

Papel de las poliaminas en el crecimiento y desarrollo

Role of polyamines in growth and development

GALLARDO, M., MATILLA, A., MUÑOZ DE RUEDA, P. y SÁNCHEZ-CALLE, I. M.
Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071 Granada. España.

RESUMEN

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son compuestos nitrogenados alifáticos que actualmente se consideran como reguladores del crecimiento y desarrollo de plantas por su efecto demostrado sobre el crecimiento, la división y la diferenciación celular a bajas concentraciones. Por su carácter policatiónico pueden unirse a moléculas cargadas negativamente tales como ácidos nucleicos, proteínas o fosfolípidos, alterando la expresión génica y la actividad de ciertos enzimas, así como variando la fluidez y la permeabilidad de las membranas biológicas. En algún caso, las poliaminas actúan como reserva de nitrógeno, constituyendo la única fuente del mismo. Su biosíntesis está muy relacionada con la de la fitohormona gaseosa etileno, ya que la S-adenosilmetionina es el intermediario común de ambas rutas metabólicas. Este reparto de la S-adenosilmetionina puede tener importantes implicaciones fisiológicas. Las poliaminas pueden conjugarse con ácidos hidroxycinámicos y desempeñar funciones, todavía poco claras, en los procesos de diferenciación, floración y maduración; por otra parte, tienen efecto sobre la resistencia a virus y hongos en ciertas plantas. La pared celular es uno de los compartimentos celulares más importantes en relación con el metabolismo degradativo de poliaminas, destacando el aumento de la conjugación de poliaminas en la pared celular durante el envejecimiento celular. La importancia de las poliaminas como precursoras de numerosos alcaloides, también se contempla en esta revisión.

Palabras clave: Poliaminas. Espermidina. Putrescina. Crecimiento.

ABSTRACT

Polyamines (putrescine, spermidine and spermine) are aliphatic nitrogenous compounds that at present are considered growth regulators because they have some demonstrated effect on cellular growth, division and differentiation at low concentrations. Polyamines, due to polycationic nature, can be bound to negatively charged molecules such as nucleic acids, proteins or phospholipids altering genic expression, the activity of some enzymes and also modifying the fluidity and permeability of the biological membranes. In some plant systems, polyamines may act to store organic nitrogen being the sole source of nitrogen. Polyamine and ethylene biosynthesis are related by the common precursor S-adenosylmethionine, and the distribution of this compound can have important physiological implications. Polyamines are also bound to hydroxycinnamic acids and thus possibly affect the processes of differentiation, flowering and maturation. Polyamines have an

effect on the resistance to virus and fungus in some plants. The plant cell wall is one of the most important compartments in relation to the polyamine catabolism, emphasizing the increase in the conjugation of polyamines in the cell wall during the cell senescence. The importance of the polyamines as precursors of numerous alkaloids are also reviewed.

Key words: Polyamies. Putrescine. Spermidine. Growth.

Recibido: 19-6-95.

Aceptado: 26-10-95.

BIBLID [0004-2927(1996) 37:1; 17-27]

INTRODUCCIÓN

Las poliaminas son compuestos nitrogenados alifáticos de bajo peso molecular y de naturaleza policatiónica (1). Las poliaminas, en plantas, se están estudiando desde las dos últimas décadas, de ahí que su papel en la fisiología de las plantas no sea bien conocido. Lo que sí se sabe es que las principales poliaminas, putrescina, espermidina, espermina y cadaverina (esta última sólo aparece en algunas especies vegetales, destacando las leguminosas) existen en las células vegetales, en cantidades que oscilan desde 10 μM hasta el orden de milimolar, junto con las enzimas que regulan su metabolismo. Además, estas sustancias, no sólo se encuentran como bases moleculares libres, sino que también aparecen en forma conjugada a compuestos de bajo peso molecular o bien a macromoléculas. Aunque forman parte del metabolismo secundario, pueden ser transformadas e integradas en otras vías de este metabolismo de plantas (2, 3, 4, 5, 6).

Aunque las funciones de las poliaminas no son bien conocidas, algunos estudios han demostrado que estos compuestos son necesarios para un crecimiento y desarrollo normal tanto de procariotas como de eucariotas. Así, mutantes deficientes en poliaminas (7, 8) o células a las que se les ha aplicado inhibidores específicos irreversibles de su biosíntesis, son incapaces de crecer y desarrollarse normalmente (9). Cuando a dichos mutantes se les adicionan poliaminas, se restaura el crecimiento y desarrollo normal; de ahí que se pueda concluir que las poliaminas son esenciales para un buen número de células. Por otra parte, en algunas bacterias termofilicas, los organismos producen de forma inusual largas cadenas de poliaminas en respuesta al estrés por altas temperaturas. En vista de ello, las poliaminas parecen jugar un papel en la protección contra la inactivación de enzimas que son especialmente sensibles a las altas temperaturas (10). Este efecto ha sido demostrado por nosotros durante la germinación de semillas de garbanzo a altas temperaturas, en las que la presencia de espermina a la concentración de 1 mM es capaz de proteger la actividad de la enzima formadora de etileno (11).

Las poliaminas están implicadas en muchos aspectos celulares, los cuales aparecen reflejados en un amplio rango de procesos fisiológicos que incluyen:

la embriogénesis, la división celular, la floración, el desarrollo del fruto, la resistencia a mecanismos de estrés y la modulación de la senescencia en plantas (12, 13). Resultados recientes parecen apuntar hacia una oscilación circadiana de los niveles endógenos de poliaminas en ciertas plantas (14, 15). Sin embargo, apenas se ha estudiado la relación entre las poliaminas y la germinación. En semillas de garbanzo, las variaciones en el contenido de poliaminas y la compartimentación de las mismas dentro de la célula, podría actuar como uno de los factores endógenos que regulan la germinación de esta semilla (16).

Las poliaminas están metabólicamente relacionadas con los aminoácidos básicos arginina y ornitina y, por tanto, con el ácido glutámico que es un intermediario clave del metabolismo del nitrógeno (17). De esta forma, las poliaminas pueden actuar como un almacén de nitrógeno orgánico, y en algunos sistemas vegetales, pueden ser las únicas fuentes de nitrógeno disponibles (4, 13, 18). Aunque las rutas biosintéticas y degradativas de las poliaminas son bien conocidas (19, 20, 21), y se han caracterizado las enzimas claves, su regulación a nivel molecular todavía es un punto oscuro.

Se conoce poco acerca de la compartimentación subcelular de las poliaminas y de sus enzimas biosintéticos (13). La extrapolación de los estudios *in vitro* a la localización subcelular *in vivo* es complicada, debido a la fácil redistribución de estas sustancias básicas que son altamente solubles, y a su desplazamiento por otros cationes celulares. Además, a pH celular, las poliaminas son cationes, de ahí que tengan una afinidad alta por varias sustancias ácidas tales como fosfolípidos, ácidos nucleicos y residuos ácidos de proteínas, pudiéndose unir a estos componentes durante el proceso de aislamiento (9).

Los principales sitios de unión de las poliaminas son probablemente: (1) ARN, tanto ribosomal como transferente, (2) ADN, tanto nuclear como organular, (3) pared celular y (4) membranas. Se sabe que las poliaminas, al igual que el Mg^{2+} , se unen a los ribosomas y facilitan la asociación de las subunidades ribosomales (9), pudiendo ser usadas *in vitro* para reasociar las subunidades 50S y 30S, en una partícula de aproximadamente 70S (6) o para mejorar la eficiencia de la síntesis *in vitro* de proteínas (22). Las poliaminas también pueden unirse a sitios específicos de la molécula de ARNt, estabilizando estructuras en doble hélice como la de los brazos del ARNr y ARNt (23). En plantas, se ha encontrado putrescina, espermidina y espermina, unidas a los ribosomas (24) así como a complejos con ARNr y ARNt (25). La unión de las poliaminas al ARN neutralizan las cargas negativas de los grupos fosfato, protegiendo así al ARN de la actividad ribonucleasa (26). Además, experimentos recientes han demostrado que las poliaminas inhiben la síntesis *de novo* de esta enzima (27). En estudios llevados a cabo con *Helianthus tuberosus* se ha determinado una secuencia específica (poly-A) que liga putrescina de forma específica (25). Esta unión es estabilizada entre los grupos amino de las poliaminas y los fosfatos ionizados del ARN.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado la interacción y estabilización del ADN por poliaminas, así como su unión a esta macromolécula (9). Aunque en las plantas la información es escasa, se ha demostrado la presencia de espermidina y espermina en cromatina aislada de maíz. La mayoría de la espermina *in vivo* está probablemente unida a la cromatina (28). La distribución de cargas en la molécula de espermina hace que se una fuertemente a los grupos fosfato de cada hebra de la doble hélice de ADN estabilizando su estructura por mantener juntas ambas hebras (23). De ello se deriva que las poliaminas sean los principales componentes catiónicos, junto con el Ca^{2+} y Mg^{2+} , de los bacteriófagos T_4 y otros virus, ya que son usadas como empaquetadoras de las moléculas de ADN y ARN y así son más fáciles de introducir en los receptores celulares. La interacción de las poliaminas con los ácidos nucleicos puede ser la base de sus efectos sobre la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Además, la aplicación de poliaminas exógenas incrementan la síntesis de proteínas, de ADN y la actividad mitótica (29). Mediante el uso de técnicas indirectas, se ha demostrado que las poliaminas se requieren para que se complete el ciclo celular en algunas células animales y en plantas superiores. Frecuentemente, cuando se añaden inhibidores de la síntesis de poliaminas a las células en división, éstas se bloquean en el estado G_1 del ciclo, pasando a la fase S cuando se añaden las poliaminas (30). Esta idea ha conducido a pensar que las poliaminas se requieren para la replicación del ADN. Este hecho, junto con la alta actividad ornitina descarboxilasa, su estimulación rápida y masiva por estimuladores del crecimiento y su rápida actividad en la metástasis tumoral, tiene un gran interés oncológico. De ahí que la difluorometilornitina, un inhibidor de la ornitina descarboxilasa, fuese suministrada como una droga anticáncer. Recientemente, se ha demostrado que las poliaminas son activadoras de proto-oncogenes nucleares en fibroblastos NIH 3T3 (10, 31).

Por otra parte, las poliaminas son también capaces de inhibir la actividad proteasa, siendo la más efectiva la espermina, seguido de la espermidina, putrescina y cadaverina (32, 33). El mecanismo de acción es debido a que la espermina interacciona con el enzima en un sitio diferente al sitio de unión del sustrato, lo cual provoca una transición de la proteína desde un estado conformacional catalíticamente activo a otro que es el 50% menos activo (33).

Otros estudios han demostrado que las poliaminas se unen a los grupos de la cabeza de los fosfolípidos cargados negativamente o a otros sitios aniónicos de las membranas, alterando la estabilidad y las características de permeabilidad de las mismas (19). La primera evidencia de que las poliaminas se unen a las membranas fue obtenida observando que la espermina era capaz de estabilizar células en suspensión. Así, se ha observado que concentraciones fisiológicas de espermidina y espermina estabilizan protoplastos de avena (34, 35) y membranas tilacoidales en hojas de cebada (35), lo cual puede ser debido a que las poliaminas puedan prevenir la peroxidación lipídica y el ataque proteolítico (36, 37).

El hecho de que las poliaminas inhiban la peroxidación lipídica puede deberse a que puedan actuar como secuestradores de radicales libres en algunos sistemas biológicos (38). Así, por ejemplo, Drolet y cols. (39) han demostrado que las poliaminas pueden eliminar de forma efectiva radicales superóxido (O_2^-) que son generados en sistemas químicos y enzimáticos. Además, la eficiencia para eliminar radicales libres es dependiente de la concentración de poliamina utilizada, siendo la óptima de 5 a 50 mM, y es también mayor para las tri- y tetraminas que para las diaminas (39, 38).

La estabilización de las membranas por poliaminas no es debida a un efecto osmótico, ya que las cantidades de aminas que se requieren para inducirlo son demasiado pequeñas, sino más bien se debe a su unión a los grupos ácidos de los fosfolípidos, reduciendo las fuerzas de repulsión. Experimentos con membranas artificiales muestran que las interacciones con los fosfolípidos son diferentes para el caso de la putrescina que para la espermidina y espermina. Los aspectos más importantes de la interacción de las poliaminas con las membranas se observan durante la senescencia celular, ya que la primera acción antisenescente de las poliaminas es la estabilización de membranas (26). La unión de las poliaminas a las membranas afectan a su fluidez, pudiendo provocar una mayor rigidez de la misma (40) y modulan de forma indirecta las actividades de las enzimas asociadas a ella (19).

La síntesis de poliaminas puede competir con la de la fitohormona etileno, ya que la S-adenosilmetionina sirve como un precursor común de ambas rutas (41). Así, la espermidina deriva de la putrescina, y la espermina de la espermidina, por la adición de grupos aminopropilos que proceden de la S-adenosilmetionina, en reacciones catalizadas por la espermidina y espermina sintasas, respectivamente. De esta manera, la S-adenosilmetionina juega un papel central en las biosíntesis tanto de etileno como de poliaminas (42). En base a esta competición por el sustrato, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de una ruta puede promover la síntesis de la otra y viceversa (43). Además, esta competición metabólica puede tener consecuencias biológicas importantes; aunque todavía no se conoce si tal regulación ocurre *in vivo*. Sin embargo, en algunos procesos del crecimiento vegetal parece que está implicado este reparto de la S-adenosilmetionina. Tal es el caso del proceso germinativo de semillas de *Cicer arietinum*, el cual está relacionado con la biosíntesis de etileno (44, 45) y poliaminas (46, 47). En este sistema modelo, hemos observado que al inhibir la síntesis de poliaminas con ciclohexilamina (inhibidor de la espermidina sintasa) se estimula la germinación y se incrementa la síntesis de etileno; lo cual nos sugiere que el conjunto de S-adenosilmetionina está más disponible para la biosíntesis de etileno (48). La mayoría de nuestros resultados nos sugieren que la competición de las rutas de etileno y poliaminas por la S-adenosilmetionina va a regular de algún modo el comienzo de la germinación en semillas de garbanzo (49, 16).

En las plantas hay algunas evidencias de que las poliaminas, principalmente las que están conjugadas a los ácidos cinámicos, se unen a la pared celular fundamentalmente a la lignina y a los ácidos urónicos (50, 51, 52). Así, Clarke (53) encontró la presencia de poliaminas unidas a componentes fenólicos que se hallaban ligadas a la pared celular. En células en cultivo de zanahoria, a las que se les suministraron poliaminas exógenas, se encontró que la mayoría de la putrescina estaba presente en los protoplastos, mientras que la espermidina aparecía principalmente en las paredes celulares (54, 55).

Las poliaminas se encuentran también como conjugados a moléculas tales como péptidos (ej. glutationilespermidina), aminoácidos (ej. putreamina) o antibióticos (ej. bleomicina), entre otros. Las poliaminas también pueden conjugarse al ácido acético, formando acetil derivados, los cuales están ampliamente distribuidos en el Reino Animal. En las plantas, las amidas de los ácidos hidroxicinámicos son las poliaminas conjugadas más comunes (56, 57, 58); pero también se pueden encontrar unidas a proteínas (59) como parte de alcaloides macrocíclicos (56). La amplia distribución de estos compuestos, el conocimiento de su estructura, su síntesis química y su significado fisiológico han sido ampliamente estudiados (2, 56, 60, 5).

En algunas plantas, la putrescina, agmatina, espermidina y espermina, pueden unirse en forma de amidas con una o dos moléculas de los ácidos cumárico, caféico o ferúlico, formando hidroxicinamoil amidas. Estos compuestos están presentes principalmente durante la floración y la fructificación y no aparecen en las estructuras vegetativas, con excepción de las raíces durante ciertos estados del desarrollo, de ahí que se les considere como marcadores de la floración en numerosas especies de plantas (61) y también como marcadores del óvulo fértil y del polen (56). Las investigaciones realizadas apuntan a que las poliaminas, incluida la espermidina conjugada a ácidos hidroxicinámicos, desempeñan una función esencial durante la diferenciación floral en cultivos de tabaco (62). Por otra parte, se ha sugerido que estos conjugados podrían tener una función de resistencia frente a infecciones víricas (56), ya que las plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico, reaccionan incrementando los niveles de poliaminas conjugadas, y la multiplicación del virus es inhibida en su presencia. Además, la presencia de las hordatinas, confieren resistencia al hongo *Helminthosporium sativum* en plántulas jóvenes de cebada (2, 56).

Estas poliaminas conjugadas también podrían actuar como una reserva desde donde las bases libres pueden ser posteriormente liberadas durante el crecimiento (4, 63), o también ser una forma de transportarse las poliaminas (56). Sin embargo, tampoco se puede descartar que estos compuestos posean por sí mismos una función metabólica intrínseca, ya que podrían actuar como sustratos en procesos catabólicos (4) o bien como precursores de alcaloides derivados de poliaminas (3). Hemos de mencionar que las poliaminas conjugadas a los ácidos hidroxicinámicos pueden alcanzar niveles altos, representando

el 80% del total de las di- y poliaminas en las flores y ser la porción principal del nitrógeno soluble.

Por otra parte, la putrescina, a parte de ser precursora de las poliaminas, espermidina y espermina, es también un precursor para la biosíntesis de alcaloides de pirrolidina (64, 65, 66). Así, los anillos de pirrolidina de los alcaloides de tabaco (nicotina, normicotina), alcaloides tropánicos (hiosciamina, hioscina y meteloidina), alcaloides de pirrolizidina (retronecina), alcaloides de *Erithroxylum coca* (higrina, cuscohigrina), y probablemente las fenantroindolizidinas (tiloforina) son derivados de la putrescina (64). Además, la espermidina, la homoespermidina y la espermina pueden conjugarse con los ácidos grasos o con los ácidos cinámicos formando varios alcaloides complejos, los cuales se han denominado como alcaloides macrocíclicos (2). Ejemplos de alcaloides derivados de espermidina son las oncinotinas, inandeninas, palustrinas, lunarinas y los alcaloides de *Cannibis*. La solamina y la solapalmitina son alcaloides derivados de la homoespermidina, mientras que la homolina, verbascenina y pitecolobinas, son ejemplos de alcaloides derivados de espermina (2). Por otro lado, la cadaverina es un precursor de los alcaloides de piperidina de *Nicotiana* (64) y de los alcaloides de quinolizidina de *Lupinus* (67). La síntesis de alcaloides se da de manera principal en las raíces desde donde son transportados a las partes aéreas de la planta, lugar éste donde se pueden acumular o además ser metabolizados (68).

BIBLIOGRAFÍA

- (1) FLORES, H. E.: "Polyamines and plant stress". In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism*. (1990), Wiley-Liss Inc. pp. 217-239.
- (2) SMITH, T. A., J. NEGREL y C. R. BIRD: "The cinnamic acid amides of the di and polyamines". In: *Advances in Polyamines Research*, (U. Bachrach, A. Kaye y R. Chayen eds.). (1983), Vol. IV, Raven Press, New York, pp. 347-370.
- (3) TIBURCIO, A.F., R. KAUR-SAWHNEY, R.B. INGERSOLL y A.W. GALSTON: "Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus". *Plant Physiol.*, (1985), **78**:323-326.
- (4) FLORES, H. E. y P. FILNER: "Metabolic relationship of putrescine, GABA, and alkaloids in cell and root cultures of *Solanaceae*". In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. (K.H. Neumann, W. Barz y E. Reinhard, eds.). (1985), Springer-Verlag., pp. 174-185.
- (5) TIBURCIO, A. F., R. KAUR-SAWHNEY y A. W. GALSTON: "Polyamine metabolism. In: *The Biochemistry of Plant*." (B. J. Mifflin y P. J. Lea eds.), (1990), Vol. 16 Academic Press, Inc., pp. 283-325.
- (6) GALSTON, A. W. y R. KAUR-SAWHNEY: Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.*, (1990), **94**:406-410.
- (7) MALMBERG, R. L. y A. C. HIATT: "Polyamines in plant mutants". In: *The Physiology of Polyamines*. (U. Bachrach y Y.M. Heimer, eds.), (1989), Vol 2, CRC Press, pp. 147-159.
- (8) TABOR, C. W. y H. TABOR: "Polyamines in microorganisms". *Microbiol. Rev.*, (1985), **49**:81-99.

- (9) TABOR, C. W. y H. TABOR: "Polyamines". *Annu. Rev. Biochem.*, (1984), **53**:749-790.
- (10) BACHRACH, U.: "Polyamines as indicators of disease activity and response to therapy in cancer patients". In: *The Physiology of Polyamines.*, (U. Bachrach y Y.M. Heimer, eds.) (1989), Vol. 2, CRC, Press, Inc., U.S., pp. 235-250.
- (11) GALLARDO, M., A. J. MATILLA e I. M. SÁNCHEZ-CALLE: "Effects of spermine, abscisic acid and temperature upon ethylene production in *Cicer arietinum* seeds". *Plant Physiol. Biochem.*, (1992), **30**:19-27.
- (12) EVANS, D. E y R. MALMBERG: "Do polyamines have roles in plant development?". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (1989), **40**:235-269.
- (13) BAGNI, N.: "Polyamines in plant growth and development". In: *The Physiology of Polyamines.*, (U. Bachrach y Y.M. Heimer, eds.) (1989), Vol. 2, CRC, Press, Inc., U.S., pp. 107-120.
- (14) SCHWALL, M., H. WENDORF y E. WAGNER: "Diurnal modulation of ADC activity of *Chenopodium rubrum*, L. by temperature and light". *Plant Cell Physiol.*, (1985), **8**:1607-1612.
- (15) N'DOYE, M., B. MILLET, M. PAYNOT y J. MARTIN-TANGUY: "Diurnal modulation of polyamine content in seedlings of *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ace 55 by temperature and light". *Plant Sci.*, (1994), **104**:11-15.
- (16) GALLARDO, M., P. MUÑOZ DE RUEDA, A. J. MATILLA y I. M. SÁNCHEZ-CALLE: "Alterations of the ethylene pathway in germinating thermoinhibited chick-pea seeds caused by the inhibition of polyamine biosynthesis". *Plant Sci.*, (1995), **104**:169-175.
- (17) LUDWIG, R. A.: "*Arabidopsis* chloroplast assimilate L-arginine and L-citrulline for use as N source". *Plant Physiol.*, (1993), **101**:429-434.
- (18) ALTMAN, A. y N. LEVIN: "Interaction of polyamines and nitrogen nutrition in plants". *Physiol. Plant.*, (1993), **89**:653-658.
- (19) SLOCUM, R. D., R. KAUR-SAWHNEY y A. W. GALSTON: "The physiology and biochemistry of polyamines in plants". *Arch. Biochem. Biophys.*, (1984), **235**:283-303.
- (20) SMITH, T. A.: "The di- and polyamine oxidase of higher plants". *Biochem. Soc. Transactions*, (1985), **13**:319-322.
- (21) ADIGA, P. R. y G. L. PRASAD: "Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants". *Plant Growth Regul.*, (1985), **3**:205-226.
- (22) MATILLA, A. J., G. NICOLÁS, O. VICENTE y J. M. SIERRA: "Preformed mRNA in cotyledons of ungerminated seeds" of *Cicer arietinum* L. *Plant Physiol.*, (1980), **65**:1128-1132.
- (23) HEBY, O. y L. PERSSON: "Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells". *Trends Biochem. Sci.*, (1990), **15**(4):153-158.
- (24) COCUCCHI, S. y N. BAGNI: "Polyamines-induced activation of protein synthesis in ribosomal preparation from *Helianthus tuberosus* tissue". *Life Sci.*, (1968), **7**:113-118.
- (25) SERAFINI-FRACASSINI, D., P. TORRIGIANI y C. BRANCA: "Polyamines bound to nucleic acids during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*". *Physiol. Plant.*, (1984), **60**:351-357.
- (26) CREUS, J. A., A. ENCUESTRA, E. G. GAVALDA y J. BARCELÓ: "Binding of polyamines to different macromolecules in plants". In: *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development.* (A.W. Galston y A. F. Tiburcio, eds.) (1991), Madrid: Fundación Juan March. Vol. 257. pp. 30-34.
- (27) ISOLA, M. C. y L. FRANZONI: "Inhibition of net synthesis of ribonuclease by polyamines in potato tuber slices". *Plant Sci.*, (1989), **63**:39-45.
- (28) HIRASAWA, E. y Y. SUZUKI: "Occurrence of spermine in chromatin of *Zea mays*". *Plant Growth Regul.*, (1985), **3**:239-245.

- (29) TIBURCIO, A. F., J. L. CAMPOS, X. FIGUERAS y R. T. BESFORD: "Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development". *Plant Growth Regul.*, (1993), **12**:331-340.
- (30) MAKI, H., S. ANDO, H. KODAMA y A. KOMAMINE: "Polyamines and the cell cycle of *Catharanthus roseus* cells in culture". *Plant Physiol.*, (1991), **96**:1008-1013.
- (31) BACHRACH, U.: "Activation of nuclear proto-oncogenes by polyamines". In: *Aspetti Biologici e clinici delle poliamine. Societa Italiana di Biochimica. Riunione del Gruppo Poliamine.* (1993), C1.
- (32) KAUR-SAWHNEY, R., L. M. SHIH, T. CEGIELSKA y A. W. GALSTON: "Inhibition of protease activity by polyamines. Relevance for control of leaf senescence". *FEBS Lett.*, (1982), **145(2)**:345-349.
- (33) BALESTRERI, E., P. CIONO, A. ROMAGNOLI, S. BERNINI, A. FISSI y R. FELICOLI: "Mechanism of polyamine inhibition of leaf protease". *Arch. Biochem. Biophys.*, (1987), **255**:460-463.
- (34) ALTMAN, A.: "Polyamines and plant hormones". In: *The Physiology of Polyamines.*, (U. Bachrach y Y.M. Heimer, eds.) Vol. 2, CRC, Press, Inc., U.S., (1989), pp. 121-145.
- (35) BESFORD, R., C. M. RICHARDSON, J. L. CAMPOS y A. F. TIBURCIO: "Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically-stressed oat leaves". *Planta*, (1993), **184**:201-206.
- (36) BESFORD, R. y B. THOMAS: "Production of monoclonal antibodies to thylakoid proteins". In: *Meeting on Photosynthesis.* London AFRC, (1988), pp. 50.
- (37) BESFORD, R., C. M. RICHARDSON, T. CAPELL y A. F. TIBURCIO: "Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically-stressed oat leaves". In: *Polyamines as Modulators of Plant Development.* Fundación Juan March. Serie Universitaria 257. (1991), pp. 72-75.
- (38) DUMBROFF, E.: "Mechanisms of polyamine action during plant development". In: *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development.* (A.W. Galston y A.F. Tiburcio, eds.). Madrid: Fundación Juan March. Vol. 257. (1991), pp. 62-66.
- (39) DROLET, G., E. B. DUMBROFF, R. L. LEGGE y E. THOMPSON: "Radical scavenging properties of polyamines". *Phytochem.*, (1986), **25(2)**:367-371.
- (40) ROBERTS, D. R., E. B. DUMBROFF y J. E. THOMPSON: "Exogenous poliamines alter membrane fluidity in bean leaves a basis for potential misinterpretation of their true physiological role". *Planta*, (1986), **167**:395-401.
- (41) KUSHAD, M. y E. B. DUMBROFF: "Metabolic and physiological relationships between the polyamines and ethylene biosynthetic pathways". In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL. (1992), ISBN 0-8493-6865-0.
- (42) MIYAZAKI, J. H. y S. F. YANG: "The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis". *Physiol. Plant.*, (1987), **69**:366-370.
- (43) ROBERTS, D. R., M. A. WALKER, J.E. THOMPSON y E.B. DUMBROFF: "The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnations". *Plant Cell Physiol.*, (1984), **25**:315-322.
- (44) GALLARDO, M., M. M. DELGADO, I. M. SÁNCHEZ-CALLE y A. J. MATILLA: "Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds". *Plant Physiol.*, (1991), **97**:122-127.
- (45) GALLARDO, M., P. MUÑOZ DE RUEDA, A. J. MATILLA e I. M. SANCHEZ-CALLE: "The relationships between ethylene production and germination of *Cicer arietinum* seeds". *Biol. Plant.*, (1994), **36(2)**:201-207.
- (46) GALLARDO, M., M. BUENO, T. ANGOSTO, E. GALLARDO y A. J. MATILLA:

- “Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination”. *Phytochem.*, (1992), **31**:2283-2287.
- (47) MUÑOZ DE RUEDA, P., E. GALLARDO, M. BUENO, M. GALLARDO, I. M. SÁNCHEZ-CALLE y A. J. MATILLA: “Content and distribution of free and bound polyamines in embryonic axes of chick-pea seeds”. *J. Plant Physiol.*, (1993), **142**:347-354.
- (48) GALLARDO, M., M. E. GALLARDO, A. J. MATILLA, P. MUÑOZ DE RUEDA y I. M. SÁNCHEZ-CALLE: “Inhibition of polyamine synthesis by cyclohexylamine stimulates the ethylene pathway and accelerates the germination of *Cicer arietinum* seeds”. *Physiol. Plant.*, (1994), **91**:9-16.
- (49) MUÑOZ DE RUEDA, P., M. GALLARDO, I. M. SÁNCHEZ-CALLE y A. MATILLA: “Germination of chick-pea seeds in relation to manipulation of the ethylene pathway and polyamine biosynthesis by inhibitors”. *Plant Sci.*, (1994), **97**:31-37.
- (50) VALLÉE, J. C., J. VANSUYT, E. NEGREL, E. PERDRIZET y J. PREVOST: “Mise en évidence d’amines liées à des structures cellulaires chez *Nicotiana tabacum* et *Lycopersicon sculetum*”. *Physiol. Plant.*, (1983), **57**:143-148.
- (51) GOLDBERG, R. y E. PERDRIZET: “Ratio of free to bound polyamines during maturation in mung-bean hypocotyl cells”. *Planta*, (1984), **161**:531-535.
- (52) SLOCUM, R. D. y M. J. FUREY: “Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues”. *Planta*, (1991), **183**:443-450.
- (53) CLARKE, D. D.: “The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack”. In: *Active Defense Mechanism in Plants*. (R.K.S. Wood, ed.) Plenum New York. (1982), pp. 321-322.
- (54) PISTOCCHI, R., F. ANTOGNONI, N. BAGNI y D. ZANNONI: “Spermidine uptake by mitochondria of *Helianthus tuberosus*”. *Plant Physiol.*, (1990), **92**:690-695.
- (55) BAGNI, N. y R. PISTOCCHI: “Uptake and transport of polyamines and inhibitors of polyamine metabolism in plants”. In: *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. (R.D. Slocum y H.E. Flores eds.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, (1991), ISBN 0-8493-6865-0, pp. 105-120.
- (56) MARTIN-TANGUY, J.: “The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants”. *Plant Growth Regul.*, (1985), **3**:381-399.
- (57) WYSS-BENZ, M., L. STREIT y E. EBERT: “Hydroxycinnamoyl amides in stem explant from flowering and non-flowering *Nicotiana tabacum*”. *Physiol. Plant.*, (1988), **74**:294-298.
- (58) WYSS-BENZ, M., L. STREIT y E. EBERT: “Feruloyl and caffeoyl putrescine are not involved in growth and floral bud formation of stem explants from *Nicotiana tabacum*, L. var. Xanthi”. *Plant Physiol.*, (1990), **92**:924-930.
- (59) DINNELLA, C., D. SERAFINI-FRACASSINI, B. GRANDI y S. DEL DUCA: “The cell cycle in *Helianthus tuberosus*: analysis of polyamine-endogenous protein conjugates by transglutaminase like activity”. *Plant Physiol. Biochem.*, (1992), **30**:531-539.
- (60) NEGREL, J.: “The biosynthesis of cinnamoylputrescine in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*”. *Phytochem.*, (1989), **28**:477-481.
- (61) MARTIN-TANGUY, J., D. TEPFER y D. BURTIN: “Effects of Ri- T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* and the inhibitors of putrescine synthesis on growth organogenesis and polyamine metabolism in tobacco”. In: *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development*. (A.W. Galston y A.F. Tiburcio, eds.). Madrid: Fundación Juan March. Vol. 257, (1991), pp. 57-61.
- (62) KAUR-SAWHNEY, R., A. F. TIBURCIO y A. W. GALSTON: “Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco”. *Planta*, (1988), **173**:282-284.
- (63) BURTIN, D., J. MARTIN-TANGUY, M. PAYNOT, M. CARRE y N. ROSSIN: “Polyamines

- hydroxycinnamoyl-putrescines, and root formation in leaf explants of tobacco cultivated *in vitro*. Effects of the suicide inhibitors of putrescine synthesis". *Plant Physiol.*, (1990), **93**:1398-1404.
- (64) LEETE, E.: "Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids". *Planta Medica*, (1990), **36**:97-112.
- (65) WALTON, N. J., R. J. ROBINS y A. C. J. PEERLESS: "Enzymes on N-methyl putrescine biosynthesis in relation to hyoscyamine in transformed root cultures in *Datura stramonium* and *Atropa belladonna*". *Planta*, (1990), **182**:136-141.
- (66) ROBINS, R. J., A. J. PARR y N. J. WALTON: "Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures. II. On the relative contribution of L-arginine and L-ornithine to the formation of the tropane ring". *Planta*, (1991), **183**:196-201.
- (67) WINK, M.: In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. (K.H. Nuemann, W. Barz y E. Reinhard, eds.). Springer-Verlag, Berlín. (1985), pp. 107-116.
- (68) FLORES, H. E.: "Catabolic pathways and secondary metabolism of polyamines in plants". In: *Lecture Course on Polyamines as Modulators of Plant Development*. (A. W. Galston y A. F. Tiburcio, eds.). Madrid: Fundación Juan March. Vol. 257, (1991), pp. 23-26.