

LOS CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE POLIAMINAS ESTÁN RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A TEMPERATURAS BAJAS EN PLANTAS DE PAPA

Changes in polyamine content are related
to low temperature resistance in potato plants

Hernán Mauricio Romero, Jesús Norato Rodríguez
y Catalina Posada

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia,
Apartado Aéreo 14490, Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En plantas de *Solanum acaule*, *Solanum phureja*, *Solanum tuberosum* c.v. Desireé, transformada con un gen que codifica para proteínas anticongelantes del pez lenguado del Ártico, y el clon 88-35-7 de genealogía (*tbr-(atzimba)* x (*acl* x *phu* ccc81), genotipos de papa con diferente grado de tolerancia a las temperaturas bajas, se determinó la variación en el contenido de poliaminas (PA) durante una helada simulada en fitotrón. La especie tolerante (*S. acaule*) fue la única que sobrevivió al tratamiento de temperaturas bajas (80% de tejido vivo), las demás especies tuvieron más de un 50% de muerte del tejido al final del experimento. El clon 88-35-7 tuvo una muerte de los tejidos más lenta que *S. phureja* y que Desireé.

La supervivencia de los tejidos estuvo relacionada con los incrementos de los niveles de putrescina (Put) y espermina (Spm) libres observados en *S. acaule* y en menor medida en el clon. Los valores de PA en las plantas susceptibles (*S. phureja* y Desireé transgénica) permanecieron bajos y constantes durante todo el tiempo de la condición extrema. La fuente para el incremento en concentración de Put y Spm en *S. acaule* y en el clon 88-35-7 al parecer estuvo constituida por las formas ligadas solubles de las dos fitohormonas, que disminuyeron en la medida que avanzaba el tratamiento de frío.

Palabras claves: Bajas temperaturas, poliaminas, resistencia, papa, *Solanum* spp.

ABSTRACT

Polyamine content and variation within a 48 hour simulated freezing stress were determined in plants with different low temperature resistance. Genotypes *Solanum acaule*, *Solanum phureja*, transgenic *Solanum tuberosum* c.v. Desireé with antifreezing trans-genes from Winter Flounder and the clone 88-35-7 (*tbr-(atzimba) x (acl x phu ccc81)*) were used for the experiment. Tolerant species *S. acaule* was the only one that survived freezing stress (80% surviving tissue) the others had more than 50% of dead tissue by the end of the experiment. Clone 88-35-7 died slower than *S. phureja* and transgenic plants of Desireé.

This response was related to free putrescine and free spermidine titters of *S. acaule* plants and in less extend in clone 88-35-7 plants. Polyamine concentration was low and stable in sensitive plants (*S. phureja* and Desireé) within freezing condition. Soluble bound forms of polyamines were the source for Put and Spm increase in *S. acaule* and 88-35-7 plants. As a result, soluble bound polyamine titer decreased with the freezing stress.

Keywords: Low temperatures, polyamines, resistance, potato, *Solanum* spp.

INTRODUCCIÓN

Las temperaturas ambientales bajas, con valores iguales o menores a 0°C, constituyen un factor que limita la productividad y la distribución geográfica de las plantas. Además ocasionan disminución de la actividad biosintética y en el funcionamiento normal de los procesos fisiológicos y pueden causar daños permanentes de consideración en los tejidos vegetales, que en muchos casos llevan a la muerte.

En las zonas andinas tropicales se presenta el fenómeno de las heladas, que trae consigo la disminución de la temperatura ambiental a valores por debajo de los 0°C. La ocurrencia de esta condición en diferentes épocas del año limita la siembra del cultivo de papa y de otras especies hortícolas de importancia, a un 70% de la superficie potencial de siembra en el primer semestre y un 30% en el segundo semestre y ocasiona caídas en la producción que traen pérdidas económicas de miles de millones de pesos (Estrada *et al.*, 1994).

Uno de los cultivos más afectados por las temperaturas bajas es la papa y debido a su importancia como alimento en todos los pueblos y en especial de los países en desarrollo, en el mundo se han emprendido numerosos estudios

para tratar de conocer los mecanismos de tolerancia al frío en especies silvestres y cultivadas (Alberdi & Corcuera, 1991; Chen & Li, 1980a; Chen & Li, 1980b; Estrada, 1982; Hetherington *et al.*, 1983; Mendoza & Estrada, 1977; Smillie *et al.*, 1983). Paralelamente se han hecho trabajos de mejoramiento con el fin de obtener variedades de papa con tolerancia a las heladas (Estrada, 1982) y se ha investigado en la aclimatación como posible mecanismo de inducción de tolerancia a las heladas (Alberdi & Corcuera, 1991; Chen & Li, 1980a; Li, 1985; Smillie *et al.*, 1983). Incluso, por técnicas de biología molecular, se ha llegado a la producción de variedades de papa transgénicas, a las cuales se les ha incorporado el gen de resistencia a la congelación, proveniente del pez lenguado del Ártico (Estrada *et al.*, 1994). Sin embargo, hasta el momento no se conocen muy bien, cuáles son los mecanismos bioquímicos y fisiológicos por medio de los cuales algunas plantas pueden resistir esta condición extrema.

Se han postulado varias hipótesis acerca de los mecanismos de tolerancia de papa a las bajas temperaturas. La más aceptada es que haya una interacción de factores y condiciones de desarrollo en el momento de sufrir la helada (Hodson, 1973). Se ha visto que, para el caso de la papa, las especies tolerantes tienen características anatómicas y fisiológicas que las diferencian de las susceptibles y las protegen del daño causado por las bajas temperaturas (Estrada *et al.*, 1994).

Entre los factores fisiológicos más importantes en la tolerancia de las plantas a las bajas temperaturas se encuentra el balance en el contenido de fitohormonas (Gusta *et al.*, 1996; Morgan & Drew, 1997; Racz *et al.*, 1996; Svenning *et al.*, 1997). Dentro de estas fitohormonas se encuentran las poliaminas (PA) que son moléculas alifáticas con grupos amina que se protonizan, por lo que adquieren condiciones policatiónicas. Esta condición constituye la base para su acción a nivel molecular, ya que forman complejos con polianiones como proteínas y ácidos nucleicos, modificando o afectando la actividad celular (Norato & Romero, 1995). La naturaleza fisicoquímica de las PA permite estabilizar las células vegetales sometidas a condiciones ambientales extremas (Altman *et al.*, 1977). La protección de las células por parte de las PA se ha evidenciado gracias a los incrementos en las PA cuando han sido sometidas a estrés por temperaturas extremas (Norato & Romero, 1995; Racz *et al.*, 1996; Romero & Norato, 1996), choques osmóticos (Mengoli *et al.*, 1989), patógenos (Walters, 1986), ozono (Bors *et al.*, 1989; Wellburn & Wellburn, 1996) y otros.

En maíz, se ha visto que en variedades sometidas a heladas, como MB 510, el rendimiento no supera las 3,67 Ton/ha y apenas si se forman 1,7 mazorcas/planta, mientras que si las plantas son tratadas con las diversas PA, los procesos de crecimiento continúan de manera similar que si el cultivo no

hubiera sufrido los rigores de la helada (Norato *et al.*, 1990), y además se activa el crecimiento de mazorcas que normalmente no se desarrollan y el rendimiento en grano se mantiene en niveles normales. De igual manera en papa, Romero y Norato (1996) aplicando poliaminas en la especie sensible *S. phureja*, variedad yema de huevo, lograron mantener la producción de plantas que habían sufrido los rigores de una helada, en cerca de 10 Ton/ha, mientras que los testigos no tratados produjeron apenas 5 Ton/ha.

Por lo anterior, este trabajo se planteó para establecer la respuesta diferencial de genotipos tolerantes y susceptibles a temperaturas bajas y la presencia o no de mecanismos fisiológicos de regulación hormonal a través de poliaminas durante el fenómeno de las heladas

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se sembraron tubérculos seleccionados de *S. acaule*, *S. phureja*, del híbrido 88-35-7 (Tbr*(acl*Phu)) y de *S. tuberosum* c.v. Desireé transgénica con un gen de resistencia al congelamiento del pez lenguado del Ártico, en materos de 10 cm de diámetro, que contenían una mezcla de suelo esterilizado, formada por dos partes de suelo por una de arena. Los materos se colocaron en una casa de malla del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia.

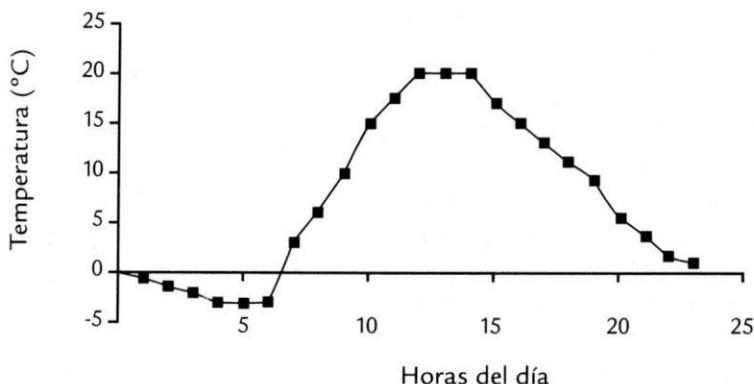


Figura 1. Variación en la temperatura durante la helada simulada.

TRATAMIENTOS

A los dos meses de edad, las plantas fueron sometidas a una helada simulada, utilizando un fitotrón de CORPOICA Tibaitatá. Se programó una curva de temperatura que seguía las variaciones que ocurren en el campo cuando se presentan las heladas (Fig. 1).

La temperatura diurna fue de 20°C y empezó a disminuir gradualmente durante la noche hasta alcanzar -3°C a las 4 a.m. Esta temperatura se mantuvo durante 2 horas. La velocidad de congelamiento fue de 1,2°C / hora y a las 6 a.m. se inició el descongelamiento a una velocidad de 1,5°C / hora. Se utilizó un fotoperíodo de 12 horas, y la humedad relativa mínima fue de 75%.

A diferentes momentos de la helada simulada, se tomaron muestras del follaje de plantas, constituyendo cada uno de estos momentos de muestreo un tratamiento diferente de helada (Tabla 1). Se utilizaron todas las hojas sanas y no senescentes de cuatro plantas diferentes de cada genotipo, escogidas al azar. Las hojas de las 4 plantas se mezclaron y procesaron inmediatamente según la variable que se iba a determinar.

TRATAMIENTO DE HELADA	HORA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE EXPERIMENTO
1	16:00	15.0	0 hrs.
2	20:00	5.5	4
3	00:00	0.0	8
4	04:00	-3.0	12
5	06:00	-3.0	14
6	10:00	15.0	20
7	16:00	15.0	24
8	16:00	15.0	48

Tabla 1. Tratamientos de helada dados a plantas de diferentes genotipos de papa. La hora y temperatura corresponden al momento en que las plantas fueron sacadas del fitotrón para los análisis correspondientes. Se presentan también las horas desde iniciada la helada simulada. El tratamiento 1 corresponde a plantas sin el tratamiento de helada, pero aclimatadas en el fitotrón.

DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE LOS TEJIDOS

Para evaluar el porcentaje de supervivencia de los tejidos a las bajas temperaturas, se utilizó el método mejorado de Steponkus y Lanphear (1967). Se

pesaron 100 mg de material vegetal de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de helada y se pusieron a incubar con cloruro de trifenil tetrazolium al 1%, durante 15 horas hasta la infiltración del reactivo. Luego se extrajo el formazán que se había formado como respuesta de la respiración de los tejidos que habían quedado vivos, y se leyó la absorbancia a 570 nm. El porcentaje de tejido vivo se midió como el porcentaje de disminución en la absorbancia con respecto al tejido vegetal de plantas que no habían sido sometidas a la helada.

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE POLIAMINAS

Las poliaminas Put, Spm y Espermidina (Spd) se extrajeron en ácido tricloroacético al 10%, agregando butilamina como estándar interno. Las poliaminas ligadas solubles y las ligadas insolubles se liberaron por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 6 N, y al igual que las poliaminas libres, fueron purificadas mediante lavados con eter etílico (Romero *et al.*, 1994). Las poliaminas purificadas fueron dansiladas (Flores & Galston, 1982), purificadas y determinadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en un cromatógrafo Merck-Hitachi con detector de fluorescencia. Se utilizó una columna Merck Lichrochart-Lichrospher RP-18. La fase móvil estuvo compuesta por metanol-agua en gradiente según metodología estandarizada por Romero *et al.* (1994). La cantidad relativa de las dansil-poliaminas de cada muestra fue determinada utilizando curvas de calibración de soluciones patrón de Dansil-PA. Las pérdidas derivadas del proceso fueron corregidas utilizando el estándar interno.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usó un diseño completamente al azar, bajo un arreglo factorial, con el genotipo de papa y el tratamiento de helada como factores. La unidad experimental estuvo compuesta por cuatro plantas, de las cuales se tomaron las hojas para los diferentes análisis bioquímicos y se hicieron 4 repeticiones. El primer factor tenía 4 niveles, correspondientes a los genotipos *S. acaule*, *S. phureja*, *S. tuberosum* c.v. Desireé transgénica y el híbrido 88-35-7. El segundo factor tenía 8 niveles, correspondientes a los tratamientos de helada, cuyas horas y temperaturas se encuentran relacionadas en la Tabla 1. Las diferencias en la respuesta de los diferentes genotipos de papa a las bajas temperaturas y su evolución con el tiempo desde el inicio de la condición estresante, se determinaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA), con $p \leq 0.05$. Todos los análisis se hicieron mediante el Proc GLM del programa *Statistical Analysis System 6.0 (SAS)*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 2 muestra el efecto de la helada simulada en la supervivencia de tejidos de las plantas de los diferentes genotipos de papa analizados. Se presentaron diferencias altamente significativas en la supervivencia entre los genotipos, entre los tratamientos y en la interacción. Durante los 4 primeros tratamientos de helada, cuando se observó el descenso gradual de la temperatura hasta los -3°C , no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de los diferentes genotipos (Tabla 2). Sin embargo, a partir de este momento, cuando las plantas habían estado sometidas a temperaturas por debajo de los 0°C durante 4 horas y se había alcanzado la mínima temperatura (-3°C), se presentaron diferentes grados de supervivencia entre los genotipos, obteniéndose al final que las plantas de *S. acaule* fueron las que mejor resistieron la condición de helada con un nivel de daño bajo (cerca de un 20% de tejido muerto al final del experimento), en comparación con los otros genotipos tratados (62% de tejido muerto en *S. phureja*, 95% de tejido muerto en las plantas transgénicas de Desireé y 70% de tejido muerto en el clon 88-35-7).

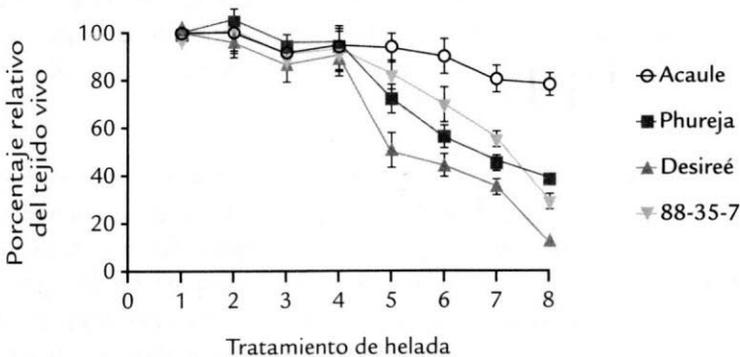


Figura 2. Supervivencia de los tejidos de plantas de diferentes genotipos de papa sometidos a una helada simulada. La supervivencia es expresada como el porcentaje de tejido vivo relativo a plantas sin el tratamiento de helada. Los datos se presentan como los promedios \pm error estándar del promedio ($n=4$).

El mayor porcentaje de muerte de tejido de las plantas transgénicas de Desireé se observó en el paso del tratamiento de helada 4 al 5 (de un 92% de tejido vivo en el 4 a tan sólo un 49% en el 5), cuando las plantas estuvieron sometidas a -3°C por 2 horas y llevaban un acumulado de 6 horas bajo temperaturas subcero. Mientras que para *S. phureja* y para el clon 88-35-7, los

mayores porcentajes de muerte de tejido se produjeron en los tratamientos de helada 5 y 6 (de 76% a 54% en *S. phureja* y de 84% a 67% en el clon 88-35-7), cuando estuvieron sometidas a un recalentamiento rápido, pasando de -3°C a 15°C en apenas 4 horas.

FUENTE	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	p
Modelo	31	82200.84	2651.64	62.82	0.0001
Genot.	3	11256.49	3752.16	88.89	0.0001
Trat.	7	58310.81	8330.11	197.34	0.0001
Genot.*Trat.	21	12633.54	601.59	14.25	0.0001
Error	96	4052.29	42.21		
Total	127	86253.14			

R ²	C.V.	Desviación Estándar	Media
0.953019	8.4277967	6.4970280	77.09046875

Tabla 2. Análisis de Varianza (ANDEVA) para la supervivencia de plantas de diferentes genotipos de papa sometidas a una helada simulada (n=4).

En el tratamiento de helada 5, las plantas transgénicas de Desireé presentaron más del 50% de tejido muerto, punto considerado como el límite para la supervivencia de la planta (Rada *et al.*, 1985). Este punto fue alcanzado por las plantas de *S. phureja* en el tratamiento de helada 6 y por el clon 88-35-7 después del tratamiento de helada 7.

Estos resultados eran de esperarse, toda vez que *S. acaule* es una especie de papa que crece entre los 3.700 y 4.200 msnm, y algunas veces se encuentra a 4.650 msnm en las zonas andinas, en donde la ocurrencia del fenómeno de heladas con temperaturas congelantes puede darse en cualquier día del año, razón por la cual la especie, que está adaptada a las condiciones extremas de frío que se presentan en estas regiones, debe desarrollar mecanismos que le permitan no sólo sobrevivir, sino mantener sus procesos de crecimiento y desarrollo a temperaturas muy bajas. Es así como las plantas de *S. acaule* son capaces de soportar temperaturas hasta de -7°C sin aclimatarse y temperaturas por debajo de los -10°C cuando han sido sometidas a procesos de aclimatación (Chen & Li, 1980b). Por lo anterior, no es extraño que las plantas que mejor resisten la helada simulada en el presente experimento hayan sido las de esta especie, con niveles de daño de los tejidos por debajo del 20%.

Las plantas del clon 88-35-7 tuvieron también algún grado de resistencia a las temperaturas bajas, de tal manera que el 50% de muerte del tejido no se

alcanzó sino hasta después del tratamiento 7, es decir, cuando las plantas habían sufrido una helada de 6 horas, con temperaturas mínimas de -3°C por dos horas. Por sus características de duración y en parte por la mínima temperatura alcanzada, se puede considerar que las plantas fueron sometidas a una helada muy fuerte y sin embargo, las plantas lograron sobrevivir durante un buen tiempo. Esta respuesta era de esperarse, si se tiene en cuenta que el clon 88-35-7 tiene en su genealogía a *S. acaule* (Tbr*(acl*phu)), de tal manera que una parte de los genes de resistencia de *S. acaule* podrían estar en las plantas del clon, confiriéndole tolerancia.

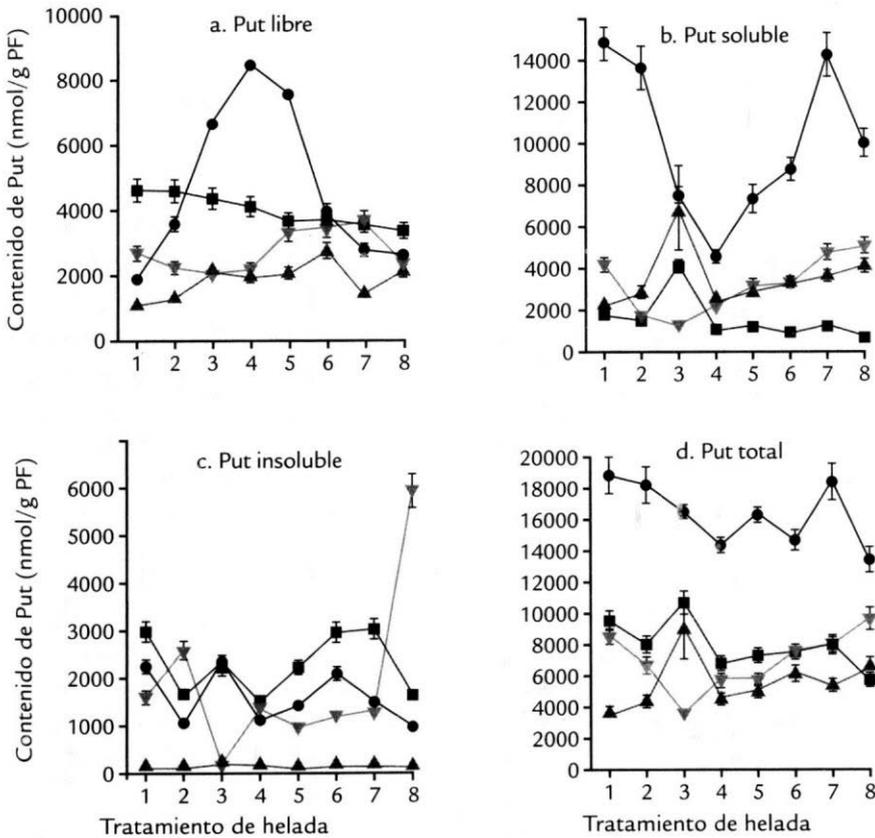


Figura 3. Variación en el contenido de Putrescina (Put) de hojas de plantas de diferentes genotipos de papa, sometidas a una helada simulada. Los datos se presentan como los promedios \pm el error estándar del promedio ($n = 4$).

◆ Acaule ■ Phureja ▲ Desireé ▼ 88-35-7

Uno de los resultados menos esperados al inicio de esta investigación fue la poca resistencia de las plantas transgénicas de Desireé a las temperaturas bajas. Sin

embargo, los resultados obtenidos se pueden explicar plenamente si se tiene en cuenta que estas plantas transgénicas de Desireé tenían incorporado un gen de resistencia a las temperaturas bajas del pez lenguado del Ártico. Este gen codifica para un tipo especial de proteínas denominadas AFPs (*antifreeze proteins*) que inicialmente fueron identificadas en peces polares y en algunos insectos (Parody-Morreale et al., 1988; Sicheri & Yang, 1995a; Yang et al., 1988). Con base en estos hallazgos, se produjeron las plantas transgénicas, esperando que sintetizaran proteínas anticongelantes que sirvieran para conferirles resistencia contra el frío. Sin embargo, los trabajos iniciales mostraron un bajo nivel de protección de entre 32% y 45% (Estrada et al., 1994).

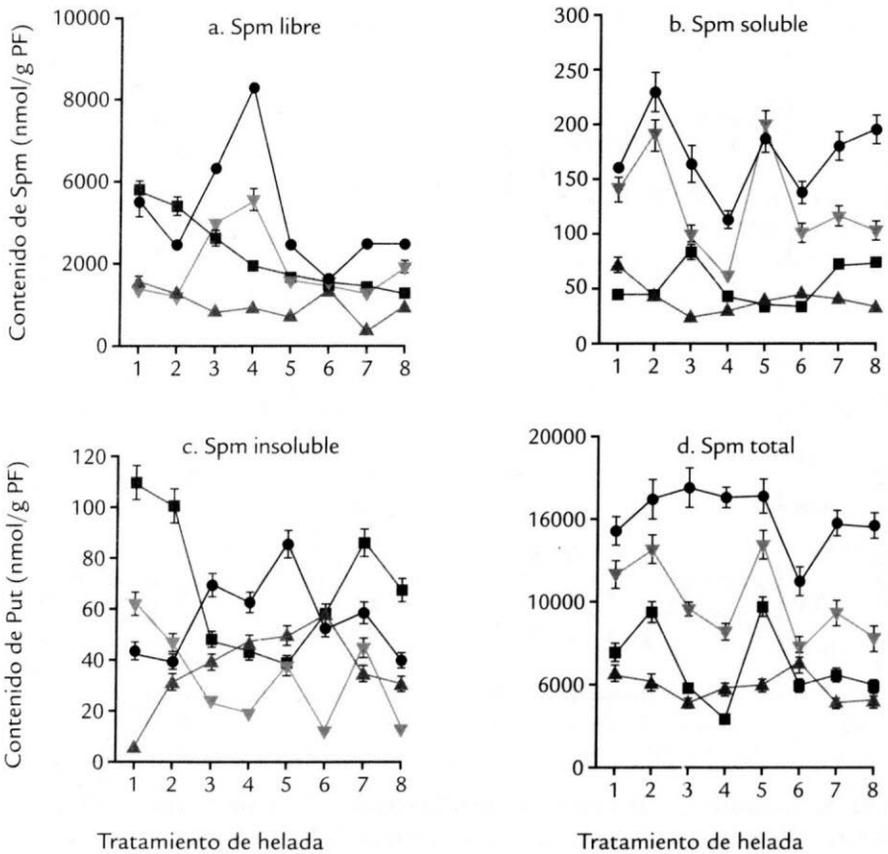


Figura 4. Variación en el contenido de Espermina (Spm) de hojas de plantas de diferentes genotipos de papa, sometidas a una helada simulada. Los datos se presentan como los promedios \pm el error estándar del promedio ($n = 4$).

● Acaule ■ Phureja ▲ Desiree ▼ 88-35-7

Posteriormente se demostró que las AFPs también están presentes en plantas de invierno aclimatadas, con un mecanismo de acción similar al de las AFPs de peces e insectos, es decir, inhibición de la formación de cristales de hielo, disminución de la recrystalización e incrementos en la histeresis termal (Griffith & Antikainen, 1996; Griffith *et al.*, 1997; Griffith & Ewart, 1995). Sin embargo, mientras en los peces las AFPs están presentes en el plasma sanguíneo, en donde ejercen su función (Sicheri & Yang, 1995b), las AFPs de plantas se localizan en el apoplasto, en donde son importantes para evitar los daños por congelamiento que se producen en las células vegetales (Antikainen *et al.*, 1996). Esto quiere decir que en las plantas, no es suficiente con la síntesis de las AFPs, es necesario que estas sean secretadas al apoplasto, para lo cual se necesitan mecanismos muy finos de regulación y de transporte. En las plantas utilizadas en este trabajo, es probable que la incorporación del gen de AFPs del pez lenguado a las plantas de Desireé haya inducido la síntesis de las proteínas, pero debido a la procedencia del gen pudo haber ocurrido que las plantas no tenían los mecanismos regulación y secreción para que las AFPs pudieran llegar al apoplasto, de esta manera, aun cuando las AFPs se estuvieran expresando en las plantas de Desireé, no estarían llegando al sitio de acción y por lo tanto, no estarían confiriendo ninguna resistencia contra las temperaturas bajas. Sin embargo, esta es una hipótesis que requiere ser confirmada.

La supervivencia de las plantas de *S. acaule* a las temperaturas bajas esta explicada por el contenido de algunas formas moleculares de las poliaminas analizadas, (Put libre, Spd ligada soluble y Spm ligada soluble). La acción de las poliaminas en la protección de las plantas contra diferentes formas de estrés es bien conocida (Faust & Wang, 1992; Flores, 1991). Incrementos en la concentración de Put libre ya habían sido correlacionados con la tolerancia de cítricos (Kushad & Yelenosky, 1987), frijol (Guye *et al.*, 1986), calabaza (Kramer & Wang, 1989; Kramer & Wang, 1990) y arroz (Lee *et al.*, 1995) a temperaturas bajas. Además, se ha observado que el grado de tolerancia a temperaturas bajas de variedades de trigo está determinado por su capacidad de síntesis de Put libre durante el período de aclimatación que se produce en el otoño, existiendo una correlación positiva entre la inducción cuantitativa de Put y la tolerancia al congelamiento de las plantas de trigo (Racz *et al.*, 1996).

Así, las mayores variaciones en el contenido de Put libre se presentaron en plantas de *S. acaule* sometidas a la helada simulada (Figura 3a). En la medida en que la temperatura se hizo más baja, la concentración de Put libre se incrementó, correspondiendo los valores más altos de la poliamina a las plantas sometidas a temperaturas por debajo de los 0°C. La concentración

máxima de Put libre se alcanzó en el momento de temperatura más baja (tratamiento de helada 4, temperatura = -3°C).

Simultáneamente, los valores más altos de Put ligada soluble (Figura 3b), se registraron en las plantas de *S. acaule*, antes de la helada simulada (tratamiento de helada 1), que fueron más de 3 veces superiores a los valores medios registrados para los otros genotipos analizados. En la medida en que avanzó la helada simulada, la concentración de esta poliamina empezó a disminuir, de manera inversa a lo ocurrido con la Put libre en las plantas de la misma especie. Así, los valores más bajos se registraron cuando la temperatura bajó de los 0°C , alcanzándose la mínima concentración de Put ligada soluble, cuando la temperatura fue más baja (tratamiento de helada 4, temperatura = -3°C).

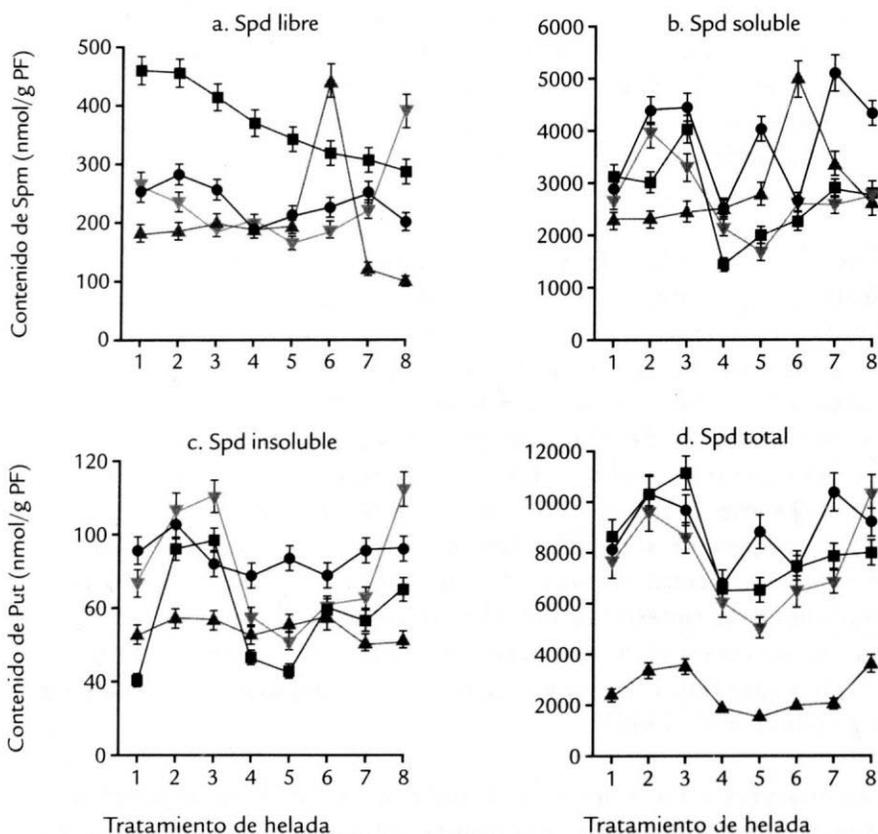


Figura 5. Variación en el contenido de Espermidina (Spd) de hojas de plantas de diferentes genotipos de papa sometidas a una helada simulada. Los datos se presentan como los promedios \pm el error estándar ($n = 4$). ● Acaule ■ Phureja ▲ Desire ▼ 88-35-7

En el presente estudio se observó que la respuesta de las plantas de *S. acaule* es inmediata, con cambios la concentración de Put libre en la medida en que la temperatura disminuye. Es decir que, a diferencia de lo observado hasta ahora en las especies que incrementan el contenido de Put durante el período de aclimatación, (cambios drásticos en los niveles de la diamina después de días o incluso semanas), lo que se obtuvo en el presente estudio fue un cambio rápido (de 1843 nmol/g PF a 8447 nmol/g PF), en tan solo unas pocas horas. Esta respuesta resulta fundamental para la supervivencia de las plantas como *S. acaule* que están sometidas a la condición congelante en cualquier momento de su crecimiento y desarrollo y deben responder a cambios de temperatura diarios, a diferencia de las plantas que crecen en zonas con estaciones y que deben cambiar su maquinaria metabólica durante el otoño para poder tolerar las bajas temperaturas del invierno. Por lo anterior, es muy importante la variación observada en la concentración de la Put ligada soluble en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de helada (Figura 3b). Si bien la Put libre sería la responsable de la protección de las plantas contra las temperaturas bajas, la Put ligada soluble resulta fundamental como fuente para la producción de la forma libre.

En las plantas de zonas templadas, en las cuales el proceso de aclimatación para responder a las temperaturas bajas es gradual, los cambios en la concentración de la Put libre se producen por un aumento en la síntesis *de novo* de la Put. Trabajos realizados en calabacín (Kramer & Wang, 1990), muestran incrementos en la actividad de la ornitina decarboxilasa y la arginina decarboxilasa, enzimas claves en la síntesis de Put, hacia los 5 días de aclimatación, observándose hasta 12 veces más actividad de estas enzimas 12 días después de iniciado el tratamiento de aclimatación, es decir, cuando las plantas alcanzan el máximo de tolerancia a las temperaturas bajas y las concentraciones más altas de Put (Kramer & Wang, 1989). Sin embargo, en las plantas que necesitan responder en ritmos diarios a los cambios drásticos de temperatura, deben existir mecanismos que hagan disponibles las formas libres, metabólicamente activas e importantes para la protección contra el daño por las temperaturas bajas, de manera rápida y con el menor gasto de energía posible. Este mecanismo es la compartimentalización de las poliaminas. Así, cuando la temperatura es alta y los requerimientos de las formas metabólicamente activas son bajos, la Put es almacenada en formas conjugadas, unidas ya sea a azúcares u otros compuestos solubles. Al bajar la temperatura, cuando las plantas requieren de altas concentraciones de la diamina libre, se hidrolizan las formas conjugadas, y se incrementa la concentración de las formas libres, a expensas, por supuesto de las formas ligadas solubles.

En la Spm libre (Figura 4a) y ligada soluble (Figura 4b) en *S. acaule*, se presentaron variaciones similares a las registradas para sus formas moleculares homólogas de Put. En el caso de Spm libre (Figura 4), la concentración se incrementó en la medida en que la temperatura disminuía, obteniéndose el valor máximo (157.58 nmol/g PF) cuando la temperatura había alcanzado su punto más bajo (en el tratamiento de helada 4, temperatura = -3°C), luego de lo cual se produjo la disminución de la concentración de la poliamina hasta alcanzar niveles similares a los del tratamiento de helada 1.

Al igual que había ocurrido con la Put ligada soluble, la concentración de Spm ligada soluble (Figura 4b) disminuyó con la temperatura, de manera inversa a lo observado para las formas libres de la hormona, en *S. acaule* obteniéndose los valores mínimos cuando la temperatura llegó a su punto más bajo, en el tratamiento de helada 4 (110.91 nmol/g PF). Cuando se inició el calentamiento, la concentración de la poliamina se incrementó rápidamente.

Las anteriores variaciones en Put libre y ligada soluble y en Spm libre y ligada soluble, no se presentaron en los genotipos más sensibles a las temperaturas congelantes (*S. phureja* y Desireé transgénica), mientras que el clon 88-35-7 que mostró algo de tolerancia, presentó únicamente variaciones en las concentraciones de Spm libre y ligada soluble similares a las de *S. acaule*.

La forma como podrían estar actuando la Put y la Spm en la resistencia de las plantas a las temperaturas bajas tiene que ver con el sitio primario de daño en la célula cuando se produce este tipo de estrés. Diversas investigaciones han mostrado que la membrana celular es el primer sitio afectado en las células sometidas a temperaturas congelantes (Steponkus, 1990) y es allí donde estarían actuando las poliaminas. En efecto, se ha comprobado que las poliaminas estabilizan las membranas celulares en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés (Altman *et al.*, 1977; Flores, 1991), específicamente, para el caso del estrés por bajas temperaturas, las poliaminas pueden disminuir el efecto de cambio de fase (*phase transition*) de líquido-cristalino a sol-gel que se presenta como respuesta a las temperaturas bajas (Guy *et al.*, 1986), al igual que estabilizan los fosfolípidos para evitar cualquier cambio configuracional que pueda ocasionar pérdidas de las características de permeabilidad selectiva (Flores, 1991).

Otra forma de acción de las poliaminas, estaría dada por su capacidad de disminuir la pérdida de proteínas de membrana, que se produce en respuesta a las temperaturas bajas (Guy, 1990a; Guy, 1990b; Steponkus, 1990)

mediante la formación de puentes catiónicos, entre las poliaminas y los residuos cisteína/metionina de las proteínas vecinas (Guye *et al.*, 1986; Kaur-Sawhney & Galston, 1991). Así mismo, ayudarían a mantener la actividad enzimática y a proteger proteínas contra la actividad de proteasas (Kramer & Wang, 1990), que en otros casos son muy activas en plantas sometidas a temperaturas congelantes.

El daño por bajas temperaturas es causado en buena medida por la deshidratación de las células debido a la influencia química del incremento en la concentración de sales y/o ácidos en el protoplasma (Steponkus, 1984). De esta manera, la supervivencia de las plantas a las temperaturas bajas está relacionada con la capacidad de retener agua (Steponkus, 1990). Las poliaminas son compuestos policatiónicos razón por la cual son osmóticamente muy activos. Así, la acumulación de las formas libres sirve para que la célula retenga agua al disminuir el potencial osmótico dentro de la célula, haciendo más difícil la salida del agua al espacio intercelular (Norato & Romero, 1995).

La tolerancia inicial a las temperaturas bajas de las plantas del clon 88-35-7 era de esperarse, si se tiene en cuenta que tiene en su genealogía a *S. acaule* (Tbr*(acl*phu)), de tal manera que una parte de los genes de resistencia de *S. acaule* deben estar en las plantas del clon, confiriendo tolerancia. Sin embargo, el que la resistencia no haya sido completa se puede explicar por el hecho de que en las plantas del clon no se presentó el incremento en Put libre en respuesta a la disminución de la temperatura, como ocurrió en *S. acaule*. De la misma manera, no se presentó disminución en los niveles de Put ligada soluble, ya que la planta no tiene el mecanismo de protección dependiente de Put contra el estrés por bajas temperaturas que se presenta en la especie silvestre. Únicamente se presentó la variación en el contenido de Spm libre y Spm ligada soluble en respuesta a la condición extrema, similar, aunque de menor magnitud, al observado en *S. acaule*. De esta manera, lo que se puede pensar es que si bien la Spm libre es importante en la protección de las plantas contra las temperaturas bajas, es también muy importante la Put libre, y si alguno de estos dos mecanismos no funciona, la resistencia de las plantas a la condición extrema se ve muy disminuida, llegando incluso a no presentarse.

Así, como en las plantas de *S. phureja* y de Desireé transgénica no se presentó ni el mecanismo de Put ni el mecanismo de Spm, se podría explicar la baja tolerancia de estas plantas a las temperaturas bajas. Al no tener estos mecanismos de protección las plantas quedaron sin ninguna defensa contra la condición extrema, lo cual ocasionó el altísimo porcentaje de muerte de tejido observado.

Las formas ligadas insolubles tanto de Put como de Spm, así como la Spd en todas sus formas, no presentaron variaciones en la concentración que se pudieran relacionar con la tolerancia de las plantas a las temperaturas bajas. En este caso, los resultados obtenidos sirven para reafirmar la hipótesis de que la Spd cumple únicamente una función como puente metabólico para la biosíntesis de la Spm en las relaciones de fuente demanda que se presentan durante los patrones biosintéticos de las poliaminas (Norato & Romero, 1995; Romero & Norato, en prensa).

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia y variación de las poliaminas Put, Spd y Spm en hojas de plantas de diferentes genotipos de papa, sometidas a estrés por bajas temperaturas, durante una helada simulada.

Las plantas de *S. acaule* fueron completamente tolerantes a las temperaturas bajas. Las plantas del clon 88-35-7 que en su genealogía tienen a *S. acaule*, presentaron algún grado de tolerancia. Mientras que las plantas de *S. phureja* y plantas transgénicas de Desireé no presentaron ningún grado de tolerancia.

La tolerancia de las plantas de *S. acaule* se relacionó con su capacidad para incrementar la concentración de Put y Spm libres durante los momentos de más baja temperatura. Este incremento se produjo a expensas de las formas ligadas solubles de las dos poliaminas asegurándose una respuesta rápida y con bajo gasto de energía.

El bajo grado de tolerancia de las plantas del clon 88-35-7 se produjo por que este genotipo presentó el mecanismo de incremento de Spm libre a expensas de la Spm ligada soluble, pero no presentó el mecanismo de la Put, por lo cual se puede concluir que los dos mecanismos son indispensables para que haya una tolerancia total.

La Spd (Figura 5) tuvo un papel únicamente como puente metabólico y su variación no se relacionó con la tolerancia a las bajas temperaturas. La Put y Spm ligadas insolubles (Figuras 3c y 4c) no jugaron ningún papel en la tolerancia de papa a las temperaturas bajas.

AGRADECIMIENTOS

A Carolina Mendoza y Alfonso Rey de Merck Colombia por su ayuda en las determinaciones cromatográficas. A Clemencia Gómez y Margarita Rojas por su colaboración durante la helada simulada. Al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERDI, M. & CORCUERA, L. J. 1991. Cold acclimation in plants. *Phytochemistry* 30: 3177-3184.
- ALTMAN, A., KAUR-SAWHNEY, R. & GALSTON, A. W. 1977. Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. *Plant Physiol.* 60: 570-574.
- ANTIKAINEN, M., GRIFFITH, M., ZHANG, J., HON, W., YANG, D. & PIHAKASKI-MAUNSBACH, K. 1996. Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing. *Plant Physiol.* 110: 845-857.
- BORS, W., LANGEBARTELS, C., MICHEL, C. & SANDERMANN, H. 1989. Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* 28: 1589-1595.
- CHEN, H. H. & LI, P. H. 1980a. Biochemical changes in tuber-bearing *Solanum* species in relation to frost hardiness during cold acclimation. *Plant Physiol.* 66: 414-421.
- _____ & LI, P. H. 1980b. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiol.* 66: 1146-1148.
- ESTRADA, N. 1982. Breeding wild and primitive potato species to obtain frost-resistant cultivated varieties. En *Plant Cold Hardiness and freezing stress* (Li, P. H. & Sakai, A., eds.), Vol. 2. Academic Press, New York.
- _____, DEVAUX, A., GARCÍA, W., CARRASCO, E., MENDOZA, O. & GARCÍA, E. 1994. Mejoramiento genético de la papa para resistencia a heladas. *Papa 12*: 17-27.

- FAUST, M. & WANG, S. Y. 1992. Polyamines in horticultural important plants. *Horticultural Reviews* 14: 333-356.
- FLORES, H. E. 1991. Changes in polyamine metabolism in response to abiotic stress. En *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plantas* (Slocum, R. D. y Flores, H. E., eds.). CRC Press, Boca Raton.
- _____ & GALSTON, A. W. 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.* 69: 701-706.
- GRIFFITH, M. & ANTIKAINEN, M. 1996. Extracellular ice formation in freezing-tolerant plants. En *Advances in Low-Temperature Biology*, Vol. 3. JAI Press Inc.
- _____, ANTIKAINEN, M., HON, W., PIHAKASKI-MAUNSBACH, K., YU, X., CHUN, J. & YANG, D. 1997. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol. Plant.* 100: 327-332.
- _____ & EWART, V. 1995. Antifreeze proteins and their potential use in frozen foods. *Biotechnology Advances* 13: 975-402.
- GUSTA, L. V., WILEN, R. W. & FU, P. 1996. Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. *HortScience* 31: 39-46.
- GUY, C. L. 1990a. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 187-223.
- _____ 1990b. Molecular mechanisms of cold acclimation. En *Environmental injury to plants* (Katterman, F., ed.). Academic Press, London.
- GUYE, M. G., VIGH, L. & WILSON, J. M. 1986. Polyamine titer in relation to chilling sensitivity in *Phaseolus* sp. *Journal of Experimental Botany* 37: 1036-1043.
- HETHERINGTON, S. E., SMILLIE, R. M., MALAGAMBA, P. & HUAMÁN, Z. 1983. Heat tolerance and cold tolerance of cultivated potatoes measured by the chlorophyll-fluorescence method. *Planta* 159: 119-124.

- HODSON, E. 1973. Realación entre la tolerancia de papa a las heladas y diferencias cualitativas en proteínas. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- KAUR-SAWHNEY, R. & GALSTON, A. W. 1991. Physiological and biochemical studies on the anti-senescence properties of polyamines in plants. En *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* (Slocum, R. D. & Flores, H. E., eds.). CRC Press, Boca Raton.
- KRAMER, G. F. & WANG, C. Y. 1989. Correlation of reduced chilling injury with increased spermine and spermidine levels in zucchini squash. *Physiol. Plant.* 76: 479-484.
- _____ & WANG, C. Y. 1990. Effects of chilling and temperature preconditioning on the activity of polyamine biosynthetic enzymes in zucchini squash. *J. Plant Physiol.* 136: 115-119.
- KUSHAD, M. M. & YELENOSKY, G. 1987. Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation in citrus. *Plant Physiol.* 84: 692-695.
- LEE, T., LUR, H. & CHU, C. 1995. Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Sci.* 35: 502-508.
- LI, P. H. 1985. Potato frost hardiness. En: *Potato Physiology* (Li, P. H., ed.) Academic Press, New York.
- MENDOZA, H. A. & ESTRADA, R. N. 1977. Breeding potatoes for tolerance to stress: heat and frost. En *Stress physiology in plants*. (Mussel, H. y Staples, R., eds.). John Wiley y Sons, New York.
- MENGOLI, M., PISTOCCHI, R. & BAGNI, N. 1989. Effect of long-term treatment of carrot cell cultures with millimolar concentrations of putrescine. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 1-8.
- MORGAN, P. W. & DREW, M. C. 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plant.* 100: 620-630.
- NORATO, J. & ROMERO, H. M. 1995. En las plantas que sufren los efectos de las heladas las poliaminas conforman algun mecanismo fisiológico que les permita sobrevivir? *Revista Comalfi* 22: 19-23.

- _____, VICENTE, C., LEGAZ, E. & TORREGROZA, M. 1990. Efecto de algunas poliaminas en la protección contra heladas y el grado de prolificidad del maíz. *Acta Biológica Colombiana* 2: 47-54.
- PARODY-MORREALE, A., MURPHY, K. P., DI CERA, E., FALL, R., DEVRIES, A. L. & GILL, S. J. 1988. Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins. *Nature* 333: 782-783.
- RACZ, I., KOVACS, M., LASZTITY, D., VEISZ, O., SZALAI, G. & PALDI, E. 1996. Effect of short-term and long-term temperature stress on polyamine biosynthesis in wheat genotypes with varying degrees of frost tolerance. *J. Plant Physiol.* 148: 368-373.
- RADA, F., GOLDSTEIN, G., AZOCAR, A. & MEINZER, F. 1985. Freezing avoidance in Andean giant rosette plants. *Plant: Cell and Environment* 8: 501-507.
- ROMERO, H. M. & NORATO, J. 1996. Acción de las poliaminas en la protección de la papa criolla (*Solanum phureja* Juz. et Buk. cv. Yema de Huevo) contra las heladas. *Agronomía Colombiana* 13: 50-55.
- _____ & NORATO, J. Estudios fisiopatológicos en palma de aceite: I. Contenido de poliaminas libres y su relación con la pudrición del cogollo. *Revista Comalfi* (en prensa).
- _____, NORATO, J. & VELANDIA, F. 1994. Determinación y aplicación de putrescina en plántulas de sietecueros (*Tibouchina lepidota*). *Revista Comalfi* 21: 7-12.
- SICHERI, F. & YANG, D. S. 1995a. Ice binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* 375: 427-431.
- _____ & YANG, D. S. 1995b. Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* 375: 427-431.
- SMILLIE, R. M., HETHERINGTON, E., OCHOA, C. & MALAGAMBA, P. 1983. Tolerance of wild potatoe species from different altitudes to cold and heat. *Planta* 159: 112-118.
- STEPONKUS, P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.

- _____ 1990. Cold acclimation and freezing injury from a perspective of the plasma membrane. En *Environmental Injury to Plants* (Katterman, F., ed.). Academic Press, New York.
- _____ & LANPHEAR, F. O. 1967. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. *Plant Physiol.* 42: 1423-1426.
- SVENNING, M. M., ROSNES, K. & JUNTILA, O. 1997. Frost tolerance and biochemical changes during hardening and dehardening in contrasting white clover populations. *Physiol. Plant.* 101: 31-37.
- WALTERS, D. R. 1986. The effects of a polyamine biosynthesis inhibitor on infection of *Vicia faba* L. by the rust fungus, *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) Schroet. *New Phytol.* 104: 613-619.
- WELLBURN, F. A. M. & WELLBURN, A. R. 1996. Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant: Cell and Environment* 19: 754-760.
- YANG, D. S., SAX, M., CHAKRABARTTY, A. & HEW, C. L. 1988. Crystal structure of an antifreeze polypeptide and its mechanistic implications. *Nature* 333: 232-237.