

“POLIAMINAS Y TOLERANCIA AL ALUMINIO EN VARIEDADES
TOLERANTES Y SENSIBLES DE *Zea mays*”

Tesis Doctoral
XAVIER FEIXA RIBA
2001

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE CIÈNCIES
LABORATORI DE FIDIOLOGIA VEGETAL
Departament de Biologia Animal Biologia Vegetal i Ecologia

Vº Bº

Los Directores de la Tesis

Dr. JUAN BARCELO COLL

Dr. JOSEP ALLUE CREUS

Tesis presentada por
XAVIER FEIXA RIBA
Para optar al grado de
Doctor en Ciencias

Bellaterra, Septiembre 2001

UNIVERSITAT AUTONÓMA DE BARCELONA

FACULTAT DE CIÈNCIES

LABORATORI DE FISIOLÒGIA VEGETAL

Departamento de Biología Animal Biología Vegetal y Ecología

JUAN BARCELÓ COLL, Catedrático de Fisiología Vegetal y JOSEP ALLUÉ CREUS, Profesor Titular de Fisiología Vegetal de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que el Licenciado Xavier Feixa i Riba, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo que para optar al grado de Doctor en Ciencias (Biología) presenta con el título:

“POLIAMINAS Y TOLERANCIA AL ALUMINIO EN VARIEDADES
TOLERANTES Y SENSIBLES DE *Zea mays*”

considerando concluida la presente memoria, autorizamos su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste firmamos el presente certificado

Bellaterra 14 de septiembre de 2001

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi infinita gratitud al Dr. Joan Barceló i Coll, Catedrático de Fisiología Vegetal de la Facultat de Ciències de la Universitat Autònoma de Barcelona y a Josep Allué Creus, Profesor Titular de Fisiología Vegetal de la misma Facultat, ambos directores de este trabajo, por la confianza que han depositado en mi a lo largo de estos años, por la ayuda y el apoyo que me han ofrecido y sobretodo por la gran oportunidad proporcionada al permitirme realizar este proyecto. Sin su valiosa ayuda esta tesis no habría sido posible.

También quisiera expresar mi agradecimiento a todos y cada uno de los miembros de este laboratorio, por su paciencia colaboración y ayuda a lo largo de estos años.

Asimismo agradezco la ayuda proporcionada por el Gobierno Español y por la Comunidad Europea por conceder los proyectos DGICYT: PB97-0163-C02-01 y UE: ICA4-CT2000-30017, de los cuales este trabajo se ha beneficiado.

De manera muy especial quiero agradecer a mis padres el apoyo ofrecido durante todos estos años.

Por último, pero no menos importante, tengo que dar las gracias a todos los que de alguna manera han colaborado y ayudado desinteresadamente, ya sea de manera personal o científica.

MIS CABELLOS YA SON GRISES
MIS PENSAMIENTOS NEGROS
MIS SUEÑOS ESTAN GASTADOS
CASI COMO MIS VAQUEROS
TODOS ME HAN ABANDONADO
TODOS MENOS MIS AMIGOS
COMO ME VAN A DEJAR
SI NUNCA LOS HE TENIDO

LOS SUAVES

“MALDITA SEA MI SUERTE”

AL MEU FILL

1989-2000

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACC	Ácido-1-aminopropil-1-carboxílico
ADC	Arginina descarboxilasa
AHci	Adenosil homocisteina
AIH	Agmatina iminohidrolasa
Al	Aluminio
Ala	Alanina
AN	Acido Nucleico
Arg	Arginina descarboxilasa
ARS	Argininosuccinato
ATP	Adenosina 5 trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
Ca	Calcio
Cad	Cadaverina
Cu	Cobre
DAO	Diamino oxidasa
Dap	Diaminopropano
DNA	Ácido desoxiribonucleico
d-SAM	S-Adenosilmetionina descarboxilada
Fe	Hierro
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HPTLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
K	Potasio
LCD	Lisina descarboxilasa
Met	Metionina
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
MTA	5-metil-tioadenosina
MTRP	Metiltioribosa-1-fosfato

NAD	Dinucleótido de nicotinamida
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NCP	N-Carbamoilputrescina
NCPasa	N-Carbamoilputrescina aminohidrolasa
N-MTHF	N-metilhidrofolato
NorSpd	Nor-Spermidina
ODC	Ornitina descarboxilasa
Orn	Ornitina
P	Fosforo
PAO	Poli-amino oxidasa
PAs	Poli-aminas
PF	Peso Fresco
PS	Peso Seco
Put	Putrescina
PYRR-DH	Pirridina deshidrogenasa
Rf	Releasing factor
RNA	Ácido ribonucleico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAM	S-Adenosinmetionina
SD	Desviación estandar
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SSC	Sodio Sodio Citrato
TCA	Ácido Tricloracético
TGasa	Transglutaminasa
ver	versión

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL ALUMINIO	1
1.1. <i>CARACTERÍSTICAS GENERALES</i>	1
1.2. <i>EL ALUMINIO EN EL SUELO</i>	2
1.2.1. Óxidos de Aluminio	3
1.2.2. Silicatos de Aluminio	4
1.3. <i>EL ALUMINIO EN SOLUCIÓN ACUOSA</i>	4
1.4. <i>EL ALUMINIO EN LA PLANTA</i>	8
1.4.1. Absorción	9
1.4.2. Translocación	10
1.4.3. Contenido	11
1.4.4. Efectos estimulantes.....	11
1.4.5. Toxicidad.....	12
1.4.6. Tolerancia.....	17
2. POLIAMINAS	19
2.1. <i>CARACTERÍSTICAS GENERALES</i>	19
2.2. <i>TIPOS DE POLIAMINAS</i>	19
2.1.1. Libres.....	19
2.1.2. Ligadas	20
2.2. <i>FUNCIONES</i>	21
2.2.1. Regulación de la división	22
2.2.2. Efecto antisenescente	23
2.2.3. Mensajero secundario hormonal	24
2.2.4. Estabilización de ácidos nucleicos	24
2.2.5. Uniones a proteínas	27
2.2.6. Efecto antiestrés	29

2.3. <i>METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS</i>	30
2.3.1. Biosíntesis de la Put	30
2.3.2. Biosíntesis de Cad	33
2.3.3. Biosíntesis de Spd y Spm.....	34
2.3.4. Absorción y Translocación	36
2.3.5. Degradación	37
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIAL Y MÉTODOS	47
1. ESQUEMA DEL TRABAJO.....	47
2. MATERIAL VEGETAL.....	48
3. CONDICIONES DE CULTIVO.....	49
3.1. <i>CÁMARA DE CULTIVO</i>	49
3.2. <i>CULTIVO DE LAS SEMILLAS</i>	50
3.3. <i>SOLUCIÓN NUTRITIVA</i>	51
3.4. <i>MUESTREO</i>	52
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	53
4.1. <i>PESO FRESCO</i>	53
4.2. <i>PESO SECO</i>	53
4.3. <i>DETERMINACIÓN DE DNA</i>	53
4.4. <i>POLIAMINAS</i>	55
4.4.1. Preparación de los extractos.....	55
4.4.2. Concentración y purificación de las PAs libres	57
4.4.3. Hidrólisis ácida del precipitado.....	58
4.4.4. Hidrólisis ácida del sobrenadante	60
4.4.5. Hidrólisis enzimática del DNA	60
4.4.6. Dansilación.....	61
4.4.7. Concentración de los dansilados	63

4.4.8. Separación de las poliaminas	64
4.4.9. Identificación y cuantificación de las poliaminas.....	65
4.5. <i>DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	65
4.6. <i>ESPÉCIES MONOMÉRICAS DE AI EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA</i>	66
4.7. <i>DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA</i>	66
I V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
1. PESO FRESCO, PESO SECO Y % PS/PF	71
2. DNA	72
3. POLIAMINAS	73
3.1. <i>POLIAMINAS LIBRES</i>	73
3.1.1. Coeficientes entre poliaminas	88
3.2. <i>POLIAMINAS CONJUGADAS</i>	89
3.3. <i>POLIAMINAS LIGADAS</i>	100
3.4. <i>POLIAMINAS EN EL DNA</i>	106
3.5. <i>DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE SUBSTANCIAS DANSILADAS</i>	111
V. CONCLUSIONES	123
VI. BIBLIOGRAFIA	127

I. -INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ALUMINIO

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El Aluminio es demasiado reactivo para ser encontrado libre. En combinación constituye cerca del 7,5% en peso de la corteza terrestre, donde es el elemento metálico más abundante (Haug, 1984). En la naturaleza aparece solo en la forma oxidada Al(III).

El Aluminio puro es un metal relativamente ligero (densidad del sólido 2700 Kg m^{-3}) de color blanco-plateado (reflectividad 71%), que a temperatura ambiente es sólido (punto de fusión $660,32 \text{ °C}$), cristalizando en forma cúbica (Fig. 1).

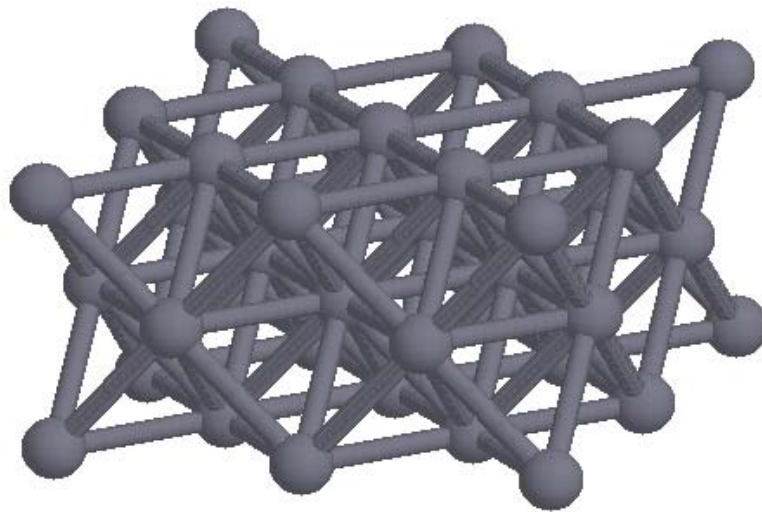


Fig. 1: Estructura cristalina del aluminio

Presenta una elevada conductividad térmica ($235 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y una baja resistencia eléctrica ($2,65 \text{ m}\Omega \text{ cm}$). Todas estas características junto con su elevada resistencia a la corrosión hacen del aluminio uno de los elementos con más usos actualmente.

El Aluminio pertenece al grupo 13 periodo 3 de la tabla periódica (Fig. 2). Es un elemento anfótero con una configuración electrónica de $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^1$.

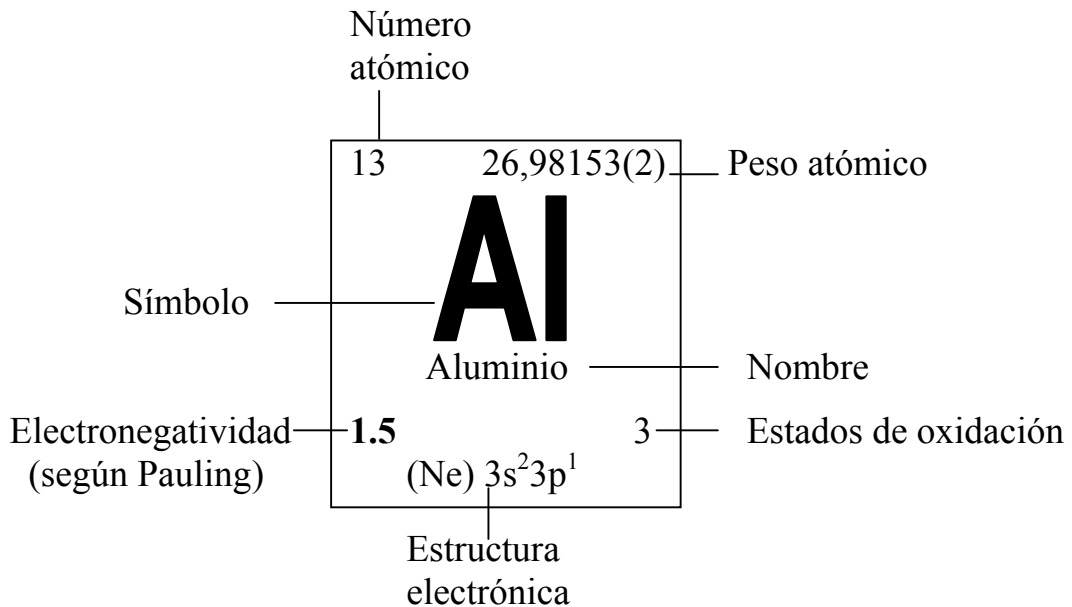


Fig. 2: Aluminio (grupo 13, periodo 3 de la tabla periódica).

El aluminio se encuentra en la naturaleza distribuido en tres grandes grupos: Biomasa viva, en solución y en partículas sólidas no vivas. La mayor parte del aluminio se encuentra inmovilizado en el suelo en forma de silicatos de aluminio que no pueden ser absorbidos por los vegetales. No obstante si las condiciones cambian, este aluminio puede llegar a solubilizarse y ser incorporado a los ciclos bioquímicos vivos (Driscoll *et al.*, 1988).

1.2. El ALUMINIO EN EL SUELO

El aluminio es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre (por detrás de silicio y oxígeno) y el constituyente clave de las piedras más comunes (excepto arenisca y piedras calizas). En el suelo se

encuentra fundamentalmente en dos tipos de compuestos: óxidos de aluminio y silicatos de aluminio (Haug, 1984).

1.2.1. Óxidos de Aluminio

La estructura de los óxidos de aluminio pueden clasificarse de acuerdo con sus características de deshidratación como: gibbsita $\gamma\text{-Al(OH)}_3$, diaspora $\alpha\text{-AlO(OH)}$, norstrandita Al(OH)_3 y alúmina $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Fig. 3).

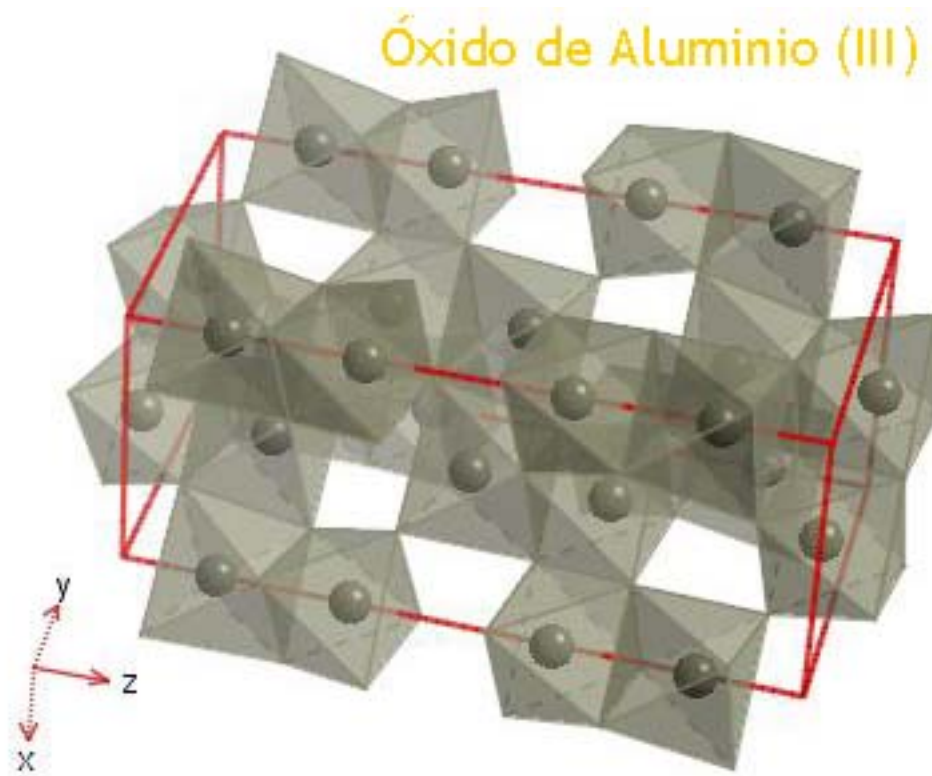


Fig. 3. Óxido de Aluminio (III), (Alúmina, Al_2O_3)

Estos óxidos e hidróxidos de aluminio juegan un papel significativo en la química ambiental de los iones metálicos y los compuestos orgánicos asociados al suelo. En solución acuosa, estos compuestos de aluminio llevan (dependiendo del pH) una carga superficial negativa, que puede ser equilibrada con la absorción de un catión, de

hidrocarburos aromáticos o complejos orgánicos del suelo como el ácido fúlvico (Haug, 1984).

1.2.2. Silicatos de Aluminio

Los aluminosilicatos mayoritarios son las zeolitas (compuestas por unidades de silicatos y/o aluminatos). Forman una red tridimensional con aberturas de 2,5 a 9 Å donde pueden acomodarse las moléculas de agua y los cationes. De especial interés son las arcillas, especialmente las “layer silicate clays” (filosilicatos) que incluyen kaolinita (Fig. 4), montmorillonita y vermiculita.

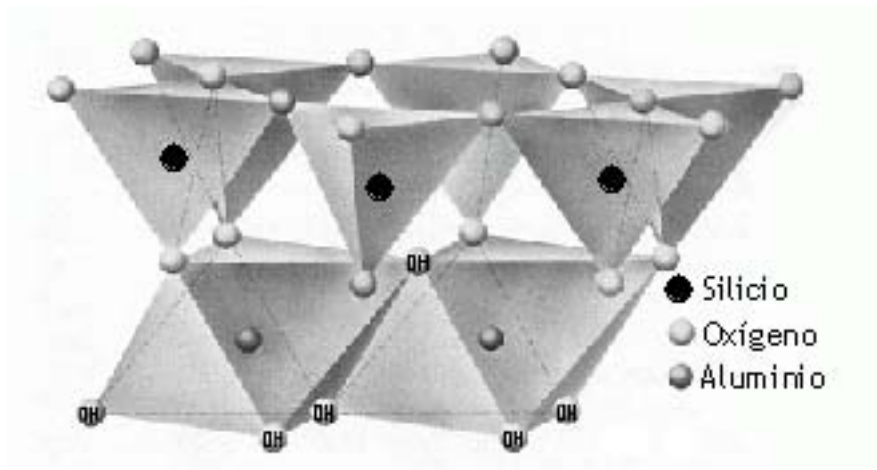


Fig. 4. Silicato de Aluminio. Kaolinita, $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_3(\text{OH})_4$

Al contrario que los óxidos de aluminio, que tenían una carga superficial en función de la absorción de H^+ o OH^- de la solución, muchos filosilicatos tienen una carga superficial negativa permanente (Haug, 1984).

1.3. EL ALUMINIO EN SOLUCIÓN ACUOSA

El ión acuoso Al(III) es el más fuerte de los iones trivalentes encontrados en la naturaleza y en los sistemas biológicos. Su radio iónico de 0,51 Å es considerablemente más pequeño que otros iones metálicos

encontrados comúnmente (Lewis, 1989). Cuando el pH del medio baja de 5, el aluminio actúa como catión Al^{3+} , o más correctamente $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, ya que a causa de su radio iónico y de su carga el Al(III) solvata moléculas de agua muy fuertemente, formándose un octaedro (Fig. 5). Como el agua es un dipolo, los hidrógenos (cargados positivamente) se orientan hacia afuera y los oxígenos (cargados negativamente) se orientan hacia el aluminio (Driscoll *et al.*, 1988).

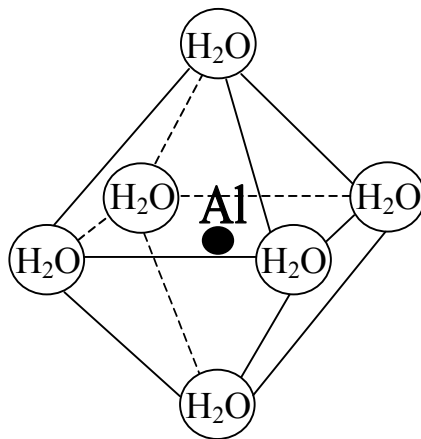
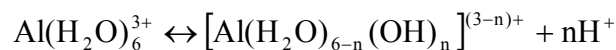


Fig. 5. Hexahidrato de Aluminio. (Driscoll *et al.*, 1988).

En condiciones de pH bajo, este complejo acuoso permanece intacto, ya que la actividad de los H^+ es alta.

Como muchos otros cationes metálicos, los iones Al(III) solvatados pueden hidrolizarse según la reacción simplificada:



La pérdida del protón del agua es facilitada por la carga positiva del catión metálico. Cuando el pH del medio sube por encima de 5, el aluminio hidroliza (protoliza) moléculas de agua adyacentes.

El grado de hidrólisis se incrementa a la vez que se incrementa el pH resultando en una serie de complejos de Al-OH. Se entiende pues, que

sea el pH del medio el que determine la solubilidad o insolubilidad del aluminio y las distintas especies iónicas predominantes (tabla 1).

PH	Especies de Aluminio	Porcentaje Aproximado
3	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$	95
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})^{2+}$	5
6.5	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3$	75
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$	15
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$	10
7	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3$	70
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$	5
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$	20
10	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$	100

Tabla 1. Distribución de especies mononucleares en una solución 10^{-5} M de Al(III) a 25°C (Baes *et al.*, 1976).

La pérdida del H^+ a su vez, permite al grupo OH^- acercarse más al aluminio que las moléculas de agua adyacentes. El Al ahora presenta más afinidad al OH^- que al oxígeno del agua (Driscoll *et al.*, 1988).

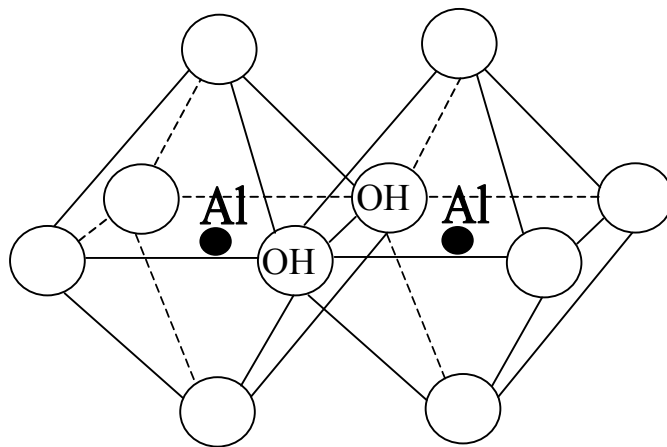


Fig. 6. Dímero de aluminio

En soluciones diluidas cuando más tiempo transcurre más probabilidades hay de que dos moléculas de Al se encuentren y de que se formen dímeros (Fig. 6) que son el comienzo de las subsiguientes reacciones de polimerización y precipitación.

A menudo se considera que las especies de aluminio en medio ácido son del tipo Al^{3+} o $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ basándose en un modelo de monómeros simples. Sin embargo, los iones de aluminio tienden a polimerizar a medida que se disocian (Wagatsuma *et al.*, 1985)

Wagatsuma *et al.*, 1985, encontraron que pasados 4 días en las soluciones de aluminio decrecían las formas monoméricas y aumentaban las formas poliméricas a medida que se aumentaba el pH entre 3.0 y 4.5-5.0 (Fig. 7).

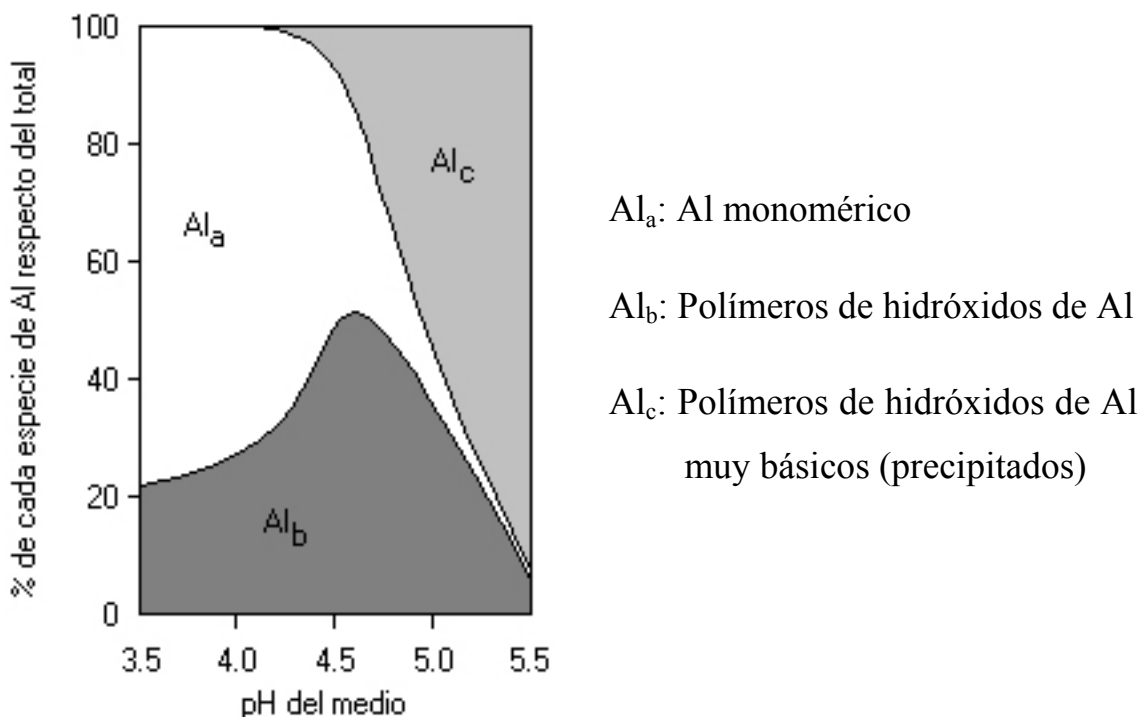


Fig. 7. Efecto del pH del medio en la formación de las distintas especies de aluminio (Wagatsuma *et al.*, 1985).

En el rango de pH neutro (6.0-8.0) el Al es relativamente insoluble.

1.4. EL ALUMINIO EN LA PLANTA

Hoy en día la toxicidad por aluminio representa un serio problema, ya que grandes zonas del planeta, la mayoría en zonas subtropicales o tropicales, presentan suelos ácidos de manera natural (Haug, 1984), dándose una gran disponibilidad de aluminio y una disminución en la productividad vegetal (Foy *et al.*, 1978; Foy, 1984; Haug, 1984).

A todo esto hay que añadir que la creciente contaminación atmosférica provoca una acidificación de las precipitaciones, disminuyendo el pH del suelo y aumentando la disponibilidad del Aluminio. Esta alta concentración de protones en el agua de lluvia, aumenta a su vez, la lixiviación de cationes básicos al incidir sobre el dosel de las hojas (Poschenrieder *et al.*, 1985).

Como las raíces son el primer órgano en contacto con las concentraciones de Aluminio, son las primeras en mostrar efectos de toxicidad (Clarkson, 1969), y las que presentan contenidos superiores de este metal (Breckle, 1989). Uno de los efectos del contacto con el aluminio es la reducción del crecimiento radicular (Ryan *et al.*, 1992); el crecimiento del tallo no se ve tan afectado. La reducción del crecimiento es causada por la inhibición directa en la absorción de nutrientes o por daños en las células de la raíz (Kochian, 1995; Budíková, 1999). La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz se ve compensada por una proliferación de las raíces laterales, que también acaban por presentar efectos de toxicidad (Breckle, 1989; Clark, 1982).

1.4.1. Absorción

El aluminio no se encuentra disponible para la planta si el pH del medio no baja por debajo de 5, ya que a valores de pH neutros (6 a 8) es bastante insoluble (Stumm *et al.*, 1970). Es importante saber la especie de Al que presenta la solución ya que no solo el aluminio monomérico puede causar toxicidad, sino que parece demostrado que también pueden absorber formas poliméricas (Wagatsuma *et al.*, 1987).

Los mecanismos de absorción del aluminio aún no son bien conocidos, las vías de entrada podrían ser:

- Por simple permeabilidad a través de la membrana celular en forma de compuestos neutros (Haug, 1984).

- A través de estructuras micelares lipídicas, cuya formación es inducida por la presencia del metal en el medio, y que facilitan su entrada en forma de partículas cargadas (Cullis *et al.*, 1979).

- Por medio de algún tipo de transportador unido a fosfolípidos propios de la membrana o algún otro agente quelante (Green *et al.*, 1980).

Por medio de inhibidores metabólicos se ha demostrado que la absorción de aluminio a través de la raíz es un proceso que no requiere energía, pues estos inhibidores metabólicos parecen mostrar un efecto positivo sobre la captación del metal.

Al disminuir la temperatura, disminuye la absorción de aluminio, pero este hecho se interpreta más como una disminución de los lugares de absorción que como consecuencia de la reducción de la actividad metabólica (Wagatsuma, 1983).

1.4.2. Translocación

Los mecanismos de translocación tampoco están muy claros, en algunas especies la concentración de aluminio en la parte aérea aumenta al incrementarse la concentración a nivel radicular. Por el contrario, en otras, esta translocación parece que solo se produce cuando la concentración radicular sobrepasa un nivel umbral, lo que podría significar una saturación de los lugares de absorción del aluminio y/o la destrucción de la función de barrera que ejerce la membrana citoplasmática (Wagatsuma, 1984).

Lo que parece más probable es que los iones polivalentes como el aluminio circulen a través de la raíz vía apoplasto, aunque una pequeña fracción podría seguir la vía del simplasto. La endodermis, con la banda de Caspari, impide la vía apoplástica y se ha visto que esta estructura varía sus características de grosor y su grado de suberificación en función de la especie la edad y del estado fisiológico de las plantas (Wagatsuma, 1984).

Las plantas que presentan niveles de aluminio más elevados en el ápice caulinar tienen alterada, en menor o mayor grado, la permeabilidad de las células de la endodermis, debido a una masiva acumulación de aluminio en el cortex. Ello provocaría la translocación hacia la parte aérea (Wagatsuma, 1984).

El mecanismo de transporte del aluminio en las plantas no se conoce exactamente. Pero dado que el aluminio puede formar complejos con los ácidos carboxílicos, se piensa que el aluminio podría transportarse como el hierro, en forma de citrato (Kinzel, 1982).

1.4.3. Contenido

La mayoría de plantas presentan una concentración que oscila entre 50 y 400 $\mu\text{g Al/g P.S.}$, pero existen plantas hiperacumuladoras de aluminio que presentan concentraciones mucho mayores. Las plantas adaptadas a suelos ácidos suelen tener mayor concentración de aluminio y son menos sensibles a este metal (Kinzel, 1982). Las plantas que acumulan más de 1mg Al/g P.S. se designan hiperacumuladoras (Chenery, 1948), pudiendo algunas acumular más de 10mg Al/g P.S. (Watanabe *et al.*, 1997,1998).

1.4.4. Efectos estimulantes

El aluminio no se considera un elemento esencial, pero algunos estudios demuestran que pequeñas concentraciones pueden tener un efecto estimulante (Foy, 1984; Bollard, 1983). Estos efectos seguramente son indirectos, ya que (Foy, 1984) considera que el estímulo podría venir dado por:

- Aumento de la disponibilidad de Fe en suelos calcáreos.
- Aumento de la fracción de Fe biológicamente activo en la planta.
- Incremento de la absorción de P mediante el bloqueo de cargas negativas en las paredes celulares.
- Prevención o corrección de la toxicidad de P, Cu o Mn.
- Alteración de la distribución de reguladores del crecimiento.
- Acción fungicida.

Hay que tener en cuenta que las plantas tolerantes al aluminio o estimuladas por el aluminio no utilizan los mismos mecanismos de resistencia. Así estas plantas se pueden dividir en: 1) Plantas que excluyen el aluminio 2) Plantas que acumulan el aluminio en la raíz 3) Plantas que acumulan aluminio, por lo que la razón del efecto beneficioso varía de especie a especie (Osaki *et al.* 1997).

1.4.5. Toxicidad

Los principales efectos tóxicos del aluminio se dan en la raíz (Clarkson, 1969). El aluminio altera rápidamente el patrón de crecimiento celular, como consecuencia, el tejido pierde organización (Bennet *et al.*, 1985a). El crecimiento longitudinal de la raíz principal se reduce y se favorece el crecimiento y proliferación de las raíces laterales, que con el tiempo, también acaban viendo inhibido su crecimiento. En conjunto el sistema radicular presenta un color pardusco (Fig. 8), con raíces cortas, engrosadas y muy ramificadas (Alam *et al.*, 1979).

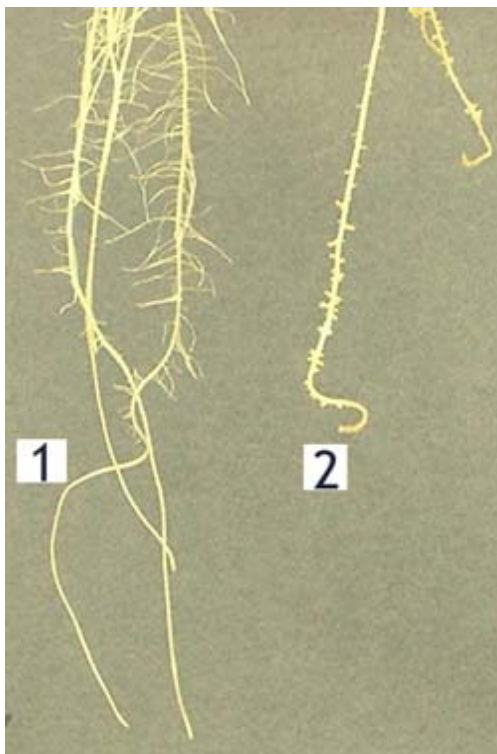


Fig. 8. Raíces de plántulas de maíz crecidas 4 días en solución nutritiva CEE II.

1) a pH 4.3

2) a pH 4.3 + 50 μ M Al

En la parte aérea, los síntomas son difíciles de identificar. Algunas plantas parecen tener síntomas de deficiencia de P, de Ca, de Mg (Jornes *et al.*, 1985) o de Fe (Foy, 1984). Estos síntomas podrían sugerir que la toxicidad por aluminio interfiere con otros elementos nutritivos esenciales para la planta, y que no son solo debidos a una inhibición del crecimiento del sistema radicular (Lee *et al.*, 1984, Poschenrieder *et al.*, 1992).

Los daños causados por la toxicidad del aluminio se pueden agrupar en 6 grupos:

a) Cambios en las cantidades y funciones de las proteínas

El aluminio induce cambios en las cantidades de proteínas de membrana (Mistrík *et al.*, 2000) y citoplasmáticas (Huttová *et al.*, 1998) pero aunque hay muchas evidencias, no se ha encontrado una función directa que relacione estas proteínas con la tolerancia al Al (Ownby *et al.*, 1991, Basu, A. *Et al.*, 1994, Somers *et al.* 1996). En otros casos se ha encontrado que el gen que codifica para estas proteínas se encontraba tanto en la variedad tolerante como en la sensible, por lo que parecen más bien involucradas en la respuesta al estrés por aluminio que a la tolerancia al aluminio (Mistrík *et al.*, 2000).

El aluminio también interfiere en la función de distintas enzimas, ya sea por unión a los grupos tiol (-SH) o mediante sustitución de otros metales específicos. Estas interacciones provocan la inhibición de la actividad enzimática o su inducción (Barceló *et al.*, 1992).

b) Daños en la estructura y función de las membranas (Stass *et al.*, 1995).

Seguramente se puede unir a los grupos fosfato de los fosfolípidos, cambiando las propiedades de fluidez y alterando todos los procesos de

transporte y actividad enzimática asociados a membranas como la fotosíntesis y la respiración (Caldwell *et al.*, 1982; Barceló *et al.*, 1996; Bennet *et al.*, 1985b; Haug, 1984). La rápida inhibición de la respiración radicular, por parte del aluminio, en ápices radiculares sería debida a una reducción del flujo de oxígeno en los tejidos radiculares más que a una interferencia directa del aluminio con el transporte electrónico mitocondrial (Horst, 1995). La disminución de la fotosíntesis viene también dada por una disminución de los niveles de clorofilas (Ohki, 1986). La interacción aluminio-membrana acaba comportando una elevada entrada de aluminio en la célula, reduce la permeabilidad al agua (Zhao *et al.*, 1987) y afecta al potencial de membrana (Olivetti *et al.*, 1995, Miyasaka *et al.*, 1989).

c) Interferencia en la estructura de la pared celular

El aluminio tiene la capacidad de unirse a la pared celular (Gunsé *et al.*, 1997; Horst, 1995; Klimashevskii *et al.*, 1980) alterando su estructura y aumentando su rigidez. Se ha comprobado la existencia de esta unión mediante estudios con rayos X (Millard *et al.*, 1989). En *Hordeum vulgare* el 85-90% del aluminio total acumulado se encontraba en la pared celular (Clarkson, 1966). Uno de los puntos donde el aluminio podría unirse sería los grupos carboxílicos de los ácidos poligalacturónicos de la lámina media (Zhang *et al.*, 1989).

d) Inhibición de la síntesis de DNA.

Se ha localizado aluminio en el núcleo de células de la raíz (Barceló *et al.*, 1996). El aluminio forma complejos fuertes con los ácidos nucleicos (Trim, 1959). Se pueden unir a los grupos fosfato del DNA (Matsumoto *et al.*, 1976). Se ha observado inhibición de mitosis y de síntesis de DNA en raíces expuestas al Al (Clarkson, 1965; Horst *et al.*,

1983; Matsumoto *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 1993). Experimentos *in vitro* (Karlik *et al.*, 1980), proponen que la especie de Al unido al DNA y el efecto seria diferente dependiendo del pH (Fig. 8).

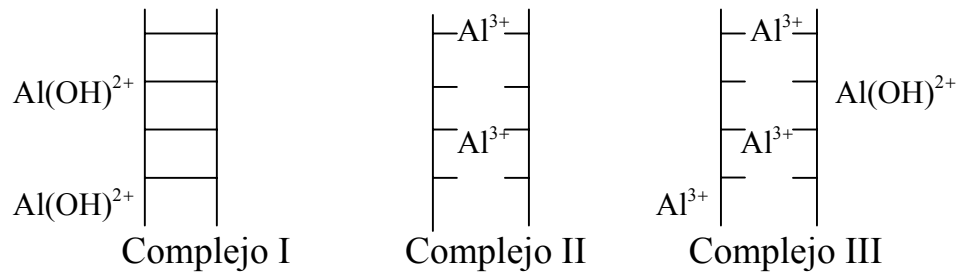


Fig. 8. Estructuras propuestas para las interacciones DNA-Al

A pH por encima de 6.0 se formaría el complejo I, que tendría afinidad por los grupos fosfato de la doble cadena y seria estabilizante. A pH por debajo de 6.0 se formaría el complejo II, que desestabilizaría el DNA y se uniría preferentemente al DNA desnaturalizado formando uniones entre las cadenas. El complejo III se formaría en todos los rangos de pH y tendría efectos dispares.

Algunos autores (Matsumoto *et al.*, 1977) afirman que la mayor parte del aluminio en el núcleo se halla unido a la cromatina, provocando una depresión de su actividad. La unión del aluminio con el DNA provoca un incremento de la estabilidad de la molécula, reduciéndose su capacidad de replicación (Matsumoto *et al.*, 1976; Morimura *et al.*, 1978^a; Morimura *et al.*, 1978b)

e) Inhibición de la elongación celular.

El ciclo de división celular en la raíz es aproximadamente de 24h. Como es un proceso relativamente lento, el factor que más contribuye a la elongación radicular es la expansión de las células ya divididas. El aluminio es capaz de inhibir la elongación radicular solo 1-2h después del

tratamiento, por lo que las interacciones del aluminio con la elongación celular jugarían un papel decisivo en la inhibición del crecimiento de la raíz. La inhibición de las células meristemáticas podría no ser la causa primaria de la disminución del crecimiento radicular (Bennet *et al.*, 1987), ya que parece que el efecto primario podría darse sobre las células de la cofia, que ejercerían una función reguladora sobre las células meristemáticas (Bennet *et al.*, 1991).

f) Interferencia en la nutrición mineral y el metabolismo.

Se han descrito interferencias con la mayoría de los elementos necesarios para la nutrición mineral, algunos efectos destacados serían:

-Calcio

Uno de los problemas principales se da con la calmodulina, que regula los niveles intracelulares de Ca. El aluminio puede interaccionar con ésta (Siegel *et al.*, 1983) e inducir cambios conformacionales y por tanto afectar a los valores normales de Ca intracelular. Dado que el Ca puede actuar de mensajero secundario, el aluminio sería el responsable indirecto de una incorrecta regulación del crecimiento.

-Magnesio

En condiciones de toxicidad por aluminio se observa una disminución de los niveles de magnesio (Blamey *et al.*, 1993). El mantenimiento de la estructura ribosómica requiere de la presencia de cationes divalentes, en particular de Mg^{2+} . Este elemento tiene una función esencial en la agregación de las subunidades ribosómicas necesarias para la síntesis de proteínas.

Cuando los niveles de magnesio son deficientes, como sucede en el caso de toxicidad por aluminio, las subunidades ribosómicas se separan y cesa la síntesis de proteínas (Horst *et al.*, 1993).

-Potasio

En *Zea mays* esta más afectada la translocación que la absorción (Cumming *et al.*, 1985). Esto provoca una disminución de los niveles de potasio en la parte aérea. Como el proceso de apertura y cierre estomático está regulado por el potasio, la disminución de la concentración de este elemento, desregula este proceso, dándose una disminución de la transpiración (Ohki, 1986).

-Fósforo

A pH fisiológico y en general a pH entre 4.5-7.0 se produce una fuerte interacción aluminio-fósforo, incrementándose considerablemente la cantidad de fósforo inmovilizado en la raíz, y disminuyendo por tanto el fósforo disponible en la parte aérea (Lee *et al.*, 1984).

1.4.6. Tolerancia

Como se han encontrado genotipos tolerantes al aluminio en diversas especies (Foy, 1984; Taylor, 1988; Devine, 1982; Massot *et al.*, 1991, 1992; Guevara *et al.*, 1992; Llugany *et al.*, 1994), es importante saber cuales son los mecanismos de tolerancia ya que aproximadamente el 40% de los terrenos cultivables presentan problemas de acidez y toxicidad por aluminio (Taylor, 1988) y se podría mejorar la productividad sin el gasto económico que supone el encalado del suelo.

Los mecanismos de tolerancia al aluminio (Taylor, 1988, 1991) se pueden agrupar en:

-Mecanismos de exclusión:

1. Inmovilización del aluminio en el apoplasto, por la modificación de las propiedades de unión al Al de la pared celular.
2. Permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática.
3. Cambios de pH en la rizosfera (alcalinización) inducidos por las raíces.
4. Exudación de ligandos quelatos, de fosfato y malato (Pellet *et al.*, 1996), de polipéptidos (Basu, U. *Et al.*, 1994, 1999) y de Al.

-Mecanismos internos de tolerancia:

1. Formación de quelatos en el citosol con ácidos orgánicos o polipéptidos.
2. Compartimentación en la vacuola.
3. Inducción de la síntesis de proteínas (algunas con uniones específicas al Al).
4. Síntesis de isozimas tolerantes al aluminio.

2. POLIAMINAS

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las poliaminas se encuentran en todos los organismos, y son esenciales para la viabilidad de las células (Evans *et al.*, 1989).

Las poliaminas se caracterizan por la presencia de más de un grupo amino terminal ($-\text{NH}_2$), además de posibles grupos imino centrales ($-\text{NH}-$). Son moléculas alifáticas de bajo peso molecular y en tejidos se pueden encontrar tanto en forma libre como conjugada (amidas). A un pH fisiológico normal se encuentran totalmente protonadas (Morris *et al.*, 1980), adquiriendo así las características de catión orgánico. Estas características son las que les dan la posibilidad de establecer enlaces con otras moléculas, sobretodo enlaces tipo puente de hidrogeno, que facilitan las uniones y escisiones rápidas, ahorrándose así energía (Smith, 1980).

2.2. TIPOS DE POLIAMINAS

2.1.1. Libres

Las principales poliaminas celulares (tabla 2), las poliaminas alifáticas, adoptan una estructura lineal pero flexible, lo que es la base para algunas de sus propiedades.

$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Spm	Espermina
$\text{N}_2\text{H}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Spd	Espermidina
$\text{N}_2\text{H}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$	Cad	Cadaverina
$\text{N}_2\text{H}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$	Put	Putrescina
$\text{N}_2\text{H}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	Dap	Diaminopropano

Tabla 2. Poliaminas libres más comunes (Evans *et al.*, 1989).

2.1.2. Ligadas

Debido a su estructura y sus características, las poliaminas se pueden encontrar unidas a:

– Ácidos fenólicos:

Hay una gran variedad dependiendo de la poliamina y el fenol (tabla 3). Los más importantes son las hidroxicinamidas, que se forman por la unión del grupo amino y el grupo carboxilo de los ácidos hidroxicinámicos. Una de las funciones propuestas para las PAs conjugadas es la de jugar un papel en los mecanismos de defensa contra el estrés biótico y abiótico, principalmente actuando como “scavenger” de radicales (Bors *et al.*, 1989).

Fenol	Poliamina
Hidroxicinamoil	Putrescina
Alkilcinamoil	Putrescina
Cumaroil Agmatina	Agmatina
Cafeoil	Putrescina y Espermidina
Feruoil	Putrescina

Tabla 3. Principales poliaminas conjugadas (Evans *et al.*, 1989).

Las poliaminas conjugadas con los ácidos cinámicos han sido encontradas en muchas familias vegetales, pero en particular en las Solanáceas (Smith *et al.*, 1983). La putrescina principalmente forma monómeros (fracción soluble del TCA) con ácido cumárico, caféico o ferúlico, pero también pueden conjugarse dímeros de estos ácidos hidroxicinámicos (fracción insoluble del TCA).

– Fosfolípidos de membrana:

Se unen a las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana.

– Ácidos nucleicos:

Las asociaciones PAs-AN se encuentran en todas las formas celulares estudiadas. La unión puede ser inespecífica, por simple atracción entre cargas positivas y negativas, o específicas, en este caso se necesitan secuencias o zonas de anclaje específicas en la cadena.

– Ribosomas:

La estructura del ribosoma es dependiente de Mg^{2+} y PAs.

– Pared celular:

Se han encontrado poliaminas en la pared celular (Golberg *et al.*, 1984), se cree que forman enlaces iónicos con las sustancias pépticas (Mariani *et al.*, 1989; D'Oragi *et al.*, 1987) y de puentes de hidrogeno con los polisacáridos neutros de la pared (Scoccianti *et al.*, 1989).

– Proteínas:

Algunas proteínas se unen a PAs mediante enlaces iónicos o covalentes.

2.2. FUNCIONES

Algunos autores han postulado que las poliaminas y los compuestos por ellas formados son un tipo de reguladores del crecimiento o mensajeros secundarios hormonales (Davies, 1987; Galston, 1983; Galston *et al.*, 1987).

Actualmente no se consideran hormonas, son consideradas un nuevo grupo de sustancias reguladoras del crecimiento (Galston, 1983), ya que las fitohormonas tienen un efecto fisiológico o de desarrollo significativo y son activas a relativamente bajas concentraciones, del orden de micromolar, muy lejos de los niveles de milimolar en que se encuentran las poliaminas. Además las fitohormonas son sintetizadas en un lugar y translocadas a otro para su función, aunque también pueden ser activas en su lugar de síntesis, y las poliaminas son ubicuas, están en todas las células (Evans *et al.*, 1989).

Se puede generalizar que en plantas superiores los niveles altos de poliaminas son característicos de tejidos meristemáticos y en crecimiento activo y que cada órgano de la planta presenta un patrón específico, en algunas ocasiones correlacionado con procesos de división celular y en otros de expansión celular (Shen *et al.*, 1985).

Las funciones pueden ser inespecíficas o específicas. Las inespecíficas vienen dadas por su naturaleza catiónica y en ellas pueden ser substituidas y sustituir a cationes inorgánicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+). La ventaja de las poliaminas estriba en su fácil disponibilidad y en su rápida regulación metabólica.

Las funciones específicas lo son en función de sus cargas y su estructura y en ellas ningún otro catión puede substituir las.

2.2.1. Regulación de la división

Numerosos investigadores han correlacionado un aumento en los niveles de poliaminas con la división celular y una caída de estos niveles durante la subsiguiente bajada de actividad metabólica (Heimer *et al.*, 1979; Berlin *et al.* 1981; Walker *et al.*, 1985)

En maíz se han encontrado altos niveles de Spm en los ápices de raíz primaria y en raíces decapitadas mientras se formaban las raíces laterales. También se ha demostrado que la ODC era localizada en primer lugar en zonas meristemáticas (Schwartz *et al.*, 1986).

2.2.2. Efecto antisenescente

Numerosos autores han atribuido un efecto antisenescente a las poliaminas. Una explicación a este efecto antisenescente sería por la disminución de la síntesis de etileno (Apelbaum *et al.*, 1985). Esta disminución de la síntesis de etileno podría venir dada por una competición por el “pool” de SAM, que es un precursor común (Even-Chen *et al.*, 1982), por un efecto de “scavenger” de radicales libres y por una inhibición de la conversión de ACC a etileno (Drolet *et al.*, 1986).

Otra razón por la cual las poliaminas tienen un efecto antisenescente es porque pueden estabilizar membranas (Altman *et al.*, 1977; Grimes *et al.*, 1986). La pérdida de la estabilidad de la membrana se inicia durante los primeros momentos de la senescencia y si esto se puede prevenir el proceso se puede ralentizar (Tiburcio *et al.*, 1994).

La unión de las poliaminas a las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana los protegen frente a los procesos de peroxidación lipídica. Pero no solo se pueden unir a los fosfolípidos sino también a los residuos de cargas negativas de las proteínas ligadas a la membrana (Schuber, 1989).

Se ha propuesto que la interacción de la Spm con las membranas de los tilacoides producía un efecto estabilizador durante la senescencia (Popovic *et al.*, 1979). En *Avena sativa* L., por medio de anticuerpos específicos y estudios ultraestructurales, se encontró que la Spm

estabilizaba la composición molecular y preservaba la integridad de las membranas de los tilacoides (Tiburcio *et al.*, 1994). El Ca^{2+} puede hacer en parte esta función, ya que puede actuar como ligando bivalente (Thompson, 1988). Esta sería una función inespecífica y competitiva con las poliaminas (Cheng *et al.*, 1984).

2.2.3. Mensajero secundario hormonal

Trabajos realizados con aplicaciones exógenas de giberelinas, daban un aumento de la actividad ADC y una acumulación de Put y Spd (Dai *et al.*, 1982). Estos aumentos se producían 6 horas después del tratamiento con giberelinas y antes de que comenzase el efecto de éstas.

Similares efectos se han obtenido con tratamientos exógenos de auxinas. Después del tratamiento y antes de cualquier efecto se incrementaban los niveles de Spm, Spd y Put (Jarvis *et al.*, 1983).

2.2.4. Estabilización de ácidos nucleicos

Hace muchos años que se viene investigando las interacciones DNA-poliaminas (Tabor *et al.*, 1972; 1976; 1984; Bacharach, 1973) y se ha encontrado que las poliaminas asociadas a DNA promueven la integridad de muchas de sus funciones biológicas y lo protegen de algunas condiciones adversas.

Debido a sus características, las poliaminas pueden interaccionar de manera específica, inespecífica o en una combinación de las dos formas.

Para un correcto funcionamiento y conservación del DNA, la mayoría de cargas de los grupos fosfato del DNA tienen que estar neutralizadas por cationes (Bloomfield *et al.*, 1981). Esta función la podría cumplir, en exclusiva, un catión inorgánico como el Mg^{2+} , pero se han

encontrado grandes cantidades de Spm en la cromatina (Liquori *et al.*, 1967).

Minimizando la energía de modelos moleculares se evaluaron las interacciones de la espermina con la forma B del DNA (Feuerstein *et al.*, 1990), tanto con secuencias de homopolímeros como alternando bases púricas y pirimidínicas. Se encontraron cuatro posiciones diferentes posibles:

-Uniendo las dos cadenas por el surco menor (Fig.11), modelo ya propuesto por Liquori *et al.*, 1967.

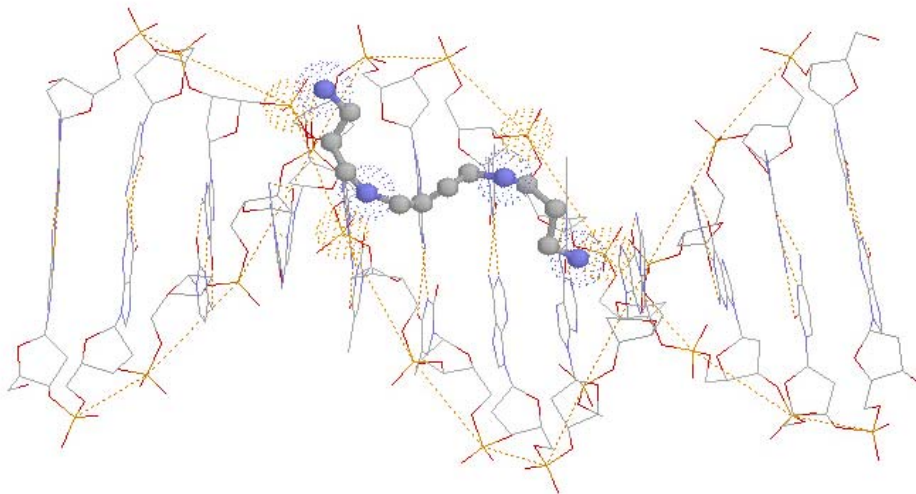


Fig. 11. Interacción espermina-DNA (adaptado del modelo propuesto por Liquori *et al.*, 1967 y Tsuboi, 1964).

-Dentro del surco mayor (Fig. 12). La interacción en el surco mayor alternando bases púricas y pirimidínicas, parece ser el más favorable de todos los modelos estudiados, y esta asociado a un significativo doblamiento del DNA. La interacción con una secuencia de

homopolímeros es menos favorable que con heteropolímeros y muestra ningún o poco doblamiento del DNA

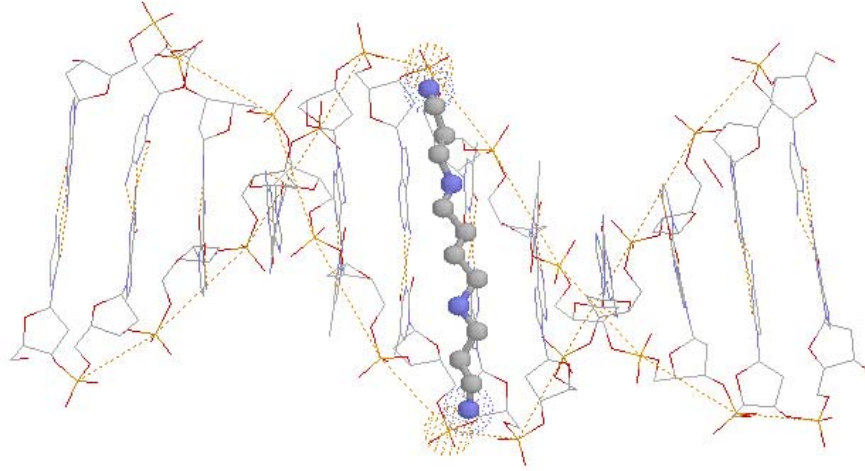


Fig. 12. Interacción DNA-espermina dentro del surco mayor.

-Dentro del surco menor

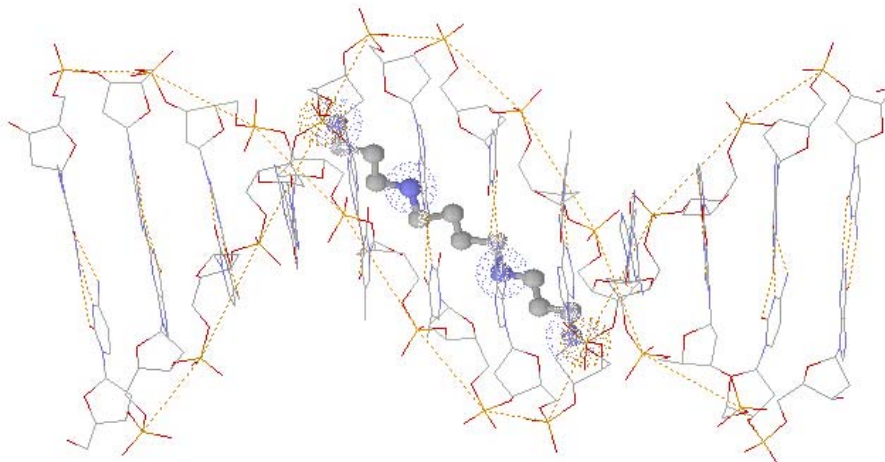


Fig. 13. Interacción DNA-espermina dentro del surco menor

-Asociación a lo largo de la cadena de fosfatos (Fig. 14). Es la menos favorable de todas las interacciones

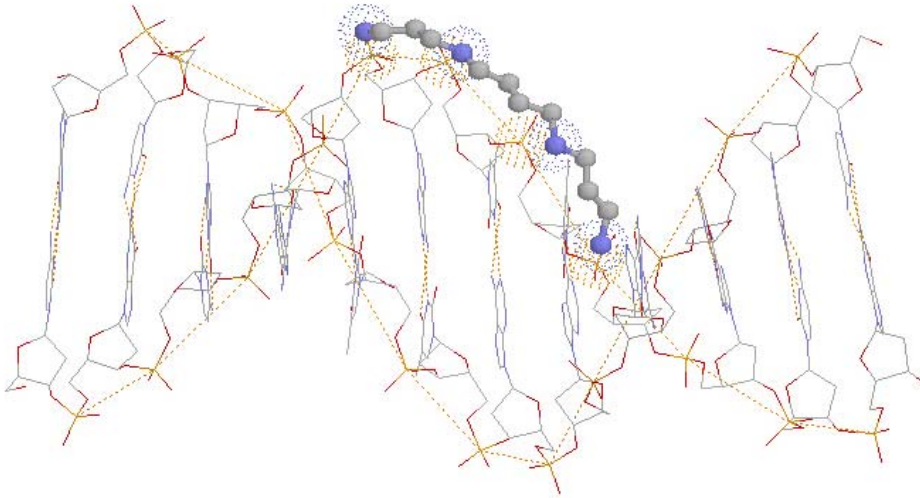


Fig. 14. Asociación a lo largo de la cadena de fosfatos

La razón es que además de neutralizar las cargas de los grupos fosfato, la Spm (y también en menor cantidad la Spd), se unen a secuencias o zonas de anclaje establecidas y contribuyen a la compactación de la cromatina, estabilizan la molécula y la protegen de las nucleasas, al tiempo que facilitan la duplicación y la transcripción (Feurstein *et al.*, 1989).

Las poliaminas también parecen las encargadas de estabilizar el RNAt por medio de uniones a lugares específicos (Sakai *et al.*, 1975). Análisis por difracción de rayos-X confirman que Spm y Mg^{2+} tienen lugares de unión específicos.

2.2.5. Uniones a proteínas

La interacción de las PAs con diferentes enzimas como son la topoisomerasa, RNAsa, proteasa y quinasa entre otras, ha estado

demostrada y se estudian los posibles efectos en la actividad enzimática.

Las poliaminas ejercen una acción estabilizadora y/o moduladora de algunas proteínas (Fig. 15) mediante interacciones iónicas y fosforilaciones.

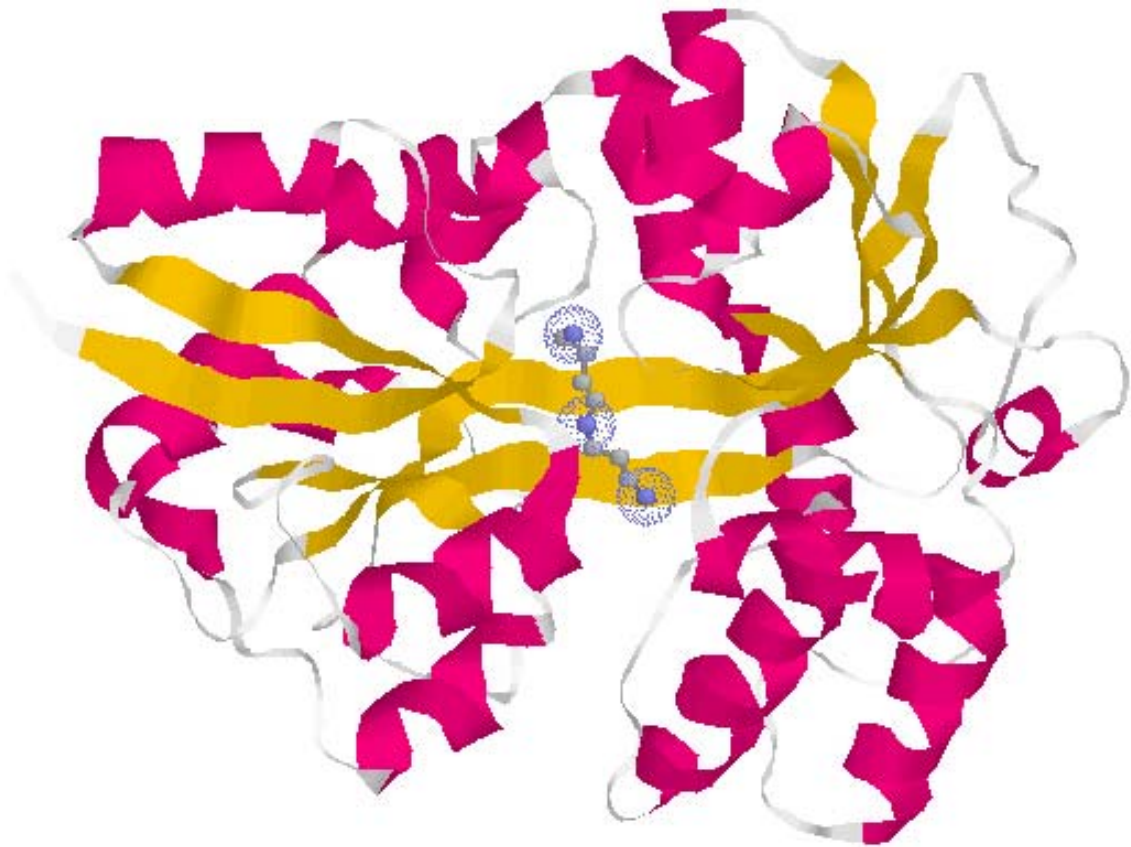


Fig. 15. Modulación de proteína por medio de espermidina

También algunas proteínas presentan regulación mediante enlaces de tipo covalente (Slocum *et al.*, 1984; Galston *et al.*, 1990). Esta unión covalente esta mediada por las transglutaminasas.

-Transglutaminasas

Las transglutaminasas catalizan uniones amidas entre un grupo amino primario de una PA o una lisina (amino donador) y un grupo γ -carboxiamida de un residuo glutamil de algunas proteínas (amino

aceptor). La presencia de transglutaminasas en vegetales se ha demostrado por reacciones con anticuerpos (Del Duca *et al.*, 1994; Bregoli *et al.*, 1994) y por la capacidad de reconocer el dipéptido sintético (Z-L-glutamil-L-leucina), un substrato específico de la TGasa animal (Serafini-Fracassini *et al.*, 1992).

2.2.6. Efecto antiestrés

En general la respuesta de la planta frente a diferentes tipos de estrés es un aumento en los niveles de poliaminas. Así, encontramos que después de inducir estrés osmótico a diferentes cereales (entre ellos *Zea mays*) se producía un rápido aumento de la actividad ADC y una acumulación de Put. Esta respuesta era muy rápida, ya que se daba solo 1-2 horas después del tratamiento (Flores *et al.*, 1982; 1984).

Resultados similares se encontraron en secciones de hoja de *Hordeum vulgare*, a los que se inducía estrés osmótico, y en los cuales se encontraba un pico máximo de Put después de 4 horas, mientras que la acumulación de prolina se detectaba entre 4 y 24 horas después del tratamiento (Turner *et al.*, 1988).

Si lo que se induce es estrés ácido, encontramos que entre 8-9 horas después del tratamiento, los niveles de Put son 8 veces más grandes a pH 3.5 que a pH 6.0, sin que se vea afectado el nivel de ninguna otra poliamina (Young *et al.*, 1983).

Hay pocos estudios que midan los cambios en los niveles de poliaminas como respuesta al estrés por metales pesados (Gavalda, 1994; Encuentra, 1995).

Un estudio muy completo (Wettlaufer *et al.*, 1991) medía los cambios en los niveles de poliaminas en *Avena sativa* L. Después de 20 tratamientos diferentes con 20 sales de metales pesados.

Los resultados indicaban que la respuesta de las poliaminas al estrés por metales pesados no es en general una, pero que es específica para algunos metales. Normalmente se encontraban aumentos pero muy menores de los que se encontraban cuando estaban sometidos a otro tipo de estrés. Específicamente un tratamiento del metal $AlCl_3$ 0.1 mM en forma de sal 16h daba aumentos de Put del 33%, de Spd del 13% y de Spm del 56%. Estos aumentos no son muy elevados si los comparamos con los del estrés osmótico, o del estrés ácido de hasta el 800 %.

2.3. METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS

2.3.1. Biosíntesis de la Put

En plantas, el metabolismo de las poliaminas se ha estudiado principalmente en plantas superiores, mientras que en plantas inferiores existe poca información.

En plantas superiores, la Put se puede formar por descarboxilación de la Orn directamente vía ODC o por descarboxilación de las Arg, vía ADC (Fig. 15), pasando por dos intermediarios (Galston, 1983; Slocum *et al.*, 1984; Hiatt, 1989).

-Ornitina descarboxilasa

Hay pocos estudios significativos sobre ODC en plantas. Se ha encontrado en cloroplastos y mitocondrias (Torrighiani *et al.*, 1986), en el citosol y también en el núcleo (Kyriakidis, 1983). En plántulas de cebada se encontró que el 75% de la actividad ODC se

encontraba asociada a la cromatina y el 25% restante a la actividad procedente del citosol.

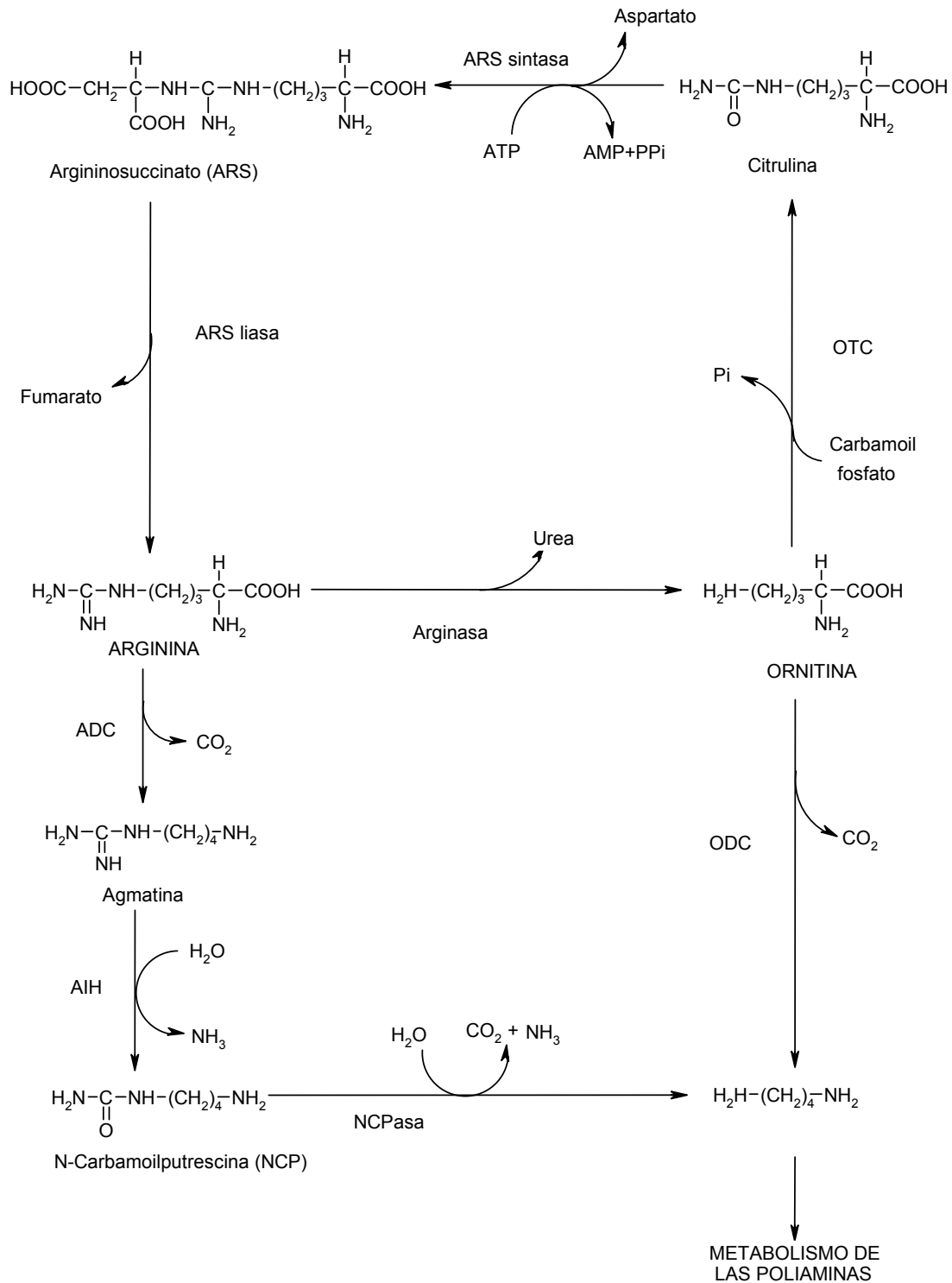


Fig. 15. Vías alternativas para la síntesis de putrescina. Interconversión de arginina y ornitina (Tiburcio *et al.*, 1990).

-Arginina descarboxilasa

Se ha logrado purificar hasta la homogeneidad en distintos vegetales superiores (Ramakrishna *et al.*, 1975; Smith, 1979; Chauduri *et al.*, 1982; Adiga *et al.*, 1985), encontrándose diferencias entre las ADCs encontradas en las distintas especies vegetales. La ADC se ha encontrado en mitocondrias y cloroplastos (Torrighiani *et al.*, 1986) y en el citosol (Adiga *et al.*, 1985), y su actividad puede ser modulada o inhibida por distintas aminos (Agm, Spm, Spd, Put).

Se ha logrado clonar el gen que codifica para la ADC de avena (Bell *et al.*, 1990). El enzima sintetizado esta formado por dos subunidades de 42 y 24KDa unidos por puentes disulfuro para formar la ADC de 66KDa (Malmberg *et al.*, 1992).

La descarboxilación de la Arg por la ADC (Smith, 1975) produce Agm, (que también es una poliamina), que mediante la acción del enzima agmatina iminohidrolasa (Smith, 1969; Chaudhuri *et al.*, 1985) es hidrolizada para formar N-carbamoilputrescina (NCP). La NCP se metaboliza a Put desprendiéndose CO₂ y NH₃ (Slocum *et al.*, 1984) mediante la acción del enzima NCP-aminohidrolasa (NCPasa) (Smith, 1965; Yanagisawa *et al.*, 1982).

La contribución relativa de las 2 vías ADC y/o ODC para la síntesis de Put en plantas superiores ha sido objeto de controversia. Las pruebas en las que se suministraba Arg u Orn marcadas no son suficientes para dar una respuesta definitiva de la contribución de estos dos enzimas (Montagne *et al.*, 1978; Villanueva *et al.*, 1980), ya que estos dos aminoácidos pueden interconvertirse en el ciclo de la Orn. Tampoco está

clara una correlación entre la actividad de cada uno de los enzimas y un determinado proceso de desarrollo.

Estudios recientes proponen que la síntesis de Put no se realiza siguiendo la misma vía en tejidos fotosintéticos y tejidos no fotosintéticos. En tejidos no fotosintéticos, como la raíz, la Put podría formarse solo por vía Orn. En tejidos fotosintéticos, con cloroplastos, se podría formar por las dos vías, o solo vía Arg. En células animales y hongos, la Put se sintetiza solo vía Orn, esto reforzaría la teoría endosimbiótica de los cloroplastos, que entrando a formar parte de las células vegetales aportarían la síntesis de Put por la vía ADC.

2.3.2. Biosíntesis de Cad

Hay muy pocos estudios de la síntesis de Cad. En bacterias la Cad procede directamente del aminoácido lisina, vía lisina descarboxilasa. En plantas de guisante, al igual que en *N. Glauca*, también se ha encontrado que la Cad se sintetiza por la descarboxilación de la lisina (Fig. 16).

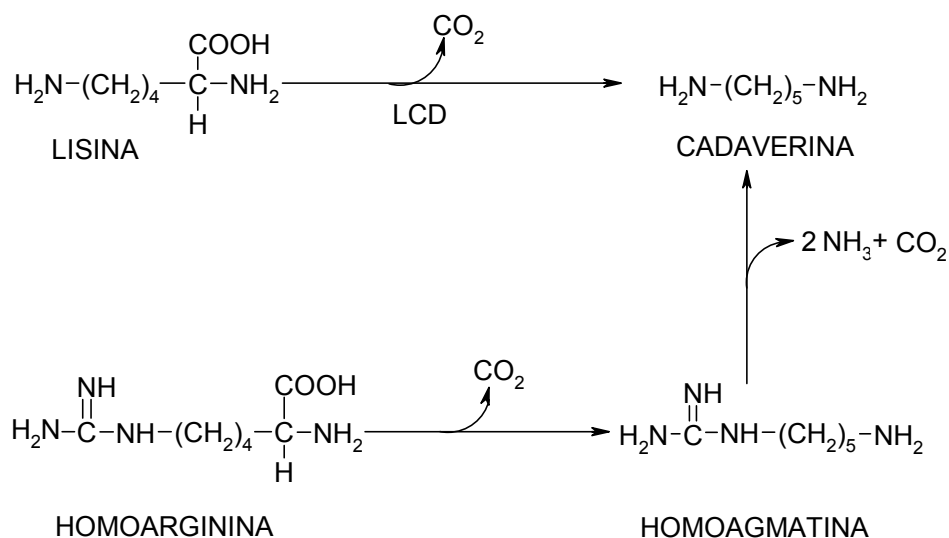


Fig. 16. Biosíntesis de cadaverina (Figueres, 1991)

Por el contrario en *Lathyrus sativus* hay evidencias de la participación de una homoarginasa-lisina descarboxilasa que actúa en la síntesis de la Cad. De esta manera existiría un único enzima responsable de la descarboxilación tanto de la homoarginina como de la lisina (Figueras, 1991).

2.3.3. Biosíntesis de Spd y Spm

Para que la Put se convierta en Spd, se necesita la adición de un grupo propilamino que procede del aminoácido Met (Fig. 17).

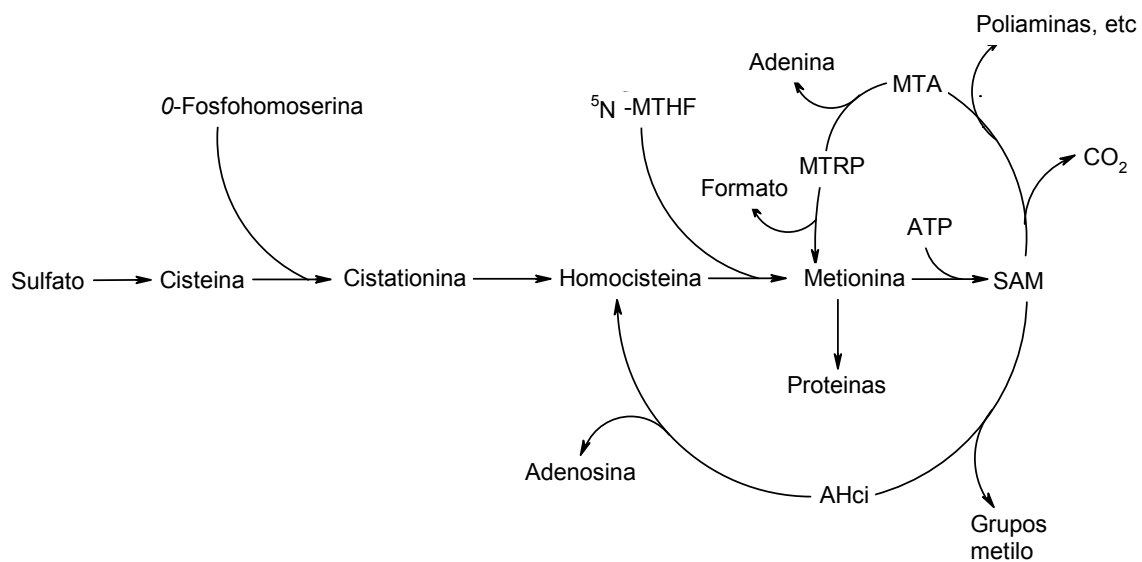
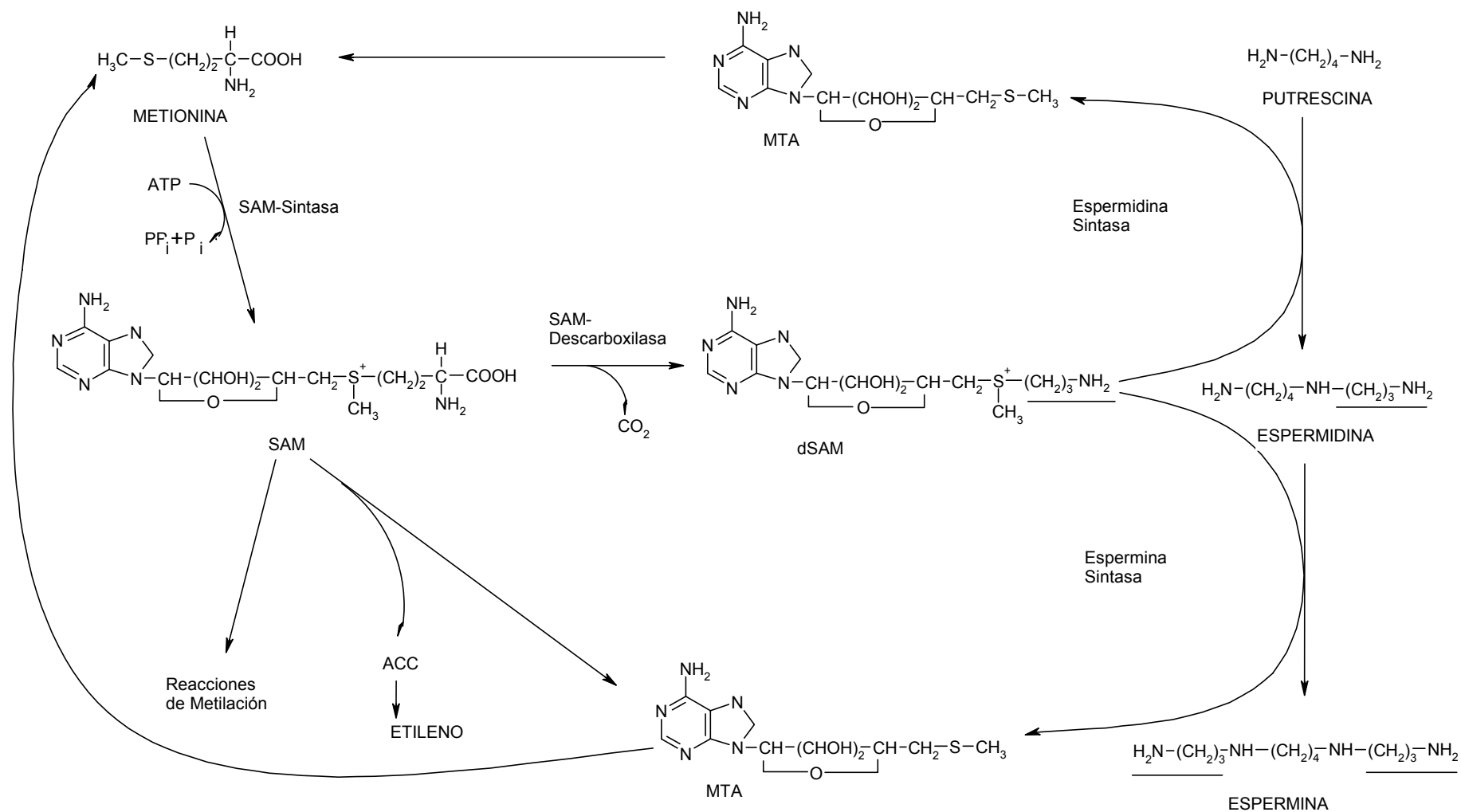


Fig. 17. Principales rutas metabólicas de la metionina

Para la biosíntesis de Spd y Spm (Fig. 18) la metionina es primero convertida en S-adenosilmetionina (SAM) y después descarboxilada, en reacciones catalizadas por la SAM-sintasa y la SAM-d Descarboxilasa. La SAM descarboxilada (dSAM) obtenida, será la donante de los grupos propilamino necesarios para la síntesis de Spd y Spm. No se conoce ninguna otra reacción donde la SAM descarboxilada pueda actuar (Pegg *et al.*, 1982).

Fig. 18. Biosíntesis de espermina y espermidina (Tiburcio *et al.*, 1990)

Como su producción está regulada y sus niveles se mantienen bajos, constituye el factor limitante en la síntesis de Spd y Spm (Pegg *et al.*, 1982; Greenberg *et al.*, 1985). La transferencia del grupo propilamino de la dSAM a Put en la formación de la Spd, está catalizada por el enzima Spd-sintasa. La transferencia de otro grupo propilamino, que también procede de la dSAM a la Spd para formar Spm, se realiza mediante otra aminopropilsintasa, la Spm-sintasa.

2.3.4. Absorción y Translocación

Desde que las poliaminas son consideradas reguladores del crecimiento en plantas, es importante conocer si son translocadas y los mecanismos (Rabiti *et al.*, 1989; Caffaro *et al.*, 1993).

El transporte a corta distancia (absorción) de las poliaminas en células vegetales se ha demostrado en pétalos de *Saintpaulia* (Bagni *et al.*, 1985; Pistocchi *et al.*, 1986), cultivos celulares de zanahoria (Pistocchi *et al.*, 1987), vacuolas y protoplastos aislados de zanahoria (Pistocchi *et al.*, 1988) y mitocondrias de *Heliantus tuberosus* (Pistocchi *et al.*, 1990).

El transporte a larga distancia (translocación) de las poliaminas ha sido probado en estudios de translocación de Put en manzano (Bagni *et al.*, 1984) y de translocación de Cad en *Nicotiana glauca* (Bagni *et al.*, 1986). De hecho solo las poliaminas libres son translocadas (Antognoni *et al.*, 1998). Además hay pruebas indirectas de la translocación de poliaminas como son la existencia de altas concentraciones de poliaminas en exudados del xilema y la existencia de poliaminas en el floema (Friedman *et al.*, 1986).

2.3.5. Degradación

Recientemente se ha establecido que al menos para los vertebrados la N¹-acetilación de las poliaminas es el primer paso en la transformación degradativa de una poliamina en otra (Gillyon *et al.*, 1987). Se ha hipotetizado que esta interconversión podría regular el metabolismo intracelular de las poliaminas en distinto material vegetal, como en raíces de maíz (De Agazio *et al.*, 1995). Este proceso involucra la acción de diferentes enzimas (Fig. 19).

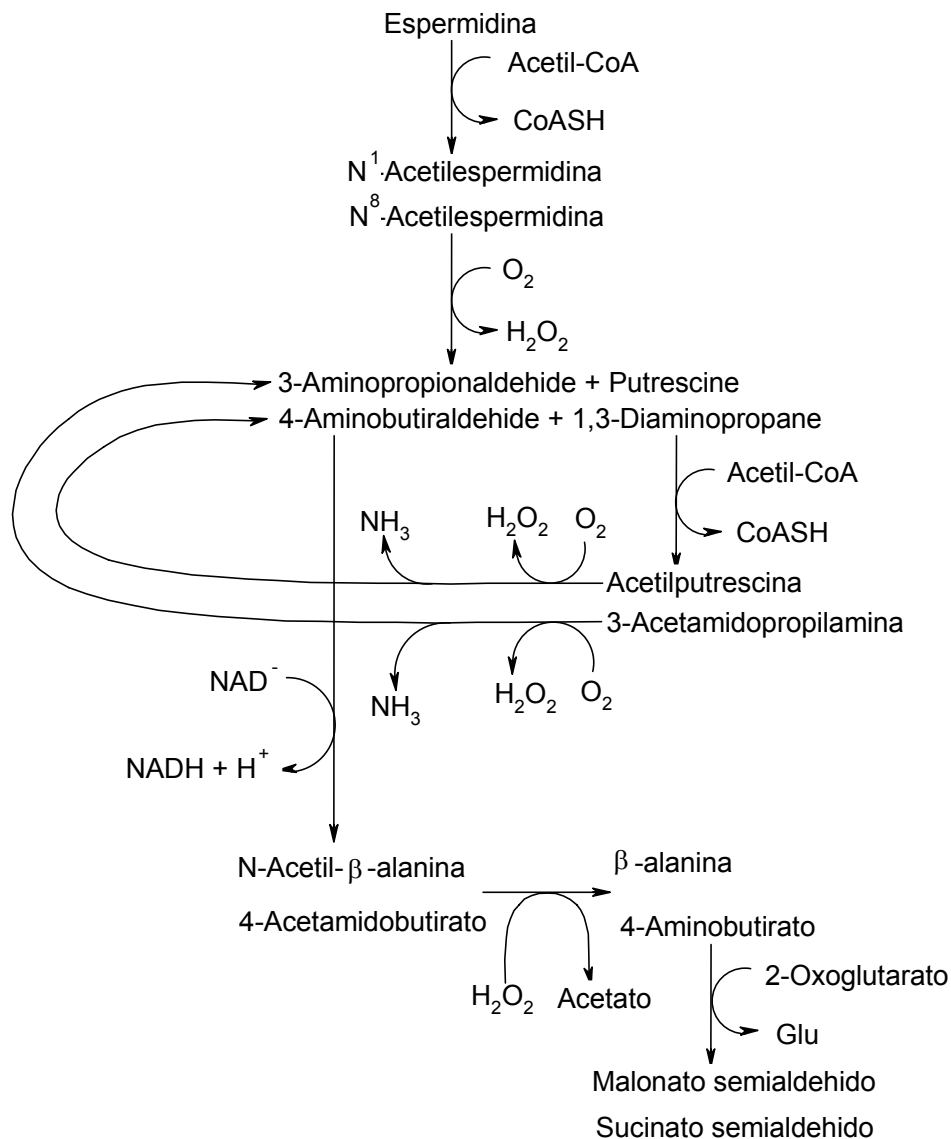


Fig. 19 Acetilación de Espermidina y Putrescina (Bagni *et al.*, 2001)

Además del paso de espermidina a putrescina a través de un proceso de acetilación, la otra vía catabólica que se conocen para las PAs en las plantas, es su oxidación (Fig. 19), acompañada de la formación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

La Put puede ser oxidada para formar pirrolina en una reacción catalizada por la diamino oxidasa (DAO).

La Spd puede oxidarse formándose 1,3-diaminopropano (Dap) y pirrolina. La Spm también puede oxidarse formándose Dap y 1-(3-aminopropil)-pirrolina. La oxidación de Spd y Spm esta catalizada por el enzima poliamino oxidasa (PAO).

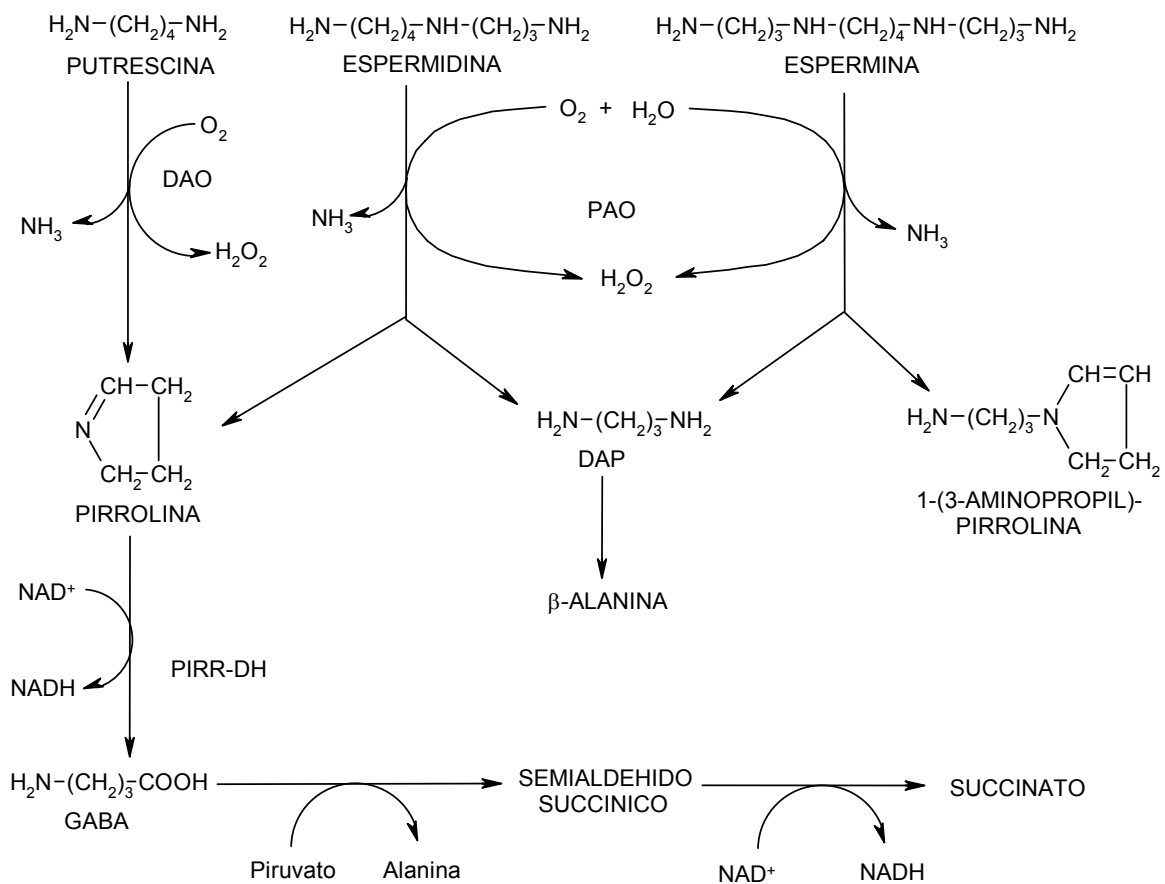


Fig. 19. Degradación de las poliaminas (Tiburcio *et al.*, 1990)

El Dap puede convertirse en β -Ala, mientras que la pirrolina puede ser metabolizada dando ácido γ -aminobutírico (GABA), en una reacción catalizada por la pirrolina deshidrogenasa (PYRR-DH) (Flores *et al.*, 1985b). El GABA, posteriormente es transaminado y oxidado a ácido succínico, que se incorpora al ciclo de Krebs. Esta vía asegura por tanto la reutilización del carbono y del nitrógeno a partir de Put y Spd (Flores *et al.*, 1985a).

II.-OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El maíz es uno de los cereales más importantes, ya que representa aproximadamente el 25 % de la producción mundial.

Como es conocido, la raíz (y el ápice radicular en particular), es el órgano que más se ve afectado en caso de toxicidad por aluminio.

Ya que a las poliaminas se les atribuye una función estabilizadora y antisenescente, se analizan los niveles de poliaminas en cinco variedades de *Zea mays* que han estado previamente seleccionadas por su diferente grado de tolerancia al Al, intentando así encontrar un indicador rápido de genotipos tolerantes.

El objetivo principal es el de encontrar como responden las PAs al tratamiento de nuestras variedades con pH ácido y con aluminio, y si los niveles de PAs preexistentes de los controles nos pueden ayudar a relacionarlas con la tolerancia o sensibilidad.

No menos importante es el estudio de las interacciones fisiológicas y bioquímicas entre aluminio y poliaminas dado que algunos lugares de acción de ambos son comunes.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESQUEMA DEL TRABAJO

En la primera experiencia determinamos las PAs de cada variedad. En primer lugar PAs libres y PAs conjugadas del sobrenadante. Antes de encontrar las PAs ligadas del precipitado, sometemos a este a un lavado con TCA para estar seguros de ninguna PA soluble haya quedado atrapada en el precipitado y volvemos a determinar PAs libres y conjugadas en el sobrenadante de este “2º lavado”. Con el precipitado determinamos las PAs ligadas (tras una hidrólisis ácida) y las proteínas.

En un segundo paso determinábamos DNA y tras una hidrólisis enzimática de este DNA, determinábamos PAs unidas a DNA.

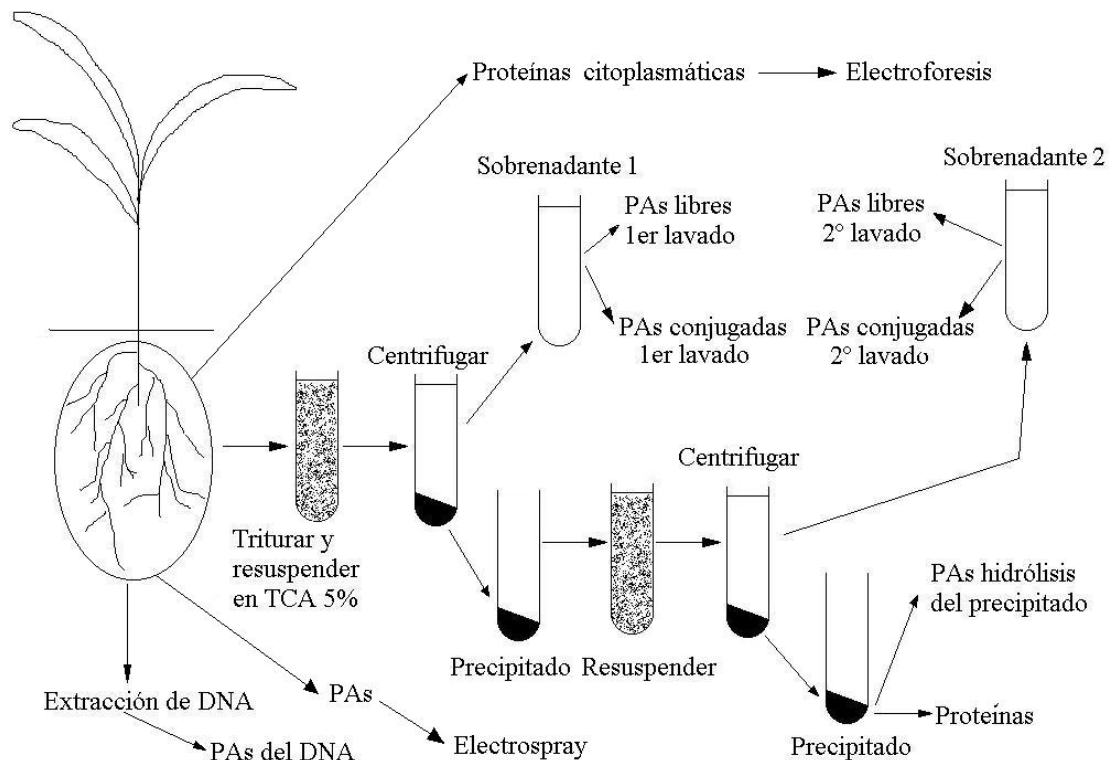


Fig. 20. Esquema general de las experiencias realizadas.

Con patrones y bandas aparecidas durante la separación de PAs dansiladas, por cromatografía de capa fina, realizábamos una tercera

experiencia que nos permitiera conocer el peso molecular de cualquier molécula dansilada.

Por último extraíamos proteínas citoplasmáticas solubles y tras determinar la concentración, apartábamos una alícuota para realizar una electroforesis de proteínas SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal seleccionado para este trabajo es maíz (*Zea mays* L.), una planta monocotiledónea de la familia de las gramíneas, monoica de flores unisexuales, que forman una inflorescencia terminal llamada panícula.

No se sabe con certeza los antepasados que la han originado. La hipótesis que parece más verosímil es la que lo hace descendiente de un antecesor desconocido con 10 pares de cromosomas que al hibridarse con alguna planta del género *Tripsacum*, habría originado el género *Euchlaena*, el más afín actualmente al maíz, el cual al hibridarse posteriormente con este antecesor desconocido, habría dado origen a las variedades más recientes de maíz. El origen de este antecesor y la relación que tienen con el maíz actual todavía se desconoce.

En este trabajo se han utilizado 5 variedades de *Zea mays*:

ADOUR250: Híbrido doble, sensible a pH ácido pero tolerante al aluminio. Variedad comercial de ciclo 200, precoz. Se utiliza en el norte de España y es resistente al vuelco mecánico y a las plagas del carbón y *Fusarium*. Las semillas fueron suministradas por Fitó S. A. Barcelona.

HS7777: Híbrido simple. Variedad sensible a pH ácido y al

aluminio. Semillas suministradas por el Dr. Rouanet del IRAT-CIRAD, Montpellier (Francia).

HS701B: Variedad sensible a pH ácido y al aluminio. Semillas suministradas por el Dr. Rouanet del IRAT-CIRAD, Montpellier (Francia).

BR201F: Variedad tolerante a pH ácido pero sensible al aluminio. Híbrido simple, desarrollado por el Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo ENBRAPA de Brasil para la adaptación a suelos ácidos. Semillas proporcionadas por el Dr. Rouanet del IRAT-CIRAD, Montpellier (Francia)

BR201M: Variedad tolerante a pH ácidos y al aluminio. Híbrido simple, desarrollado por el Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo ENBRAPA de Brasil para la adaptación a suelos ácidos. Semillas proporcionadas por el Dr. Rouanet del IRAT-CIRAD, Montpellier (Francia)

3. CONDICIONES DE CULTIVO

3.1. CÁMARA DE CULTIVO

Las condiciones de la cámara de cultivo en las que se realizaron los experimentos fueron:

Intensidad de la luz	330 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$
Fotoperíodo	16 h luz/ 8 h oscuridad
Humedad relativa	70% día/ 85% noche
Temperatura	26°C día/ 20°C noche

3.2. CULTIVO DE LAS SEMILLAS

Las semillas se colocan en la parte superior de dos papeles de filtro. Estos a su vez se colocan entre dos espumas (Fig. 21). Cada 4 espumas se empaquetan entre 2 plásticos rígidos con cinta adhesiva. Tanto el papel de filtro como las espumas fueron previamente humedecidos con CaSO_4 1.5 μM .

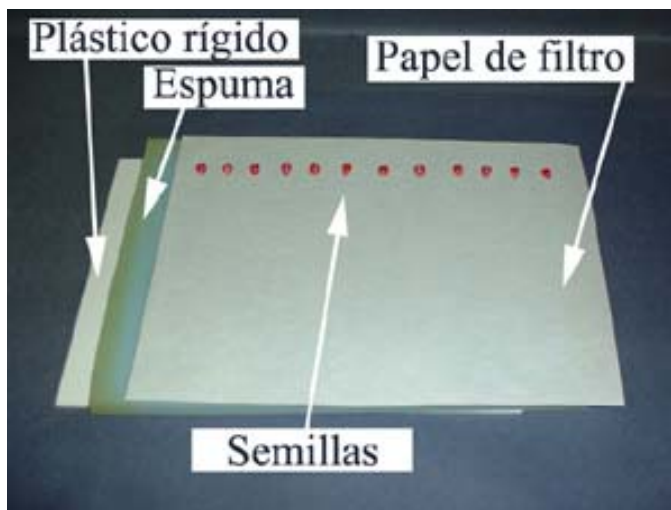


Fig. 21. Siembra por el método del sándwich

Cada paquete o sándwich se pone en una cubeta con CaSO_4 1.5 μM en la parte inferior y se cubre el conjunto con plástico transparente para conservar la humedad (Fig. 22).



Fig. 22. Cubeta con “sándwiches” listos para germinar

En estas condiciones se deja 4 días en la cámara de cultivo hasta transplantar las plántulas a cultivo hidropónico (Fig. 23 y 24).

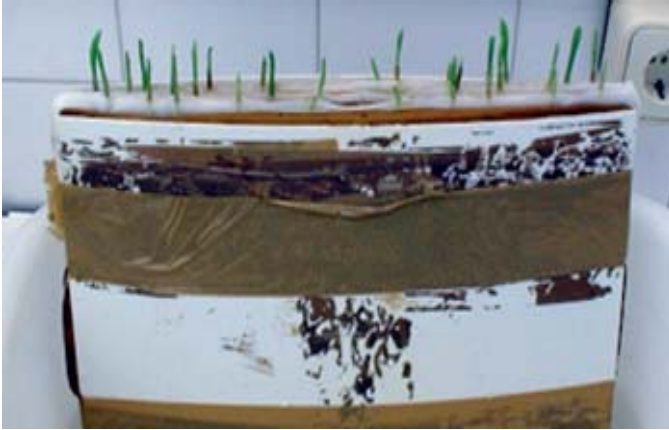


Fig. 23 y 24. Plántulas de 4 días de edad listas para pasar a hidropónico

3.3. SOLUCIÓN NUTRITIVA

Los cultivos eran hidropónicos, en cubetas de 15 litros, con aireación continua. Las plántulas, hasta 25 por cubeta, se pusieron en un soporte de porexpan con la parte radicular sumergida en la solución nutritiva CEE II (Tabla 4).

Hay 3 tratamientos distintos, 1 de control, a pH 6.0, uno con tratamiento de pH ácido (pH 4.3) y uno con tratamiento de aluminio a 50 μM , con el pH también ajustado a 4.3.

Solución nutritiva CEE II

COMPUESTO	[FINAL]	[SOL. MADRE]	mL/L
CaSO ₄ ·2H ₂ O	200 μM	10 mM	20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100 μM	0.1 mM	1
KNO ₃	400 μM	0.5 M	0.8
MmSO ₄	15 μM	10 mM	1.5
ZnSO ₄	0.38 μM	1 mM	0.4
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16 μM	1 mM	0.16
Fe-EDTA	10 μM	20 mM	0.5
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 μM	10 mM	0.5
NH ₄ NO ₃	300 μM	0.5 M	0.6
H ₃ BO ₃	16 μM	10 mM	1.6
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.06 μM	10 mM	0.6
AlCl ₃	50 μM	0.1 mM	20

Tabla 4 Solución nutritiva CEE II

3.4. MUESTREO

Antes de aplicar el tratamiento se dejan un día en cultivo hidropónico para que el efecto del estrés provocado por el trasplante no se sume al provocado por el tratamiento.

Pasadas 24 horas se aplica a una cubeta de pH 4.3 la cantidad de aluminio correspondiente para tener una concentración de 50μM. Una vez aplicado el aluminio hay que tener cuidado de mantener el pH de cada cubeta mientras dura el tratamiento, que es de 24 horas.

Todas las experiencias se hicieron analizando la raíz, ya que es la parte de la planta que se cree más afectada. Las raíces son medidas 3 veces

mientras dura la experiencia: la primera cuando se pasa a cultivo hidropónico, la segunda antes del tratamiento y la tercera cuando se hace la recogida 24 horas después. También se cogen muestras de la solución nutritiva justo después de incorporar el aluminio y una vez finalizado el tratamiento.

Una vez medidas, las raíces se pesan, se etiquetan, se empaquetan individualmente y se congelan con nitrógeno líquido y se guardan en el congelador de -80°C para usarlas en las posteriores determinaciones. Mientras sea posible por la disponibilidad y germinación de las semillas, las experiencias se realizan por triplicado.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. PESO FRESCO

Una vez finalizado el tratamiento se corta cada raíz y se seca con papel de filtro para eliminar la solución nutritiva que pueda quedar y se pesa con una balanza analítica lo más rápido posible.

4.2. PESO SECO

Las muestras que servirán para la determinación del peso seco se envuelven con papel después de anotar su peso fresco y se ponen en la estufa de 60°C hasta que estén totalmente deshidratadas y por lo tanto tengan un peso estable.

4.3. DETERMINACIÓN DE DNA

La extracción de DNA se efectuó mediante el kit “nucleon phytopure for large samples, 1.0 g” de extracción de DNA de plantas de Nucleon Biosciences (Scotlab Ltd.) (Amersham). Resuspendiéndose el

DNA precipitado y centrifugado en buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, a pH 8.0).

La concentración de DNA se calcula midiendo la absorbancia a 260 nm. A esta longitud de onda el coeficiente de absorción del DNA es de $20 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Berger, 1987). Además, se realizaba un espectro en la región de longitud de onda comprendida entre 220-350 nm. A continuación se muestra un espectro típico de DNA obtenido en este trabajo (Fig. 25).

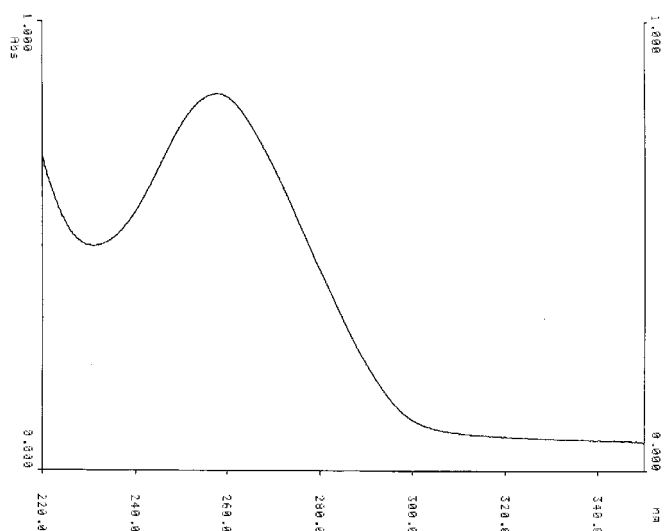


Fig. 25. Espectro entre 220-350 nm de una solución de DNA

El espectro permitía tener información de la pureza del DNA con el que estábamos trabajando, puesto que a 230 nm absorben el enlace peptídico y los anillos aromáticos (presentes en el fenol y en algunos aminoácidos) y a 280 nm absorben las proteínas, el RNA y el fenol (Gallager, 1994). Esto permitía establecer unas relaciones que darían un grado de pureza aceptable para una muestra de DNA.

$$\frac{A_{260\text{nm}}}{A_{230\text{nm}}} = 2.4 - 2.5$$

Valores inferiores indican la presencia de proteínas o fenol en medio.

$$\frac{A_{260\text{nm}}}{A_{280\text{nm}}} = 1.8 - 1.9$$

Valores inferiores o superiores denotan la presencia de RNA, fenol o proteínas en el medio.

Además, la medida de absorbancia a 320 nm es útil para determinar la presencia de agregados o partículas que dispersen la luz (Gallager, 1994). Para contrarrestar los efectos de este tipo de contaminaciones, al valor de la absorbancia obtenida a 260 nm se le restaba el obtenido a 320 nm (Gallego, 1994).

4.4. POLIAMINAS

El método utilizado se basa en la dansilación de los grupos amino en condiciones básicas (Smith et al., 1975) y su posterior separación mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC). Este método ha estado ligeramente modificado para conseguir mejores resultados (Dinella et al., 1992).

4.4.1. Preparación de los extractos

Para preparar los extractos (Fig. 26), se coge del control o de cada tratamiento la suficiente cantidad como para tener 1 gramo de muestra fresca. Esta muestra se coloca en un mortero de porcelana precongelado con nitrógeno líquido. Sin dejar descongelar se tritura la muestra con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino.

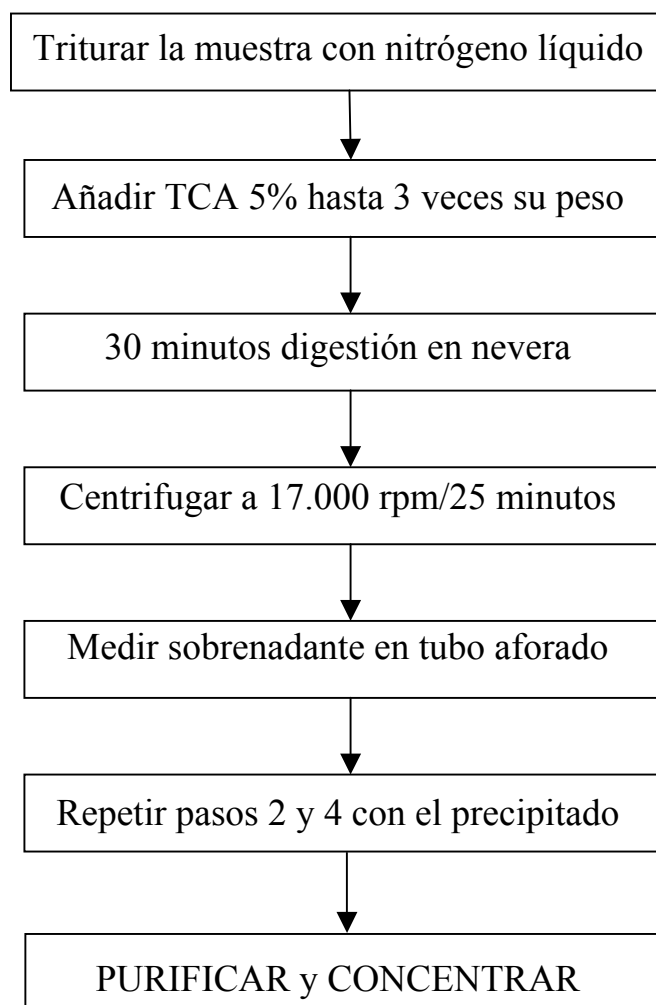


Fig. 26. Esquema de la extracción de PAs

Al triturado se le aplica TCA al 5% en un volumen de tres veces su peso fresco. Se continua triturando mientras se deja macerar media hora. Una vez transcurrido este tiempo se pasa a tubos de centrífuga y se centrifuga (Beckman J2-21) a 17.000 r.p.m. durante 25 minutos a 4°C.

Después de centrifugar se mide el sobrenadante pasándolo a un tubo aforado. Con esta muestra se medirán los niveles de poliaminas libres solubles y de poliaminas conjugadas solubles.

El precipitado se resuspende con TCA 5% hasta alcanzar el mismo volumen que tenia el sobrenadante, para posteriormente volver a centrifugar y tener un segundo sobrenadante. Con este procedimiento nos

aseguramos que no quedan poliaminas solubles atrapadas en el precipitado. Con esta fracción volvemos a analizar poliaminas solubles libres y poliaminas solubles conjugadas que se sumarán a los valores obtenidos en el primer sobrenadante para dar los totales.

El precipitado se resuspende con SSC hasta un volumen igual al que había de sobrenadante, y se guarda a -20°C . De esta muestra se analizarán los niveles de poliaminas ligadas (previa hidrólisis ácida).

4.4.2. Concentración y purificación de las PAs libres

Desgraciadamente los niveles de algunas poliaminas en estas variedades de *Zea mays* son demasiado bajos como para que se puedan leer directamente, por lo que es necesaria una concentración de la muestra que a la vez no concentre también las impurezas (Fig. 27).

El extracto con PAs libres (2mL o más) se pipetea dentro de una jeringuilla a la que se le ha puesto un seppack terminal del tipo cationes fuertes (Maxi-Clean SCX, 600mg de Alltech). Para el lavado y la elución de las poliaminas se modificó el método de Makita *et al.*, 1978. El seppack es lavado con 5 mL de buffer de fosfato sódico 0.1 M (pH 8.0) que contenía NaCl 0.1 M, y luego con 5 mL de HCl 1 M. Las poliaminas se eluyen con 5 mL de HCl 6M. Estos 5 mL se colocan en un recipiente del liofilizador junto con 5 mL de agua destilada. Se congela el extracto sumergiéndolo en nitrógeno líquido y se conecta al liofilizador. Una vez liofilizado el extracto durante toda la noche, se resuspende con la mínima cantidad de HCl 0.1 M (1 mL).

El seppack teóricamente puede retener hasta 600mg de muestra, por lo que puede también servir de método de concentración si se carga con cantidades altas de muestra que contenga poliaminas.

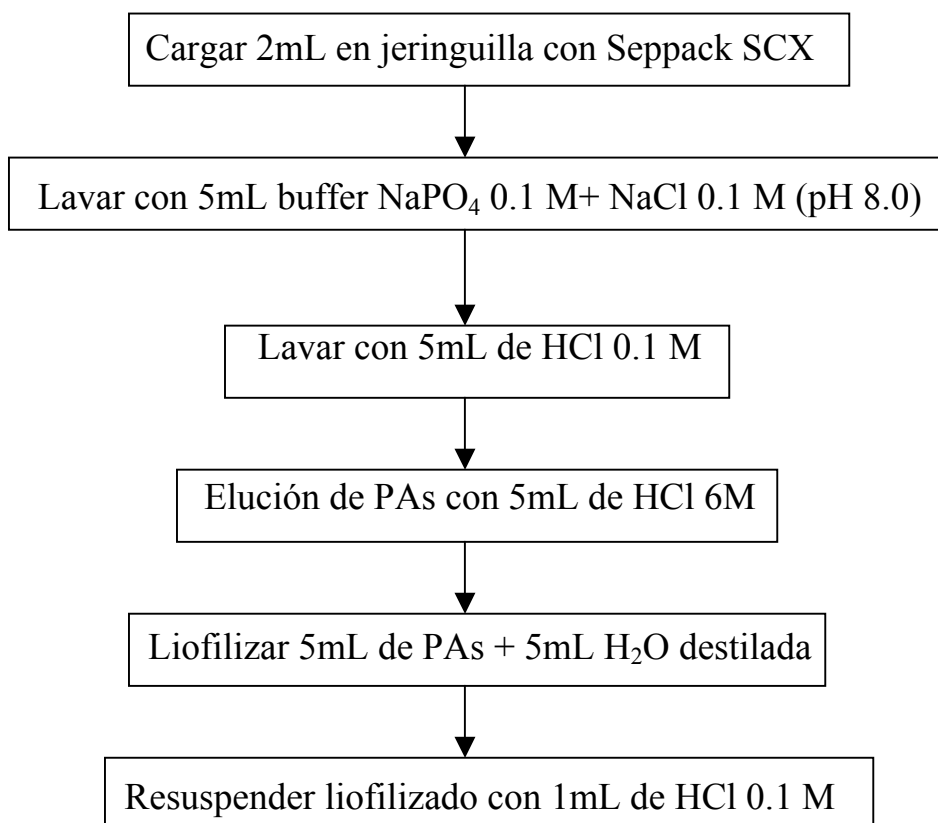


Fig. 27. Esquema de la concentración y purificación PAs libres

Cuando concentramos con otros métodos, también concentramos las impurezas, por eso es importante efectuar este paso incluso en el caso de resuspender el extracto liofilizado con el mismo volumen inicial, puesto que evitamos que haya impurezas que interfieran en las determinaciones.

En el caso de que aún no tengamos suficiente concentración de PAs y que tengamos que concentrar todavía más, tenemos la oportunidad de hacerlo con los dansilados (sección 4. 4. 7.)

4.4.3. Hidrólisis ácida del precipitado

Se cogen 0.5 mL del precipitado resuspendido en SSC y se ponen en un vial color topacio juntamente con 0.5 mL de HCl 37% ($\cong 12M$) y se llena con N_2 , para conseguir una atmósfera inerte. Se sella el recipiente con

una llama y se deja 24 horas a 105°C (Fig.28).

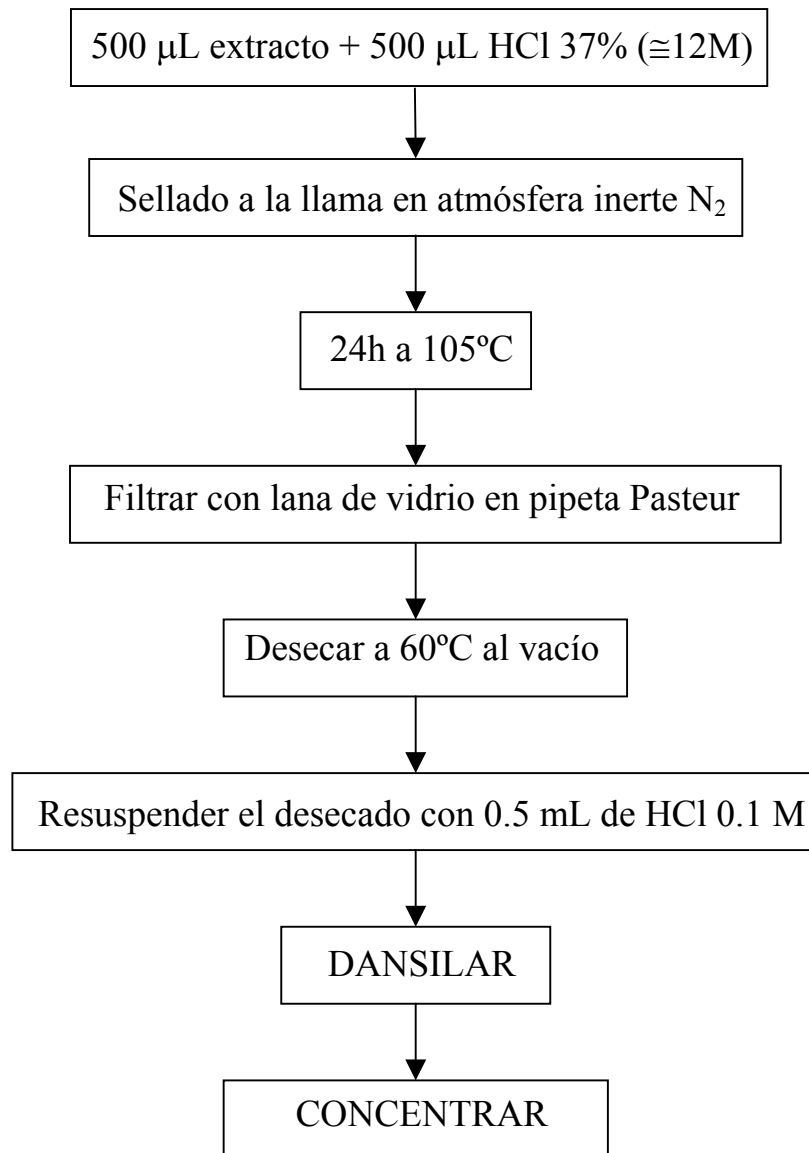


Fig. 28. Esquema del procedimiento de hidrólisis ácida del precipitado

Después de este tiempo se filtra el contenido con lana de vidrio y se pone en viales, limpiando la botellita con 0.2 mL de HCl 0.1 M. Se ponen los viales en el desecador termostatzado a 60-70°C y una vez desecados se resuspenden con 0.5 mL de HCl 0.1 M. La solución obtenida se guarda en eppendorfs a -20°C hasta su dansilación.

4.4.4. Hidrólisis ácida del sobrenadante

Se coge 0.5 mL del sobrenadante y se coloca en un vial junto con 0.5 mL de HCl 37% ($\cong 12M$) y se llena de N_2 , para conseguir una atmósfera inerte. Se sella el recipiente a la llama y se deja 24 horas a $105^\circ C$.

Como en el caso de la hidrólisis del precipitado, transcurrido este tiempo se rompe la botellita y se deja en el desecador termostatzado a $60-70^\circ C$ y una vez desecados se resuspenden con 0.5 mL de HCl 0.1 M y se congelan en eppendorfs hasta su dansilación.

4.4.5. Hidrólisis enzimática del DNA

Una vez determinado el DNA se procedió a una hidrólisis enzimática para liberar las posibles PAs unidas (Fig. 29).

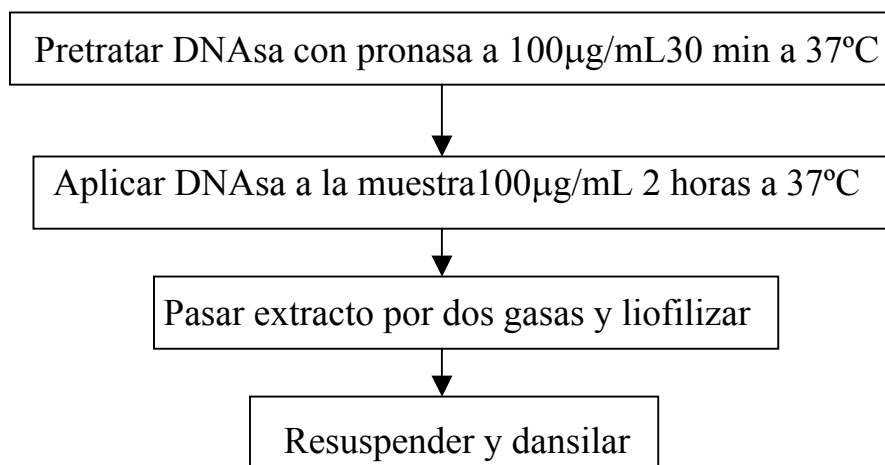


Fig. 29. Esquema de la hidrólisis enzimática del DNA

La desoxiribonucleasa tipo I de páncreas bovino (Sigma) fue primero pretratada con pronasa a una concentración de $100\mu g/mL$ durante 30 min. a $37^\circ C$ para inactivar posibles contaminantes. Una vez pretratada, la DNAsa fue aplicada a nuestra muestra de DNA previamente determinada a una concentración de $100\mu g/mL$ durante 2 horas a $37^\circ C$. Transcurrido

este tiempo, el extracto se pasaba a través de dos gasas, se pasaba a un recipiente del liofilizador, se congelaba en nitrógeno líquido y se liofilizaba, para seguidamente resuspenderlo en HCl 0.1M y guardarlo hasta su dansilación.

4.4.6. Dansilación

La determinación de las poliaminas por dansilación consiste en la incorporación a éstas de uno o más grupos dansilo que cede el cloruro de dansilo y que se une al grupo amino o imino. Este grupo dansilo es el que hace posible la cuantificación de las poliaminas ya que es fluorescente (Fig. 30).

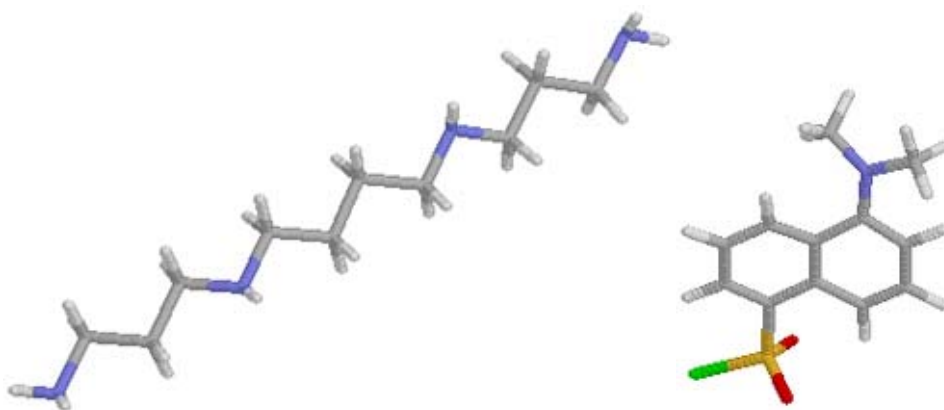


Fig. 30. Espermina (con sus 4 grupos amino en azul) y cloruro de dansilo.

El proceso (Fig. 31) comienza descongelando el eppendorf en el que tenemos 1 mL del extracto reconcentrado y purificado de PAs libres, del cual vamos pipeteando 100 μ L, hasta agotar el extracto, a tubos cónicos con tapón de rosca (10 en total). Seguidamente añadimos a cada tubo entre 50-55 mg de bicarbonato sódico para rectificar el pH (Seiler *et al.*, 1970) y 200 μ L de cloruro de dansilo que se prepara justo antes de empezar la dansilación (3mg/mL de acetona anhidra). Después de tapar los tubos se agitan al vortex y se dejan 1 hora a 60°C.

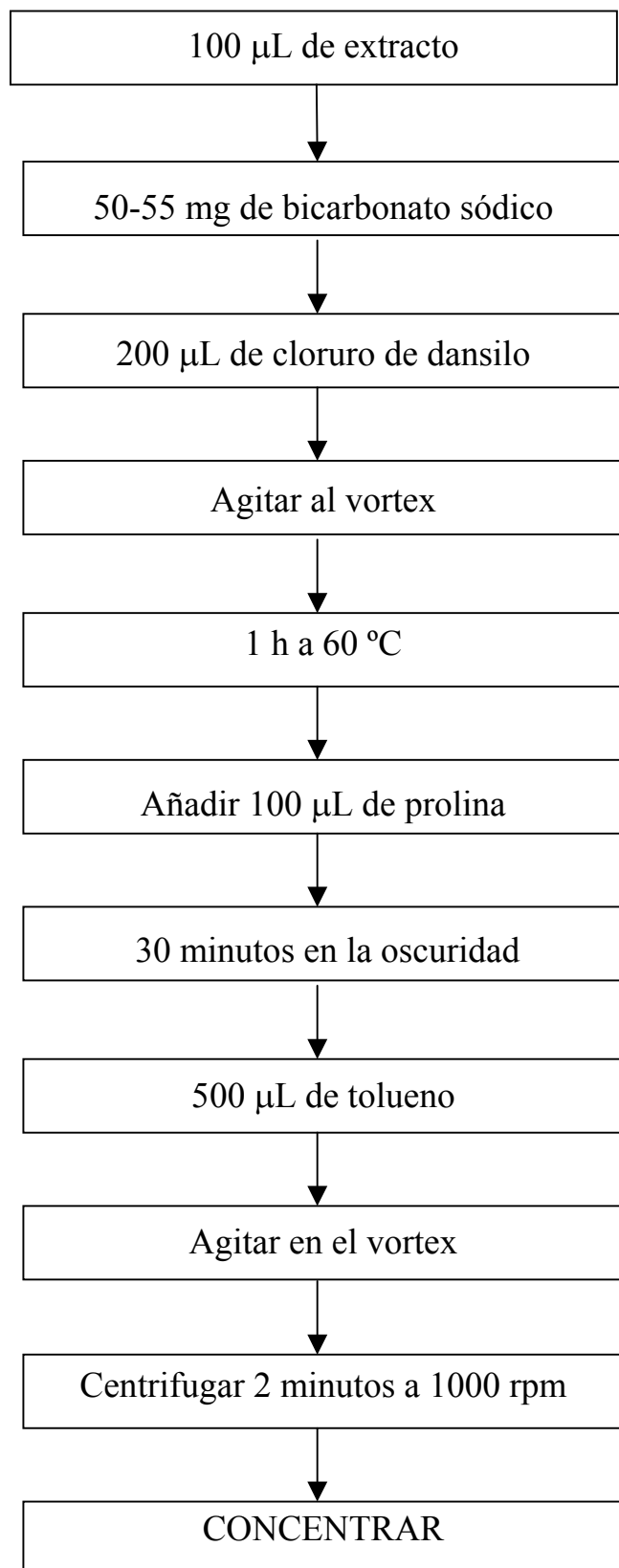


Fig. 31. Esquema del proceso de dansilación

Transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 100 μL de prolina (15 mg/mL) para la eliminación del exceso de cloruro de dansilo, y después de agitar al vortex se deja en la oscuridad media hora más.

Finalmente ya solo queda extraer las PAs dansiladas (Fig. 32) añadiendo 500 μL de tolueno, agitando al vortex y centrifugando suavemente (1000 rpm/2 min) para separar las dos fases.

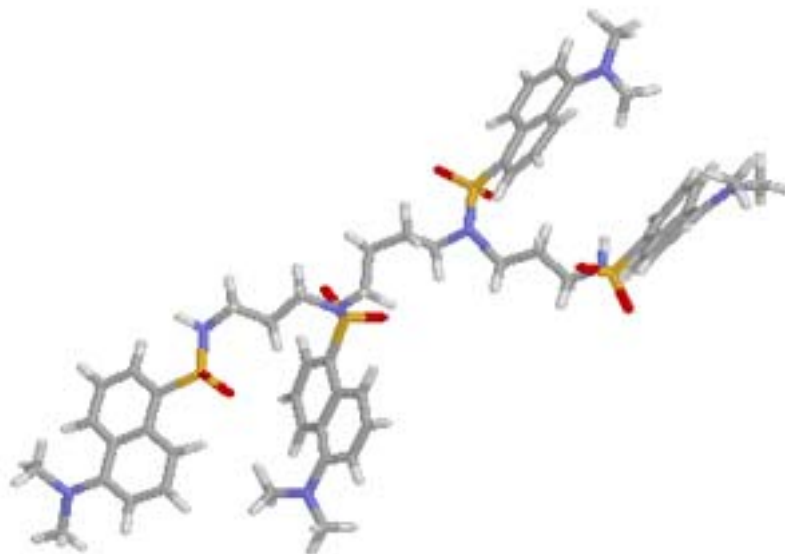


Fig. 32. Espermina dansilada

Todo este proceso es bastante largo, así que las PAs dansiladas se pueden guardar una noche en la cámara fría para continuar el día siguiente.

4.4.7. Concentración de los dansilados

Una vez se obtienen los dansilados (10 tubos de cada tratamiento con 500 μL de fase toluénica que contiene las PAs dansiladas) se procede a su concentración.

Se cogen los 3 primeros tubos de cada tratamiento y se pipetea los 500 μL de la fase toluénica en un eppendorf. Se deja el eppendorf abierto en la centrífuga acoplada al liofilizador y se ponen en marcha. Una

vez liofilizado (el proceso es rápido, 30-45 min) se van añadiendo encima todas las fases toluénicas necesarias para tener suficiente concentración (no se añade otra hasta que estén liofilizadas las 3 anteriores) y finalmente se puede congelar liofilizado hasta su utilización.

Siguiendo este método se puede concentrar por orden de magnitudes. En el momento de utilizar solo hay que añadir el disolvente (tolueno, metanol, acetona, etc.).

4.4.8. Separación de las poliaminas

La separación de las PAs se consigue mediante el uso de placas de HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography), Whatman de sílica gel 60A, linear-K 6D de 20x20 cm; 0,25 mm de grosor y 19 canales con zona preabsorbente. Estas placas son previamente activadas a 105°C durante 30 minutos.

El máximo de muestra que se puede aplicar es de 60 μL , pero puesto que la concentración de la muestra se controlaba por los métodos anteriormente descritos, la cantidad cargada en cada canal era normalmente de 30 μL , porque la mancha quedaba más pequeña y las bandas más estrechas y nítidas.

La placa se pone en una cámara de desarrollo, previamente saturada de la fase móvil utilizada, en este caso unos 50 mL de Cloroformo-Trietilamina (8:2, v/v). La saturación previa se efectuaba poniendo un papel de filtro 30 minutos antes de poner la placa, cosa que hace que la fase móvil que está subiendo sature el ambiente.

4.4.9. Identificación y cuantificación de las poliaminas

Para poder identificar las poliaminas de las muestras y saber a que concentración están, se utilizan patrones. Por ahora, y con los métodos utilizados solo podemos determinar la naturaleza y la concentración de 8 bandas (Fig. 33) que corresponden a: Spm, Spd, NorSpd, Cad, Put, Dap, etanolamina, NH_4 .

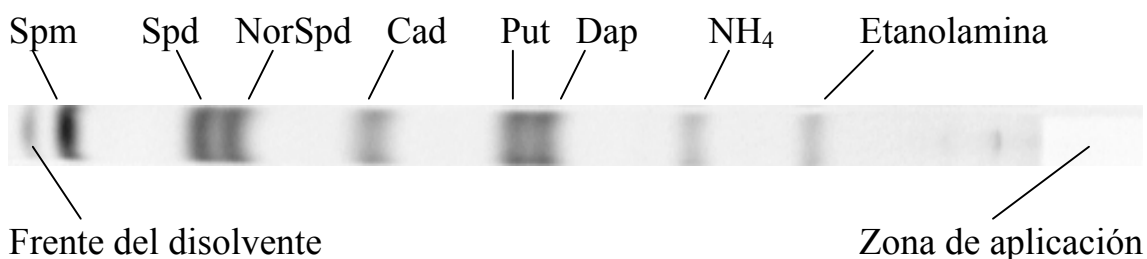


Fig.33. Patrones de poliaminas

La adquisición de la imagen digital de la placa se realiza mediante el Gel-Doc 1000 de Bio Rad, que utiliza un transiluminador ultravioleta a 302nm y una cámara con filtro de ultravioleta. La cuantificación de la PAS se realiza mediante el análisis densitométrico de las bandas de la imagen obtenida, usando el software Molecular Analyst ver. 1.5.

4.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Para el análisis de proteínas usamos el método de Bradford (1976). Tomamos un alícuota del precipitado resuspendido en SSC o un alícuota de la extracción para electroforesis de 40 μL y lo diluimos en 760 μL de tampón de proteínas (Tris-HCl 50mM con DTT 2mM, a pH 8.0). Añadimos 200 μL de reactivo “Coomassie Protein Assay Reagent” (PIERCE). Homogeneizamos y leemos en el espectrofotómetro a 595 nm.

El complejo formado por el colorante y la proteína tiene un máximo de absorción que permite una determinación sensible a 595 nm. La respuesta es lineal entre ciertos límites de concentración, midiendo la absorbancia después de 5 minutos y antes de una hora. En este intervalo el complejo formado es estable. Para la recta patrón se usa BSA, a una concentración que oscila entre 5 y 100 $\mu\text{g/mL}$

4.6. ESPÉCIES MONOMÉRICAS DE Al EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA

La suma de concentraciones de especies monoméricas de Al en la solución nutritiva se analizó siguiendo el método de Kerven *et al.*, 1989. Se recogen 1.5 mL de cada muestra y se añaden 0.5 mL de ácido ascórbico 0.5%. Justo antes de proceder a la lectura, añadimos 0.5 mL de acetato de aluminón (acetato glacial + NaOH + aluminón + H₂O desionizada) a pH 4.2. Homogeneizamos y leemos las muestras a los 30 segundos en el espectrofotómetro a una λ de 530 nm.

En las cubetas control sin aluminio el resultado fue de 0. En las cubetas con tratamiento de 50 mM de Al los resultados al principio y al final de las 24 del tratamiento fueron de 48.6 ± 0.27 y 46.52 ± 0.36

4.7. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS BANDAS OBTENIDAS EN LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Una vez leída, la placa de cromatografía de poliaminas escogida se llevó a un cuarto oscuro. Debajo de la luz ultravioleta se marco con lápiz el contorno de cada banda. Ya fuera del cuarto oscuro se rascó con una espátula el interior de la superficie dibujada y se recogió por separado el polvillo de sílica desprendido de todas las bandas de la placa que tuvieran

la misma Rf. Cada uno se introdujo dentro de una jeringuilla unida a un filtro (Anotop 10, 0.2 μm , 10mm de Whatman). Dentro de la jeringuilla se añadió un disolvente (metanol, tolueno o acetona) y se eluyeron por separado cada poliamina o cada banda que no tenia su correspondiente patrón. Se recogió dentro de un eppendorf que se dejó abierto dentro de la centrifuga unida al liofilizador. Una vez liofilizado se guardó congelado hasta que se pudo leer la muestra por electrospray (ES).

Los parametros usados en el electrospray fueron:

Instrumento: VG-QUATTRO de Micromass Instruments

Lectura de iones positivos

Gas nebulizador: N_2 10L/h

Gas secado: N_2 450L/h

Temperatura de la fuente: 80°C

Voltage del capilar: 3.5 Kv

Voltage foco: 57 v

Flujo: 15mL/min

Disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1) 1% Fórmico

IV.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PESO FRESCO, PESO SECO y % PS/PF

En la Fig. 34 se observa una disminución del peso fresco de las raíces. Esto se interpreta como una inhibición del crecimiento a causa del pH ácido y el tratamiento con aluminio.

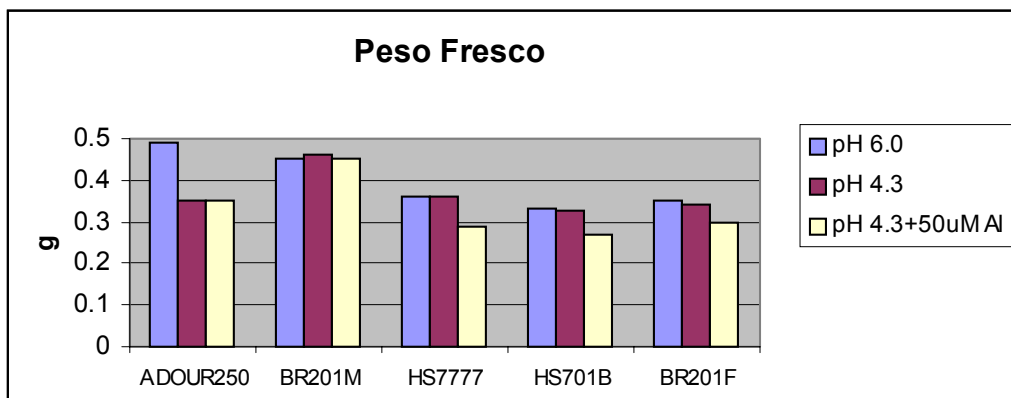


Fig. 34. Peso fresco

El peso seco también disminuye (Fig. 35). Hay que tener en cuenta que aunque había una disminución del crecimiento longitudinal, las raíces tratadas con aluminio eran más gruesas y se favorecía el crecimiento y aparición de raíces laterales.

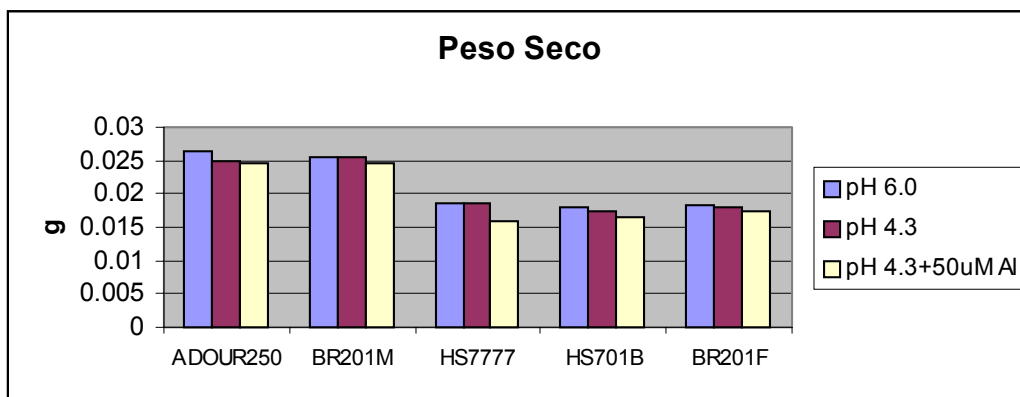


Fig. 35. Peso seco

Además hay que tener en cuenta que el tratamiento solo duraba 24 horas, cosa que explicaría que la disminución del peso (fresco o seco) no sea exagerada.

Si nos fijamos en el porcentaje PS/PF (Fig. 36) vemos que, excepto en BR201M, aumenta con el tratamiento de Al. Esto indica una disminución del porcentaje de agua en la raíz, cosa que indicaría un pequeño estrés hídrico como consecuencia del tratamiento con Al.

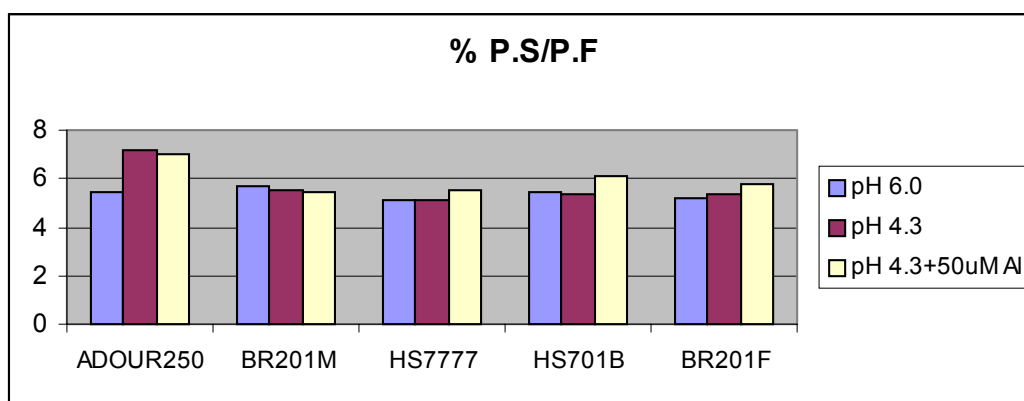


Fig. 36. Porcentaje de Peso Seco/Peso Fresco

2. DNA

Los contenidos de DNA disminuyen proporcionalmente con el pH ácido y el tratamiento con Al en todas las variedades (Fig. 37). Esto se puede interpretar como una inhibición de la síntesis de DNA.

Las pequeñas diferencias entre el contenido de DNA de las distintas variedades podría ser consecuencia de que las células de algunas de estas variedades son más pequeñas. Por lo que a mismo peso, más células y más DNA.

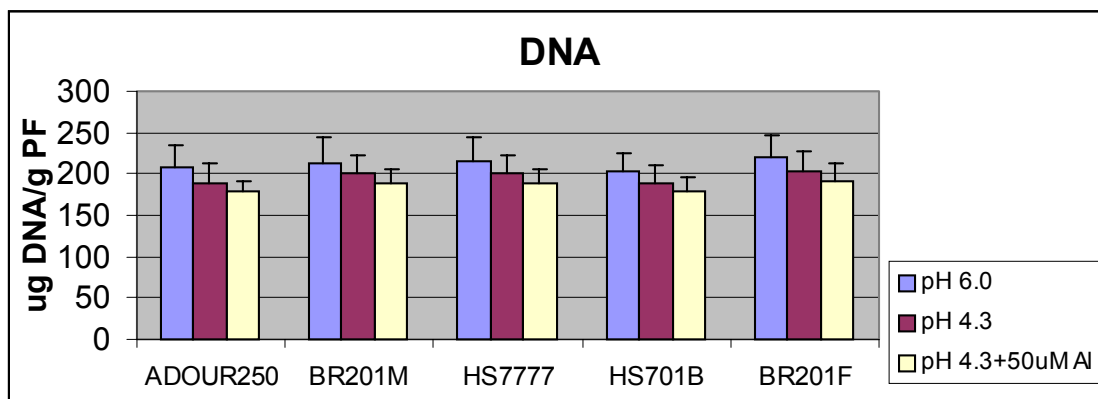


Fig. 37. Contenido total de DNA

3. POLIAMINAS

Para poder interpretar los resultados de PAs hay que tener una visión global de todas las fracciones: solubles libres, solubles ligadas (conjugadas) y ligadas del precipitado. Hay que recordar que ADOUR250 y BR201M son tolerantes al Al. y HS7777, HS701B y BR201F son sensibles. Por este motivo se estudian las diversas fracciones.

Por otra parte se efectúan aproximaciones mediante el cálculo de coeficientes entre algunos de los resultados.

3.1. POLIAMINAS LIBRES

Como norma general se consideran poliaminas libres aquellas poliaminas que se encuentran en el citoplasma y no están unidas a ninguna molécula. En este trabajo, hemos considerado los niveles de poliaminas libres de Spm, Spd y Put. También hemos tenido en cuenta los niveles de Dap, pero teniendo siempre presente que es un producto de degradación de las poliaminas Spm y Spd.

Los niveles de poliaminas libres en las dos variedades tolerantes ADOUR250 (Fig. 38) y BR201M (Fig. 39) son extremadamente parecidos.

Como perfil general, las dos variedades presentan unos niveles de poliaminas libres más elevados que las variedades no tolerantes y los niveles de las 4 poliaminas se encuentran en valores muy parecidos.

En ADOUR250 los niveles de poliaminas libres de las plantas tratadas con aluminio son muy parecidos a los niveles que presenta el control a pH 6.0. Sin embargo el tratamiento a pH 4.3 presenta niveles superiores en todas las poliaminas. Parece pues que el aluminio minimiza un poco el impacto que causa la bajada de pH.

En BR201M nos encontramos que los niveles de poliaminas libres en el control y los tratamientos eran muy parecidos, pero el nivel más bajo lo presentaba el control a pH 6.0, mientras que a pH 4.3 y el tratamiento con aluminio presentaban valores ligeramente superiores. El hecho de que los valores de las poliaminas a pH 4.3 y del tratamiento a pH 4.3 + 50 μ M de Al sean casi idénticos, parece indicar que la adición de aluminio no tiene apenas efecto.

POLIAMINAS LIBRES EN ADOUR250

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	55.2	3.7	58.9	6.8
pH 4.3	70	4.1	74.1	7.7
pH 4.3+50uM Al	57	3.6	60.6	4.3

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	50.4	4.1	54.5	3.4
pH 4.3	52.2	3.3	55.5	3.5
pH 4.3+50uM Al	49.6	4.3	53.9	4.3

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	56.1	3.4	57.5	3.2
pH 4.3	79.6	5.4	85	2.2
pH 4.3+50uM Al	57.3	3.4	64.7	3

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	56.7	3.5	60.2	5.4
pH 4.3	80.6	5.3	85.9	10.3
pH 4.3+50uM Al	65.2	4.7	69.9	6.1

Tabla 7. Poliaminas libres en ADOUR250

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	58.9±6.8 ^a	54.5±3.4 ^a	57.5±3.2 ^a	60.2±5.4 ^a
pH 4.3	74.1±7.7 ^b	55.5±3.5 ^a	85±2.2 ^b	85.9±10.3 ^b
pH 4.3+50uM Al	60.6±4.3 ^{ab}	53.9±4.3 ^a	64.7±3 ^c	69.9±6.1 ^{ab}

Tabla 8. Poliaminas libres en ADOUR250

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

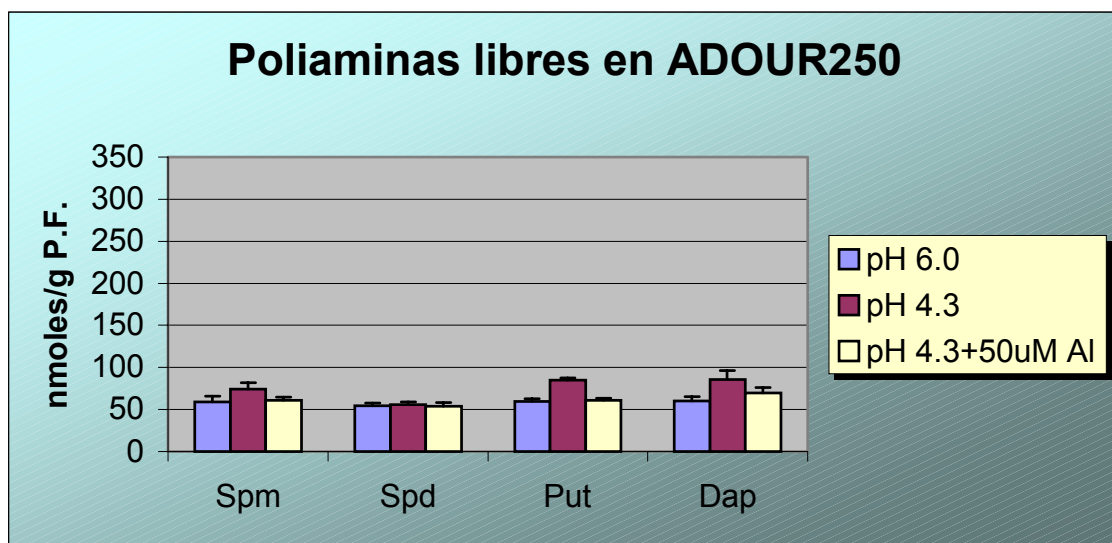


Fig. 38. Poliaminas libres en ADOUR250

POLIAMINAS LIBRES EN BR201M

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	37.8	4.5	42.3	3.2
pH 4.3	43.6	4.7	48.3	4.6
pH 4.3+50uM Al	44.1	4.2	48.3	4.6

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	41.6	2.9	44.5	3.6
pH 4.3	54.2	4.7	58.9	4.9
pH 4.3+50uM Al	47.8	5.1	52.9	4.2

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	51.1	3.4	54.5	6.2
pH 4.3	64.2	5.2	69.4	4.6
pH 4.3+50uM Al	63.6	5.1	68.7	4.7

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	66.2	6.75	72.95	5.4
pH 4.3	69.3	5.7	75	10
pH 4.3+50uM Al	67.2	6.8	74	6.1

Tabla 9. Poliaminas libres en BR201M

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	42.3±3.2 ^a	44.5±3.6 ^a	54.5±6.2 ^a	72.95±5.4 ^a
pH 4.3	48.3±4.6 ^a	58.9±4.9 ^b	69.4±4.6 ^b	75±10.3 ^a
pH 4.3+50uM Al	48.3±4.6 ^a	52.9±4.2 ^b	68.7±4.7 ^b	74±6.1 ^a

Tabla 10. Poliaminas libres en BR201M

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

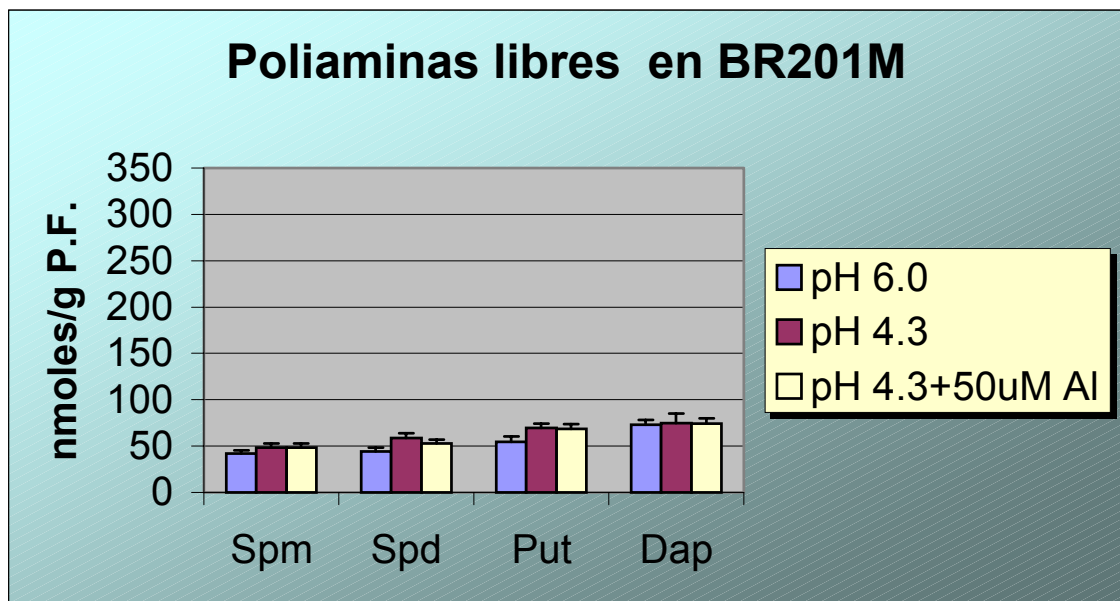


Fig. 39. Poliaminas libres en BR201M

En las variedades sensibles al aluminio (HS7777, HS701B y BR201F) hay más variabilidad. Como perfil general vemos que todas las poliaminas aumentan a pH ácido y vuelven a aumentar en el tratamiento con aluminio (especialmente Put y Dap), pero así como en HS701B y BR201F los niveles de todas las poliaminas libres son muy bajos, en HS7777 los niveles de Put y Dap son especialmente altos.

Los niveles de poliaminas libres de HS701B (Fig. 40) en el control a pH 6.0 son extremadamente bajos. En general los niveles de poliaminas de HS701B son muy bajos pero destaca la gran subida de Put y Dap en las plantas tratadas con aluminio. Estas subidas de poliaminas libres (especialmente Put) se interpretan como un indicador de estrés. En el control a pH 4.3 respecto del control a pH 6.0 encontramos casi el doble de todas las poliaminas, pero si al pH ácido (pH 4.3) añadimos aluminio, los niveles de Put y Dap se multiplican por 3 y por 13 respectivamente. Parece pues que el aluminio causa una situación de estrés visible y detectable en 24 horas.

En BR201F (Fig. 41) encontramos unos resultados muy parecidos, pero en este caso los bajos niveles de poliaminas libres en el control a pH 6.0 aumentan más por el pH ácido que por el tratamiento con aluminio.

Los resultados nos llevan a pensar que la planta parece afectada por el pH ácido y que el tratamiento con aluminio no hace más que agravar la situación.

POLIAMINAS LIBRES EN HS701B

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	5.4	2.1	7.5	2.1
pH 4.3	14.4	2.4	16.8	2.3
pH 4.3+50uM Al	24.6	3.8	28.4	2.6

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.8	1.7	5.5	2.2
pH 4.3	7.4	2.4	9.8	1.9
pH 4.3+50uM Al	20.4	4.4	24.8	2.7

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	5.9	2.9	8.8	1.7
pH 4.3	12.32	3.8	16.12	2
pH 4.3+50uM Al	40.27	8.8	49.07	7.4

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.7	2.1	4.8	2.1
pH 4.3	4.6	2.7	7.3	1.5
pH 4.3+50uM Al	91	4.5	95.5	14

Tabla 11. Poliaminas libres en HS701B

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	7.5 ±2.1 ^a	5.5 ±2.2 ^a	8.8±1.7 ^a	4.8 ±2.1 ^a
pH 4.3	16.8 ±2.3 ^b	9.8 ±1.9 ^b	16.12±2 ^b	7.3 ±1.5 ^b
pH 4.3+50uM Al	28.4 ±2.6 ^c	24.8 ±2.7 ^c	49.07±7.4 ^c	95.5 ±13.5 ^c

Tabla 12. Poliaminas libres en HS701B

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

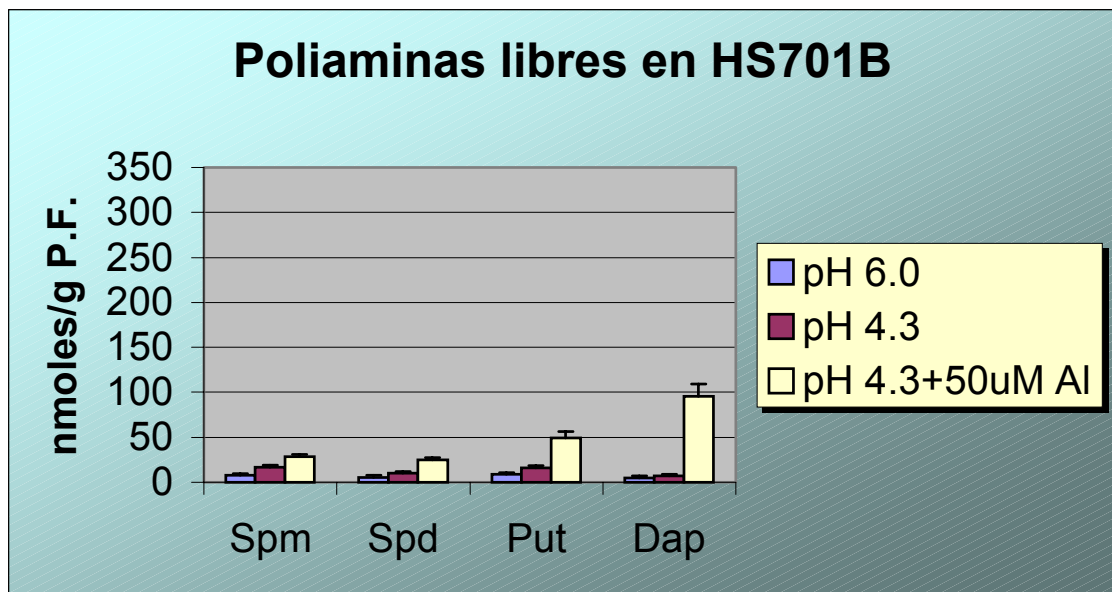


Fig. 40. Poliaminas libres en HS701B

POLIAMINAS LIBRES EN BR201F

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	12.2	1.7	13.9	1.2
pH 4.3	16.6	1.9	18.5	2.1
pH 4.3+50uM Al	24.1	2.2	26.3	1.9

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	6.2	1.6	7.8	1.1
pH 4.3	7.4	1.6	9	0.9
pH 4.3+50uM Al	14.7	1.9	16.6	0.8

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	17.6	1.2	18.8	1.8
pH 4.3	54.2	3.6	57.8	2.9
pH 4.3+50uM Al	67.1	6.2	73.3	2.5

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	26.7	3.2	29.9	3.2
pH 4.3	33.2	2.2	35.4	2.2
pH 4.3+50uM Al	60.6	1.5	62.1	2.2

Tabla 13. Poliaminas libres en BR201F

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	13.9 ±1.2 ^a	7.8 ±1.1 ^a	18.8 ±1.8 ^a	20.6 ±3.2 ^a
pH 4.3	18.5 ±2.1 ^b	9 ±0.9 ^b	57.8 ±2.9 ^b	60.7 ±2.2 ^b
pH 4.3+50uM Al	26.3 ±1.9 ^c	16.6 ±0.8 ^c	73.3 ±2.5 ^c	75.8 ±2.2 ^c

Tabla 14. Poliaminas libres en BR201F

Valores de la media \pm s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

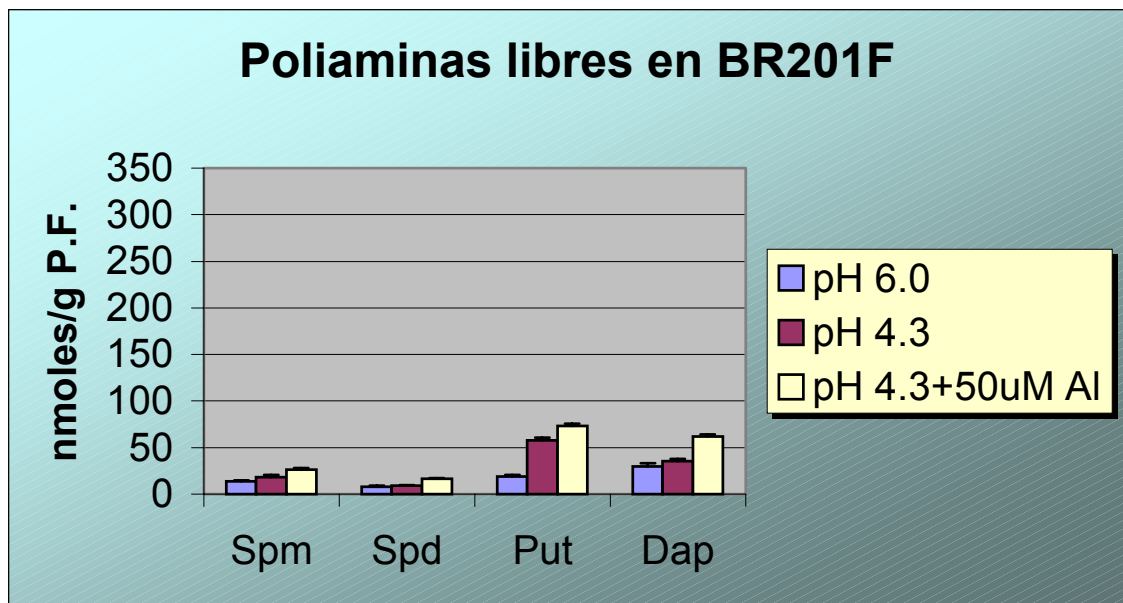


Fig. 41. Poliaminas libres en BR201F

POLIAMINAS LIBRES EN HS7777

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	7.88	2.1	9.98	1.2
pH 4.3	15.19	2.3	17.49	2.1
pH 4.3+50uM Al	26.99	3.5	30.49	1.9

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	25.21	3.7	28.91	1.1
pH 4.3	35.12	4.4	39.52	0.9
pH 4.3+50uM Al	54.23	5.3	59.53	0.8

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	89.39	7.9	97.29	1.7
pH 4.3	217.33	13.5	230.8	2
pH 4.3+50uM Al	291.63	13.8	305.4	7.4

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	98.51	7.6	106.1	2.1
pH 4.3	121.59	7.6	129.2	1.5
pH 4.3+50uM Al	134.58	7.6	142.2	14

Tabla 15. Poliaminas libres en HS7777

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	9.98 ±1.2 ^a	28.91 ±1.1 ^a	97.29 ±1.7 ^a	106.11 ±2.1 ^a
pH 4.3	17.49 ±2.1 ^b	39.52 ±0.9 ^b	230.8 ±2 ^b	129.19 ±1.5 ^b
pH 4.3+50uM Al	30.49 ±1.9 ^c	59.53 ±0.8 ^c	305.4 ±7.4 ^c	142.18 ±13.5 ^c

Tabla 16. Poliaminas libres en HS7777

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

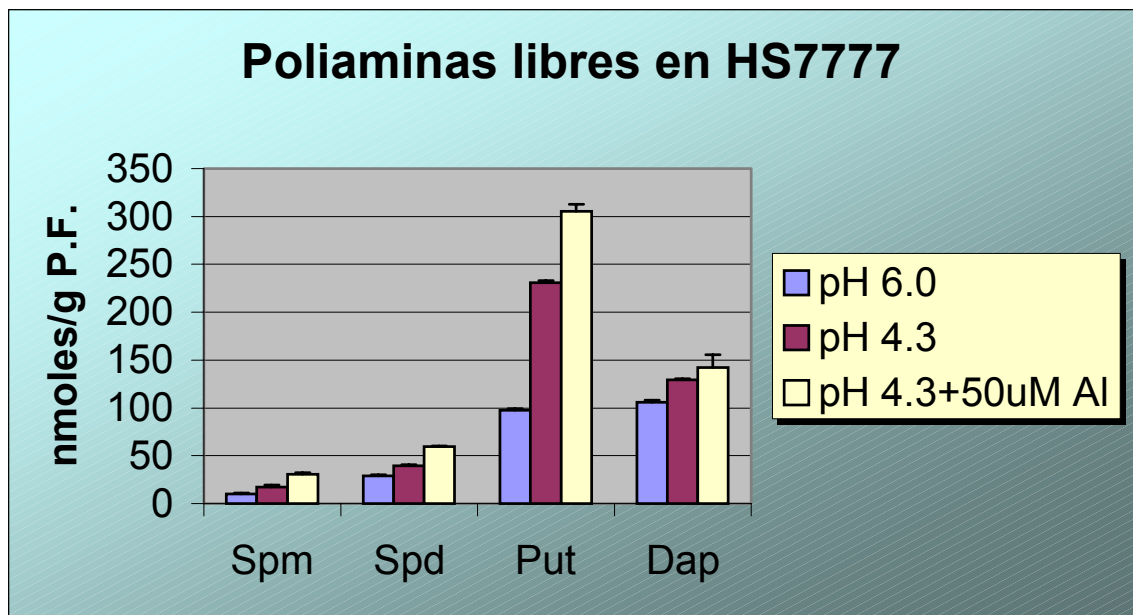


Fig. 42. Poliaminas libres en HS7777

La variedad HS7777 (Fig. 42) es la variedad sensible que más se aparta de un posible perfil. No por su patrón de comportamiento que es similar al de las otras variedades sensibles, sino por los altos niveles iniciales de Put y Dap a pH 6.0, como con el tratamiento a pH 4.3 o aluminio. Las cantidades de Spm son parecidas en las 3 variedades sensibles, pero los niveles de Put y Dap en HS7777 son realmente altos y los incrementos por pH ácido y tratamiento por aluminio también notables. Los resultados nos llevan a la conclusión que HS7777 sufre estrés tanto por pH ácido como por tratamiento con aluminio y que los incrementos de Put no se traducen en incrementos suficientes de Spm y Spd, probablemente por que el catabolismo está activado, como parece indicar el Dap.

En las Fig. 43, 44 y 45 podemos ver el comportamiento de cada variedad a cada pH, lo que nos ayuda a establecer su perfil.

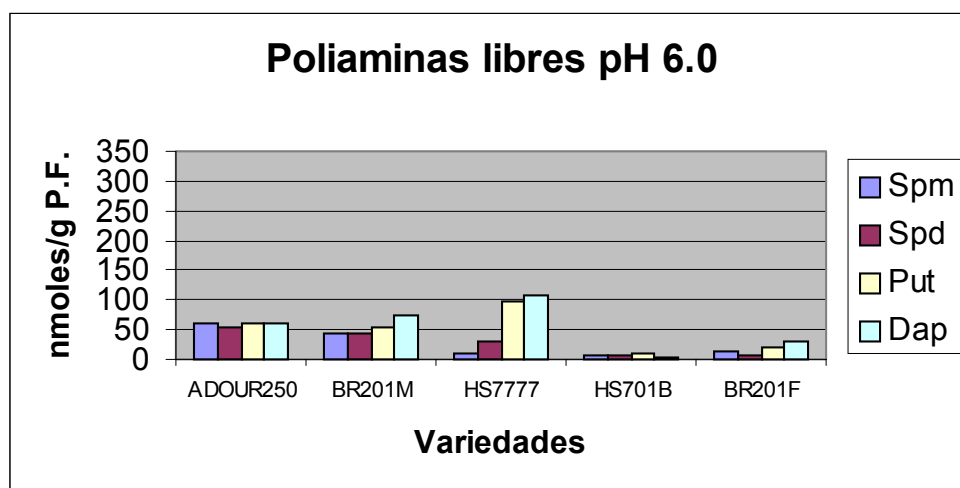


Fig. 43. Poliaminas libres a pH 6.0

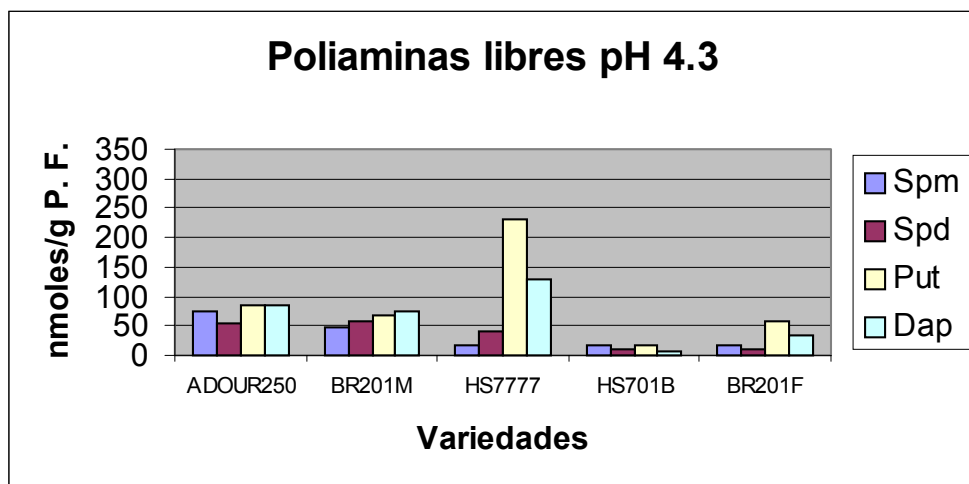
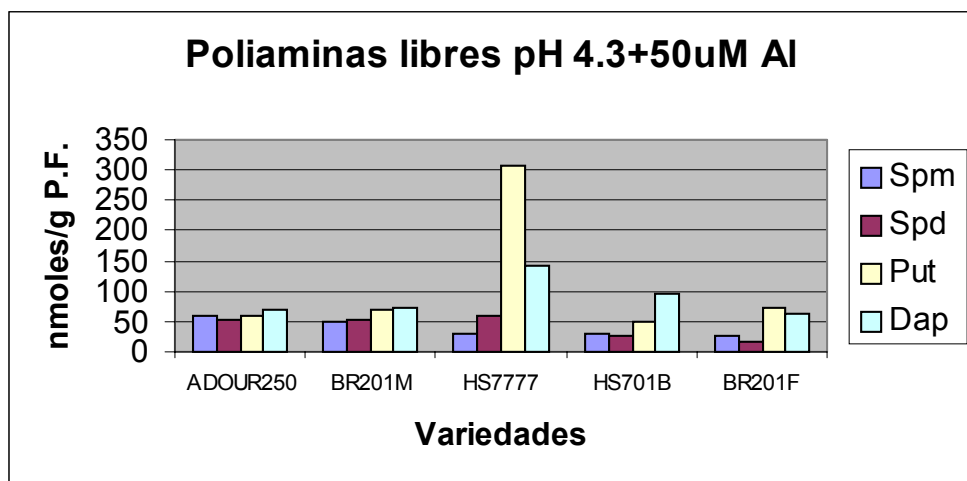


Fig. 44. Poliaminas libres a pH 4.3

Fig. 45. Poliaminas libres a pH 4.3 + 50 μ M Al

Los niveles de poliaminas libres totales (Spm+Spd+Put) corroboran que podríamos *a priori* valorar si una variedad es sensible o tolerante viendo su comportamiento (Fig. 46).

Los niveles de poliaminas libres totales en las dos variedades tolerantes son similares y los valores apenas aumentan o disminuyen por los tratamientos. Sin embargo, en las tres variedades sensibles vemos que

los niveles de poliaminas libres totales de pH 6.0 aumentan entre un 300 y un 500 % en el tratamiento con pH4.3 + 50 μ M de Al.

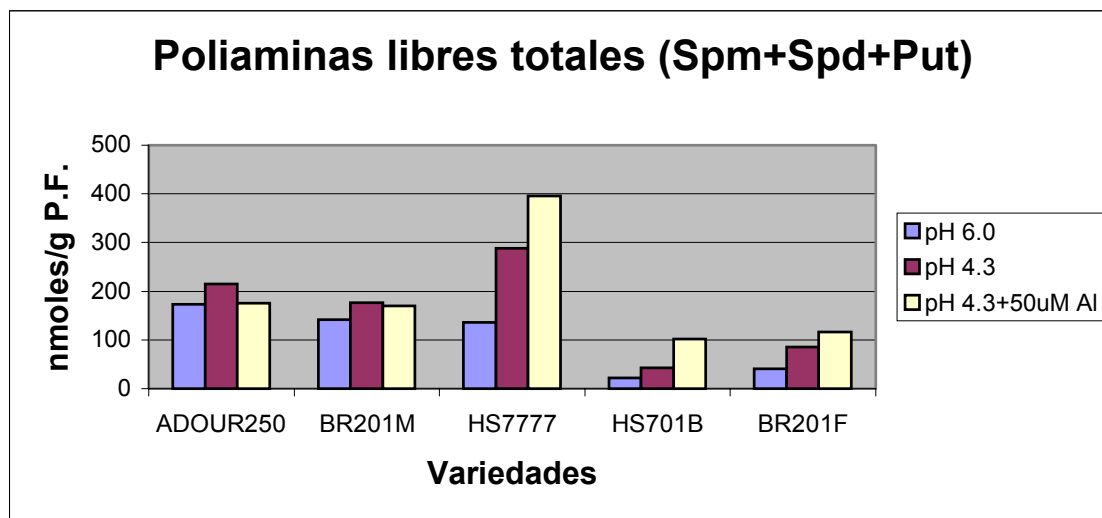


Fig. 46. Poliaminas libres totales (Spm+Spd+Put)

3.1.1. Coeficientes entre poliaminas

Hemos calculado dos tipos de coeficientes entre las PAs libres de las diferentes variedades:

a) Coeficientes Spm/Put y Spd/Put. Estos coeficientes sirven para ver gráficamente si alguna poliaminas predomina sobre las demás. Si aceptamos que en las reacciones de síntesis de PAs de una Put se forma una Spd y que de una Spd se forma una Spm, vemos que la reacción no está desplazada hacia ninguno de los puntos metabólicos. Vemos que las variedades tolerantes y sensible presentan dos comportamientos distintos. En las variedades tolerantes (ADOUR250 y BR201M) la relación es de aproximadamente 1. Los resultados de las variedades sensibles (HS7777, HS701B y BR201F) son muy inferiores a 1, lo que nos indica que hay mucha más cantidad de Put. Por lo que podemos pensar que la secuencia

metabólica no se desplaza hacia la formación de Spd y/o Spm, o que Spd y Spm se degradan rápidamente a Dap sin conservar unos niveles altos.

b) Coeficientes Put/(Spm+Spd). Este coeficiente entre la diamina y las poliaminas (Fig. 47) da una idea de la situación de estrés, atendiendo a los niveles de estas PAs que presentan las plantas. Valores superiores a los del control, indican un proceso de respuesta a las condiciones adversas a los que están sometidos.

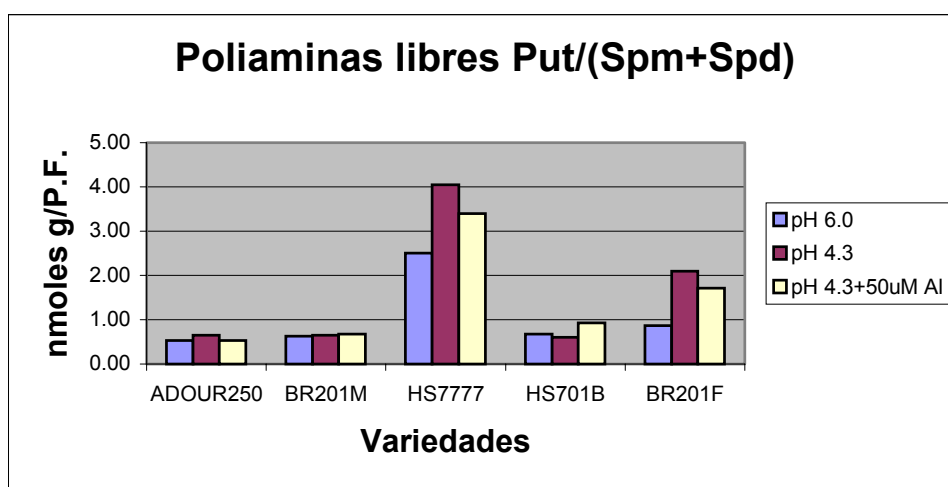


Fig. 47. Coeficiente Put/(Spm+Spd)

Las variedades tolerantes (ADOUR250 y BR201M) no presentan aumentos en el tratamiento con aluminio. La variedad ADOUR250 presenta un leve aumento en el tratamiento a pH 4.3 pero parece normal ya que es sensible al pH ácido. Sin embargo todas las variedades sensibles presentan valores del coeficiente más altos en el tratamiento con aluminio. Este predominio de Put es típico en los primeros momentos de someter plantas a condiciones adversas.

3.2. POLIAMINAS CONJUGADAS

Son poliaminas conjugadas aquellas poliaminas que están unidas a péptidos o a moléculas pequeñas, como amidas de ácidos

hidroxicimámicos (Bagni *et al.*, 2001). En este trabajo solo determinamos aquellas poliaminas conjugadas que se encuentran en la fracción soluble en TCA.

En nuestras variedades los resultados obtenidos muestran que es difícil establecer una relación entre los niveles de poliaminas conjugadas y la sensibilidad o tolerancia a pH ácido y/o al aluminio.

Las variedades tolerantes al aluminio presentan valores muy similares. En la variedad ADOUR250 los niveles de poliaminas conjugadas (que son muy bajos) no presentan ninguna tendencia. Quizás un leve descenso de Spm y un leve aumento de Put conjugada. En BR201M los valores también son muy bajos y se aprecia un leve aumento de Spm y de Put conjugadas.

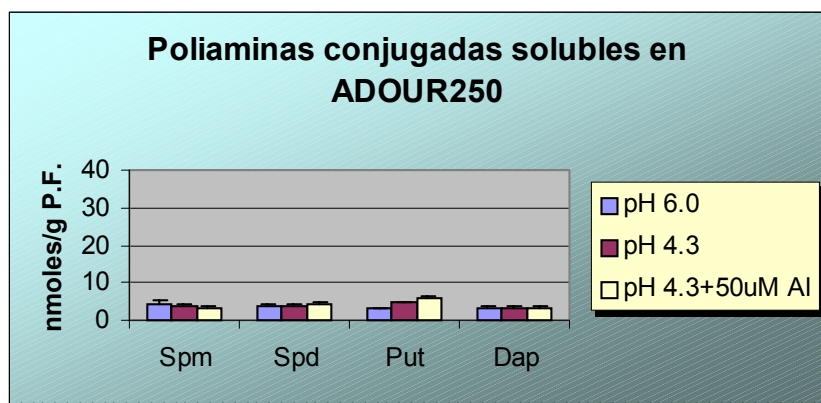


Fig. 48. Poliaminas conjugadas solubles en ADOUR250

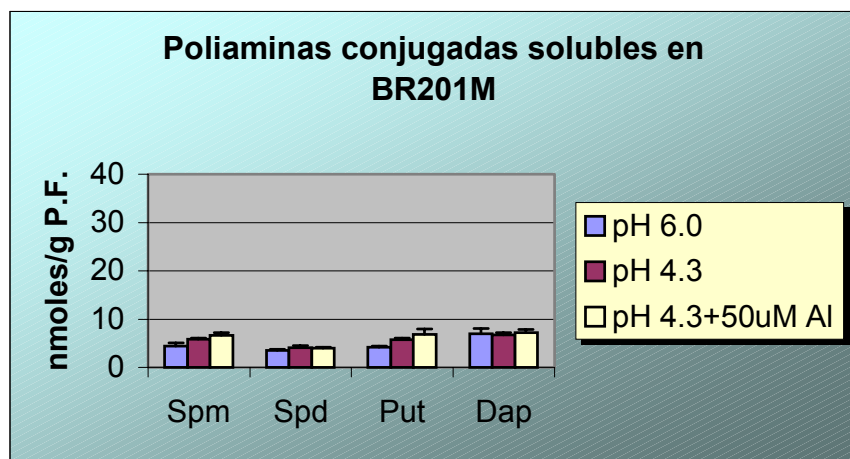


Fig. 49. Poliaminas conjugadas solubles en BR201M

POLIAMINAS CONJUGADAS EN ADOUR250

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.1	1.3	4.4	1.1
pH 4.3	2.2	1.4	3.6	0.6
pH 4.3+50uM Al	2.1	1.3	3.4	0.6

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.7	1.3	4	0.2
pH 4.3	2.4	1.4	3.8	0.3
pH 4.3+50uM Al	2.6	1.6	4.2	0.5

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	1.9	1.4	3.3	0.1
pH 4.3	2.9	1.7	4.6	0.1
pH 4.3+50uM Al	3.9	1.9	5.8	0.4

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.2	1.1	3.3	0.2
pH 4.3	2.1	1.1	3.2	0.4
pH 4.3+50uM Al	2.2	1.1	3.3	0.3

Tabla 17. Poliaminas conjugadas solubles en ADOUR250

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	4.4 ±1.1 ^a	4 ±0.2 ^a	3.3 ±0.1 ^a	3.3 ±0.2 ^a
pH 4.3	3.6 ±0.6 ^a	3.8 ±0.3 ^a	4.6 ±0.1 ^b	3.2 ±0.4 ^a
pH 4.3+50uM Al	3.4 ±0.6 ^a	4.2 ±0.5 ^a	5.8 ±0.4 ^c	3.3 ±0.3 ^a

Tabla 18. Poliaminas conjugadas solubles en ADOUR250

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	4.4 ±0.7 ^a	3.5 ±0.3 ^a	4.2 ±0.2 ^a	7 ±1.1 ^a
pH 4.3	5.9 ±0.2 ^b	4.1 ±0.4 ^a	5.8 ±0.3 ^b	6.7 ±0.5 ^a
pH 4.3+50uM Al	6.6 ±0.6 ^b	4 ±0.2 ^a	6.9 ±1.1 ^b	7.2 ±0.6 ^a

Tabla 19. Poliaminas conjugadas solubles en BR201M

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

POLIAMINAS CONJUGADAS EN BR201M

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.1	1.3	4.4	0.7
pH 4.3	4.3	1.6	5.9	0.2
pH 4.3+50uM Al	5	1.6	6.6	0.6

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.1	1.4	3.5	0.3
pH 4.3	2.5	1.6	4.1	0.4
pH 4.3+50uM Al	2.3	1.7	4	0.2

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.1	1.1	4.2	0.2
pH 4.3	4.3	1.5	5.8	0.3
pH 4.3+50uM Al	5.2	1.7	6.9	1.1

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	5.5	1.5	7	1.1
pH 4.3	5.5	1.2	6.7	0.5
pH 4.3+50uM Al	5.7	1.5	7.2	0.6

Tabla 20. Poliaminas conjugadas en BR201M

En las variedades sensibles nos encontramos diferencias de comportamiento. En HS7777 y HS701B las poliaminas conjugadas son una fracción significativa de las poliaminas totales de la planta. En todos los casos hay un aumento de todas las poliaminas, ya sea por tratamiento a pH ácido o por tratamiento con aluminio. En BR201F nos encontramos que también aumentan todas las poliaminas pero en este caso los valores son bastante más bajos que en las otras variedades sensibles.

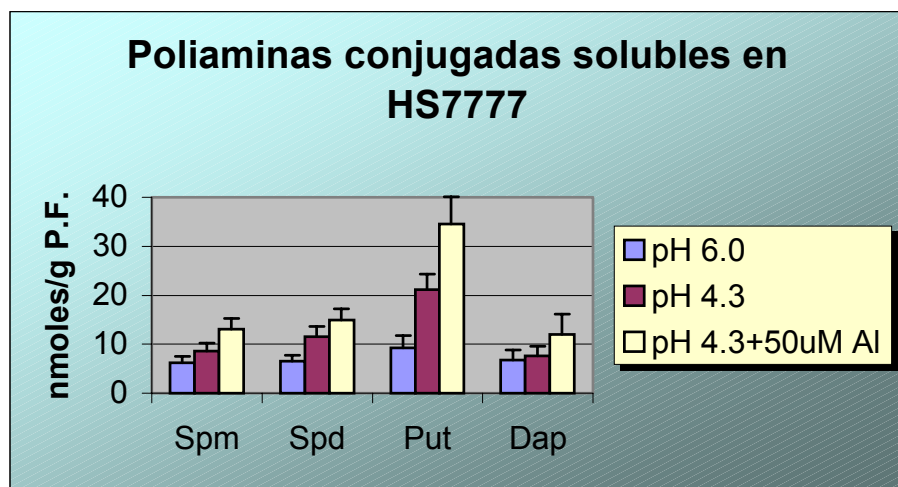


Fig. 50. Poliaminas conjugadas solubles en HS7777

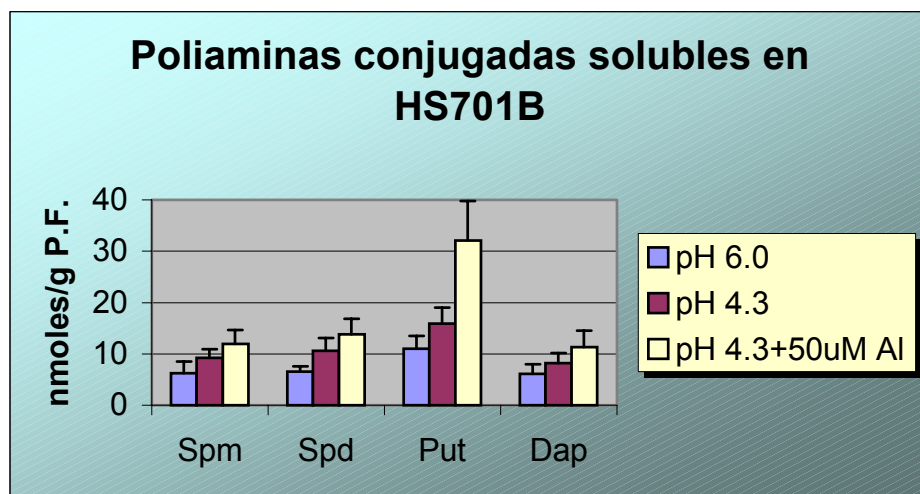


Fig. 51. Poliaminas conjugadas solubles en HS701B

POLIAMINAS CONJUGADAS EN HS7777

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.3	2.9	6.2	1.3
pH 4.3	4.7	3.9	8.6	1.6
pH 4.3+50uM Al	6.6	6.5	13.1	2.2

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.21	3.3	6.51	1.2
pH 4.3	5.6	5.9	11.5	2.1
pH 4.3+50uM Al	7.7	7.2	14.9	2.3

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	5.1	4.2	9.3	2.5
pH 4.3	12.3	8.8	21.1	3.2
pH 4.3+50uM Al	21.6	12.97	34.57	5.5

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.8	3	6.8	2
pH 4.3	4.5	3.1	7.6	2
pH 4.3+50uM Al	8.9	3.1	12	4.1

Tabla 21. Poliaminas conjugadas solubles en HS7777

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	6.2 ±1.3 ^a	6.51 ±1.2 ^a	9.3 ±2.5 ^a	6.8 ±2 ^a
pH 4.3	8.6 ±1.6 ^a	11.5 ±2.1 ^b	21.1 ±3.2 ^b	7.6 ±2 ^a
pH 4.3+50uM Al	13.1 ±2.2 ^b	14.9 ±2.3 ^b	34.57 ±5.5 ^c	12 ±4.1 ^a

Tabla 22. Poliaminas conjugadas en HS7777

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	6.2 ±2.3 ^a	6.5 ±1.1 ^a	11 ±2.5 ^a	6.1 ±1.9 ^a
pH 4.3	9.2 ±1.7 ^a	10.6 ±2.5 ^b	15.9 ±3.1 ^a	8.2 ±2 ^a
pH 4.3+50uM Al	11.95 ±2.7 ^a	13.85 ±3 ^b	32.15 ±7.6 ^b	11.35 ±3.2 ^a

Tabla 23. Poliaminas conjugadas solubles en HS701B

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

POLIAMINAS CONJUGADAS SOLUBLES EN HS701B

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.2	3	6.2	2.3
pH 4.3	4.7	4.5	9.2	1.7
pH 4.3+50uM Al	6.45	5.5	11.95	2.7

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.2	3.3	6.5	1.1
pH 4.3	5.4	5.2	10.6	2.5
pH 4.3+50uM Al	7.65	6.2	13.85	3

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	6.1	4.9	11	2.5
pH 4.3	8.9	7	15.9	3.1
pH 4.3+50uM Al	19.25	12.9	32.15	7.6

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.5	2.6	6.1	1.9
pH 4.3	4.8	3.4	8.2	2
pH 4.3+50uM Al	7.25	4.1	11.35	3.2

Tabla 24. Poliaminas conjugadas solubles en HS701B

POLIAMINAS CONJUGADAS SOLUBLES EN BR201F

	Spm		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.4	1.2	3.6	0.7
pH 4.3	3.4	1.1	4.5	0.8
pH 4.3+50uM Al	6.4	1.4	7.8	0.7

	Spd		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	1.5	0.6	2.1	0.5
pH 4.3	1.5	1.2	2.7	0.5
pH 4.3+50uM Al	2.2	1.7	3.9	0.5

	Put		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	2.2	1.1	3.3	0.9
pH 4.3	4.6	1.4	6	1.3
pH 4.3+50uM Al	10.3	2.1	12.4	1.2

	Dap		Total	SD
	1° Lavado	2° Lavado		
pH 6.0	3.1	1.1	4.2	1
pH 4.3	2.9	0.9	3.8	1.2
pH 4.3+50uM Al	4.5	1.7	6.2	1.1

Tabla 25. Poliaminas conjugadas solubles en BR201F

La función de estas poliaminas conjugadas no está clara todavía. En otros casos se ha propuesto una correlación entre la acumulación de estos compuestos y los ataques por patógenos. Esto podría relacionarse con un estado general defensivo. Por otro lado las poliaminas conjugadas no tienen ningún efecto en los procesos de división celular (Bagni *et al.*, 1994).

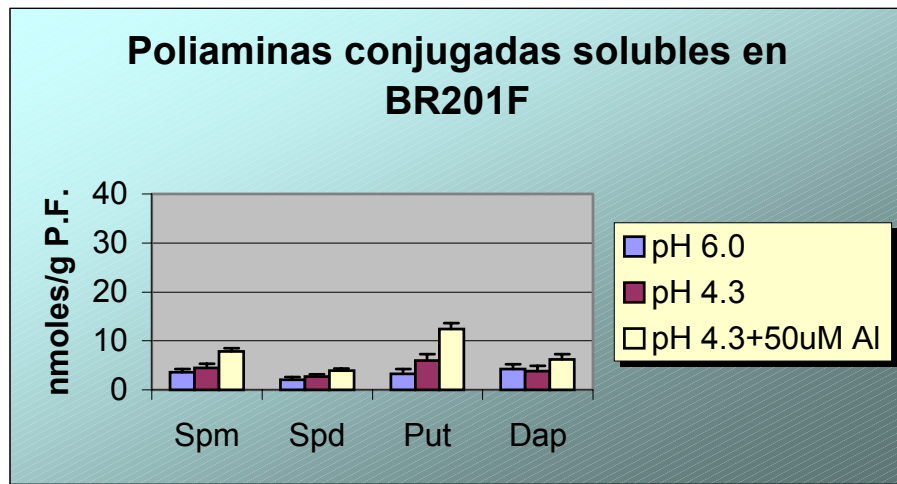


Fig. 52. Poliaminas conjugadas solubles en BR201F

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	3.6 ± 0.7 ^a	2.1 ± 0.5 ^a	3.3 ± 0.9 ^a	4.2 ± 1 ^a
pH 4.3	4.5 ± 0.8 ^a	2.7 ± 0.5 ^a	6 ± 1.3 ^b	3.8 ± 1.15 ^a
pH 4.3+50uM Al	7.8 ± 0.7 ^b	3.9 ± 0.5 ^b	12.4 ± 1.2 ^c	6.2 ± 1.1 ^b

Tabla 26. Poliaminas conjugadas solubles en BR201F

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

3.3. POLIAMINAS LIGADAS

En este trabajo consideramos poliaminas ligadas a todas aquellas poliaminas que se encuentran unidas a moléculas que hacen que se sitúen en la fracción insoluble al TCA y que son liberadas mediante una hidrólisis ácida.

En este caso sí que hay unos niveles y un comportamiento homogéneo dentro de cada grupo (sensibles o tolerantes al aluminio). En las variedades tolerantes nos encontramos niveles preexistentes de poliaminas altos y en cambio en las variedades sensibles los niveles de poliaminas ligadas preexistentes en los controles son tan bajos que incluso de alguna poliamina no llegan a detectarse.

Dentro de las variedades tolerantes, ADOUR250 es la que presenta valores más elevados, mientras que en BR201M los valores son ligeramente inferiores. Las dos variedades presentan un comportamiento o patrón idéntico frente a la toxicidad por Al o H⁺. Encontramos gran cantidad de las cuatro poliaminas ligadas, pero hay que destacar los altos niveles de Spm y también de Spd. En los tratamientos con aluminio, Spm y Spd aumentan ligeramente, mientras que Put y Dap disminuyen. Podríamos pensar, pues que los aumentos de Spm y Spd pueden venir por la disminución de su degradación a Dap o por el aumento de utilización de Put para la síntesis de Spm y Spd.

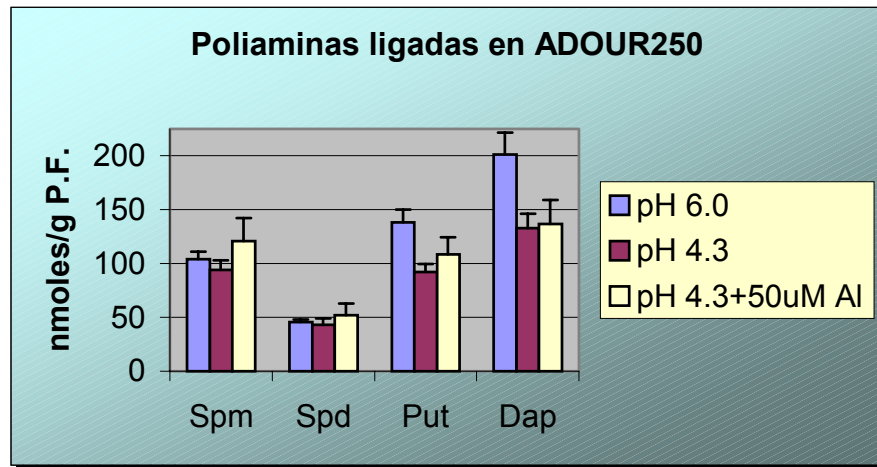


Fig. 53. Poliaminas ligadas en ADOUR250

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	104.1 ± 6.8 ^a	45.78 ± 2.4 ^a	138.08 ± 12.3 ^a	201.04 ± 20.3 ^a
pH 4.3	94 ± 9.3 ^a	43.29 ± 5.7 ^a	92.25 ± 7.5 ^b	132.7 ± 13.4 ^b
pH 4.3+50uM Al	121.03 ± 21 ^a	51.91 ± 10.91 ^a	108.32 ± 16.3 ^{ab}	136.8 ± 22.4 ^b

Tabla 27. Poliaminas ligadas en ADOUR250

Valores de la media \pm s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

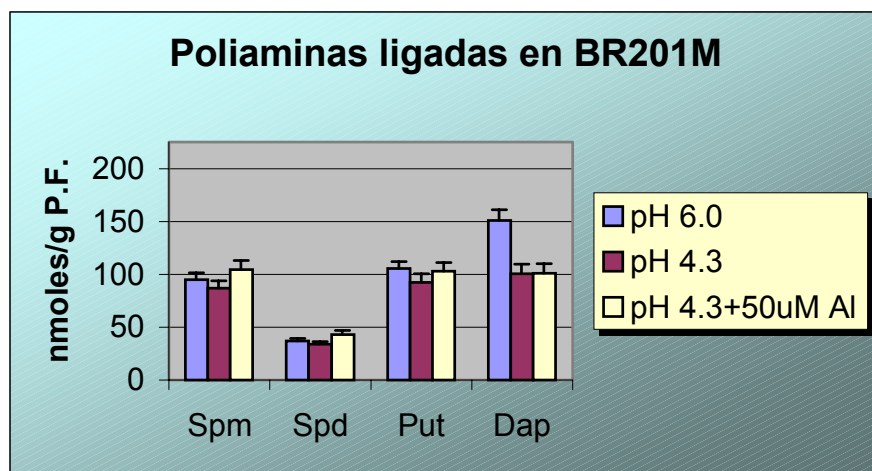


Fig. 54. Poliaminas ligadas en BR201M

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	95 ± 6.3 ^a	37 ± 2.1 ^a	105.2 ± 6.7 ^a	150.6 ± 10.2 ^a
pH 4.3	87 ± 6.7 ^a	33.9 ± 2.6 ^a	92.4 ± 7.8 ^a	100.3 ± 9.3 ^b
pH 4.3+50uM Al	104.3 ± 8.9 ^a	44.9 ± 4.1 ^c	103.1 ± 7.8 ^a	101.1 ± 9.1 ^b

Tabla 28. Poliaminas ligadas en BR201M

Valores de la media \pm s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

En las variedades sensibles, los niveles de poliaminas ligadas son extremadamente bajos, especialmente en HS7777, variedad en la que ni siquiera detectamos Spm. Los niveles de poliaminas ligadas de las tres variedades tienen el mismo perfil, niveles bajos de Spm y Spd en el control a pH 6.0 y aumentos no significativos en los tratamientos a pH ácido y con aluminio. En el caso de la Put, aumenta en HS7777 y en BR201F de manera significativa y se mantiene en HS701B. El Dap se mantiene bajo en

HS701B y en BR201F, acorde con los bajos niveles de Spm y Spd. Parece que no hay Spm y Spd no porque se degrada todo, sino porque no se forman. En HS7777 ni siquiera encontramos Dap en los tratamientos, cosa que es de esperar ya que no hay niveles de Spm que degradar.

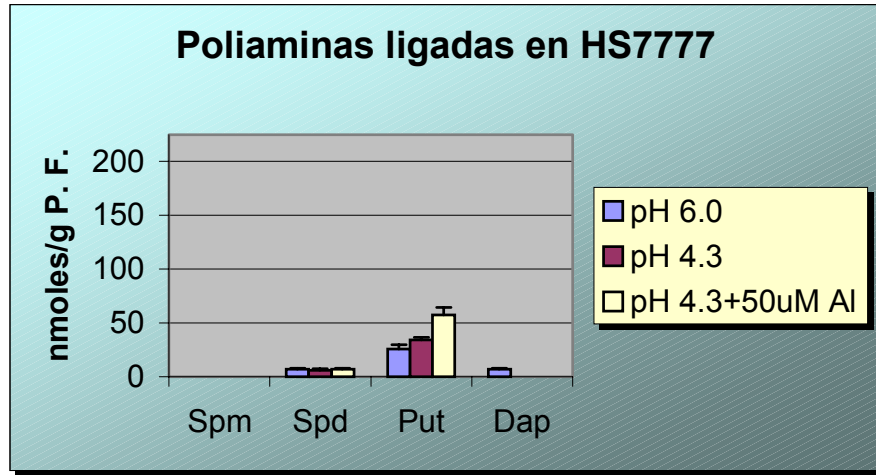


Fig. 55. Poliaminas ligadas en HS7777

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	0 \pm 0 ^a	7.1 \pm 0.9 ^a	25.56 \pm 4.3 ^a	6.74 \pm 1 ^a
pH 4.3	0 \pm 0 ^a	6.16 \pm 1.5 ^a	34.04 \pm 2.5 ^b	36.54 \pm 7.5 ^b
pH 4.3+50uM Al	0 \pm 0 ^a	7.09 \pm 0.9 ^a	57.55 \pm 6.8 ^c	64.35 \pm 13.1 ^c

Tabla 29. Poliaminas ligadas en HS7777

Valores de la media \pm s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

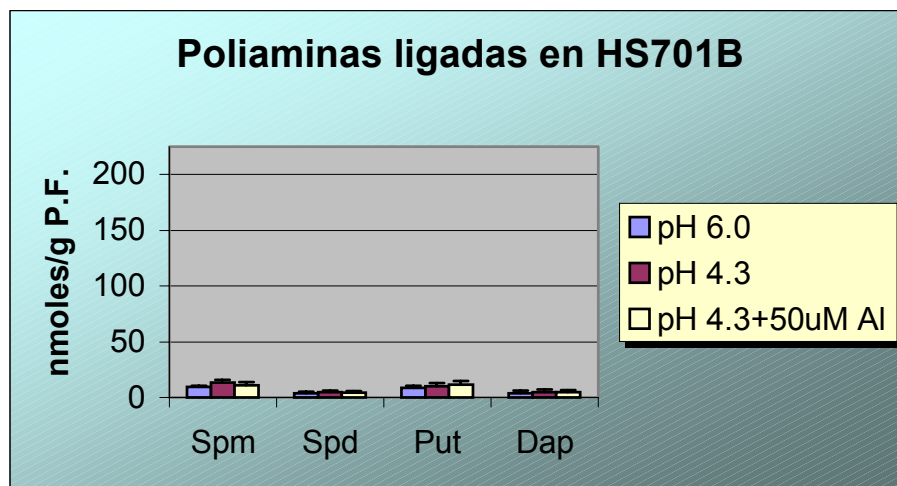


Fig. 56. Poliaminas ligadas en HS701B

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	9.6 ± 1.1 ^a	3.65 ± 1.6 ^a	8.6 ± 2.1 ^a	4 ± 2.1 ^a
pH 4.3	13.37 ± 2.2 ^b	4.7 ± 1.6 ^a	10.1 ± 3 ^a	4.8 ± 2.2 ^a
pH 4.3+50uM Al	10.98 ± 3 ^{ab}	4.2 ± 1.5 ^a	11.5 ± 3.2 ^a	4.8 ± 1.9 ^a

Tabla 30. Poliaminas ligadas en HS701B

Valores de la media ± s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

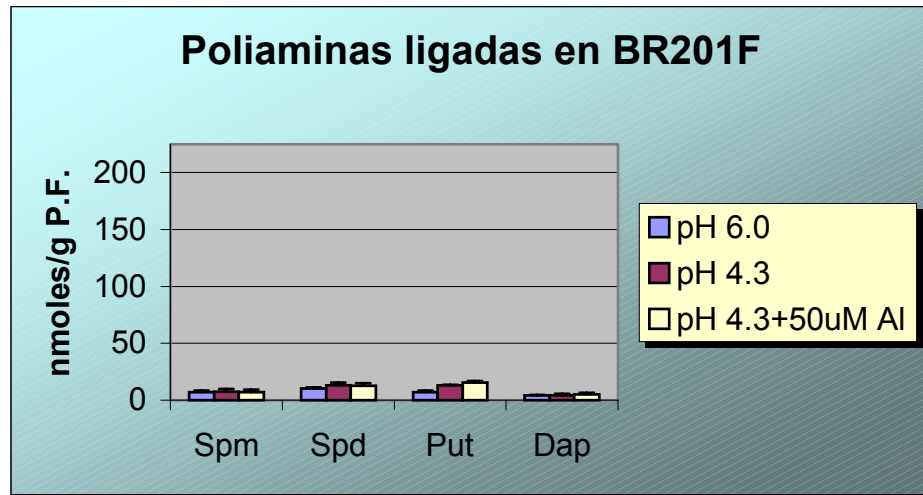


Fig. 57. Poliaminas ligadas en BR201F

	Spm	Spd	Put	Dap
pH 6.0	7.1 ± 1.3 ^a	10.1 ± 1.1 ^a	7.2 ± 1.1 ^a	4.3 ± 0.3 ^a
pH 4.3	7.6 ± 2.3 ^a	13.2 ± 2.5 ^a	13.3 ± 0.5 ^b	4.3 ± 1.1 ^a
pH 4.3+50uM Al	7.2 ± 2.1 ^a	12.5 ± 2.3 ^a	15.3 ± 1.4 ^c	5.2 ± 1.2 ^a

Tabla 31. Poliaminas ligadas en BR201F

Valores de la media \pm s.d.. Dentro de una misma columna, los valores seguidos de diferente letra presentan diferencias significativas con una $p < 0.05$

Estos valores de Spm y Spd son muy importantes ya que son las poliaminas a las que les atribuimos funciones estabilizantes y antisenescentes. La estructura de Spm y Spd las capacita para tener 3 o 4 enlaces a la vez. Esta capacidad de unión es la que concede a la molécula sus propiedades.

Las variedades sensibles tienen escasa cantidad de Spm y Spd ligado, por lo que tienen poca protección y no son capaces de incrementar sus niveles lo suficiente como para paliar los efectos.

Las variedades tolerantes tienen gran cantidad de Spm y Spd ligadas y aunque no presentan una respuesta excesiva delante de la toxicidad por pH ácido o aluminio, sus niveles preexistentes hacen que estén mejor protegidas antes de sufrir el estrés. Como los lugares de unión del Al y de las poliaminas son potencialmente los mismos, niveles más altos de poliaminas ligadas prevendrían de los posibles efectos tóxicos del aluminio.

3.4.POLIAMINAS EN EL DNA

Una vez realizados los perfiles de PAs, se eligieron dos variedades, una sensible y otra tolerante, para cuantificar las PAs que estaban unidas al DNA. Como variedad tolerante se eligió ADOUR250 y como variedad sensible HS7777.

Los resultados muestran que la variedad tolerante ADOUR250 (Fig. 58, tabla 15), presenta mayor cantidad de Spm unida al DNA en todos los tratamientos. Destaca el incremento de Spm unida en el tratamiento a pH ácido. Cuando al pH se suma el efecto del aluminio la cantidad es ligeramente inferior. Si para un correcto funcionamiento del DNA, la mayoría de grupos fosfato tienen que estar unidos a alguna molécula que

contrarreste su carga negativa, parece que la Spm es la encargada de efectuar esta función de protección cuando el pH baja. Cuando añadimos Al, la cantidad total de Spm unida al DNA desciende. Como el Al también tiene carga positiva podemos interpretar que parte del Al absorbido compite con las PAs en los lugares de unión al DNA.

En HS7777 (Fig. 59, tabla15), la cantidad de Spm unida al DNA es inferior a la de la variedad tolerante, todo y tener mayor cantidad de DNA. Los valores de Spm aumentan tanto a pH ácido como por adición de aluminio. Parece que los valores de Spm preexistentes son determinantes, ya que HS7777 presentaría en su DNA más lugares libres para la unión de Al.

nmols de Espermina unida al DNA/g P.F.			
	pH 6.0	pH 4.3	pH 4.3 + 50uM Al
ADOUR250	0.6187	0.892	0.8404
HS7777	0.5432	0.6236	0.6659

Tabla 15. Espermina unida al DNA

En los valores de Spd nos sorprende no encontrar espermidina en la variedad tolerante ya que hipotéticamente su estructura la capacita para unirse al DNA y protegerlo de posibles ataques. Parece ser que la función de protección la realiza por completo la Spm.

Hay que destacar que en el extracto de poliaminas unidas al DNA en ADOUR250 hay una molécula que se dansila que es el componente mayoritario del extracto y que se sitúa justo por debajo de la Spm. Como no corresponde a ninguno de nuestros patrones no la podemos aun identificar, pero podría ser una poliamina “no comun”.

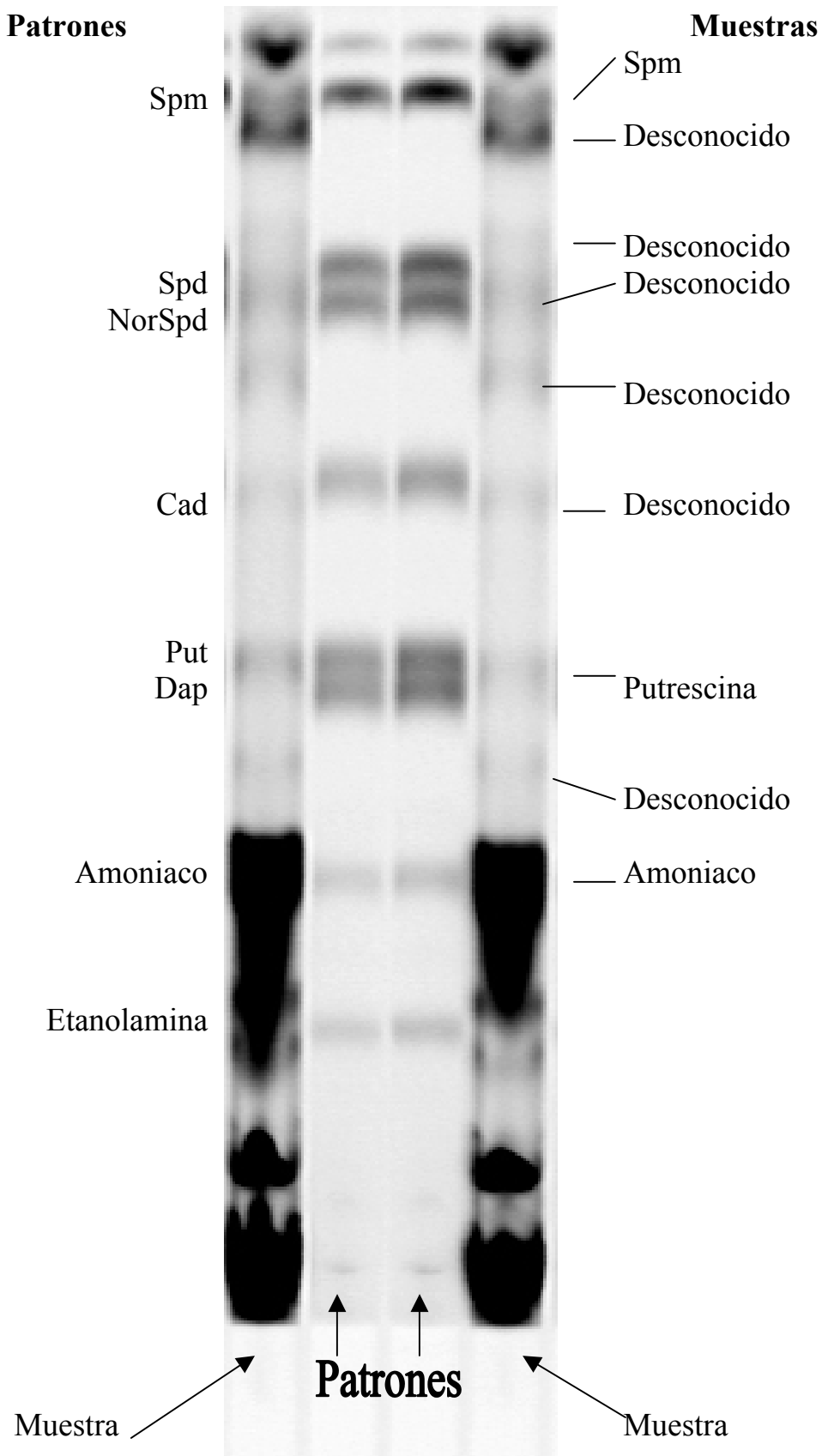


Fig. 58. Poliaminas unidas al DNA en ADOUR250

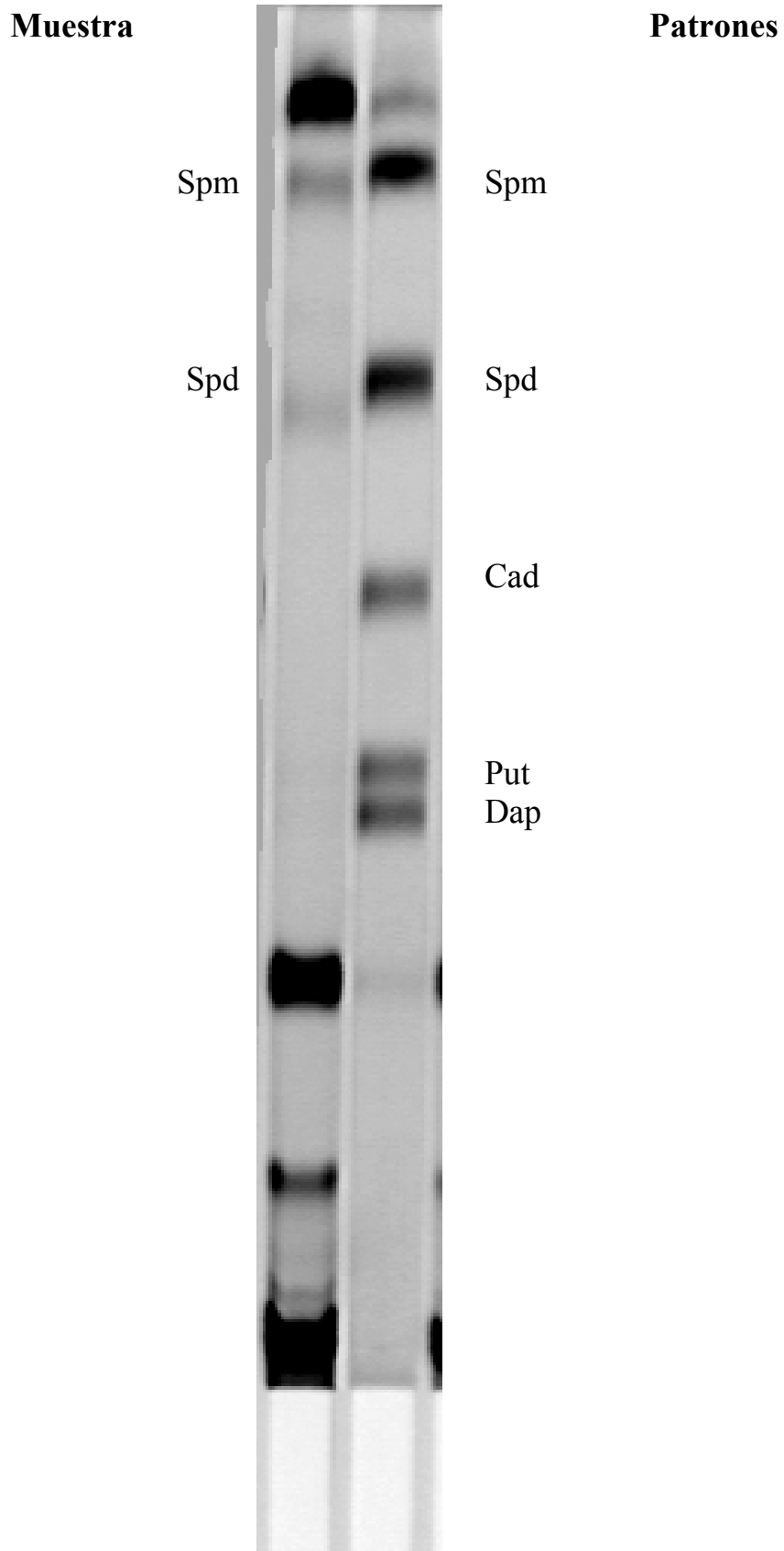


Fig. 59. Poliaminas unidas al DNA en HS7777

En HS7777 ligeros valores de Spd (tabla 16) se complementan con la Spm en la estabilización del DNA, pero en este caso los valores descienden con el pH ácido y con el aluminio. Parece pues que parte de los valores preexistentes de Spd son usados para la síntesis de Spm.

nmols de Espermidina unida al DNA/g P.F.			
	pH 6.0	pH 4.3	pH 4.3 + 50uM Al
ADOUR250	n.d.	n.d.	n.d.
HS7777	0.2101	0.1999	0.1987

Tabla 16. Espermidina unida al DNA

Una vez cuantificado el DNA de 1 g de tejido fresco (tabla 17) y extraídas las poliaminas que se encuentran en él (tablas 15 y 16), y sabiendo que aproximadamente 1 mol de Pares de Bases equivale a 630 g, podemos saber aproximadamente cada cuantos pares de bases hay una molécula de espermina (tabla 18).

ug DNA/g P.F.			
	pH 6.0	pH 4.3	pH 4.3 + 50uM Al
ADOUR250	207.83±27.2	189.72±23.6	178.15±12.2
HS7777	215.4±28.4	200.42±22.4	188.62±18.1

Tabla 17. Contenido de DNA

En la variedad tolerante ADOUR 250 vemos que a pH 6.0 hay una molécula de Spm cada 533 pares de bases. El tratamiento con pH ácido hace que la distancia se acorte un tercio (una molécula de Spm cada 337 pares de bases). El tratamiento a pH ácido más aluminio no modifica este

número. Estos valores refuerzan la idea de sensibilidad de ADOUR250 al pH ácido pero no al aluminio.

En HS7777 el número de pares de bases por cada molécula de espermina es mayor que en ADOU250 ya en el control a pH 6.0. El tratamiento con pH ácido hace que la distancia entre dos moléculas de espermina disminuya y el posterior tratamiento con aluminio hace que esta distancia aún disminuya más, pero ni siquiera en el tratamiento con aluminio llega a ser tan corta como en ADOUR250.

Pares de bases/Spm			
	pH 6.0	pH 4.3	pH 4.3 + 50uM Al
ADOUR250	533.20	337.60	336.47
HS7777	629.42	510.15	449.61

Tabla 18. Número de pares de bases por cada molécula de Spm

En tinciones por hematoxilina se ha demostrado que el aluminio penetra menos en ADOUR250 que en las variedades sensibles. Dado que el aluminio puede unirse a los grupos fosfato del DNA por interacción de carga, sería lógico pensar que parte del aluminio absorbido llegaría hasta el DNA y se formarían uniones inespecíficas, pero por el momento no se ha podido cuantificar específicamente el aluminio unido a DNA previamente extraído debido a la poca cantidad de muestra inicial (como mucho 207 μ g).

3.5.DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE SUBSTANCIAS DANSILADAS

Dado que en todos nuestros experimentos con poliaminas dansiladas encontramos que aparecen “bandas” que no se corresponden con los patrones, se decidió intentar determinar el peso molecular de estas sustancias para poder llegar a su total identificación.

Los análisis por electroespray demuestran que es un método fiable para determinar el peso molecular de las sustancias dansiladas. Para comprobar el método usamos bandas que se correspondían con patrones de poliaminas que ya usábamos. El método puede servir para corroborar el peso molecular de una sustancia o como apoyo a la determinación de la sustancia por resonancia magnética nuclear. Muchas de las poliaminas usadas en este experimento presentan un pico que corresponde a su peso molecular y otro que corresponde a la mitad de su peso molecular. Esto significa que la molécula (en este caso la PA) estaba dansilada pero protonada, por lo que su relación carga/masa desciende a la mitad. Este hecho parece un “artefacto” de el método que se usó para disolver las PAs: H₂O/CH₃CN (1:1) 1% Fórmico, y no su estado real.

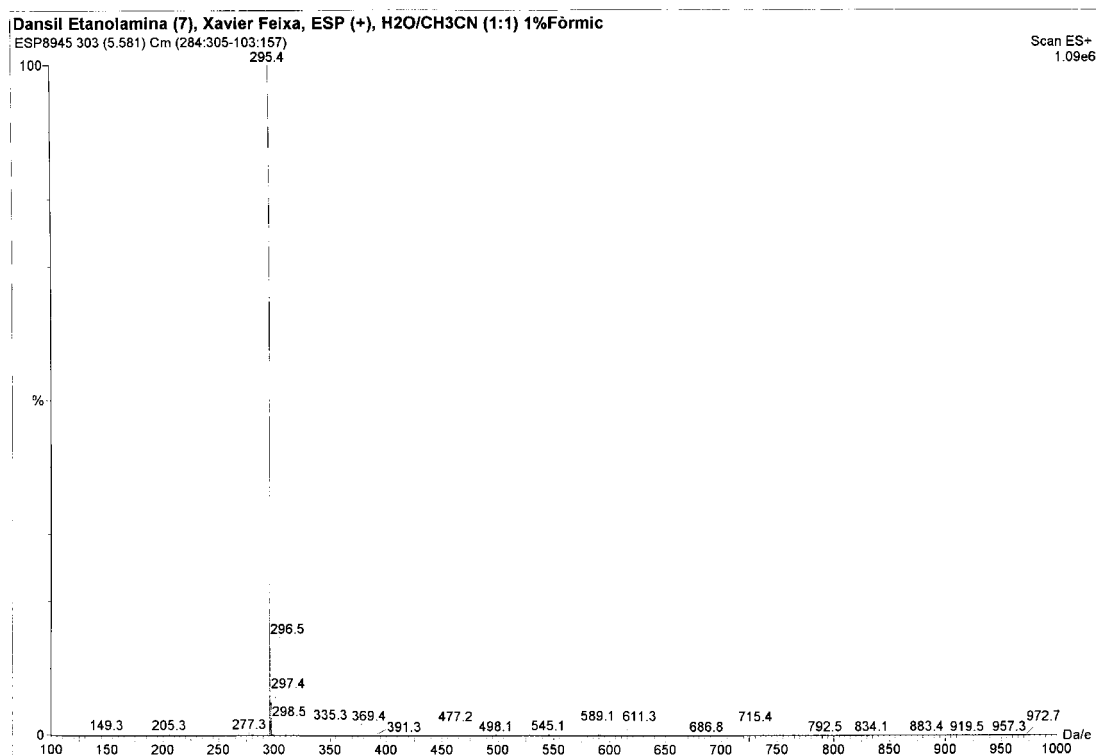
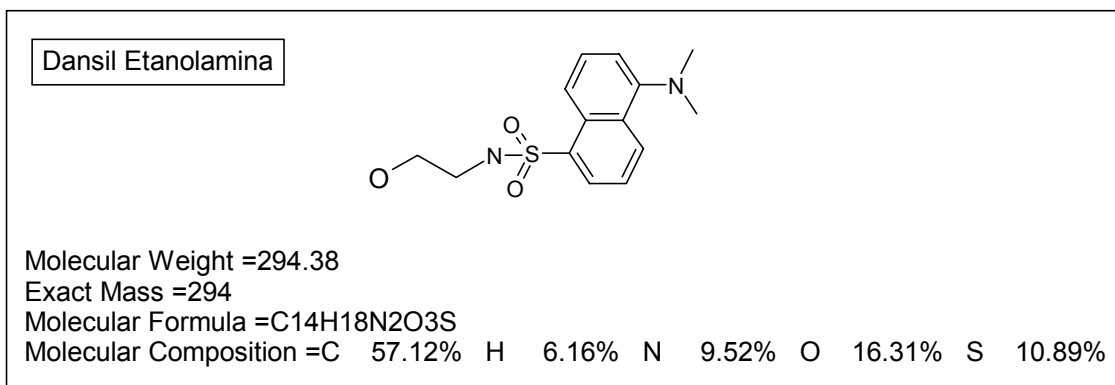
El problema que presenta este método es que la inyección para la determinación del peso molecular es en frío y directa, no hay método cromatográfico previo excepto la cromatografía de capa fina efectuada anteriormente. Este hecho es de especial relevancia ya que si la muestra presenta algún tipo de impureza, saldrá también un pico con su peso molecular y si hay más de una impureza habrá más picos y no podremos resolver cual es el peso molecular de nuestra sustancia.

Otro inconveniente que tiene es que no da información de los fragmentos que componen la molécula por lo que a pesos moleculares altos es necesaria complementar esta técnica con la de RMN, ya que hay cientos de combinaciones de elementos que pueden dar un peso molecular alto.

En nuestras muestras encontramos que Spm y Spd habían perdido alguno de sus grupos dansilo durante el proceso de su traslado hasta el centro donde se realizaron los análisis y que precisamente en la banda que correspondía a Spm había más de una sustancia, lo que nos hace pensar que

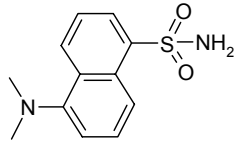
quizás estemos sobrevalorando los contenidos de Spm de las muestras, ya que parece que por enzima de un determinado peso molecular, o con según que estructura, las sustancias se sitúan en la misma posición que la Spm.

A continuación se muestran los impactos obtenidos de Etanolamina, NH₄, Dap, Put, Cad, NorSpd, Spd y Spm.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dansil Amina

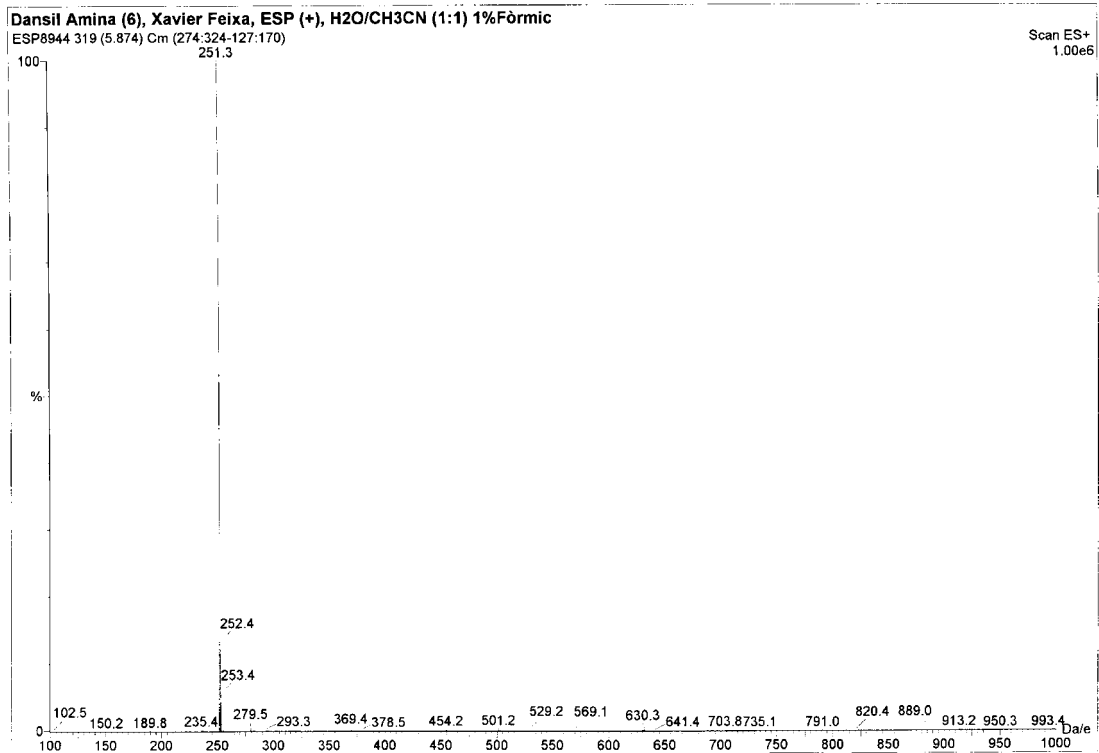


Molecular Weight =250.32

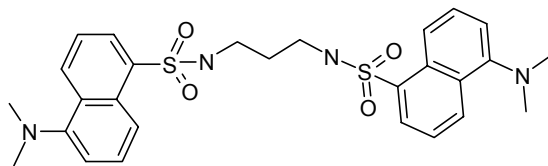
Exact Mass =250

Molecular Formula =C₁₂H₁₄N₂O₂S

Molecular Composition =C 57.58% H 5.64% N 11.19% O 12.78% S 12.81%



Didansil Diaminopropano

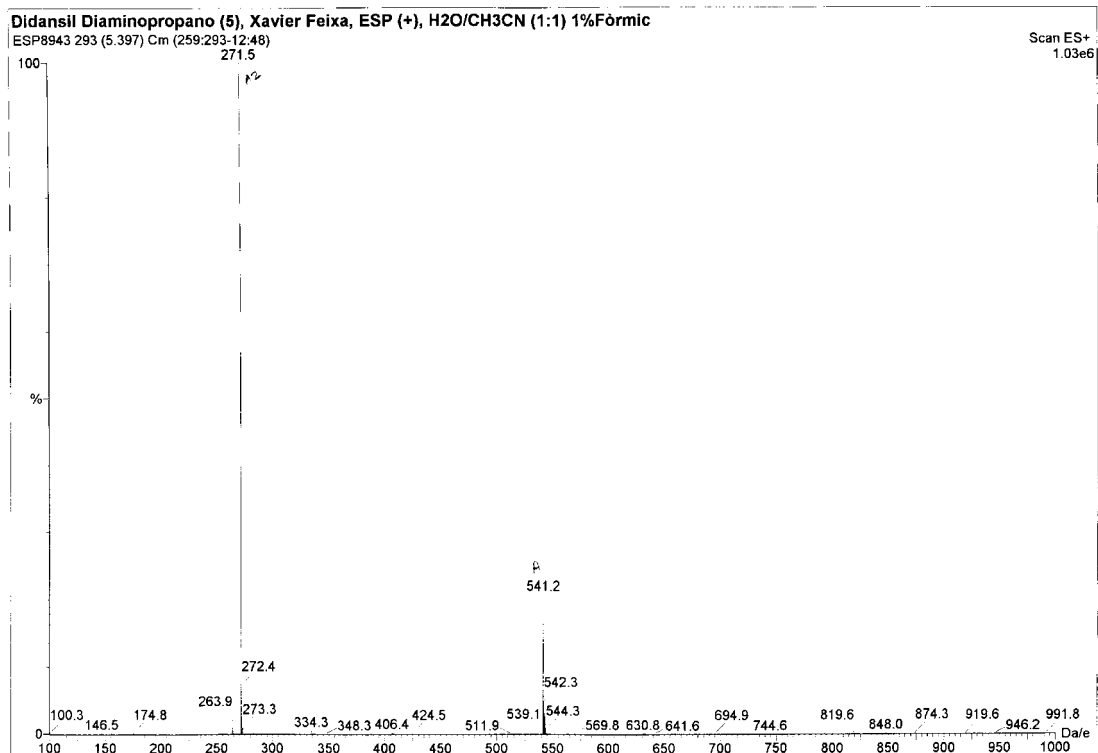


Molecular Weight =540.71

Exact Mass =540

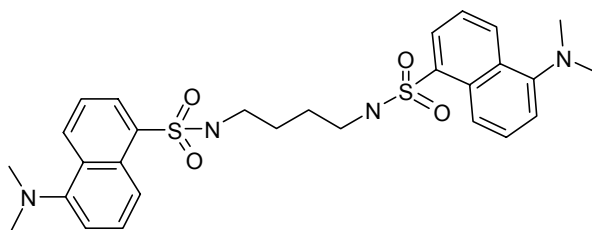
Molecular Formula =C₂₇H₃₂N₄O₄S₂

Molecular Composition =C 59.98% H 5.97% N 10.36% O 11.84% S 11.86%



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Didansil Putrescina

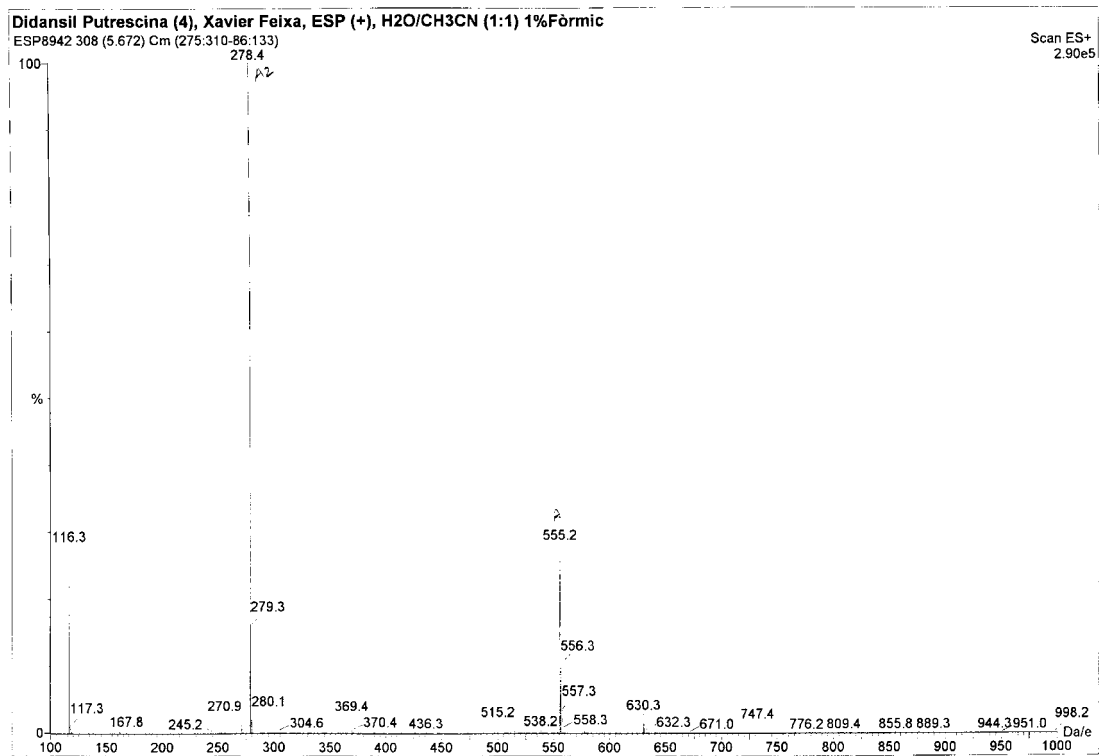


Molecular Weight =554.74

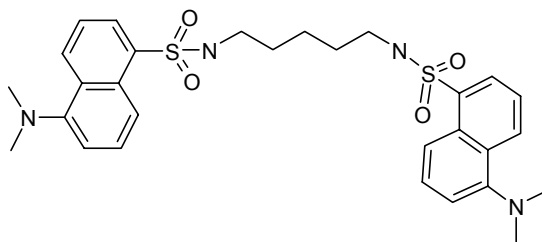
Exact Mass =554

Molecular Formula =C₂₈H₃₄N₄O₄S₂

Molecular Composition =C 60.63% H 6.18% N 10.10% O 11.54% S 11.56%



Didansil Cadaverina



Molecular Weight =568.76

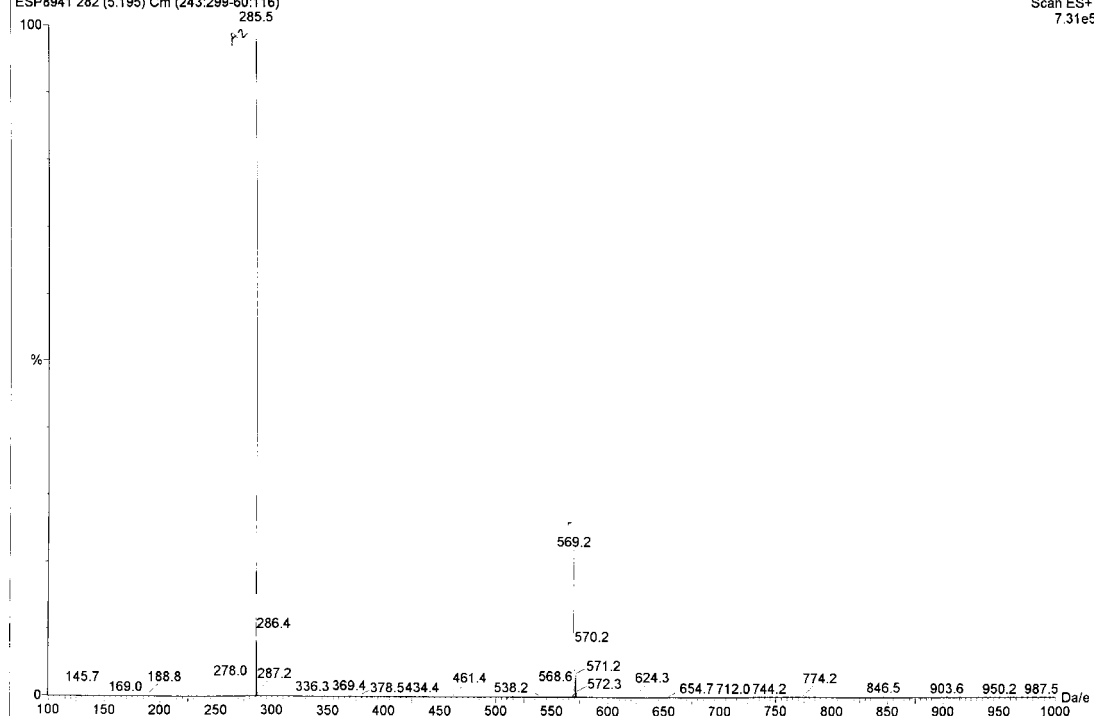
Exact Mass =568

Molecular Formula =C₂₉H₃₆N₄O₄S₂

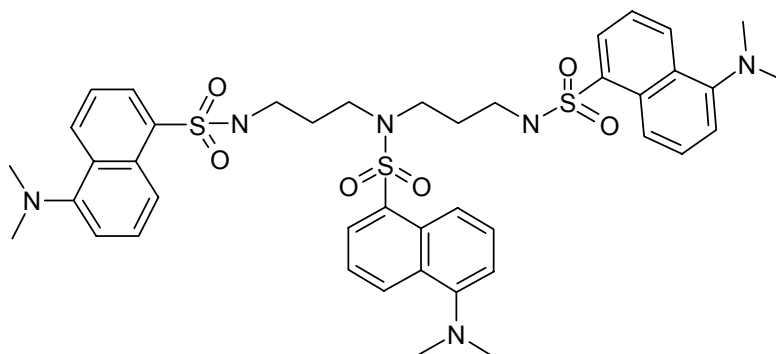
Molecular Composition =C 61.24% H 6.38% N 9.85% O 11.25% S 11.28%

Didansil Cadaverina (3), Xavier Feixa, ESP (+), H₂O/CH₃CN (1:1) 1% Fòrmic
 ESP8941 282 (5.195) Cm (243.299-60.116)

Scan ES+
 7.31e5



Tridansil Nor-Espermidina

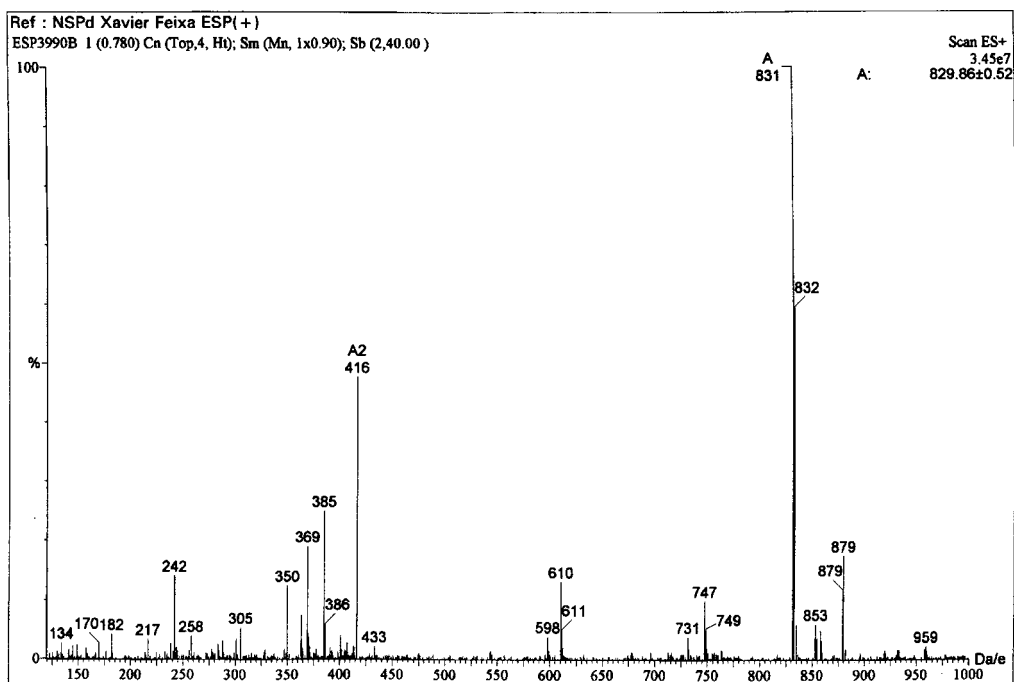


Molecular Weight =831.10

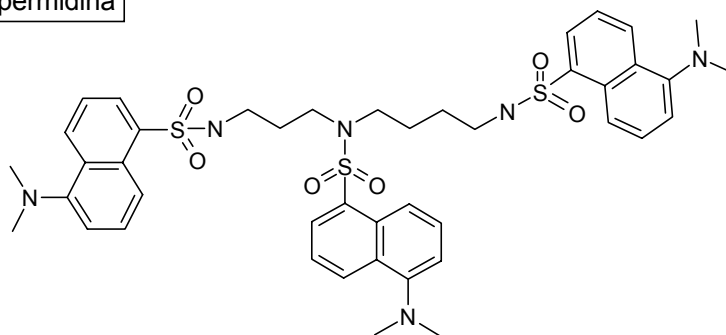
Exact Mass =830

Molecular Formula =C₄₂H₅₀N₆O₆S₃

Molecular Composition =C 60.70% H 6.06% N 10.11% O 11.55% S 11.57%



Tridansil Espermidina

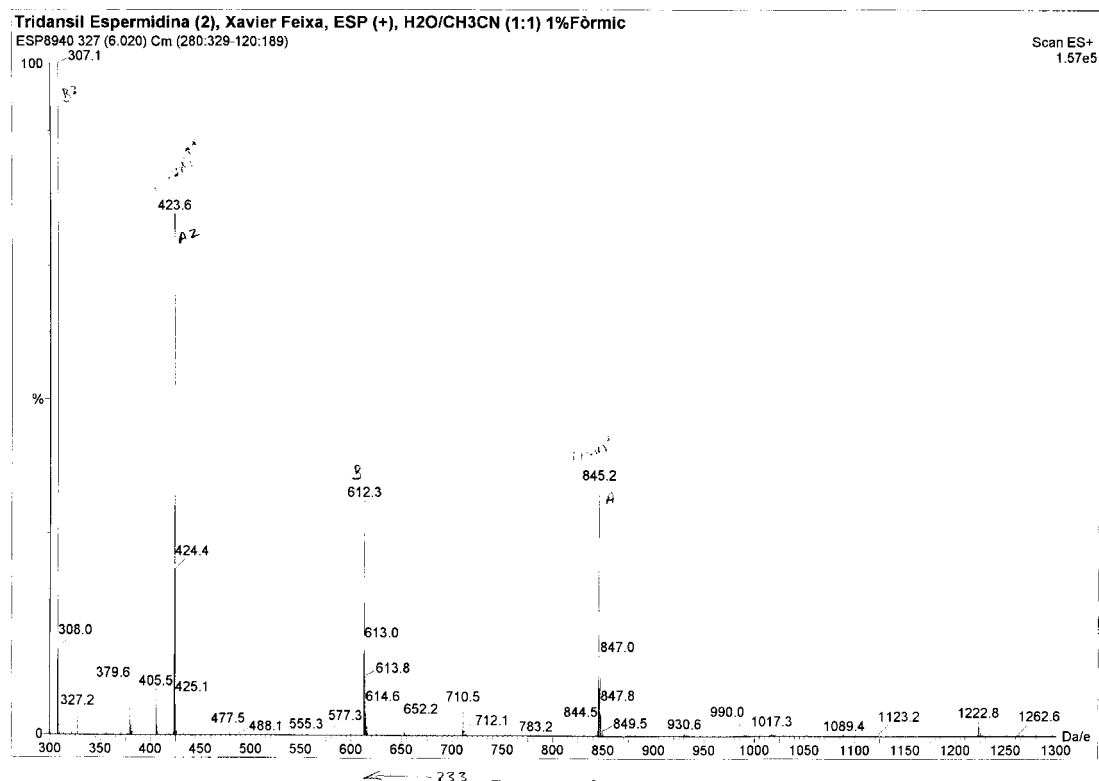


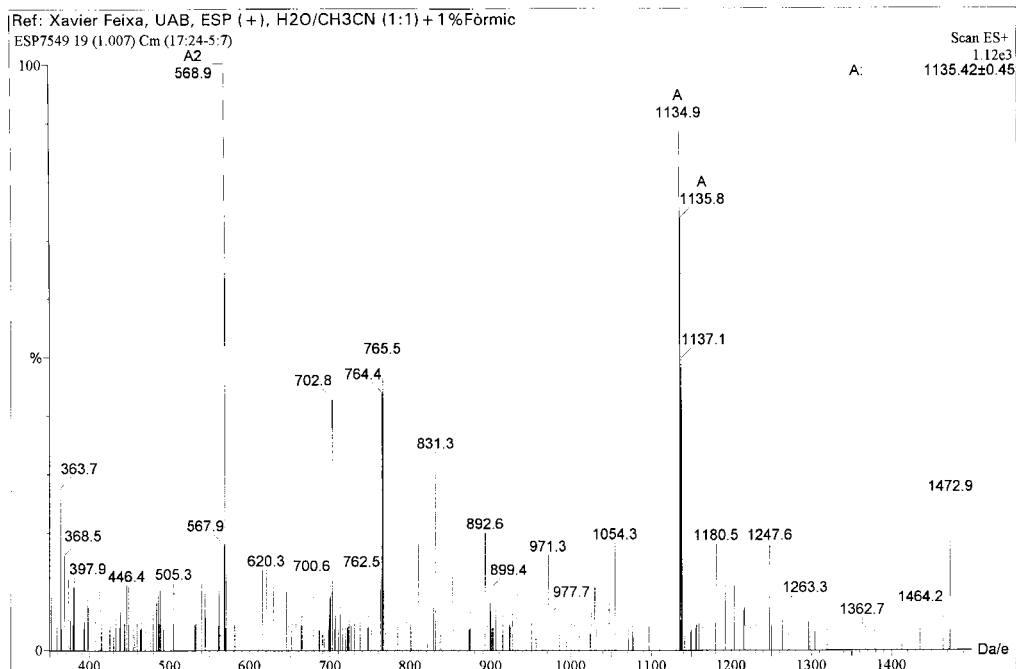
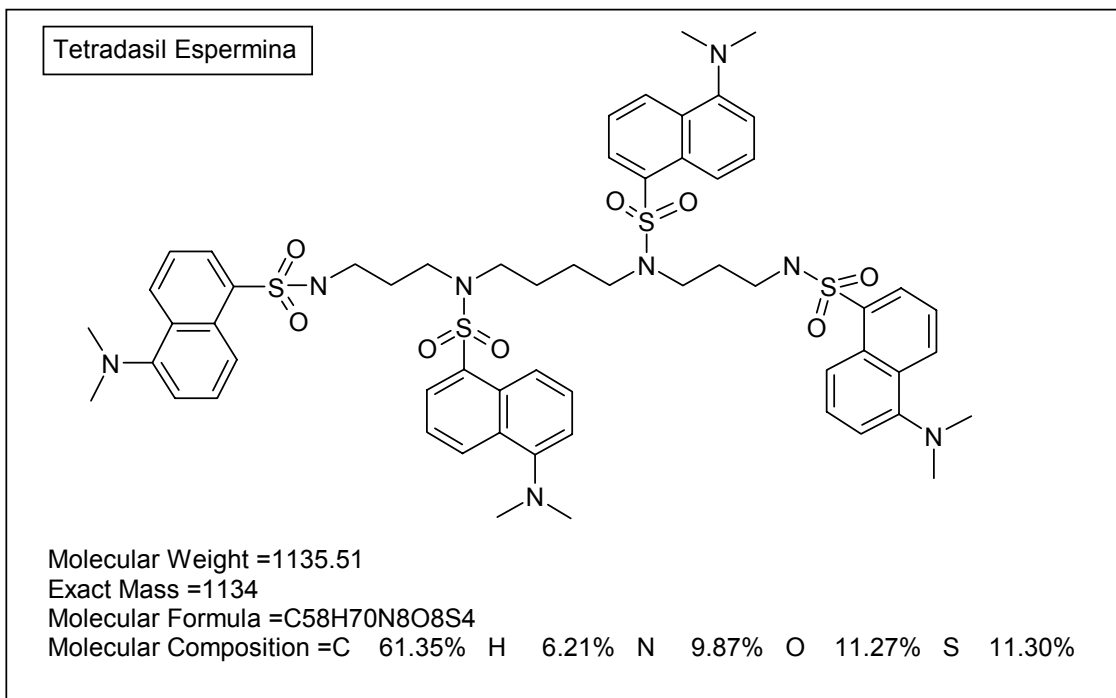
Molecular Weight =845.12

Exact Mass =844

Molecular Formula =C₄₃H₅₂N₆O₆S₃

Molecular Composition =C 61.11% H 6.20% N 9.94% O 11.36% S 11.38%





V.-CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Los perfiles de PAs de las plantas no tratadas pueden servir de indicadores de la tolerancia de nuestras variedades a pH ácido y tratamiento con aluminio.
2. Las variedades tolerantes utilizadas presentan niveles altos de poliaminas libres ya en los controles, y los tratamientos con pH ácido o Al no producen aumentos significativos.
3. Las PAs libres de las variedades sensibles estudiadas aumentan significativamente con el tratamiento con pH ácido o aluminio. Siendo Put y Dap los que presentan mayor respuesta.
4. Los niveles de PAs y los coeficientes calculados son buenos indicadores de las variaciones que producen los tratamientos, pudiéndose diferenciar entre sí.
5. En ADOUR250 y BR201M la ruta metabólica que forma Spm a partir de Put no se encuentra desplazada hacia ningún lado ya que encontramos niveles similares de Put, Spd y Spm incluso en los tratamientos con pH ácido y Al.
6. En nuestras variedades los niveles totales de poliaminas libres (Spm+Spd+Put+Dap) pueden servir de indicador de tolerancia al pH o Al ya que en ADOUR250 y BR201M son altos y se mantienen constantes frente al pH ácido o al Al. Mientras que en las variedades sensibles son bajos y se incrementan con los tratamientos.
7. Según nuestros resultados las variedades sensibles presentan niveles de PAs conjugadas superiores que las tolerantes y el pH ácido o el Al provoca aumentos significativos de esta fracción.

8. Los niveles preexistentes de PAs ligadas en las variedades tolerantes estudiadas son altos, mientras en las variedades sensibles son casi inexistentes.
9. El tratamiento con pH ácido provoca en las variedades tolerantes una bajada de los niveles de todas las PAs ligadas. La adición de Al a estas plantas tratadas con pH ácido reduce un poco los efectos.
10. Las PAs ligadas de nuestras variedades sensibles nunca alcanzan valores significativos como para reducir los efectos del aluminio.
11. El tratamiento con pH ácido o con aluminio provoca una disminución progresiva de los niveles de DNA existentes en el control a pH 6.0 en todas las variedades estudiadas.
12. La variedad ADOUR250 (tolerante) parece tener su DNA mejor protegido por PAs que HS7777 (sensible). Presenta valores muy superiores de Spm ligada a DNA que HS7777 ya que con cantidades inferiores de DNA/g P.F., presenta mayor cantidad de Spm ligada.
13. Pese a tener menor cantidad de DNA en los tratamientos a pH ácido, la cantidad de PAs unidas a este aumenta en las dos variedades estudiadas.
14. La determinación del peso molecular por electrospray es un método nuevo que parece ser útil en todas las poliaminas analizadas estudiadas.

VI. - BIBLIOGRAFIA

VI. BIBLIOGRAFIA

Adiga, R. C.; Prasad, G. L. (1985) Biosynthesis and regulation of polyamines in higher plants. *Plant Growth Regulation*. 3; 205-226.

Alam, S. M.; Adams, W. A. (1979) Effects of aluminium on nutrient composition and yield of oat. *Journal of Plant Nutrition*. 1; 365-375

Altman, A.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, A. W. (1977) Stabilization of oat leaf protoplast through polyamine mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol*. 60; 570-574.

Antognoni, F.; Fornalè, S.; Grimer, C.; Komor, E.; Bagni, N. (1998) Long distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta*. 204; 520-527.

Apelbaum, A.; Goldlust, A.; Ickson, I. (1985) Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in Pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol*. 79; 635-640.

Bacharach, U. (1973) Function of the naturally occurring polyamines; Academic Press, New York.

Baes, C. F. and Mesmer, R. E. (1976) The Hydrolysis of Cations; John Wiley & Sons. New York, 112

Bagni, N.; Baraldi, R.; Costa, G. (1984) Uptake, translocation and metabolism of aliphatic polyamines in leaves and fruitlets of *Malus domestica* (cv "Ruby supr"). *Acta Hortic*. 149; 173-178.

Bagni, N.; Pistocchi, R. (1985) Putrescine uptake in *Saintpaulia* petals. *Plant Physiol*. 77; 398-402.

Bagni, N.; Creus, J. A.; Pistocchi, R. (1986) Distribution of cadaverine and lysine decarboxylase activity in *Nicotiana glauca* plants. J. Plant Physiol. 125; 9-15.

Bagni, N.; Scaramagli, S.; Bueno, M.; Della Mea, M.; Torrigiani, P. (1994) Which is the active form of polyamines in plants? In: Caldarera CM, Clò C, Moruzzi MS (eds) Polyamines: biological and clinical aspects. CLUEB, Bologna, 131-137.

Bagni, N.; Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. Amino Acids. 20; 301-317.

Barceló, J.; Poschenrieder, Ch. (1992) Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo y Planta. 2; 345-361.

Barceló, J.; Poschenrieder, Ch.; Vazquez, M. D.; Gunsé, B. (1996) Aluminium phytotoxicity. Fer. Res. 43; 217-223.

Basu, A.; Basu, U.; Taylor, G. J. (1994) Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. Plant Physiol. 104; 1007-1013.

Basu, U.; Basu, A.; Taylor G. J. (1994) Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. Plant Physiol. 106; 151-158.

Basu, U.; Good, A. G.; Aung, Taing, A.; Slaski, J. J.; Basu, A.; Briggs, K. G.; Taylor, G. J. (1999) A 23-kDa, root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. Physiologia Plantarum. 106; 53-61.

Bell, E.; Malmberg, R. L. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding arginine decarboxylase from oats. In: Polyamines and ethylene: biochemistry, physiology and interactions. Eds. Flores, H. *et al.*, Eds. American Society of Plants Physiologists. 251-255.

Bennet, R. J.; Breen, C. M. (1991) Then recovery of roots of *Zea mays* L. from various aluminium treatments: towards elucidating the regulatory processes that underline root growth control. *Environ. Exp. Bot.*, 31; 153-163.

Bennet, R. J.; Breen, C. M. (1985a) Aluminium uptake sites in the primary root of *Zea mays* L. *Afric. J. of Plant Soil.* 2; (1) 1-6.

Bennet, R. J.; Breen, C. M.; Fey, M. V. (1985b) Aluminium induced changes in the morphology of the quiescent centre, proximal meristem and growth region of the root of *Zea mays* L. *Afric. J. of Bot.* 51; (5), 355-262.

Bennet, R. J.; Breen C. M.; Fey, M. V. (1987) The effects of aluminium on root cap function and development in *Zea mays* L. *Environ. Experimental Botany.* 27; 91-204.

Berger, S. (1987) Quantifying ³²P-labeled and unlabeled nucleic acids. *Methods Enzymol.* 152; 49-54.

Berlin, J.; Forche, E. (1981) DL- α -difluoromethylornithine causes enlargement of cultured tobacco cells; *Z. Pflanzen. Physiol.* 101; 272-282.

Blamey, F. P. C.; Asher, C. J.; Kelven, G. L.; Edwards, D. G. (1993) Factors affecting aluminium sorption by Calcium pectate. *Plant and Soil.* 149; 87-94.

Bloomfield, V. A.; Wilson, R. W. (1981) Interaction of polyamines with polynucleotides. In: Polyamines in biology and medicine; Morris, D. A. & Marton, L. J., Eds., Marcel Dekker, New York, 183.

Bollard, E. G. (1983) Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition; Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, 15, A. Lläuchli & R. L. Bielski (eds)

Bors, W.; Langebartels, C.; Michel, C.; Sandermann, H. (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*. 28; 1589-1595.

Brabford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72; 248-254.

Breckle, S. W. (1989) Growth under stress: Heavy Metals. In: The root system, the hidden half; Y. Waisel, V. Kafkafi, A. Eshel (eds.), Marcel Dekker, New York.

Bregoli, A. M.; Del Duca, S.; Bergamini, S.; Serafini-Fracassini, D. (1994) In: Proceedings of the Fourth International Conference on Transglutaminase and protein crosslinking reactions. Debrecen, Hungary, 68.

Budíková, S. (1999) Structural changes and aluminium distribution in maize root tissues. *Biologia Plantarum*. 42 (2); 259-266

Caffaro, S.; Scaramagli, S.; Antognioni, F; Bagni, N. (1993) Polyamine content translocation in soybean plants. *J. Plant Physiol*. 141; 563-568.

Caldwell, C. R.; Haug, A (1982) Divalent cation inhibition of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} -ATPase activity and its reversal by monovalent cations. *Physiologia Plantarum*. 54; 112.

Chaudhuri, M. M.; Ghosh, B. (1982) Purification and partial characterization of arginine decarboxylase from rice embryos *Oryza sativa*. *Arg. biol. Chem.* 46; 739-743.

Chaudhuri, M. M.; Ghosh, B. (1985) Agmatine diamine in rice seedlings. *Phytochemistry*. 24; 2433-2435.

Chenery, E. M. (1948) Aluminium in the plant world. Part I. *Kew Bull.* 2; 173-183.

Cheng, S. H.; Shyr, Y. Y.; Kao, C. H. (1984) Senescence of rice leaves. XII. Effects of 1,3-diaminopropane, spermine and spermidine; *Bot. Bull. Acad. Sin.* 25; 191-196.

Clark, R. B. (1982) Plant response to mineral element toxicity and deficiency breeding plants for less favorable environments; M. N. Christiansen and C. F. Lewis (eds.), *John Wiley and sons*, New York, 71-142.

Clarkson, D. T. (1965) The effect of Aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annual Bot.* 29; 309-315.

Clarkson, D. T. (1966) Effect of aluminium on the uptake and metabolism of phosphorus by barley seedlings. *Plant Physiol.* 41; 165-173.

Clarkson, D. T. (1969) Metabolic aspects of aluminium toxicity and deficiency breeding plants for less favorable environments; M. N.

Christiansen and C. F. Lewis (eds.), John Wiley and sons, New York. 71-142.

Cullis, P. R.; Kruijff, B. (1979) Lipid polymorphism and the functional role of lipids in biological membranes. *Bioch. Biophys. Acta.* 559; 339-420.

Cumming, J. R.; Ecbert, R. T.; Evans, L. S. (1985) Effect of aluminium on K uptake by red spruce seedling. *Can. J. of Bot.* 63; (6), 1099-1103.

Dai, Y. R.; Kaur- Sawhney, R.; Galston, A. W. (1982) Promotion by gibberellic acid of polyamine biosynthesis in internodes of light-grown dwarf peas. *Plant Physiol.* 69; 103-105.

Davies, P. J. (1987) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In: *Plant hormones and their role in plant growth and development*; P. J. Davies, (ed), A1, Boston: Martinus Nijhoff.

De Agazio, M.; Zacchini, M.; Federico, R.; Grego, S. (1995) Putrescine accumulation in maize roots treated with spermidine: evidence for spermidine to putrescine conversion. *Plant Sci.* 111; 181-185.

Del Duca, S.; Tidu, V.; Bassi, R.; Esposito, C.; Serafini-Fracassini, D. (1994) Identification of chlorophyll-*a b* proteins as substrates of transglutaminase activity in isolated chloroplasts of *Helianthus tuberosus* L. *Planta.* 193; 283-289.

Devine, T. E. (1982) Genetic fitting of crops to problem soils, In: *Bleeding Plants for less favorable environments.* M. N. Christiansen & L. W. Lewis (eds); John Wiley & Sons, New York.

Dinella, C.; Creus, J. A.; D'Orazi, D.; Encuentra, A.; Gavalda, E. G.; Serafini-Fracassini, D. (1992) Quantification of polyamine losses during manipulation and assay procedures. *Phytochemical Analysis*. 3; 110-116

D'Oragi, D.; Bagni, N. (1987) In vitro interactions between polyamines and peptic substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148; 1259-1263.

Driscoll, C. T.; Schecher, W. D. (1988) Aluminium in the Enviroment. In: *Metal Ions in Biological Systems*. vol. 24. Aluminium and its Role in Biology; H. Siegel & A. Siegel (eds). Marcel Dekker, Inc. New York. 59-122.

Drolet, G.; Dumbroff, E. B.; Legge, R. L.; Thompson, J. E. (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*. 25; 367-371.

Encuentra, A. (1995) Variaciones en los niveles de poliaminas y proteínas en *Phaseolus vulgaris* tratada con cadmio; Tesis Doctoral (UAB).

Evans, P. T.; Malmberg (1989) Do polyamines have roles in plant development?. *Plant Physiol., Annu. Rev., Plant Mol. Biol.* 40; 235-269.

Even-Chen, Z; Mattoo, A. K.; Goren, R. (1982) Inhibition of ethilene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from C¹⁴-Methionine into spermidine in a aged orange peel discs. *Plant Physiol.* 69; 385-388.

Feurstein, B. G.; Marton, L. J. (1989) Specificity and binding in polyamine/nucleic acid interactions. In: *The physiology of polyamines*, vol II, Bachrach, U. & Heimer, Y. M. (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida.

Feurstein, B. G.; Pattabiraman, N.; Marton, L. (1990) Molecular mechanics of the interaction of spermine with DNA: DNA bending as a result of ligand binding. *Nucleic Acids Research*. 18; (5), 1271-1282.

Figueras, X. (1991) Las poliaminas como marcadores de la diferenciación en células vegetales; Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Flores, H. E.; Filner, P. (1985a) 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. Neuman, W. Barz and Reinhard, eds. Springer-Verlag. Berlin. 174-185.

Flores, H. E.; Filner, P. (1985b) Polyamine catabolism in higher plants characterization of pyrroline dehidrogenase. *Plant Growth Regulation*. 3; 277-291.

Flores, H. E.; Galston, A. W. (1982) Polyamine and plant stress: Activation of putrescine biosynthesis by osmotic shock. *Science*. 217; 1259-1261.

Flores, H. E.; Galston, A. W. (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves. *Plant Physiol*. 75; 102-109.

Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. (1978) The physiology of metal toxicity in plants. *Ann. Rev. Plant Phys.* 29; 511-566.

Foy, C. D. (1984) Physiological effects of hidrogen, aluminium and manganese toxicities in acid soil. In: *Soil Acidity and Liming*; 2^a ed. F. Adams (ed). ASA. CSA-SSSA. Publisher. Madison, Wisconsin, 57-97.

Friedman, R; Levin, N; Altman, A. (1986) Presence and identification of polyamines in xylem and phloem exudates of plants. *Plant Physiol.* 82; 1154-1157.

Galston, A. W. (1983) Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience.* 33; 382-388.

Galston, A. W.; Kaur-Sawhney, R. (1987) Polyamines as endogenous growth substances. *Plant Physiol.* 86; 338-340.

Galston, A. W.; Kaur-Sawhney, R. (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94; 406-410.

Gallager, R. (1994) Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. In: *Current protocols in molecular biology* (eds. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl). A.3D.1-A.3D.8. John Wiley & Sons, Chichester (UK).

Gallego, F. (1994) Dinàmica nucleosomal durant l'etapa d'elongació de la transcripció *in vitro* de cromatina. Tesis doctoral. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Gavaldà, E. (1994) Poliamines lligades a àcids nucleics en plantes de fesolera tractades amb crom; Tesis Doctoral (UAB).

Gillyon, C.; Haywood, G.; Large, P.; Nellen, B.; Robertson, A. (1987) Putrescine breakdown in the yeast *Candida bondinii*: subcellular location of some of the enzymes involved and properties of two acetamidoaldehyde dehydrogenases. *J. Gen Microbiol.* 133; 2477-2485.

Goldberg, R.; Perdrizet, E. (1984) Ratio of free to bound polyamines during maturation in mung-bean hypocotyl cells. *Planta.* 161; 531-535.

Green, D. E.; Fry, M.; Bloning, G. A. (1980) Phospholipids as molecular carriers of ion and solute transport in biological membranes; Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 77; 257-261.

Greenberg, M. L.; Cohen, S. S. (1985) Dicyclohexylamine-induced shift of biosynthesis from spermidine to spermine in plant protoplasts. Plant Physiol. 78; 568-575.

Grimes, H. D.; Slocum, R. D.; Boss, W. F. (1986) α -Difluoromethylarginine treatment inhibits protoplast fusion in fusogenic wild carrot protoplast. Biochem. Biophys. Acta. 886; 130-134.

Guevara, P.; Poschenrieder, Ch.; Barceló, J. (1992) Differential response of four maize (*Zea mays* L.) Varieties to aluminium toxicity. Suelo y Planta. 2; 713-721.

Gunsé, B; Poschenrieder, Ch.; Barceló, J. (1997) Water transport properties of roots and cortical cells in proton- and aluminium- stressed maize varieties. Plant Physiol. 113; 595-602.

Haug, A. (1984) Molecular Aspects of Aluminium Toxicity; CRC Critical Reviews in Plant Sciences. 1; (4) 345-373.

Heimer, Y.; Mizrahi; Bachrach, U. (1979) Ornithine decarboxylase activity in rapidly proliferation plant cells; FEBS Lett. 104; 146-149.

Hiatt, A. (1989) Polyamine synthesis in maize cell lines. Plant Physiol. 90; 1378-1381.

Horst, W. J.; Wagner, A.; Marscher, H. (1983) Effect of aluminium on root growth, cell division rate and mineral element contents in roots of *Vigna unguiculata* genotypes. Z. Pflanzenphysiology. 109; 95-103.

Horst, W. J.; Marscher, H. (1993) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Limited, eds. Great Britain.

Horst, W. J. (1995) The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd.* 158; 419-428.

Huttová, L.; Tamás, L.; Mistrík, I. (1998) Quantitative changes in maize cytoplasmic proteins induced by aluminium. *Biologia Plantarum.* 41; (4) 547-554

Jarvis, B. C.; Shannon, P. R. M.; Yasmin, S. (1983) Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol.* 24; 677-683

Jornes, A. & Hecht-Buchholz, Ch. (1985) Aluminiuminduzierter Magnesium –und Calcium –mangel im Laborversuch bei Fichtensämlingen. *Allgem Forst.* 40; 1248-1252

Karlik, S. J.; Eichhorn, G. L.; Lewis, P. N. and Crapper, D. R. (1980) Interaction of Aluminum Species with Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry.* 19; 5991-5998.

Kerven, G.; Edwards, C.; Asher, P.; Hallman, P.; Kokot, S. (1989) Aluminium determination in soil solution II: Short-term colorimetric procedures for the measurement of inorganic monomeric Al in the presence of organic acid ligands. *Aust. J. Soil. Re.* 27; 91-102.

Kinzel, H. (1982) Die calcicolen und calcifugen, Basiphilen und Acidophilen pflanzen; *Pflanzenökologie una Mineralstoffwechsee*, Ulmer-Verlag, Stuttgart. 216-380.

Kiriakidis, D. A. (1983) Effect of plant growth hormone and polyamines on ornithine decarboxylase activity during the germination of barley seeds. *Physiol. Plant.* 57; 499-504.

Klimashevskii, E. L.; Dedov, V. M. (1980) Characteristics of an elastic cell wall of the root in relation to genotypic variance of plant resistance to aluminium ions. *Isv. Sib. Atb. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol. Nauk.* 1, 108-112; *Chem. Abstr.* 93; 142-143.

Kochian, L. V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46; 237-260.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227; 680-685

Lee, J.; Pritchard, M. V. (1984) Aluminium toxicity expression on nutrient uptake, growth and root morphology of *Trifolium repens* L. *Plant and Soil.* 82 (1); 101-116.

Lewis, T. E. (1989) *Environmental Chemistry and Toxicology of Aluminum*; Lewis Publishers, Inc.

Liquori, A. M.; Constantino, L.; Crescenzi, V.; Elia, V.; Giglio, E.; Puliti; DeSantis; Vitigliano (1967) Complexes between DNA and polyamines: a molecular model. *J. Mol. Biol.* 24; 113.

Liu, D.; Jiang, W. (1993) Effects of aluminium on root growth, cell division, and nucleoli of garlic (*Allium sativum* L.). *Environmental Pollution.* 82; 295-299.

Llugany, M.; Massot, N.; Wissemeier, H.; Poschenrieder, Ch.; Horst, W. J.; Barceló, J. (1994) Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *Z. Pflanzeneraehr. Bodenk.* 157; 447-451.

Makita, M.; Yamamoto, S.; Miyake, M.; Masamoto, K. (1978) Practical gas chromatographic method for the determination of urinary polyamines. *Journal of Chromatography.* 156; 340-345.

Malmberg, R. L.; Smith, K. E., Bell, E.; Cellino, M. L. (1992) Arginine decarboxylase of oats is clipped from precursor into two polypeptides found in the soluble enzyme. *Plant Physiol.* 100; 146-152.

Mariani, P.; D'Orazi, D.; Bagni, N. (1989) Polyamines in primary walls of carrot cells: Endogenous content and interactions. *J. Plant Physiol.* 131; 508-510.

Massot, N.; Poschenrieder, Ch.; Barcelo, J. (1991) Aluminium assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and hematoxylin staining; *Suelo y Planta.* 1; 25-32.

Massot, N.; Poschenrieder, Ch.; Barceló, J. (1992) Differential response of three bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars to aluminium; *Acta Bot. Neerl.* 41; 293-298.

Matsumoto, H.; Morimura, S. (1980) Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiol.* 21; 951-959.

Matsumoto, H.; Hirasawa, F.; Torikai, H.; Takahashi, E. (1976) Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. *Plant Cell Physiol.* 17; 127-137.

Matsumoto, H.; Morimura, A.; Takashashi, T. (1977) Binding of aluminium to DNA of DNP in pea root nuclei. *Plant and Cell Physiol.* 18; 987-993.

Mistrík, I.; Tamás, L.; Huttová, J. (2000) Quantitative changes in maize membrane proteins induced by aluminium. *Biologia Plantarum.* 43; (1) 85-91.

Millard, M. M.; Foy, C. D.; Caradetti, C. A.; Renisel, M. D. (1989) G-Ray photoelectron spectroscopy surface analysis of aluminium ion stress in barley roots. *Plant Physiol.* 91; (3), 1094-1099.

Miyasaka, S. C.; Kochian, L. V.; Shaff, J. E.; Foy, C. D. (1989) Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K^+ , and H^+ , transport, and root-cell membrane potentials. *Plant Physiol.* 91; 1188-1196.

Montagne, M. J.; Koppenbrink, J. W.; Jaworski, E. G. (1978) Polyamine Metabolism in Embryogenic Cells of *Daucus carota* I. Changes in Intracellular Content and Rates of Synthesis; *Plant Physiol.* 62; 430-433.

Morimura, A.; Matsumoto, H. (1978a) Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion roots. *Z. Pflanzenphysiol.* 88 (5); 395-401.

Morimura, A.; Matsumoto, H. (1978b) Effect of aluminium on some properties and template activity of purified pea DNA. *Plant and Cell Physiol.* 19; (3), 429-436.

Morris, D. R.; Harada, J. J. (1980) Participation of polyamines in the proliferation of bacterial and animal cells. In: *Polyamines in biochemical research*; J. M. Gaugas (ed).

Ohki, K. (1986) Photosynthesis, chlorophyll and transpiration responses in aluminium stressed wheat and sorghum. *Crop Sci.* 26 (3); 572-575.

Olivetti, G. P.; Cumming, J. R.; Etherton, B. (1995) Membrane potential depolarization of root cap cells precedes aluminum tolerance in snapbean. *Plant Physiol.* 109; 123-129.

Osaki, M.; Watanabe, T.; Tadano, T. (1997) Beneficial Effect of Aluminum on Growth of Plants Adapted to Low pH Soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43 (3); 551-563.

Ownby, J. D.; Hruschka, W. R. (1991) Quantitative changes in cytoplasmatic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars of winter wheat. *Plant, Cell and Environment.* 14; 303-309.

Pegg, A. E.; Mc Cann, P. P. (1982) Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.*, 243 (Cell Physiol.); C212-C221.

Pellet, D. M.; Papernik, L. A.; Kochian, L. V. (1996) Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol.* 112; 591-597.

Pistocchi, R.; Bagni, N.; Creus, J. A. (1986) Polyamine uptake, kinetics, and competition among polyamines and between polyamines and inorganic cations. *Plant Physiol.* 80; 556-560.

Pistocchi, R.; Bagni, N.; Creus, J. A. (1987) Polyamine uptake in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* 84; 317-380.

Pistocchi, R.; Keller, F.; Bagni, N.; Malite, P. (1988) Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplast and vacuoles. *Plant Physiol.* 87; 514-518.

Pistocchi, R.; Antognoni, F.; Bagni, N.; Zannoni, D. (1990) Spermidine uptake by mitochondria of *Helianthus tuberosus*. *Plant Physiol.* 92; 690-695.

Popovic, R. B.; Kyle, D. J.; Cohen, A. S.; Zalik, S. (1979) Stabilization of thylacoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barley leaf discs. *Plant Physiol.* 64; 721.

Poschenrieder, Ch; Massot, N.; Guevara, P.; Barceló, J. (1992) Aluminio II: Mecanismos de toxicidad en hombre, animales y plantas. *Cir. Far.* 313; 27-42.

Poschenrieder, Ch.; Barceló, J. (1985) La muerte de los bosques: ¿Tiene la culpa la acidez de la lluvia?. *Circular Farmac.* 286; 71-80.

Rabiti, A. L.; Pistocchi, R.; Bagni, N. (1989) Putrescine uptake and translocation in higher plants. *Physiol. Plant.* 77; 225-230.

Ramakrishna, S; Adiga, P. R. (1975) Arginine decarboxilase from *Lathirus sativus* seedlings. *Eur. J. Biochem.* 59; 377-386.

Ryan, P. R.; Shaff, J. E.; Kochian, L. V. (1992) Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum-tolerant wheat cultivars. *Plant Physiol.* 99; 1193-1200.

Sakai, T. T.; Cohen, S. S. (1975) Effects of polyamines on the structure and reactivity of t-RNA. *Prog. Nucleic Acid Re. Mol. Biol.*, 17; 15.

Seiler, N.; Wiechmann, N. (1970) TLC analysis of amines as their dans-derivatives; Niederwiesser, A.; Pataki, G. (eds.) In: *Progress in TLC and*

related methods. Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Harbor Michigan. 1; 95-114.

Serafini-Fracassini, D; Del Duca, S. (1992) In: Proceedings of the Third International Conference on Transglutaminase and Protein Crosslinking Reactions. Ardmore. July 7-10, 14.

Schwartz, M.; Altman, A.; Cohen, Y.; Arzee, T. (1986) localization of ornithine decarboxilase and changes in polyamine content in root meristems of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 67; 485-492.

Scocianti, V.; Bagni, N.; Dubinsky, O.; Arad, S. (1989) Interactions between polyamines and cell of the marine unicellular red alga *Porphyridium* sp. *Plant Physiol. Biochem.* 27; 899-904.

Seiler, N.; Wiechmann, N. (1970) TLC Analysis of amines as their Dansil derivatives; Niederwiesser, A., Pataki, G. (eds) in: Progress in TLC and related methods; 1; 95-114. Ann Arbor-Humphrey Science, Ann Harbor Michigan.

Shen, H. J.; Galston, A. W. (1985) Correlations between polyamine ratios and growth patterns in seedlings roots. *Plant Growth Regul.* 3; 353-363.

Shubert, F. (1989) Influence of polyamine on membrane functions (review article). *Biochem. J.* 260; 1-10.

Siegel, N.; Haug, A. R. (1983) Aluminium interaccion with Calmodulin: Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochem. Biophys. Acta.* 744; 36-45.

Slocum, R. D.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, A. W. (1984) The physiology and biochemistry of polyamines in plants. *Archives of Biochem. And Biophys.* 235 (2); 283-303.

Smith, T. A. (1965) N-carbamoylputrescine aminohydrolase of higher plants and its relation to potassium nutrition. *Phytochemistry.* 4; 599-607.

Smith, T. A. (1969) Agmatine iminohydrolase in maize. *Phytochemistry.* 8; 2111-2117.

Smith, T. A. (1975) Recent advances in the biochemistry of plant amines. *Phytochemistry.* 14; 865-890.

Smith, T. A. (1979) ADC of oat seedlings. *Phytochemistry.* 18; 1447-1452.

Smith T. A. (1980) Plant amines. In: encyclopedia of plant physiology. E. A. Bell & B. V. Charlwood (eds); VIII; 433-460. Springer-Verlag. Berlin.

Smith, T. A.; Negrel, J. Bird C. (1983) The cinnamic acid amides of di- and polyamines. In: Bacharach U, Kaye A, Chayen R (eds) *Advances in polyamine reserch*, vol 4. Raven Press, New York. 347-370.

Somers, D. J.; Briggs, K. G.; Gustafson, P. J. (1996) Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. *Physiologia Plantarum.* 97; 694-700.

Stass, A., Horst, W. J. (1995) Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. – In: Date, R. A.; Grundon, N. J.; Rayment, G. E.; Probert, M. E. (ed.): *Plant Soil Interaccions at Low pH*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht – Boston – London. 279-284.

Stumm, W.; Morgan, J. J. (1970) *Aquatic Chemistry*; Wiley Interscience, New York

Tabor, H.; Tabor, C. W. (1972) Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, Spd, Spm, and related amines. *Adv. Enzymol.* 36; 203.

Tabor, C. W.; Tabor, H. (1976) 1,4-diaminobutane (Put), Spd, and Spm. *Annu. Rev. Biochem.* 45; 285.

Tabor, C. W.; Tabor, H. (1984) Polyamines; *Annu. Rev. Biochem.* 53; 749.

Taylor G. J. (1991) Current views of aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *In* Randal, D. D.; Blevins, D. G.; Miles C. D. eds, *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, vol 10, Ultraviolet B Radiation Stress, Aluminum Stress, Toxicity and Tolerance, Boron Requirements, Stress and Toxicity. University of Missouri, Columbia. 57-93.

Taylor G. J. (1988) The physiology of aluminum tolerance. . *In*: *Metal Ions in Biological Systems*. vol. 24. Aluminium and its Role in Biology; H. Siegel & A. Siegel (eds). Marcel Dekker, Inc. New York. 165-198.

Thompson, J. E. (1988) The molecular basis for membrane deterioration during senescence. *In*: Nooden, L. D.; Leopold, A. C., (eds).; *Senescence and aging in plants*. New York; Academic Press. 51-83.

Torrigiani, P.; Serafini-Fracassini, D.; Biondi, S; Bagni (1986) Evidence for the subcellular localization of polyamines and their biosynthetic enzymes in plant cells. *J. Plant. Physiol.* 124; 23-29.

Tiburcio, A. F.; Bestford, R. T.; Capell, T.; Borrel, A.; Testillano, P. S.; Risueño, M. C. (1994) Mechanisms of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 45 (281); 1789-1800.

Tiburcio, A. F.; Kaur-Sawhney, R.; Galston, A. W. (1990) Polyamine metabolism. In: *The biochemistry of plants*. B. J. Mifflin & Peter, J. Lea, eds., 16, Academic Press, Inc. 283-325.

Trim, R. R. (1959) Metal ions as precipitants for nucleic acids and their use in the isolation of polynucleotides from leaves. *Biochem J.* 72; 289-304.

Tsuboi, M. (1964) *Bull. Chem. Soc. (Japan)*. 37, 1514

Turner, L. B.; Steward, G. R. (1988) Accumulation in Barley (*Hordeum vulgare* L.) leaf sections during osmotic stress. *Journal of Experimental Botany*. 39 (200); 311-316.

Villanueva, V. R.; Adlakha, R. C.; Caldveyrac, R. (1980) Biosynthesis of polyamines in *Euglena gracilis*. *Phytochemistry*. 19; 787-790.

Wagatsuma, T. (1983) Effect of non-metabolic conditions on the uptake of Al by plant roots. *Soil Sci. Plant Nutri.* 29 (3); 323-330.

Wagatsuma, T.; Ezoe, Y (1985) Effects of pH on ionic species of Aluminium in medium and on aluminium toxicity under solution culture. *Soil Sci. Plant Nutrition*. 31; 457-561.

Wagatsuma, T. (1984) Characteristics of upward translocation of aluminum in plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30 (3); 345-358

Wagatsuma, T.; Kaneko, K. (1987) High toxicity of hydroxi-aluminium polymer ions to plant roots. *Soil Sci. Plant Nutrition.* 33; 57-67

Walker, M. A.; Roberts, D. R.; Shih, C. Y.; Dumbroff, E. B. (1985) A requirement for polyamines during the cell division phase of radicle emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol.* 26; 967-972.

Watanabe, T.; Osaki, M.; Tadano, T. (1997) Aluminum-induced growth stimulation in relation to calcium, magnesium, and silicate nutrition in *Melastoma malabathricum* L. *Soil Sci. Plant Nutr.* 43; 827-837.

Watanabe, T.; Osaka, M.; Yoshihara, T.; Tadano, T. (1998) Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 201; 165-173.

Wettlauber, S. H.; Osmeloski, J.; Weinstein, L. H. (1991) Response of polyamines to heavy metal stress in oat seedlings. *Environmental toxicology and chemistry.* 10; 1083-1088.

Yanagisawa, H.; Suzuki, Y. (1982) Purification and properties of N-carbamoylputrescine aminohydrolase from maize shoots. *Phytochemistry.* 21; 2201-2203.

Young, N. D.; Galston, A. W. (1983) Putrescine and acid stress. *Plant Physiol.* 71; 767-771.

Zhang, G.; Taylor, G. J. (1989) Kinetics of aluminium uptake by excised roots of aluminium-tolerant and aluminium-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. *Plant Physiol.* 91; 1094-1099.

Zhao, G.; Sucoff, E.; Stadelman, E. J. (1987) Al^{3+} and Ca^{2+} alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. *Plant Physiol.* 83 (1); 159-162.