno. De igual manera, estos investigadores opinan que uno de los efectos de la aplicación exógena del ácido giberélico para estimular el desarrollo del fruto, es inducir el incremento de la actividad ADC que precede al alargamiento celular en tejidos que crecen sin divisiones celulares.

Nuestros resultados, nos llevan a sugerir que la vía de síntesis para putrescina que opera en los tejidos del ovario de la platanera en las condiciones experimentales de esta investigación es la vía ADC, y que una posible metabolización de la putrescina sería necesaria para el crecimiento de los tejidos de la pulpa. Dicha metabolización podría ser inhibida por el DFMO. Esta hipótesis explicaría el hecho de que la aplicación exógena de putrescina a los cultivos donde su síntesis endógena ha sido inhibida, tenga una respuesta diferente en cuanto al crecimiento, en función de la presencia o no de este inhibidor, así como de la concentración empleada la cual se correlaciona con una acumulación en los tejidos de esta poliamina.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente trabajo confirman investigaciones previas por las cuales se demuestra que los tejidos del ovario de la platanera requieren para su óptimo desarrollo "in vitro" un aporte de sustancias hormonales.

El tratamiento con estas sustancias en los estadios iniciales ejerce un efecto desencadenante del crecimiento haciendo que su presencia no sea imprescindible superados los primeros 15 días.

La incorporación de los reguladores a los medios de cultivo desencadena el crecimiento de los tejidos de manera inmediata, siempre que éstos no hayan perdido su viabilidad, hecho que tiene lugar tras 3 semanas sin la presencia de los reguladores.

2. Se realizan análisis comparativos del crecimiento y los niveles endógenos de poliaminas (*putrescina*, *espermidina* y *espermina*) en tejidos cultivados en presencia y ausencia de reguladores.

En el primer caso, la cinética del crecimiento de los tejidos refleja tres etapas que se correlacionan con variaciones importantes en los niveles de putrescina y espermidina. El primer pico en la concentración de estas sustancias se corresponde con la etapa inicial del crecimiento en la que presumiblemente dominan los procesos de división celular, circunstancia que también ocurre en condiciones naturales. Un segundo pico se corresponde con etapas de alargamiento celular.

Los niveles endógenos de poliaminas en un medio sin reguladores son superiores a los observados en un medio con suplemento hormonal. La estimulación del crecimiento tras la incorporación de los reguladores lleva implícito el descenso inmediato en los niveles endógenos de poliaminas.

3. Tanto el 2,4-D como la BA, individualmente o conjugadas, ejercen una acción inductora del crecimiento de los tejidos, que no puede ser reemplazada, en modo alguno, por los tratamientos con poliaminas. La aplicación exógena de putrescina carece por completo de efecto, mientras que altos niveles de espermidina y la espermina inhiben el crecimiento inducido por los reguladores anteriormente citados.
4. Los tratamientos con inhibidores de la síntesis de espermidina, MGBG y CHA, inhiben el crecimiento de los tejidos, al tiempo que se incrementan los niveles de putrescina. El efecto de estas sustancias sobre la acumulación de espermidina, no obstante, muestra características diferentes; mientras que el CHA la disminuye, el MGBG no manifiesta ninguna repercusión.
5. Los inhibidores de la síntesis de putrescina, DFMA y DFMO, usados de manera individual o combinados, determinan igualmente una inhibición muy notoria del crecimiento de la pulpa que guarda relación con la concentración. Dicha respuesta muestra correlaciones contradictorias con la síntesis y acumulación de putrescina. Mientras que el DFMA reduce los niveles endógenos de putrescina, el tratamiento con DFMO produce un aumento de la concentración.

Estos datos ponen de manifiesto que la vía de síntesis para la putrescina en los tejidos de la pulpa es la vía ADC.

6. La aplicación exógena de putrescina a los cultivos restituye el crecimiento de los tejidos inhibido por la presencia del DFMA, pero no así en los tratamientos con DFMO. Este hecho es indicativo de que al menos ciertos niveles de putrescina son requeridos para el crecimiento óptimo de los cultivos.

La recuperación del crecimiento por efecto del tratamiento con putrescina exógena cuando el DFMA es ensayado conjuntamente con el DFMO, está

en función de la concentración de este inhibidor. Mientras que a la concentración 0.1 mM, el crecimiento se recupera parcialmente, a 0.5 mM no se observa efecto alguno. Esta respuesta se acompaña por una menor o mayor acumulación de putrescina respectivamente.

Con los resultados de esta Memoria y los datos bibliográficos discutidos en los distintos capítulos, hemos elaborado una hipótesis sobre el papel de las poliaminas en el desarrollo de los tejidos del ovario de la platanera.

El papel de las poliaminas y su mecanismo de acción ha suscitado extensos debates en la literatura al igual que ocurre con las hormonas en general. Diversos autores exponen argumentos consistentes para considerar a estas sustancias como reguladoras del crecimiento, otros ponderan su función como mensajeros secundarios, moléculas que intervienen en la regulación de la homeostasis celular, compuestos que pueden estar implicados en el metabolismo suministrando o reciclando nitrógeno y carbono, etc.... En cualquier caso, la presencia de dichas sustancias parece fundamental para el desarrollo de los tejidos.

Aunque resulta difícil establecer de manera fehaciente una acción de las poliaminas en la línea de las funciones anteriormente relacionadas, opinamos que los resultados obtenidos apoyan un posible papel como metabolitos cuyo catabolismo es importante para las actividades celulares.

Así se constata que la inhibición del crecimiento, ya sea por la ausencia de reguladores del crecimiento (cap. II de los Resultados), o ya sea, por los tratamientos con MGBG, CHA, y DFMO (cap. III y IV), va acompañada por un incremento en los niveles de poliaminas, principalmente putrescina. Es conocido que en el catabolismo de la putrescina están implicadas una serie de enzimas, una de las cuales es la *diamina oxidasa* (DAO). Datos bibliográficos ponen de manifiesto que esta enzima puede ser inhibida bajo ciertas condiciones de estrés y, al mismo tiempo, estimulada por la presencia de sustancias hormonales. Estos datos podrían explicar los resultados del

cap. II, donde se observa que cuando los cultivos son transferidos desde un medio cero a otro con aporte hormonal, la estimulación del crecimiento se acompaña con un descenso en los niveles de poliaminas.

Igualmente una inhibición de la *diamina oxidasa* podría ser contemplada en los tratamientos con MGBG. Es sabido que el MGBG es un potente inhibidor de la DAO, lo cual explicaría la acumulación de putrescina en los tejidos tratados con esta sustancia y la correspondiente inhibición del crecimiento.

Los tratamientos con DFMO, en los cuales también se observa una inhibición del crecimiento paralelamente a una acumulación de putrescina, pueden ser explicados por una inhibición del catabolismo de esta sustancia, dato que estaría apoyado por las citas bibliográficas recogidas en el cap. IV.

Por otro lado, el hecho de que la aplicación exógena de putrescina a los cultivos en que la síntesis endógena está inhibida por la presencia del DFMA, tenga respuestas diferentes en función de la presencia y concentración del DFMO, puede apoyar esta hipótesis en la medida que esta molécula afecte al catabolismo de la putrescina.

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

ABELES, F.B. (1973). Ethylene in plant biology. Academic Press. New York. pp. 334-338.

ADAMS, D.O. y YANG, S.F. (1977). Methionine metabolism in apple tissue Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to C₂H₄. *Plant Physiology*, 60: 892-896.

ADIGA, P.R. y PRASAD, G.L. (1985). Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regulator*, 3: 205-226

ALTAMURA, M.M., TORRIGIANI, P., CAPITANI, F., SCARAMAGLI, S. y BAGNI, N. (1991). De novo root formation in tobacco thin layers is affected by inhibition of polyamine biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 42: 1575-1582.

ALTMAN, A. (1989). Polyamines and plant hormones. En: The Physiology of Polyamines. Bachrach, U. y Heimer, Y.M. (eds). CRC Press. Boca Raton. Florida. Vol II. pp. 121-145.

ALTMAN, A., FRIEDMAN, R. y LEVIN, L. (1982). Arginine and ornithine decarboxylases, the polyamine biosynthesis enzymes of mung bean seedlings. *Plant Physiology*, 69: 876-879.

ALTMAN, A., FRIEDMAN, R., y LEVIN, N. (1983). Alternative metabolic pathways for polyamine biosynthesis in plant development. En: Advances in Polyamines Research. Bachrach, U., Kaye, A. y Chayen, F. (eds.). Vol. IV. Raven Press. Nueva York. pp. 395-408.

ALTMAN, A. y LEVIN, N. (1993). Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plant. *Physiologia Plantarum*, 89: 653-658.

APELBAUM, A. (1986). Polyamine involvement in the development and ripening of avocado fruit. *Acta Horticulturae*, 179: 779-785.

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 Physiology*, 88: 996-998.

BACHRACH, U. y HEIMER, Y.M. (eds) (1989). *The Physiology of Polyamines*. CRC Press. Boca Raton. Florida. . Vol I and II.

BAGGA, S., DHARMA, A., PHILLIPS, G.C. y KUEHN, G.D. (1991). Evidence for the occurrence of polyamine oxidase in the dicotyledonous plant *Medicago sativa L.* *Plant Cell Reports*, 10: 550-554.

BAGNI, N. (1989). Polyamines in plant growth and development. En: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. y Heimer, Y.M. (eds). CRC Press. Boca Raton. Florida. Vol.II. pp. 107-119.

BAGNI, N. y BIONDI, S. (1987). Polyamines. En: *Cell and Tissue Cultures in Forestry*. Bonga J.M. y Durzan D.J. (eds). Martinus Nijhoff. pp. 113-124.

BAGNI, N., y PISTOCCHI, R. (1988). Polyamines as growth substances in higher plants. En: *Progress in Polyamine Research*. Zappia, V. y Pegg, A.E. (eds). Plenum Publishing Corporation. New York. 547-558.

BAGNI, N. y SERAFINI-FRACASSINI, D. (1974). The role of polyamines as growth factors in higher plant and their mechanism of action. En: *Plant Growth Substances*. Hirasawa Publishing Co. Inc. Tokyo. pp. 1205-1217.

BAGNI, N., SERAFINI-FRACASSINI, D. y TORRIGIANI, P. (1981a). Polyamines and growth in higher plants. En: *Advances in Polyamines Research*. Caldarera, C.M. y Zappia V. (eds). Raven Press. New York. Vol. 3. pp. 377-388.

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. London. pp. 473-482.

BAGNI, N. y SPERANZA, A. (1977). Pathways of polyamine biosynthesis during the growth of *Helianthus tuberosus* parenchymatic tissue. En: *Plant Growth Regulators*. Kudrew, T., Ivanova, I. y Karanov, E. (eds). Publishing House of the Bulgarian Academy of Sciences. Sofia. pp. 75-78.

BAGNI, N., TORRIGIANI, P. y BARBIERI, P. (1981b). Effect of various inhibitors of polyamine synthesis on the growth of *Helianthus tuberosus*. *Medical Biology*, 59: 403-409.

BAIN, J.M. y ROBERTSON, R.N. (1951). *Australian Journal Science Reseach*. 4: 75-91.

BASSO, L.C. y SMITH, T.A. (1974). Effect of mineral deficiency on amine farmation in higher plant. *Phytochemistry*, 13: 875-883.

BELL, E. y MALMBERG, R.L. (1990). Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidense of protein processing. *Molecular and General Genetcs*, 224:431-436.

BERRIDGE, M. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annual Review Biochemistry*. 56: 159-193.

BESFORD, R., RICHARDSON, C., CAPELL, T. y TIBURCIO. A.F. (1991). Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically-stressed oat leaves. En: *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development*. Galston, A.W. y Tiburcio, A.F. (eds). Fundación Juan March. Madrid. Vol. 257: 72-75.

BIASI, R., BAGNI, N. y COSTA, G. (1988). Endogenous polyamines in apple and their relationship to fruit set and fruit growth. *Physiologia Plantarum*, 73: 201-205.

BIASI, R., COSTA, G. y BAGNI, N. (1991). Polyamine metabolism as related to fruit set and growth. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29 (5): 497-506.

BIONDI, S., BAGNI, N. y SANSOVINI, A. (1986). Dicyclohexylamine uptake and effects on polyamine content in cultured cotyledons of *Pinus radiata*. *Physiologia Plantarum*, 66: 41-45.

BIONDI, S., MENGOLI, M., MOTT, D. y BAGNI, N. (1993). Hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*: effect of polyamine biosynthesis inhibitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31(1): 51-58.

BOHNER, J. y BANGERTH, F. (1988). Effects of fruit set sequence and defoliation on cell number, cell size and hormone levels of tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.) within a truss. *Plant Growth Regulation*, 7: 141-155.

BOHNER, J., HEDDEN, P., BORA-HABER, E. y BANGERTH, F. (1988). Identification and quantification of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum* and their relationship to fruit set in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Plant Physiology*, 73: 348-353.

BOLLARD, E. (1970). The physiology and nutrition of developing fruits. En: The biochemistry of fruit and their products. Academic Press. Vol. I.

BORRELL, A., CARBONELL, L., FARRAS, R., PUIG-PARELLADA, P. y TIBURCIO, A.F. (1997). Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiologia Plantarum*, 99:385-390.

BOURBOULOUX, A. y BONNEMAIN, J.L. (1973). *Planta*, 115: 161-172.

BROWNING, G. (1989). The physiology of fruit set. En: Manipulation of fruiting. Wright, C.J. (ed). Butterworths. Londres. pp. 195-218.

CACCIAPOUTI, G., PORCELLI, M., CARTENI-FARINA, M., GAMBACORTA, A. y ZAPPIA, V. (1986). Purification and characterization of propylamine transferase from *Sulfolobus solfataricus*, an extreme thermophilic archaeobacterium. *European Journal Biochemistry*, 161: 263-271.

CARBONELL, J. y NAVARRO, J.L. (1989). Correlation of spermine levels with ovary senescence and with fruit set and development in *Pisum sativum L.* *Planta*, 178: 482-487.

COHEN, E., ARAD, S.M., HEIMER, Y.M. y MIZRAHI, Y. (1982). Participation of ornithine decarboxylase in early stages of tomato fruit development. *Plant Physiology*, 70:540-543.

COHEN, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. N.J.

COHEN, S.S., SINDHU, R.K., GREENBERG, M., YAMANOHA, B., BALINT, R. y McCARTHY, K. (1985). Cellular systems for the study of biosynthesis of polyamines and ethylene, as well as of virus multiplication. En: Polyamines in Plant. Galston, A.W. y Smith, T.A. (eds). Nijhoff-Junk Publishers. Dordrecht. pp.25-36.

COOMBE, B.G. (1976). The development of fleshy fruits. *Annual Review Plant Physiology*, 27: 507-528.

COSTA, G. y BAGNI, N. (1983). Effects of polyamines on fruit-set of apple. *HortScience*, 18 (1): 59-61.

CRANE, J.C. (1964). Growth substances in fruit setting and development. *Annual Review Plant Physiology*, 15: 303-326.

CRANE, J.C. (1965). *Plant Physiology*, 40: 606-610.

CRISOSTO, C.H., LOMBARD, P.B., SUGAR, R. D. y POLITO, V.S. (1988a). Putrescine influences ovule senescence, fertilization time, and fruit set in 'Comice' pear. *Journal of American Society Horticultural Science*, 113 (5): 708-712.

CRISOSTO, C.H., SUGAR, R. D. y LOMBARD, P.B. (1988b). Effect of putrescine sprays at anthesis on 'Comice' pear yield components. *Advanced Horticultural Science*, 2: 27-29.

CHAMPION, J. (1968). *El Plátano*. Editorial Blume. Madrid. 247 pp.

DAVIES, P.J. (1988). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. En: *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. Davies, P.J. (ed). Martinus Nijhoff. Boston.

DAVINSON, R.M. (1960). Fruit-setting of apples using gibberellic acid. *Nature*, 188: 681-682.

DENNIS, F.G. (1986). Apple. En: *Handbook of Fruit Set and Development*. Monselise, S.P. (ed). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp.1.

DE ROSA, M., DE ROSA, S., GAMBACORTA, A., CARTENI-FARINA, M. y ZAPPIA, V. (1978). The biosynthetic pathway of new polyamines in *Caldariella acidophila*. *Biochemical Journal*, 176: 1-7.

DI TOMASO, J.M., SHAFF, J.E. y KOCHIAN, L.V. (1989). Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport process in roots of intact corn seedling. *Plant Physiology*, 90: 988-995.

DODDS, K.S. y SIMMONDS, N.W. (1948). Sterility and parthenocarphy in diploid hybrids of *Musa*. *Heredity*, 2: 101-107.

DOLLFUSS, H. (1936). Wuchsstoffstudien. *Planta*, 25: 1-21.

DUMBROFF, E. (1991). Mechanisms of polyamine action during plant development. En: Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development. Galston, A.W. y Tiburcio, A.F. (eds). Fundación Juan March. Madrid. Vol. 257: 62-66.

DUMORTIER, F.M., FLORES, H.E., SHEKHAWAT, N.S. y GALSTON, A.W. (1983). Gradients of polyamines and their biosynthetic enzymes in coleoptiles and roots of corn. *Plant Physiology*, 72: 915-918.

DUREJA-MUNJAL, L., ACHARYA, M. y GUHA-MUKHERJEE, S. (1992). Effect of hormones and spermidine on the turnover of inositolphospholipids in *Brassica* seedlings. *Phytochemistry*, 31: 1161-1163.

DROLET, G., DUMBROFF, E., LEGGE, R.L. y THOMPSON, J.E. (1986). Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, 25: 267-271.

EGEA-CORTINES, M., COHEN, E., ARAD, S. y MIZRAHI, Y. (1990). Effect of difluoromethylornitine on the growth of pollinated and naphthalene acetic acid-induced tomato ovaries. En: Polyamines and Ethylene Biosynthesis, Physiology and Interactions. Flores, H.E., Arteca, R.N. y Shannon, J.C. (eds). American Soc. Plant Physiologists. Rockville. pp. 325-328.

EGEA-CORTINES, M., COHEN, E., ARAD, S., BAGNI, N. y MIZRAHI, Y. (1993). Polyamine levels in pollinated and auxin-induced fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during development. *Physiologia Plantarum*, 87: 14-20.

EGEA-CORTINES, M. y MIZRAHI, Y. (1991). Polyamines in cell division, fruit set and development, and seed germination. En: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plant. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). Boca Raton: CRC Press. Florida. pp. 143-158.

EGEA-CORTINES, M. y MIZRAHI, Y. (1993). The effect of difluoromethylornithine on polyamine levels in pollinated and naphthalenacetic acid-induced young tomato fruits. *Plant Growth Regulation*, 12: 287-292.

EL HADRAMI, L. y D'AUZAC, J. (1992). Effects of polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis and cellular polyamines in *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plant Physiology*, 140: 33-36.

EVANS, P.T. y MALMBERG, R.L. (1989). Do polyamines have roles in plant development?. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40: 235-269.

FAHN, A., KISLEV, N.K. y ZIV, D. (1961). The abnormal flower and fruit of May-flowering Dwarf cavendish bananas. *Botanical Gazette*. 123: 116-125.

FALLON, K.M. y PHILLIPS, R. (1988). Polyamines in relation to growth in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, 88: 224-227.

FEDERICO, R. y ANGELINE, R. (1986). Occurrence of diamine oxidase in apoplast of pea epicotyls. *Planta*, 167: 300-302.

FEDERICO, R. y ANGELINE, R. (1991). Polyamine catabolism in plant. En: *Biochemistry of Polyamines in Plant*. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 41-56.

FEDERICO, R., ANGELINE, R., CESTA, A. y PINI, C. (1985). Determination of diamine oxidase in lentil seedling by enzyme activity and immunoreactivity. *Plant Physiology*, 79: 62-64.

FEUERSTEIN, B.G. y MARTON, L.J. (1989). Specificity and binding in polyamine/nucleic interactions. En: *The Physiology of Polyamines*. Bachrach, U. y Heimer, Y.M. (eds). CRC Press. Boca Raton. Florida. Vol. I. pp. 109-124.

FEIRER, R.P., MIGNON, G., y LITVAY, J.D. (1984). Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in wild carrot. *Science*, 223: 1433.

FITTING, H. (1909). Entwicklungsphysiologische problème der fruchtbildung. *Biol. Centralbl.*, 29: 193-206 y 226-239.

FLINK , L. y PETTIJOHN, D.E. (1975). Polyamines stabilize DNA folds. *Nature*, 253: 62-63.

FLORES, H.E. (1990). Polyamines and plant stress. En: Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms. Alscher, R.G. y Cumming, J.R. (eds). Wiley-Liss. New York. pp. 217-239.

FLORES, H.E. (1991a). Catabolic pathways and secondary metabolism of polyamines in plants. En: Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development. Galston, A.W. y Tiburcio, A.F. (eds). Fundación Juan March. Madrid. pp. 23-26.

FLORES, H.E. (1991b). Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En: Biochemistry and Physiology of polyamines in Plant. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 213-228.

FLORES, H.E. y FILNER, P. (1985a). Polyamine catabolism in higher plant: characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regulation*, 3: 277-291.

FLORES, H.E. y FILNER, P. (1985b). Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. En: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. Neumann, K-H., Bazz, W. y Reinhard, E. (eds). Springer-Verlag. Heidelberg. pp. 174-185.

FLORES, H.E. y GALSTON, A.W. (1982). Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiology*, 69: 701-706.

FLORES, H.E. y MARTIN-TANGUY, J. (1991). Polyamines and plant secondary metabolites. En: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 57-76.

FLORES, H.E., PROTACIO, C.M. y SIGNS, M.W. (1989). Primary and secondary metabolism of polyamines in plant. En: *Plant Nitrogen Metabolism, Recent Advances in Phytochemistry*. Poulton, J.E., Romeo, J.T. y Conn, E.E. (eds). Plenum Press. New York. Vol 23. pp. 329-393.

FOBERT, P. y WEBB, D.T. (1988). Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons. *Canadian Journal of Botany*, 66: 1734-1742.

FUJIHARA, S., NAKASHIMA, T. y KUROGOCHI, Y. (1982). Occurrence of a new polyamine, canavalmine, in the sword bean *Canavalia gladiata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107: 403-410.

GALAN SAUCO, V., GARCIA, V., SAMARIN, J. y CARBONELL, E. (1984). Estudio de la práctica del deshijado y la fenología de la platanera (*Musa acuminata* Colla (AAA) cv. Pequeña enana en la isla de Tenerife. *Fruit*, 39 (7-8): 453-459; 39 (9): 541-549; 39 (10): 595-605 y 606-611.

GALSTON, A.W. (1983). Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience*, 33 (6): 382-388.

GALSTON, A.W. y FLORES, H.E. (1991). Polyamines and plant morphogenesis. En: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plant*. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). CRC Press. pp. 175-186.

GALSTON, A.W. y KAUR-SAWHNEY, R. (1982). Polyamines: are they a new class of growth regulators?. En: Plant Growth Substances. Wareing, P. (ed). Academic Press. London. pp. 451-461.

GALSTON, A.W. y KAUR-SAWHNEY, R. (1987). Polyamines and senescence in plant. En: Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology. Thomson, W.W., Nothnagel, E.A. y Huffaker, R.C. (eds). American Society of Plant Physiology. Rockville. Maryland. pp. 167-181.

GALSTON, A.W. y KAUR-SAWHNEY, R. (1990). Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology*, 94: 406-410.

GALSTON, A.W. y KAUR-SAWHNEY, R. (1995). Polyamines as endogenous growth regulators. En: Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Davies, P.J. (ed). Kluwer Academic Press. London. pp. 158-178.

GALUN, E. (1952). Effect of seed treatment of sex expression in cucumber. *Experientia*, 12: 218.

GALLARDO, M., GALLARDO, M.E., MATILLA, A.J., MUÑOZ DE RUEDA, P. y SÁNCHEZ CALLE, L.M. (1994). Inhibition of polyamine synthesis by cyclohexylamine stimulates the ethylene pathway and accelerates the germination of *Cicer arietinum* seeds. *Physiologia Plantarum*, 91: 9-16.

GAMARNIK, A. y FRYDMAN, R. B. (1991). Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology*, 97: 778-785.

GLATZ, Z., KOVAR, J., MACHOLAN, L. y PEC, P. (1987). Pea (*Pisum sativum*) diamino oxidase contains pyrroloquinoline quinone as cofactor. *Biochemical Journal*, 242: 603-606.

GASPAR, T., KEVERS, C., HAUSMAN, J. F., PENEL, C., JOUVE, L., MARTIN-TANGUY, J., ARIBAUD, M. y GREPPIN, H. (1996). Peroxidase as an

indissociable factor of auxin and polyamine metabolisms in the induction of rooting and flowering. En: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C. y Greppin, H. (eds). University of Geneva. pp. 226-234.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. y CARBONELL, J. (1980). Fruit-set of unpollinated ovaries of *Pisum sativum* L. Influence of plant-growth regulators. *Planta*, 147: 451-456.

GIL, G.F., GRIGGS, W.H. y MARTIN, G.C. (1972). Gibberellic-induced parthenocarpy in "winter nelis". *Hortscience*, 7 (6): 559-561.

GOODWIN, P.B. (1978). Phytohormones and fruit growth. En: *Phytohormones and the development of higher plants*. Letham, D.S., Goodwin, P.B. y Higgins, T.J.V. (eds). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. pp. 175-214.

GRANGE, R.I. (1993). Crecimiento del fruto. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon-Bieto, J. y Talon, M. (coord). Interamericana-McGraw Hill. pp. 449-462.

GROCHOWSKA, M.J. (1974). *Biologia Plantarum*, 16: 194-198.

GUILFOYLE, T.J. y HANSON, J.B. (1973). Increased activity of chromatin-bound ribonucleic acid polymerase from soybean hypocotyl with spermidine and high ionic strength. *Plant Physiology*, 51: 1022-1025.

GUSTAFSON, F.G. (1936). Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 22: 628-636.

GUSTAFSON, F.C. (1961). Development of fruits. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer-Verlag. Berlín. vol XV. pp. 951-958.

HAMANA, K. y MATSUZAKI, S. (1982). Widespread occurrence of norspermidine and norspermine in eukaryotic algae. *Journal of Biochemistry*, 91: 1321-1328.

HAMANA, K. y MATSUZAKI, S. (1985a). Further study on polyamines in primitive unicellular eukaryotic algae. *Journal of Biochemistry*, 97: 1311-1315.

HAMANA, K y MATSUZAKI, S. (1985b). Distinct differences in the polyamine compositions of Bryophyta and Pteridophyta. *Journal of Biochemistry*, 97: 1595-1601.

HAMANA, K., MATSUZAKI, S., NIITSU, M. y SAMEJIMA, K. (1992). Distribution of unusual polyamines in leguminous seeds. *Canadian Journal Botany*, 70: 1984-1990.

HAMANA, K., NIITSU, M., SAMEJIMA, K. y MATSUZAKI, S. (1991). Linear and branched pentaamines, hexaamines and heptaamines in seeds of *Vicia sativa*. *Phytochemistry*, 30 (10): 3319-3322.

HAUSMAN, J.F., KEVERS, C. y GASPAR, T. (1994). Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised in vitro. *Physiologia Plantarum*, 92: 201-206.

HAVIS, A.L. (1943). *American Journal of Botany*, 30: 311-314.

HEDDEN, P. y HOAD, G.V. (1985). Hormonal regulation of fruit growth and development. En: Regulation of Sources and Sinks in Crop Plants. Monograph 12. Jeffcoat, B., Hawkins, A.F. y Stead, A.D. (eds). British Plant Growth Regulator Group. Bristol. Reino Unido.

HEIMER, Y.M., MIZRAHI, Y. y BACHRACH, U. (1979). Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferating plant cells. *FEBS Letters*, 104: 146-148.

HO, L.C. (1992). Fruit growth and sink strength. En: Fruit and Seed Production. Aspects of Development Physiology and Ecology. Marshall, C. y Grace, J. (eds). Society for Experimental Biology Seminar Series 47. Cambridge University Press. Cambridge. Reino Unido.

ICEKSON, I. y APELBAUM, A. (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology*, 84: 972-974.

IGARASHI, K., SAKAMOTO, L., GOTO, N., KASHIWAGI, K., HONMA, R. y HIROSE, S. (1982). Interaction between polyamines and nucleic acids or phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 219: 438-443.

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.

KANO, K., FUJIMURA, T., HIROSE, T. y TSUKAMOTO, Y. (1957). *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* 12: 45-90.

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 Science*, 62: 123-128.

KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A. W. (1991). Physiological and biochemical studies on the anti-senescence properties of polyamines in plant. En: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plant. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 201-211.

KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L.M. y GALSTON, A.W. (1982). Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tuber. *Plant Physiology*, 69: 405-410.

KHALIFAH, R.A. (1967). *Physiologia Plantarum*, 20: 355-360.

KHAN, A.J. y MINOCHA, S. C. (1991). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. II. The effects of cyclohexylammonium phosphate. *Journal of Plant Physiology*, 137: 446-452.

KOETJE, D., KONONOWICZ, H. y HODGES, T.K. (1993). Polyamine metabolism associated with growth and embryogenic potential of rice. *Journal of Plant Physiology*, 141: 215-221.

KOTZABASIS, K. (1996). A role for chloroplast-associated polyamines?. *Botanica Acta*, 109: 5-7.

KUEHN, G.D., BAGGA, S., RODRÍGUEZ-GARAY, B., y PHILLIPS, G.C. (1990a). Biosynthesis of uncommon polyamines in higher plants and their relation to abiotic stress responses. En: Polyamines and ethylene: Biosynthesis, Physiology and interactions. Flores H.E., Arteca, R.N. y Shannon, J.D. (eds). American Society of Plant Physiologists Press. Rockville. MD. pp. 109-202.

KUEHN, G.D., RODRÍGUEZ-GARAY, B., BAGGA, S. y PHILLIPS, G.C. (1990b). Novel occurrence of uncommon polyamines in higher plants. *Plant Physiology*, 94: 855-857.

KUMAR, P.P. y THORPE, T.A. (1989). Putrescine metabolism in excised cotyledons of *Pinus radiata* cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 76: 521-526.

KUSHAD, M.M., y DUMBROFF, E.B. (1991). Metabolic and physiological relationships between the polyamine and ethylene biosynthetic pathways. En: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Slocum, R.D. y Flores, H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 77-92.

KUSHAD, M.M., YELENOSKY, G., y KNIGHT, R. (1988). Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening. *Plant Physiology*, 87: 463-467.

- LADENBURG, A. y ABEL, J. (1888). Ueber das Aethylenimin (Spermin?). *Ber. Dtsch. chem. Ges.*, 21:758.
- LAI, R., WOOLLEY, D.J. y LAWES, J.S. (1990). The effect of inter-fruit competition, type of fruiting lateral and time of anthesis on the fruit growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Horticultural Science*, 65: 87-96.
- LAIBACH, F. y KRIBBEN, F.J. (1949). Der einflub von wüchsstoff auf die bildung männlicher und weiblicher blüter bei einer monözischen pflanze (*Cucumis sativus L.*). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 62: 53-55.
- LASSOUDIÈRE, A. (1978). Quelques aspects de la crossance et du développement de bananier "poyo" en Côte d'Ivoire. *Fruit*, 33 (5): 293-336, (6): 373-412 y (7-8): 457-503.
- LECUONA M.C. (1975). Contribución al estudio estructural de la platanera Canaria. Servicio de Publicaciones de la Caja General de Ahorros de Santa Cruz de Tenerife.
- LEE, S.H. y PARK, K.Y. (1991). Compensatory aspects of the biosynthesis of spermidine in tobacco cells in suspension culture. *Plant Cell Physiology*, 32 (4): 523-531.
- LEHLE, L. (1990). Phosphatidyl inositol metabolism and its role in signal transduction in growing plant. *Plant Molecular Biology*, 15: 647-658.
- LE RUDULIER, D. y GOAS, G. (1975). Influence des ions ammonium et potassium sur l'accumulation de la putrescine chez le jeunes plantes de *Soja hispida* Moench. privees de leurs cotyledons. *Physiologie Vegetal*, 13: 125-136.
- LI, Z. y McCLURE, J.W. (1989). Polyamine oxidase of primary leaves is apoplasmic in oats but symplasmic in barley. *Phytochemistry*, 28: 2255-2259.

LINCK, A.J. y SWANSON, C.A. (1960). A study of several factors affecting the distribution of phosphorous-32 from the leaves of *Pisum sativum*. *Plant and Soil*, 12: 57-68.

LORENZO MARTÍN, J.R. (1985). Contribución al conocimiento del desarrollo partenocárpico del fruto de la platanera (*Musa acuminata* Colla AAA cv. Dwarf cavendish). Cultivo "In vitro" de flores, ovarios y fragmentos de ovario. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. 235 pp.

LUCKWILL, L.C. (1957). Hormonal aspects of fruit development in higher plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11: 63-85.

MACCARRONE, M., ROSSI, A., AVIGLIANO, L. y AGRO, A.F. (1991). Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedling under different growth conditions. *Plant Science*, 79: 51-55.

MAPELLI, S., TORTI, G., BADINO, M. y SORESI, G.P. (1979). Effect of GA₃ on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. *Horticultural Science*, 14: 736

MARMÉ, D. (1989). The role of calcium and calmodulin in signal transduction. En: *Second Messengers in Plant Growth and Development*. Boss, W.F. y Morré, D.J. (eds). Alan R. Liss. New York. pp. 57-80.

MARTIN-PREVEL, P. (1979). Apuntes sobre el curso: "La fisiología de la platanera en relación con las prácticas de cultivo". Colegio Oficial de Ingenieros Agrónomos. Santa Cruz de Tenerife. 98 pp.

MARTIN-TANGUY, J. (1985). The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plant. *Plant Growth Regulator*, 3: 381-399.

MARTIN-TANGUY, J. y CARRE, M. (1993). Polyamines in grapevine microcuttings cultivated "in vitro". Effects of amines and inhibitors of polyamine

biosynthesis on polyamine levels and microcutting growth and development. *Plant Growth Regulation*, 13: 269-280.

MASGRAU, C., ALTABELLA, T. y TIBURCIO, A.F. (1996). El sistema "Tet-repressor" como modelo de estudio de la función de las poliaminas en plantas transgénicas de tabaco. *Sociedad española de Fisiología Vegetal*, 25: 4-6.

MARTON, L. y MORRIS, D. (1987). Molecular and cellular functions of the polyamines. En: *Inhibition of Polyamines Metabolism*. McCann, P.P., Pegg, A. y Sjoerdsma, A. (eds). Academic Press. San Diego. pp. 79-105.

METCALF, B.W., BEY, P., DANZIN, C., JUNG, M.J., CASARA, P.J. y VEVERT, J.P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase by substrate and products analogues. *Journal of American Chemical Society*, 100: 2251-2253.

MILLER, A.R., VELBINGER, C., MUJER, C.V., SCHMID, J.C. y FERREE, D. (1988). Polyamines as regulators of apple fruit development. En: *Fruit crops 1987: A summary of research*. The Ohio State University. Research circular, 295: 11-13.

MINOCHA, R., MINOCHA, S.C., KOMAMINE, A. y SHORTLE, W.C. (1991a). Regulation of DNA synthesis and cell division by polyamines in *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 10: 126-130.

MINOCHA, S.C., PAPA, N.S., JAMAL KHAN, A. y SAMUELSEN, A.I. (1991b). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. III. Effects of methylglyoxal bis(guanyldrazone). *Plant and Cell Physiology*, 32 (3): 395-402.

MITCHELL, J.W. y WITTEWER, S.H. (1962). *Science*, 136: 880.

MIZRAHI, Y., APPLEWHITE, P.B. y GALSTON, A.W. (1989). Polyamine binding to proteins in oat and petunia protoplast. *Plant Physiology*, 91: 738-743.

MIZRAHI, Y. y HEIMER, Y. M. (1982). Increased activity of ornithine decarboxylase in tomato ovaries induced by auxin. *Physiologia Plantarum*, 54:367-368.

MOHAN RAM, H.Y., RAM, M. y STEWARD, F.C. (1962). Growth and development of the banana plant. 3A. The origin of the inflorescence and the development of the flowers. B. The structure and development of the fruit. *Annals of Botany*, 26 (104): 657-671.

MONSELISE, S.P., VARGA, A. y BRUINSMA, J. (1978). Growth analysis of the tomato fruit, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Annals of Botany*, 42: 1245-1247.

MOSSETTI, U., SERAFINI-FRACASSINI, D. y DEL DUCA, S. (1987). Conjugated polyamines during the cell cycle. En: Conjugated Plant Hormones. Structure, Metabolism and Functions. Schreiber, K., Schutte, H.R. y Sembdner, G.(eds). Deutcher Verlag der Wissenschaften. Berlin. pp. 369-375.

MULLER-THURGAU, H. (1898). Abhängigkeit der ausbildung der tranbenbeeren und einiger anderen frûchte von der entwicklung der samen. *Landw. Jb. Schweiz*, 12: 135-205.

MURASHIGE, R. y SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.

NATHAN, R., ALTMAN, A. y MONSELISE, S.P. (1984). Changes in activity of polyamine biosynthetic enzymes and in polyamine contents in developing fruit tissues of 'Murcott' mandarin. *Scientia Horticulturae*, 22: 359-364.

NEGI, S.S. y OLMO, H.P. (1966). *Science*. 152: 1624.

NIKULA, P., ALHONEN-HONGISTO, L., SEPPÄNEN, P. y JÄNNE, J. (1984). Inhibition of long-chain fatty acid oxidation by methylglyoxal-

bis(guanylhydrazone). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120: 9-14.

NITSCH, J.P. (1952). Plant hormones in the development of fruits. *Quarterly Review of Biology*, 27: 33-57.

NITSCH, J.P. (1970). Hormonal factors in growth and development. En: *The Biochemistry of the Fruits and their Products*. Hulme, A.C. (ed). Academic Press. Londres. pp. 427-472.

OLSON, A.R. y NOWAK, J. (1988). Free polyamines in postpollination placenta and ovules of potato. *HortScience*, 23 (6): 1042-1044.

OSHIMA, T. (1978). Novel polyamines of extremely thermophilic bacteria. En: *Biochemistry of Thermophily*. Friedman, S.M. (ed). Academic Press. New York. pp. 211-220.

OSHIMA, T. (1979). Molecular basis for unusual thermostabilities of cell constituents from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. En: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Shilo, M. (ed). Dahlem Konferenzen. Berlin. pp. 455-469.

OSHIMA, T. (1983). Unusual polyamines in an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Advances in Polyamine Research*, 4: 479-487.

OWEN, H.R. y AUNG, L.H. (1990). Genotypic and chemical influences on fruit growth of tomato. *HortScience*, 25: 1255-1257.

PALAVAN, N., y GALSTON, A.W. (1982): Polyamine biosynthesis and titer during various developmental stages of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 55: 438-444.

PALEVITCH, D., PRESSMAN, E. y RUDICH, J. (1972). Induction of parthenocarpy by triiodobenzoic acid in cucumber (*Cucumis sativa L.*). *Z. Pflanzenphysiol*, 67: 457-459.

PANAGIOTIDIS, C.A., GEORGOTSOS, J.G., y KYRIAKIDIS, A. (1982). Superinduction of cytosolic and chromatin-bound ornithine decarboxylase activities of germinating barley seeds by actinomycin D. *FEBS Letters*, 146: 193-196.

PEGG, A.E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 243: 249-262.

PEGG, A.E. (1987). The use of inhibitors to study the biochemistry and molecular biology of polyamine biosynthesis and uptake. En: Inhibition of Polyamine Metabolism. McCANN, P.P., PEGG, A.P. y SJOERDSMA, A. (eds). Academic Press. San Diego. pp. 107-119.

PEGG, A.E. y McCANN, P.P. (1982). Polyamine metabolism and function. *American Journal of Physiology*, 243 (*Cell Physiol.*): 212-221.

PFOSSER M., MENGL M., KÖNIGSHOFER H. y KANDELER R. (1992). Time course of polyamine levels during starvation of *Medicago varia* cells and its correlation with cell cycle data. *Journal of Plant Physiology*, 140: 77-92.

PÉREZ-AMADOR, M.A. y CARBONELL, J. (1995a). Arginine decarboxylase and putrescine oxidase in ovaries of *Pisum sativum (L.)*. *Plant Physiology*, 107: 865-872.

PÉREZ-AMADOR, M.A., CARBONELL, J. y GRANELL, A. (1995b). Expression of arginine carboxylase is induced during early fruit development and in young tissues of *Pisum sativum (L.)*. *Plant Molecular Biology*, 28: 997-1009.

PLESHKEWYCH, A., MAURER, T.C. y PORTER, C.W. (1983). Ultrastructural changes in the mitochondria of intestinal epithelium of rodents treated with methylglyoxal-bis(guanylhydrazone). *Cancer Resarch*, 43: 646-652.

PHILLIPS, R., PRESS, M.C., BINGHAM, L. y GRIMMER, C. (1988). Polyamines in cultured artichoke explants: effects are primarily on xylogenesis rather than cell division. *Journal of Experimental Botany*, 39: 473-480.

PHILLIPS, R., PRESS, M. C. y EASON, E. (1987). Polyamines in relation to cell division and xylogenesis in cultured explants of *Helianthus tuberosus*: lack of evidence for growth-regulatory action. *Journal of Experimental Botany*, 38: 164-172.

PREIBE, A., KLEIN, H. y JÄGER, H.J. (1978). Role of polyamines in SO₂ - polluted pea plant. *Journal of Experimental Botany*, 29: 1045-4050.

QUEBEDEAUX, B. y BEYER, E.M. (1972). Chemical induced parthenocarpy in cucumber by a new inhibitor of auxin transport. *HortScience*, 7: 474-476.

RASTOGI, R. y DAVIES, P.J. (1990). Polyamine metabolism in ripening tomato fruit. I. Identification of metabolites of putrescine and spermidine. *Plant Physiology*, 94: 1449-1455.

RASTOGI, R. y DAVIES, P.J. (1991a). Polyamine metabolism in ripening tomato fruit. II. Polyamine metabolism and synthesis in relation to enhanced putrescine content and storage life of alc tomato fruit. *Plant Physiology*, 95: 41-45.

RASTOGI, R y DAVIES, P.J. (1991b). Effects of light and plant growth regulators on polyamine metabolism in higher plants. En: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plant*. Slocum, R.D y Flores, H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 187-200.

RASTOGI, R., DULSON, J. y ROTHSTEIN, S. J. (1993). Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 103: 829-834.

RASTOGI, R. y KAUR-SAWHNEY, V. (1990). Polyamines and flower development in the male sterile stamenless-2 mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). II. Effects of polyamines and their biosynthetic inhibitors on the development of normal and mutant floral buds culture "in vitro". *Plant Physiology*, 93: 446-452.

RAWN, J.D. (1989). *Bioquímica*. Vol. I. Interamericana-McGraW-Hill.

ROBERTS, D.R., WALKER, M.A., THOMPSON, J.E. y DUMBROFF, E.B. (1984). The effects of inhibitors polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant and Cell Physiology*, 25: 315-322.

ROBIE, C.A. y MINOCHA, S.C. (1989). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. I. The effects of difluoromethylornithine and difluoromethylarginine. *Plant Science*, 65: 45-54.

ROBINSON, R.W., CANTLIFFE, D.J. y SHANNON, S. (1971). Morphactin-induced parthenocarpy in the cucumber. *Science*, 171: 1251-1252.

RODRÍGUEZ-GARAY, B., PHILLIPS, G.C. y KUEHN, G.D. (1989). Detection of norspermidine and norspermine in *Medicago sativa* L. (Alfalfa). *Plant Physiology*, 89: 525-529.

RUGINI, E. y MENCUCCINI, M. (1985). Increased yield in the olive with putrescine treatment. *HortScience*, 20:102-103.

RUSELL, D.H. y DURIE, B.G.M. (1978). Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth. En: *Progress in Cancer Research and Therapy*. Raven Press. New York. Vol. 8.

SÁNCHEZ-GRAS, M. C. y SEGURA, J. (1988): Morphogenesis in vitro of *Sideritis angustifolia*: Effects of auxins, benzyladenine y spermidine. *Plant Science*, 57:151-158.

SANDELIUS, A. S. y SOMMARIN, M. (1990). Membrane-localized reactions involved in Polyphosphoinositide turnover in plant. En: Inositol Metabolism in Plant. Morr , Boss, W.F. y Loewus, F.A. (eds). Wiley-Liss, inc., Nueva York. pp. 139-161.

SANTANEN, A. y SIMOLA, L.K. (1992). Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. *Journal of Plant Physiology*, 140: 475-480.

SCHERER, G.F.E. (1996). Biologically active lipids and lipid-modulated protein kinase in plant. En: Signal Transduction in Plant Growth and Development. D.P.S. Verma (ed.). Springer- Wien-New York. pp 197-215.

SCHROEDER, C.A. (1953). *Proceedings American Society Horticultural Science*, 61: 103-109.

SCHWARTZ, M., ALTMAN, A., COHEN, Y. y ARZEE, T. (1986). Localization of ornithine decarboxylase and changes in polyamine content in root meristems of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*, 67: 485-492.

SCOCCIANTI, V., TORRIGIANI, P. y BAGNI, N. (1991). Occurrence of diamine oxidase activity in protoplasts and isolated mitochondria of *Helianthus tuberosus* tuber. *Journal of Plant Physiology*, 138:752-756.

SCORZA, R., MAY, L.G., PURNELL, B. y UPCHURCH, B. (1991). Differences in number and area of mesocarp cells between small-and large-fruited peach cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 116: 861-864.

SERAFINI-FRACASSINI, D. (1991). Polyamine biosynthesis and conjugation to macromolecules during the cell cycle of *Helianthus tuberosus* tuber. En: Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development. Galston, A.W. y Tiburcio, A. (eds). Fundación Juan March. Madrid. Vol. 257: 40-45.

SHIH, H.J. y GALSTON, A.W. (1985). Correlation between polyamines ratios and growth patterns in seedling roots. *Plant Growth Regulation*, 3: 353-363.

SHIRAHATA, A., y SAMEJIMA, K. (1990). Inhibitors acting at putrescine or spermidine binding site of aminopropyltransferases. En: The Biology and Chemistry of Polyamines. Goldemberg S.H. y Algranati I.D. (eds). Oxford University Press. pp. 99-102.

SIGNORINI, M., BENINATI, S. y BERGAMINI, M. (1991). Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal Plant Physiology*, 137: 547-552.

SIMMONDS, N.W. (1953). The development of the banana fruit. *Journal of Experimental Botany*, 4 (10): 87-105.

SIMMONDS, N.W. (1973). Los Plátanos. Editorial Blume. 539 pp.

SIVERIO-GRILLO, G. (1994). Contribución al estudio del papel de las poliaminas en el desarrollo del fruto de platanera. Tesis de Licenciatura. Universidad de La Laguna. 96 pp.

SLOCUM, R.D. y FUREY, M.J. (1991). Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. *Planta*, 183: 443-450.

SLOCUM, R.D. y GALSTON, A.W. (1985a). Changes in polyamine biosynthesis associated with postfertilization growth and development in tobacco ovary tissues. *Plant Physiology*, 79: 336-343.

SLOCUM, R.D. y GALSTON, A.W. (1985b): In vivo inhibition of polyamine biosynthesis and growth in tobacco ovary tissues. *Plant and Cell Physiology*, 26 (8): 1519-1526.

SLOCUM, R.D. y GALSTON, A.W. (1987). Inhibition of polyamine biosynthesis in plant and plant pathogenic fungi. En: Inhibition of Polyamine Metabolism. McCann, P.P., Pegg, A.E. y Sjoerdsma, A. (eds). Academic Press. San Diego. pp. 305-316.

SLOCUM, R.D., KAUR-SAWHNEY, R., y GALSTON, A.W. (1984). The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 235 (2): 283-303.

SLOCUM, R.D. y WEINSTEIN, L.H. (1990). Stress-induced putrescine accumulation as a mechanism of ammonia detoxification in cereal leaves. En: Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions. Flores, H.E., Arteca, R.N. y Shannon, J.C. (eds). Am. Soc. Plant Physiol., Rockville. pp. 157-165.

SMITH, T.A. (1977). Recent advances in the biochemistry of plant amines. *Progress in Phytochemistry*, 4: 27-82.

SMITH, T.A. (1982). Polyamines as plant growth regulators. *British Plant Growth Regulator Group*

SMITH, T.A. (1983). Putrescine and inorganic ions. *Recent Advances in Phytochemistry*, 18: 7-54.

SMITH, T.A. (1985). Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 36: 117-143.

SMITH, T.A. (1991a). A historical perspective on research in plant polyamine biology. En: Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants. Slocum, R.D. y Flores H.E. (eds). Boca Raton. CRC Press. Florida. pp. 1-22.

SMITH, T.A. (1991b). Occurrence and distribution of polyamine in the plant kingdom. En: Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development. Galston, A.W. y Tiburcio, A.F. (eds). Fundación Juan March. Madrid. Vol. 257: 15-18.

SMITH, T.A., CROKER, S.J. y LOEFFLER, R.S.T. (1986). Occurrence in higher plant of 1-(3-aminopropyl)-pyrrolinium and pyrroline: products of polyamine oxidation. *Phytochemistry*, 25: 683-689.

SMITH, T.A. y SINCLAIR, C. (1967). The effect of acid feeding on amine formation in barley. *Annals of Botany*, 31: 103-111.

SOTO, M. (1990). Bananos. Cultivo y comercialización. *Litografía e imprenta LIL S.A.* Costa Rica. 627 pp.

SRIVASTAVA, S. K., PRAKASH, V. y NAIK, B.I. (1977). Regulation of diamine oxidase activity in germinating pea seeds. *Phytochemistry*, 16: 185-187.

STERLING, C. (1953). *Bull. Torrey Botan. Club.* 80: 457-458.

STROGONOV, B.P., SHEVYAKOVA, N.I. y KABANOV, V.V. (1972). Diamines in plant metabolism under conditions of salinization. *Soviet Plant Physiology*, 19: 938-943.

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 YANAGISAWA, H. (1980). Purification and properties of maize polyamine oxidase -a flavoprotein. *Plant and Cell Physiology*, 21: 1085-1094.

TABOR, C.V. y TABOR, H. (1984). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, 53: 749-790.

TAIT, G.H. (1976). A new pathway for the biosynthesis of spermidine. *Biochemical Society London Transactions*, 4: 610-612.

TAKENO, K., ISE, H., MINOWA, H. y DOUNOWAKI, T. (1992). Fruit growth induced by benzyladenine in *Cucumis sativus L.* Influence of benzyladenine on cell division, cell enlargement and indole-3-acetic content. *Journal of the Japanese Society Horticultural Science*, 60: 915-920.

TASSONI, A., ANTOGNONI, F. y BAGNI, N. (1996). Polyamine binding to plasma membrane vesicles isolated from zucchini hypocotyls. *Plant Physiology*, 110: 817-824.

TAYLOR, M. A., MAD ARIF, S. A., KUMAR, A., DAVIES, H. V., SCOBIE, L. A., PEARSE, S. R. y FLAVELL, A. J. (1992). Expression and sequence analysis of cDNA induced during the early stades of tuberisation in different organs of the potato plant (*Solanum tuberosum L.*). *Plant Molecular Biology*, 20: 641-651.

TEITEL, D.C., COHEN, E., ARAD, S., BIRNBAUM, E. y MIZRAHI, Y. (1985). The possible involvement of polyamines in the development of tomato fruit in vitro. *Plant Growth Regulation*, 3: 309-317.

TERANO, S. y SUZUKI, Y. (1978). Biosynthesis of γ -aminibutyric acid from spermine in maize seedling. *Phytochemistry*, 17: 550-551.

TIBURCIO, A.F., BESFORD, R.T., CAPELL, T., BORRELL, A., TESTILLANO, P.S. y RISUEÑO, M.C. (1994). Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 45: 1789-1800.

TIBURCIO, A. F., CAMPOS, J.L., FIGUERAS, X. y BESFORD, R.T. (1993a). Recent advances in the understanding of polyamines functions during plant development. *Plant Growth Regulation*, 12: 331-340.

TIBURCIO, A.F., FIGUERAS, X. y CAMPOS, J.L. (1993b). Poliaminas. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon-Bieto, J. y Talon, M. (coord.). Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. pp. 357-378.

TIBURCIO, A.F., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1990). Polyamine metabolism. En: The Biochemistry of Plants. Mifflin, B.J. y Lea, P.J. (eds). Academic Press. Vol.16. pp. 283-325.

TIBURCIO, A.F., KAUR-SAWHNEY, R. y GALSTON, A.W. (1993c). Spermidine biosynthesis as affected by osmotic stress in oat leaves. *Plant Growth Regulation*, 13: 103-109.

TONIN, G.S., WHEELER, C.T. y CROZIER, A. (1991). Effect of changes in nitrogen nutrition on the polyamine content of *Alnus glutinosa*. *Plant Cell and Environment*, 14: 415-421.

TORRIGIANI, P., ALTAMURA, M.M., SCARAMAGLI, S., CAPITANI, F., FALASCA, G. y BAGNI, N. (1993). Regulation of rhizogenesis by polyamines in tobacco thin layers. *Journal of Plant Physiology*, 142: 81-87.

TORRIGIANI, P. y SERAFINI-FRACASSINI, D. (1980). Early DNA synthesis and polyamines in mitochondria from activated parenchyma of *Helianthus tuberosus*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 97: 353-359.

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. *Journal of Plant Physiology*, 124: 23-29.

TORRIGIANI, P., SERAFINI-FRACASSINI, D. y FARA, A. (1989). Diamine oxidase activity in different physiological stages of *Helianthus tuberosus* tuber. *Plant Physiology*, 89: 69-73.

TUDELA, D. y TADEO, F.R. (1993). Respuestas y adaptaciones de las plantas al estrés. Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon-Bieto, J y Talon, M, (coord.) Interamericana-McGraw-Hill. pp. 537-553.

TURNER, D.W. (1970). The growth of the banana. *The Journal Australian of the Institute of Agricultural Sciences*. June: 102-110.

ULRICH, R. (1936). Corrélation entre l'allongement du fruit et le développement des graines chez la Giroflée (*Cheiranthus cheiri L.*). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 203: 1012-1013.

VERCHER, Y. y CARBONELL, J. (1991). Changes in the structure of ovary tissues and in the ultrastructure of mesocarp cells during ovary senescence or fruit development induced by plant growth substances in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 81: 518-526.

VERCHER, Y., MOLOWNY, A. y CARBONELL, J. (1987). Gibberellic acid effects on the ultrastructure of endocarp cells of unpollinated ovaries of *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 71: 302-308.

VERCHER, Y., MOLOWNY, A., LÓPEZ, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. y CARBONELL, J. (1984). Structural changes in the ovary of *Pisum sativum L.*, induced by pollination and gibberellic acid. *Plant Science Letter*, 36: 87-91.

WALKER, M.A., ROBERTS, D.R., SHIH, C. Y. y DUMBROFF, E.B. (1985). A requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant and Cell Physiology*, 26 (5): 967-971.

WEAVER, R.J., VAN OVERBEEK, J. y POOL, R.M. (1965). *Nature*, 206: 952-953.

WITTEW, S.H., BUKOVAL, M.J., SELL, H.M. y WELLER, L.E. (1957). Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. *Plant Physiology*, 32:39-41.

- YAMANOHA, B., y COHEN, S.S. (1985). S-adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase from Chinese cabbage. *Plant Physiology*, 78: 784-790.
- YANAGISAWA, H., HIRASAWA, E. y SUZUKI, Y. (1981). Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotyls. *Phytochemistry*, 20: 2105-2108.
- YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1983). Putrescine and acid stress. *Plant Physiology*, 71: 767-771.
- YOUNG, N.D. y GALSTON, A.W. (1984). Physiological control of arginine decarboxylase activity in K-deficient oat shoots. *Plant Physiology*, 76: 331-335.