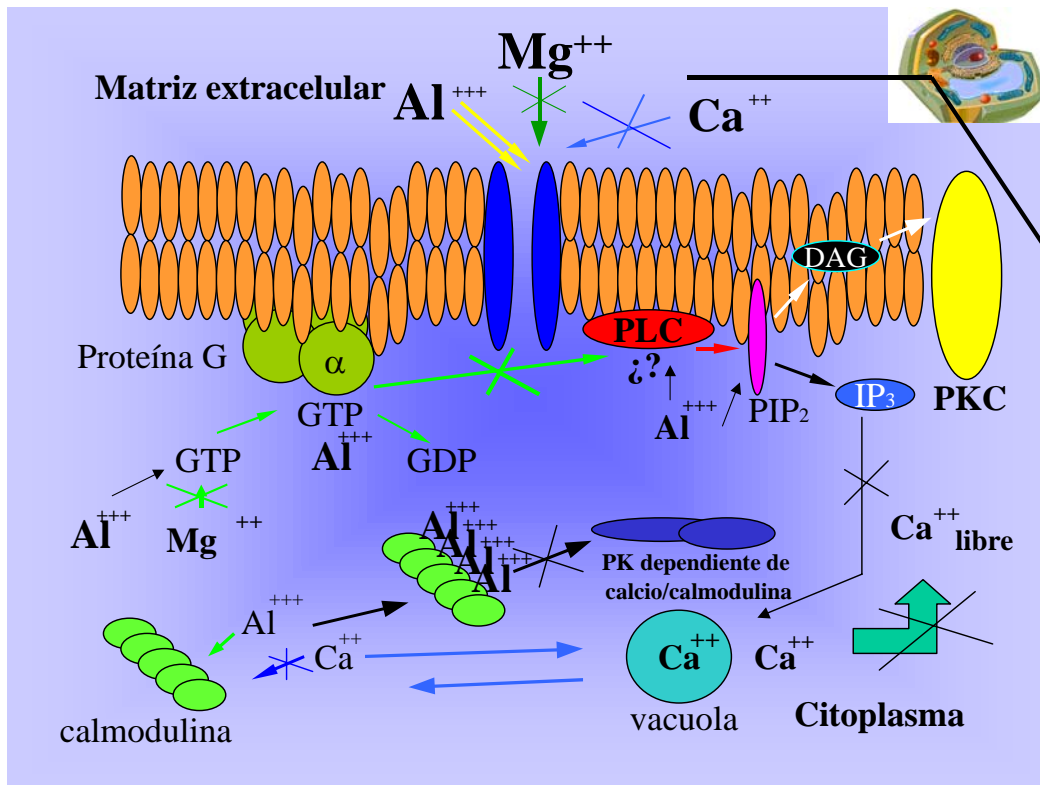


DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café



Manuel Martínez Estévez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Estudios sobre la toxicidad del aluminio
en suspensiones celulares de café**

**Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta:**

Manuel Martínez Estévez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2001

A Ileana, quien a sabido entenderme y a la que le debo gran parte de lo que soy hoy en la vida y en la ciencia,

A la persona que más quiero en el mundo, Luis Manuel, que a pesar de no entender la separación a sido paciente y me ha apoyado siempre, para él es este título.

RECONOCIMIENTOS.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biología Experimental del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. bajo la dirección de la Dra. S. M. Teresa Hernández Sotomayor y el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

Este Trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (33646-N) y una beca de Doctorado (117154) para Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente,

A la Dra. S. M. Teresa Hernández Sotomayor y al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por su gran apoyo incondicional en momentos difíciles, gracias por haber confiado en mi, espero no haberlos defraudado.

A los Doctores S. M. Teresa Hernández Sotomayor, Víctor Manuel Loyola Vargas, Felipe Vázquez Flota, Luis González de la Vara, Armando Escamilla Bencomo, Neftalí Ochoa Alejo, Diógenes Infante, Graciela Racagni de Di Palma e Igor Pottosin por sus valiosas sugerencias y la revisión crítica con la que siempre enriquecieron el presente escrito.

A Ileana, mi esposa y amiga por estar siempre a mi lado en los momentos difíciles y por hacerme creer que algún día lo lograría.

A mis suegros Bertha y Regino, quienes han educado y querido a mi hijo durante este tiempo y sin su ayuda no hubiera podido llegar al final de esta dura carrera, Muchas Gracias.

A mi familia; padre y hermana por su apoyo incondicional, y especialmente a mi madre, que también puso su granito de arena en lograr que mi hijo tuviera un poquito mas de amor.

A la memoria de mi abuela Luisa, que hace 30 años me regaló mi primer microscopio y me llevó por primera vez por la senda de la investigación.

A Rafael y Silvia, amigos y hermanos por apoyarme y tenderme la mano siempre que lo necesité.

A Miriam Monforte, quien tuvo para mí palabras de consuelo en momentos difíciles, me supo tender la mano, y me brindo su amistad.

A Nancy, Kelly, Daisy, Albana y Vicky que nos han apoyado y ayudado en momentos difíciles, a todas ellas les estaremos eternamente agradecidos, Muchas Gracias.

A Angela Ku González, por su amistad, y a José Armando Muñoz Sánchez por su gran apoyo en lo referente al trabajo experimental.

Al Dr. Jorge Santamaría Fernández, Julián Coello y Adriana Quiroz con quienes comencé a formarme en esta difícil carrera.

A todos mis compañeros de clase y de laboratorio, Elizabeta, José, Margarita, Iván, Mario, Manuel, Felipe, Francisco, Luis Carlos, Juan, Ligia, Julissa y a todos los que me dieron consejos y apoyaron incondicionalmente.

A Yucatán y a toda su gente que me tomó como parte de ellos,

Gracias por todo, México.

LISTADO DE FIGURAS.

CAPÍTULO I

Figura 1.1 Representación esquemática de la dependencia de las diferentes especies químicas del aluminio del pH.

Figura 1.2 Representación esquemática de las principales vías de transporte de calcio identificadas en las membranas de células vegetales.

Figura 1.3 Representación esquemática del origen y localización de las señales de calcio en respuesta a estímulos específicos.

Figura 1.4 Estructura general de las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} con dominio parecido a calmodulina (CDPKs).

Figura 1.5 Estructura de cinasas dependiente de Ca^{2+} y de la calmodulina (CaM/ Ca^{2+}).

CAPÍTULO II

Figure 2.1 Characterization of cellular suspension lines of coffee (*C. arabica*).

Figure 2.2 The effects of medium modifications on cellular suspension lines of coffee (*C. arabica*) during a culture cycle.

Figure 2.3 Effect of AlCl_3 on pH, conductivity and growth.

Figure 2.4 Accumulation of Al in cells after exposure to AlCl_3 . Staining of cells of Al-treated cellular suspension with the Al indicator dye Morin.

CAPÍTULO III

Figure 3.1 Change in PIP₂-PLC activity in cellular suspensions of line 2 coffee cells during a culture cycle.

Figure 3.2 Effect of AlCl₃ on PIP₂-PLC activity.

Figure 3.3 Change in PIP₂-PLC activity on day 7 cellular suspensions of line 2 coffee cultures in the presence of different concentrations of AlCl₃ (0, 25, 100 μM).

Figure 3.4 Change in PIP₂-PLC activity on cellular suspensions at day 14 of the culture line 2 of coffee at different concentrations of AlCl₃ (0, 25, 50, 75, 100 μM).

CAPÍTULO IV

Figure 4.1 A General pattern of total proteins from crude extracts of cellular suspensions of Line 2 during a culture cycle.

Figure 4.2 Effect of aluminum on the phosphorylation pattern of suspension cells line 2.

Figure 4.3 Effect of AlCl₃ on the protein phosphorylation calcium dependent pattern.

Figure 4.4 Effect of AlCl₃ on the in vitro phosphorylation assay.

Figure 4.5 Models to represent the different effects of aluminum on the protein phosphorylation.

CAPÍTULO VII

Figura 7.1 Modelo del efecto del aluminio sobre una vía de transducción de señales en la cual están involucradas la enzima fosfolipasa C y la fosforilación de proteínas.

LISTADO DE CUADROS.

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Efectos del Al^{3+} en la toma de Ca^{2+} y su efecto en la inhibición del crecimiento de células vegetales en diferentes especies.

Cuadro 1.2 A Algunos de los mecanismos más estudiados en plantas monocotiledóneas para la tolerancia al efecto del aluminio.

Cuadro 1.2 B Algunos de los mecanismos más estudiados en plantas dicotiledóneas para la tolerancia de las plantas al efecto del aluminio.

CAPÍTULO II

Table 2.1 Growth parameters of the coffee line cell cultivated at different pH and ionic strength.

Table 2.2 Determination of real concentration of AlCl_3 in the different culture media using Morin.

CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS.

AGRADECIMIENTOS.

ABREVIATURAS.

RESUMEN.

ABSTRACT.

INTRODUCCIÓN.

CAPITULO I. Antecedentes.	1
Aluminio.	1
¿Por qué el aluminio es tóxico para las plantas?.	2
¿Por qué la importancia de estudiar el efecto de este metal en el cultivo del cafeto?.	3
Estudios de la toxicidad de aluminio en el cultivo <i>in vitro</i> de células y órganos vegetales.	4
Efecto del aluminio en la homeostasis de calcio intracelular y en el crecimiento de los tejidos de las plantas.	5
Relación del aluminio con el proceso de transducción de señales que involucra a la enzima fosfolipasa C (PLC).	12
Relación entre la fosforilación de proteínas dependientes de calcio y el aluminio.	13
Efecto del aluminio en la secreción de ácidos orgánicos en células vegetales, como uno de los mecanismos de tolerancia a dicho metal.	16
Hipótesis.	20
Objetivos.	20
Objetivos generales.	20
Objetivos particulares.	20
CAPÍTULO II. Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (<i>Coffea arabica</i> L.).	33

CAPÍTULO III. Phospholipase C activity in a cell suspension of coffee (<i>Coffea arabica</i> L.).	46
CAPÍTULO IV. Aluminum increase phosphorylation of particular proteins in cellular suspension of coffee (<i>Coffea arabica</i> L.).	59
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL.	74
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES GENERALES.	83
CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS.	84

INTRODUCCIÓN

Los suelos ácidos representan el 40% de los suelos arables del mundo, y en éstos, el aluminio (Al^{3+}) es uno de los factores limitantes para la productividad de los cultivos (Foy *et al.*, 1978). Este elemento, es el más abundante de los metales de la corteza terrestre (cerca del 7%) (Delhaize y Ryan, 1995).

El café es una planta que en México es cultivada en suelos ligeramente ácidos bajo sombra. Por la elevada concentración de materia orgánica que se deposita en esos suelos el pH tiende a valores más ácidos, lo que permite que el Al^{3+} se encuentre en la forma química en la que es más fácilmente asimilado por las plantas (Pavan, 1983). El primer y más dramático síntoma de la toxicidad por Al^{3+} es la inhibición del crecimiento de las raíces, lo que hace que resulta en respuestas secundarias como la inhibición en la toma de agua y de minerales, con el consiguiente efecto en el crecimiento de la planta. Consecuentemente, se ha estado estudiado la selección y mejoramiento de genotipos asociados con la tolerancia al exceso de Al en un gran número de plantas y cultivos celulares (Conner y Meredith, 1985b; Ojima y Ohira, 1983, 1985; Ojima *et al.*, 1984; Koyama *et al.*, 1988; Kamp-Glass *et al.*, 1993).

Los trabajos en los que se han empleado cultivo de tejidos como estrategia experimental para la selección y mejoramiento de la tolerancia al Al, ha sido necesario modificar los medios de cultivo con el fin de propiciar la toxicidad del Al tal y como sucede en los suelos ácidos (Espino *et al.*, 1995). Para garantizar esa máxima toxicidad es importante usar hierro no quelado, reducir la concentración de fosfato a $10\ \mu\text{M}$, la de calcio a $0.1\ \text{mM}$ y el pH del medio a 4.00 (Conner y Meredith, 1985a). Dentro de estos medios modificados se tienen: el medio MS modificado (Espino *et al.*, 1995; Van Sint Jan *et al.*, 1997); el medio RMNO modificado por Conner y Meredith, (1985c); una mezcla de medios MS:RMNO (2:5) (Conner y Meredith, 1985b); el medio R2 (Koyama *et al.*, 1988) y el medio SH (Kamp-Glass *et al.*, 1993).

Durante varias décadas los estudios de la toxicidad por Al^{3+} , se han encaminado a la obtención de plantas resistentes a este elemento. Sin embargo en los últimos años los estudios de la toxicidad por Al^{3+} , se han abordado a nivel celular, con estudios bioquímicos y moleculares de los daños que provoca la acumulación de Al^{3+} en el interior de las células vegetales. Entre los estudios más importantes que se están realizando se encuentran el de los procesos de crecimiento y división celular, los de transducción de señales que involucran a la enzima fosfolipasa C (PLC) (Haug *et al.*, 1994; Jones y Kochian, 1995), la cinética de la toma de algunos nutrientes, como es el caso específico de la inhibición de la toma de calcio en las células vegetales (Huang *et al.*, 1992a y b; Rengel, 1992a; Archambault *et al.*, 1997), los daños que provoca en el interior de las células (Yamamoto *et al.*, 1997) y los posibles mecanismos de resistencia de las plantas al Al^{3+} , como la exudación de ácidos orgánicos (Delhaize *et al.*, 1993a; Miyasaka *et al.*, 1991; Larsen *et al.*, 1998; Degenhardt *et al.*, 1998).

En este trabajo se presentan los resultados sobre el efecto de la toxicidad al Al^{3+} en procesos metabólicos involucrados en la transducción de señales, usando como modelo suspensiones celulares de café.

CAPÍTULO I

Antecedentes

Parte de este capítulo fue aceptado para su publicación en la revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias.

ALUMINIO

El Al^{3+} es el metal más abundante, y el tercer elemento más común en la corteza terrestre. Éste se encuentra en el suelo en forma de aluminosilicato o de óxidos, siempre que éstos sean suelos medianamente ácidos o neutros. Sin embargo, en los suelos ácidos las formas en las que se encuentra es como Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ó $\text{Al}(\text{OH})_2$. Estas son formas tóxicas para las plantas por estar disponibles en solución, lo que limita su crecimiento (Figura 1.1) (Foy, 1984; 1988). El síntoma inicial y más dramático de la toxicidad por Al^{3+} es la inhibición de la elongación de las raíces (Delhaize y Ryan, 1995).

Diferentes especies del  en dependencia del pH.

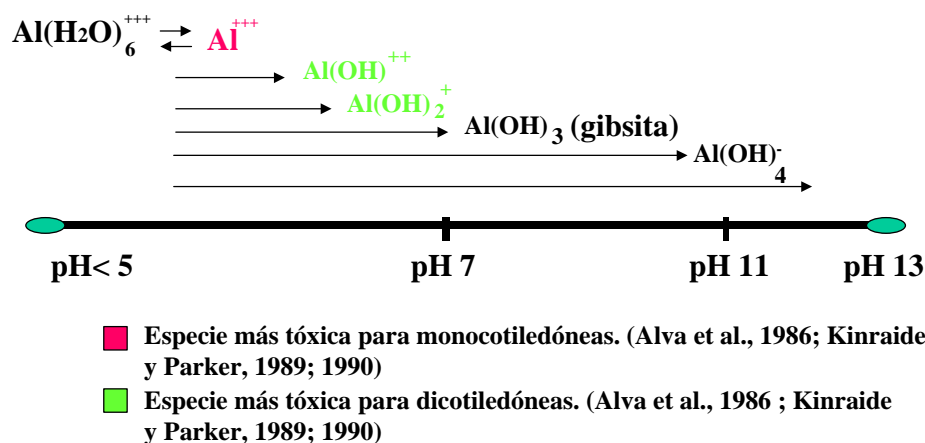


Figura 1.1 Representación esquemática de la dependencia de las diferentes especies químicas del aluminio del pH.

Debido a que el Al^{3+} interactúa con un gran número de estructuras extra e intracelulares, se han descrito diferentes mecanismos mediante los cuales este ión intoxica a las células. Estos mecanismos incluyen la interacción del Al^{3+} con la pared celular de las células de la raíz, con los procesos de transporte a través de las membranas y con constituyentes del simplasto, como por ejemplo la calmodulina.

¿POR QUÉ EL ALUMINIO ES TÓXICO A LAS PLANTAS?

Existe una gran cantidad de síntomas provocados por la toxicidad del aluminio en las plantas. Estos síntomas están vinculados a desórdenes que generalmente se encuentran divididos en dos categorías: (1) respuestas a largo plazo, que toman al menos horas para desarrollarse, y (2) respuestas a corto plazo, que pueden ser

medidas a los pocos minutos o aún a los pocos segundos después de la exposición al Al^{3+} (Taylor, 1988).

Dentro de los síntomas que se consideran vinculados a las respuestas de largo plazo están los relacionados con la inhibición del crecimiento de la raíz. Las primeras señales de estas respuestas relacionadas con la toxicidad al Al^{3+} se han observado después de una hora (Ownby y Popham, 1989). Por otra parte, las respuestas más importantes a la aplicación de Al^{3+} a corto plazo parece ser la interrupción del flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Huang *et al.*, 1992b; Rengel y Elliot, 1992; Jones *et al.*, 1998).

El Al^{3+} , en general, provoca en las plantas síntomas similares a los producidos por la deficiencia de fósforo (hojas pequeñas de color verde oscuro, maduración tardía, amarillamiento y muerte de los ápices de las hojas); también provoca síntomas similares a los producidos por deficiencia o reducción del transporte de calcio (enrollamiento de las hojas jóvenes y colapso de los meristemos). También las raíces de las plantas que son afectadas por aluminio son pequeñas y quebradizas, los ápices de estas raíces y de las raíces laterales se hacen finos y se tornan de color café. Como consecuencia las raíces se tornan ineficientes en la toma de nutrientes y agua (Thawornwong y Van Diest, 1974).

El Al provoca a inhibición de la división celular de los meristemos radiculares, la disminución de la respiración de las raíces, la interferencia con algunas de las enzimas que actúan en la deposición de los polisacáridos de la pared celular, el aumento en la rigidez de la pared debido al mal entrecruzamiento de las pectinas (Foy *et al.*, 1978); la inhibición en la toma y el transporte de varios elementos (Ca^{2+} ,

Mg²⁺, P, K⁺), así como en la toma de agua por las raíces (Foy, 1974) y la precipitación *in vivo* de los ácidos nucleicos al formar fuertes complejos con ellos (Trim, 1959, citado por Foy *et al.*, 1978).

¿POR QUÉ LA IMPORTANCIA DE ESTUDIAR EL EFECTO DE ESTE METAL EN EL CULTIVO DEL CAFETO?

El cafeto (*Coffea ssp.*) es cultivado en más de 50 países, siendo Brasil el principal productor a nivel mundial. A pesar de que hay muchas especies de este cultivo, solo, *C. arabica* y *C. canephora*, son las de importancia económica (Marshal, 1975). La propagación del cafeto es generalmente a través de semillas y las plantas se cultivan en un sombreador de 6 a 24 meses hasta que puedan ser llevadas al campo (Cobley, 1976). Por sus requerimientos agronómicos de sombra, se cultiva en suelos con gran cantidad de materia orgánica, la cual en su durante su descomposición produce H⁺ lo que hace que las condiciones del suelo se tornen ácidas. Esto es un problema en algunas zonas productoras de cafeto en México, ya que la toxicidad del aluminio para las plantas de cafeto provoca pérdidas en el cultivo.

Al igual que con otras especies el primer síntoma de la toxicidad del Al³⁺ en plántulas de cafeto es la inhibición del crecimiento de las raíces. Las raíces laterales se hacen delgadas, las raíces primarias pasan de tener un color blanco a ser de color café pocas semanas después de estar expuestas al tratamiento con Al³⁺. Los síntomas en las hojas comienzan con una necrosis en el borde seguida de un enrollamiento de las mismas. La severidad de estos síntomas se ha

asociado más con la actividad del Al^{3+} , que con la concentración de las especies solubles. Estas hojas de café al ser analizadas después de una exposición al Al^{3+} reflejaron una reducción en el contenido de Ca^{2+} y el $(\text{PO}_4)^{3-}$ intracelular y un aumento en las concentraciones intracelulares de Al^{3+} (Pavan y Bingham, 1982; Pavan *et al.*, 1982; 1983).

Aunque desde la década de los 70s se conocen los efectos del aluminio sobre diferentes cultivos y se han reportado las condiciones a las cuales esto sucede se sabe que la toxicidad por aluminio no es igual para todas las plantas y aún más, no es igual en plantas de una misma especie, ya que la resistencia a la toxicidad de aluminio esta genéticamente controlada (Gallego y Benito, 1997; Wu *et al.*, 1997; Minella y Sorrells, 1997; Zhang y Jessop, 1998; Bianchi *et al.*, 1998). Por ello y debido a la repercusión económica que los efectos de la toxicidad por aluminio tiene en los cultivos, se comenzaron a hacer estudios utilizando las ventajas que brinda el cultivo de tejidos, para la obtención de líneas tolerantes a este metal.

ESTUDIOS DE LA TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN EL CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS Y ÓRGANOS VEGETALES

El cultivo de tejidos se ha utilizado para la selección de mutantes tolerantes a aluminio con el objeto de aumentar la producción de los cultivos en suelos ácidos (Meredith, 1978). Ejemplos son el cultivo celular de zanahoria (*Daucus carota*) (Ojima y Ojira, 1983, 1985; Ojima *et al.*, 1984; Koyama *et al.*, 1988); tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia*) (Conner y Meredith, 1985a ;1985b; 1985c), alfalfa

(*Medicago sativa*) (Kamp-Glass *et al.*, 1993), frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Espino *et al.*, 1995) arroz (*Oryza sativa*) (Vant Sin Jant *et al.*, 1997) y trigo (*Triticum aestivum*) (Barnabás *et al.*, 2000).

Los medios de cultivo de células deben de ser ácido (pH de 4) (Conner y Meredith, 1985a), usar hierro no quelado, reducir la concentración de fosfato a 10 μM , y la concentración de calcio a 0.1 mM . Todo esto con el objeto de lograr la máxima toxicidad del Al y poder simular las condiciones del suelo.

EFFECTO DEL ALUMINIO EN LA HOMEOSTÁSIS DE CALCIO INTRACELULAR Y EN EL CRECIMIENTO DE LOS TEJIDOS DE LAS PLANTAS

Se conoce que a tiempos de exposición al Al^{3+} relativamente cortos (30 minutos) de las plantas, se inhibe el crecimiento de la raíz; y se ha sugerido que se altera el flujo de Ca^{2+} (Lazof *et al.*, 1994).

No es una sorpresa que la interacción Al^{3+} - Ca^{2+} esté implicada en la toxicidad del Al. En estudios recientes se ha reportado que los síntomas de toxicidad severa por el Al^{3+} son muy similares a los que se presentan cuando existe deficiencia de Ca^{2+} , y que la aplicación de calcio en las formas de CaSO_4 y/o CaCO_3 disminuye dicha toxicidad (Delhaize y Ryan, 1995).

Existen algunos trabajos electrofisiológicos en los que se plantea que la toxicidad por Al^{3+} en las raíces no se produce como resultado de daños a la membrana plasmática; sin embargo, se ha determinado que el Al^{3+} induce dramáticas alteraciones en el crecimiento y la morfología de dichas raíces, por lo que se

plantea que se encuentra involucrado en el bloqueo de sistemas específicos del transporte de iones (Huang *et al.*, 1992b; Kinraide, 1998; Miyasaka *et al.* 1989b).

Huang *et al.*, (1992a) estudiaron el efecto del aluminio en la cinética de la toma de Ca^{2+} en las células de los meristemos de las raíces de dos cultivares de trigo. Estos autores determinaron que la cinética de la toma de Ca^{2+} era similar tanto en el cultivar tolerante a la toxicidad por Al^{3+} como en el sensible. Al someter a los cultivares a la presencia de 5 a 20 μM de Al^{3+} la absorción de Ca^{2+} por las raíces fue inhibida de manera importante en el cultivar sensible. Estos resultados indican que la interrupción en el transporte de Ca^{2+} pudiera tener una función importante en el mecanismo de toxicidad por aluminio en cultivares de trigo sensibles a este metal.

El grupo de Huang *et al.*, (1992b), trabajando con cultivares de trigo determinó que la inhibición del flujo de Ca^{2+} a través del plasmalema de la raíz por el Al^{3+} era provocada por un bloqueo de los canales de Ca^{2+} y que la diferencia observada en el efecto del Al^{3+} de inhibir la toma de Ca^{2+} en el cultivar aluminio sensible, pudiera jugar un papel fundamental en los mecanismos celulares de la toxicidad del aluminio en plantas superiores. Otros grupos (Rengel y Elliot, 1992; y Rengel, 1992b) también determinaron que el aluminio bloqueaba rápidamente el flujo de Ca^{2+} posiblemente al bloquear los canales de este ión en protoplastos de *Amaranthus*.

Más adelante, en 1994, Ryan *et al.*, obtuvieron una inhibición severa del crecimiento de las raíces de trigo a concentraciones de Al^{3+} que no afectaron la

toma de calcio, poniendo a discusión la hipótesis de que el Al^{3+} inhibe el crecimiento de las raíces por inhibición en la toma de Ca^{2+} . El mismo grupo concluyó que la hipótesis del desplazamiento de Ca^{2+} por cationes a partir de los canales transportadores o de ligandos en la superficie no es válida en el caso de la toxicidad del Al^{3+} ; sin embargo, no niega la posibilidad que esta toxicidad pudiera ser una consecuencia de la ruptura de la homeostásis de calcio (Kinraide *et al.*, 1994).

Ryan *et al.*, (1997a y b) demostraron que la hipótesis del desplazamiento de Ca^{2+} no podía explicar la toxicidad del aluminio en la inhibición del crecimiento de las raíces de trigo, y sugirieron que ésta puede deberse a una acumulación de aluminio en el meristemo de las raíces, lo cual sucede en la variedad sensible al Al^{3+} .

Huang *et al.*, (1996) caracterizaron canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática de las raíces de trigo y demostraron que actividades micromolares de Al^{3+} efectivamente bloquean dichos canales, tanto en plantas tolerantes, como en plantas susceptibles, con la diferencia de que en las plantas tolerantes el aluminio induce la exudación de malato. Debido a que el malato puede quelar al Al^{3+} en la rizoósfera y excluirlo del meristemo de la raíz, la sensibilidad diferencial del flujo de Ca^{2+} al Al^{3+} en raíces intactas de cultivares resistentes, probablemente se debe al mantenimiento de la baja actividad del Al^{3+} en las zonas meristemáticas de las raíces de los primeros.

Jones *et al.*, (1998), demostraron que el Al^{3+} produce una prolongada reducción en la concentración del Ca^{2+} citosólico y una inhibición del crecimiento en células de tabaco, similar al efecto que produce el bloqueo de los canales de Ca^{2+} por La^{3+} y por el quelador de Ca^{2+} , el ácido etilenglicol-bis(b- amino etileter N, N-tetra acético) en tanto que los canales de Ca^{2+} bloqueados con verapamil y nifedipina no inducen disminución del Ca^{2+} citoplasmático ni disminución del crecimiento.

Estos resultados, como los analizados anteriormente, sugieren que el Al^{3+} puede actuar como bloqueador de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática de las células vegetales y que su acción puede tener una función crucial en su actividad fitotóxica.

La calmodulina es una proteína que por si misma no tiene actividad enzimática, pero es capaz de modular las actividades de algunas enzimas y algunas proteínas sin actividad enzimática de una manera dependiente de calcio (Allan y Hepler, 1989). Debido a su amplio rango de funciones y su ubicuidad en células eucarióticas, la calmodulina es un componente fundamental de las vías de transducción de señales mediadas por calcio.

Se ha sugerido (Siegel *et al.*, 1982; Siegel, 1983) que un blanco primario de la fitotoxicidad del aluminio puede ser la proteína a la cual se une el Ca^{2+} , la calmodulina. Se ha reportado que el Al^{3+} se une estequiométricamente a los sitios de unión a Ca^{2+} de la calmodulina, con una afinidad 10 veces mayor que el propio Ca^{2+} y provoca cambios conformacionales en ella que pudieran inhibir su capacidad para activar otras enzimas (Kochian, 1995). Sin embargo, estudios en

otros laboratorios han creado dudas sobre la interacción calmodulina- Al^{3+} . You y Nelson (1991) determinaron, repitiendo los experimentos de Siegel y Haug, que el ión Al^{3+} no interactúa directamente con la calmodulina, que éste no compite con el ión Ca^{2+} por la calmodulina y que la inhibición encontrada en la enzima fosfodiesterasa activada por dicha proteína fue el resultado del efecto directo del Al^{3+} sobre esta enzima y no sobre la calmodulina.

Schofield *et al.*, (1998) plantearon que sus observaciones no apoyaban la hipótesis de que el Al^{3+} reduce sustancialmente la unión del Ca^{2+} a sus sitios de unión por competencia como se plantea que ocurre en algunas enzimas o en el caso específico de la calmodulina. Una posibilidad es que el Al^{3+} , al entrar a la célula, compita con los sitios de unión del Ca^{2+} a la calmodulina (Siegel y Haug, 1983; Siegel *et al.*, 1982), aunque en este sentido hay resultados contradictorios, Richard y colaboradores encontraron que el Al^{3+} no actúa directamente en la calmodulina y además éste no desplaza al Ca^{2+} del sitio de unión sobre esta proteína, además plantean que la reducción de la concentración de Ca^{2+} citosólica es una consecuencia indirecta de la intoxicación con el Al^{3+} (Richard *et al.*, 1985).

Por último otra teoría acerca del efecto del Al^{3+} sobre la homeostasis del calcio fue dada por Zhang y Rengel (1999) quienes plantean que el Al^{3+} , lejos de disminuir la concentración intracelular del Ca^{2+} , lo que hace es inducir un incremento en dicho ión en raíces intactas de trigo. Esto explica el porque del aumento en la síntesis de calosa en raíces de trigo en presencia de Al^{3+} (Zhang *et al.*, 1994). Se sabe que un incremento en la concentración del Ca^{2+} es un pre-requisito para la síntesis de calosa en células vegetales (Kauss, 1985).

El calcio (Ca^{2+}) tiene una función fundamental en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, debido a que los cambios en la concentración de este ión en la célula se perciben a través de proteínas que regulan una gran cantidad de procesos celulares (Bush, 1995).

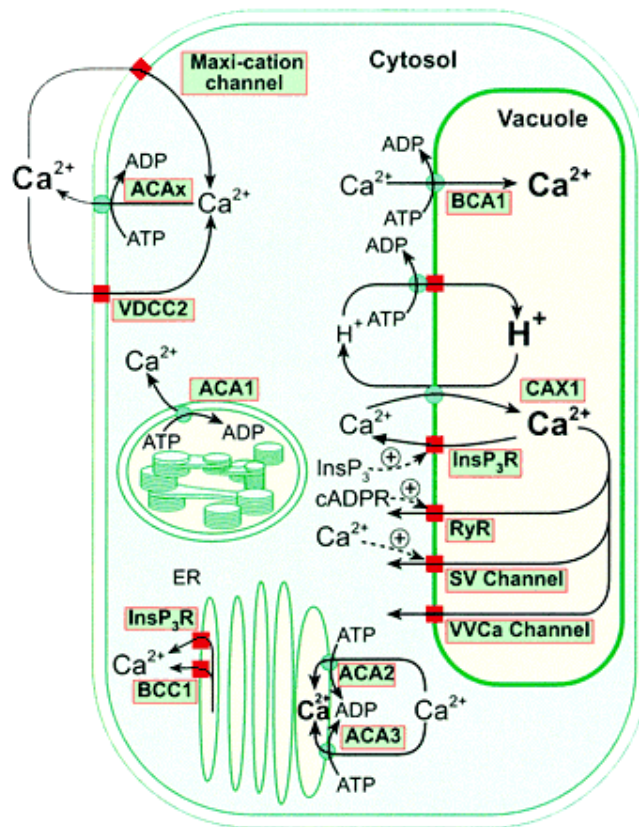


Figura 1.2 Representación esquemática de las principales vías de transporte de calcio identificadas en las membranas de células vegetales. (Redibujado de Sanders, *et al.*, 1999)

El Ca^{2+} también participa en la respuesta acoplada a diversos estímulos en todos los organismos eucarióticos. En las plantas, el Ca^{2+} regula una gran variedad de

funciones celulares, incluyendo el balance iónico (Cosgrove y Hendrich, 1991; Hendrich *et al.*, 1990; Tester y MacRobbie, 1990; Ward y Schroeder, 1994), la motilidad celular (Williamson y Monck, 1989), la expresión de genes (Lam *et al.*, 1989; Neuhaus *et al.*, 1993), el metabolismo de carbohidratos (Brauer *et al.*, 1990), la mitosis (Lino *et al.*, 1989) y la secreción de sustancias (Zorec y Tester, 1992), entre otros.

Hoy en día, los adelantos que se han dado en el estudio de la homeostasis del Ca^{2+} y su papel dentro de los procesos de transducción de señales en las células vegetales, se han acelerado por la posibilidad de medir directamente las actividades de los canales iónicos y los niveles de Ca^{2+} en las células vivas, además del avance en la caracterización de las proteínas transportadoras de Ca^{2+} lo que ha permitido conocer como se afectan éstos en presencia de diferentes efectores (Bush, 1995).

Las señales producidas por el Ca^{2+} citosólico pueden ser el resultado de dos funciones opuestas: los flujos de calcio hacia adentro y hacia fuera del citoplasma. En teoría, las características de los sistemas de transporte que regulan la entrada y salida del Ca^{2+} son los determinantes primarios que forman señales mediadas por dicho ión. Sin embargo, las proteínas que unen calcio, en virtud de su capacidad amortiguadora, pudieran actuar como modificadores significativos de la dinámica de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

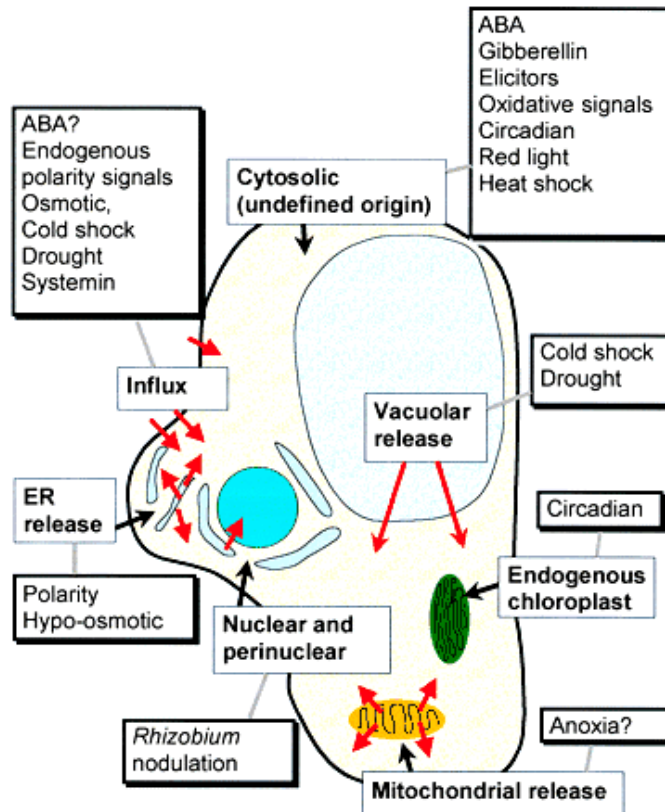


Figura 1.3 Representación esquemática del origen y localización de las señales de calcio en respuesta a estímulos específicos. (Redibujado de Sanders *et al.*, 1999)

Se ha reportado que existen gradientes electroquímicos de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Bjorkman y Cleland, 1991; Harker y Venis, 1991), tonoplasto (Miller *et al.*, 1990; Reid y Smith, 1992), de la membrana de retículo endoplásmico (Knight *et al.*, 1991; Rizzuto *et al.*, 1992), de la membrana de los plastidios y mitocondrias (Kreimer *et al.*, 1988; Rizzuto *et al.*, 1992), así como de la membrana nuclear (Al-Mohana *et al.* 1994; Birch *et al.*, 1992). Los gradientes de Ca^{2+} citoplasmáticos son importantes para el funcionamiento normal de los procesos celulares, no solo durante los eventos de transducción de señales, sino,

para la regulación de los procesos metabólicos propios del citoplasma y de algunos organelos.

En la figura 1.2 se muestra una representación esquemática de las vías de transporte de calcio que han sido identificadas en las membranas de las células vegetales (Sanders *et al.*, 1999). Se ha enfatizado en el papel de los transportadores que son reguladores de calcio en la vacuola, retículo endoplasmático y membranas plasmáticas y nos han mostrado un panorama mas amplio de aquellos eventos en los que esta involucrado el calcio, eventos que pudieran estar siendo afectados por la presencia de concentraciones nanomolares de aluminio dentro de la célula.

La concentración del Ca^{2+} libre en el citoplasma se mantiene generalmente alrededor de 200 nM, pero los aumentos transcientes del Ca^{2+} citoplasmático son vitales para el crecimiento de las células, debido a que éste actúa como segundo mensajero para iniciar y regular procesos metabólicos (Coté y Crain, 1993). Los incrementos transcientes en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático se producen por el flujo a través de la membrana, o por su liberación a partir de organelos celulares, y hay evidencias de que este aumento de Ca^{2+} dispara procesos de señales de transducción que involucran proteínas que unen GTP, proteínas cinasas y fosfatidilinosítidos (Coté y Crain, 1993).

Como se muestra en la figura 1.3 la regulación del flujo de Ca^{2+} a través del tonoplasto y la membrana plasmática, se encuentran implicadas condiciones

extremas provocadas por bajas temperaturas y sequía entre otras, dentro de las cuales pudiera estar participando el aluminio (Sanders *et al.*, 1999).

En el cuadro 1.1 se presenta un resumen de algunas de las hipótesis del efecto del Al³⁺ sobre la toma de Ca²⁺ y el crecimiento en las plantas.

Cuadro 1.1 Efectos del Al³⁺ en la toma de Ca²⁺ y su efecto en la inhibición del crecimiento de células vegetales en diferentes especies.

Autores	Especie	Año	Efectos
Huang <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1992(a)	La inhibición del flujo de calcio a través de la membrana es por un posible bloqueo de los canales de calcio.
Ryan <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1994	La inhibición del crecimiento de la raíz se debe a la toxicidad por aluminio, pero no se observó inhibición en la toma de calcio.
Huang <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1996	La inhibición del crecimiento se debe a un bloqueo de los canales de calcio.
Jones <i>et al.</i> ,	<i>Nicotiana tabacum</i>	1998	La exposición al aluminio induce una disminución en la concentración del calcio citosólico.

RELACIÓN DEL ALUMINIO CON EL PROCESO DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES QUE INVOLUCRAN A LA ENZIMA FOSFOLIPASA C (PLC)

La vía de transducción de señales a través de los fosfoinosítidos involucra la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol 4, 5- bifosfato (PIP₂) por la

enzima fosfolipasa C (PLC) produciendo dos segundos mensajeros intracelulares: el inositol 1, 4, 5- trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG).

El IP_3 tiene el papel primario de movilizar al Ca^{2+} de los depósitos intracelulares donde se acumula este ión. Esta movilización provoca que las concentraciones de Ca^{2+} citosólico aumenten, lo que hace que se produzca una respuesta celular, al activar directamente a proteínas cinasas dependientes de calcio o indirectamente a través de su unión a la calmodulina así como a otras proteínas que unen calcio (Shi y Haug, 1992; Kochian, 1995)

Existen reportes de investigaciones en el campo médico que indican que los mecanismos celulares de toxicidad por Al^{3+} pudieran involucrar interacciones entre el Al^{3+} y algunos de los componentes de la vía de transducción de señales que involucran a los fosfoinosítidos (Shi y Haug, 1992; Coté y Crain, 1993; Haug et al., 1994).

Se ha demostrado que el Al^{3+} es un inhibidor de la actividad de la enzima PLC, en preparaciones de membranas plasmáticas de raíces de trigo (Jones y Kochian, 1995), Kopka y colaboradores demostraron también que el ión Al^{3+} inhibe la actividad de las tres isoformas de PLC caracterizadas en *Solanum tuberosum*, mientras que el ión Mg^{2+} no interactúa directamente con la PLC de la planta, pero puede estimular a la enzima por la vía de un componente que se une a la PLC que pudiera estar presente en las preparaciones de las membranas plasmáticas (Kopka et al., 1998).

En contraste, el ión Al^{3+} al parecer actúa directamente sobre la hidrólisis del PIP_2 , para ello existen dos explicaciones que se pueden aplicar a la inhibición de la hidrólisis del PIP_2 : a) la inhibición pudiera ser causada por una inactivación de la enzima debido al desplazamiento del ión calcio a partir de un sitio de unión putativo en el centro activo del dominio C_2 de la enzima PLC; y b), se pudiera estar formando un complejo Al^{3+}/PIP_2 y que no permite que la PLC hidrolice su sustrato, PIP_2 . De hecho se ha reportado que el Al^{3+} puede sustituir al Ca^{2+} en un complejo de liposomas con diferentes fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, debido a que el Al^{3+} tiene 560 veces más afinidad por los glicerolípidos (Akerson et al, 1989).

RELACIÓN ENTRE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE CALCIO Y EL ALUMINIO

La fosforilación de proteínas es la modificación covalente más utilizada para la regulación de proteínas. Esta reacción es catalizada por un grupo de enzimas llamadas proteínas cinasas. A la fecha se conoce la existencia de un gran número de proteínas cinasas (PK), las que tienen una importante función en los procesos que regulan el desarrollo, así como algunos procesos fisiológicos y bioquímicos. Las PK llevan a cabo la fosforilación de las proteínas, fundamentalmente en los residuos aminoácidos de serina, treonina y tirosina; si bien otros aminoácidos como lisina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico y cisteína también pueden ser fosforilados bajo ciertas condiciones (Walton y Dixon, 1993).

La fosforilación de proteínas ha sido llamada el “cerebro de la célula” y juega un importante papel en el metabolismo y en la transducción de señales en plantas (Fallon y Trewaras, 1993). Se ha estimado que entre el 1 y 3% del total de los genes de una célula eucariótica codifican para proteínas cinasas y que éstas están involucradas en la regulación y el metabolismo celular en muchas vías diferentes (Marks, 1996).

En las plantas existen reportes de la existencia de las siguientes proteínas cinasas: proteínas cinasas dependiente de calcio (CDPKs), proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina, [la calmodulina es una proteína pequeña que une Ca^{2+} y actúa como segundo mensajero en el proceso de transducción de señales provocando un amplio rango de respuestas celulares (Zielinski, 1998)], ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$); proteínas cinasa dependientes de calcio y fosfolípidos [proteínas cinasa C (PKC)]; proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteínas cinasa parecidas a receptores (RLKs), proteínas cinasas dependientes de ciclinas (cdks), proteínas cinasas dependientes de AMP cíclico (PKA), y algunas otras proteínas cinasas (Sopory y Munshi, 1998)

Tomando en consideración que el aluminio inhibe la entrada de Ca^{2+} a las células, así como también la homeostásis del Ca^{2+} intracelular, se esperaría que de alguna manera influya en la fosforilación dependiente de Ca^{2+} de las proteínas.

Las CDPKs (Figura 1.4) son un grupo específico de cinasas que requieren concentraciones micromolares de Ca^{2+} para su actividad, pero no de calmodulina ni de fosfolípidos. Es la presencia de un dominio parecido a calmodulina (Figura

1.4), la que explica por qué las CDPKs son capaces de unirse y subsecuentemente ser activadas por Ca^{2+} (Harmon *et al.*, 1987).

Las proteínas cinasa Ca^{2+} /CaM (Figura 1.5) son un grupo de cinasas que requieren Ca^{2+} y de la calmodulina para activarse, debido a la similitud entre calmodulina y el dominio parecido a calmodulina en las CDPKs la interpretación de los resultados de la identificación de estas proteínas son muy difíciles.

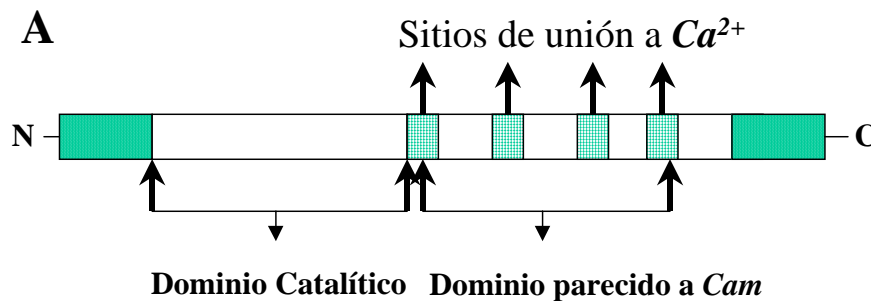


Figura 1.4 Estructura general de las proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} con dominio parecido a calmodulina (CDPKs). (Redibujado de Sopory y Munshi, 1998)

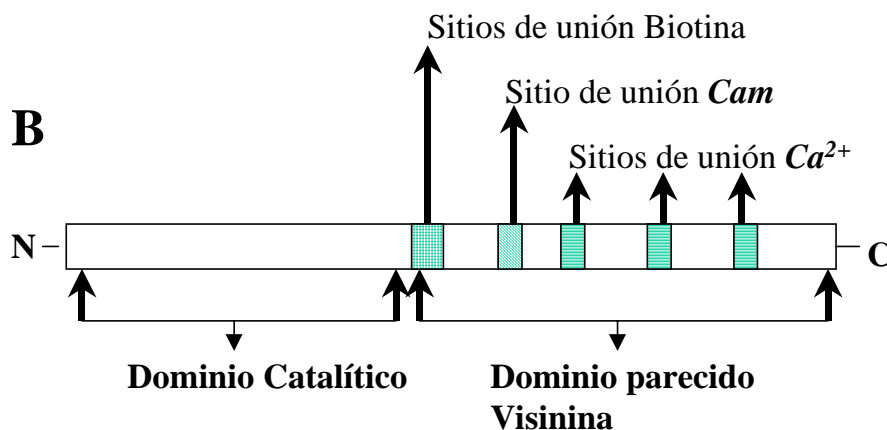


Figura 1.5 Estructura de cinasas dependiente de Ca^{2+} y de la calmodulina (CaM/ Ca^{2+}). (Redibujado de Sopory y Munshi, 1998)

Existen reportes en los que se plantea que el Al^{3+} solo se acumula en la superficie de la membrana de la raíz y que la inhibición del crecimiento de las raíces, en este caso de *Allium cepa*, no ocurre en el interior de los meristemos radiculares, la hipótesis es que la inhibición en el interior de los meristemos es mediada por una señal iniciada o interrumpida por exceso de Al^{3+} en la periferia de los meristemos (Schofield *et al.*, 1998). Esta señal puede activar la cascada de fosforilación y desencadenar respuestas hasta hoy no estudiadas, aún no se sabe cómo y de qué magnitud es la respuesta de la célula a esta señal, en nuestro caso podemos plantear que algunas cinasas incrementan su actividad.

La inhibición del crecimiento de las raíces de *Zea mays* por intoxicación por aluminio ha sido asociada con alteraciones en el citoesqueleto, lo que hace que éste sea considerado un blanco de la toxicidad de dicho metal (Blancaflor *et al.*, 1998). Los movimientos en el citoesqueleto son modulados por fosforilación, esto hace suponer que existe una relación entre aluminio y fosforilación, relación que hasta hoy no ha sido estudiada. A pesar de que se ha reportado el efecto del aluminio en la toma y traslocación de calcio por las células vegetales, no se ha determinado si se afecta la fosforilación, dependiente de calcio, de proteínas. Conocer como funciona la relación entre aluminio y los procesos de fosforilación es uno de los objetivos de este trabajo.

EFFECTO DEL ALUMINIO EN LA SECRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÉLULAS VEGETALES, COMO UNO DE LOS MECANISMOS DE TOLERANCIA

Existen numerosos reportes de que las células de las raíces son capaces de excretar ácidos orgánicos como un mecanismo de tolerancia a la presencia de aluminio; estos ácidos son capaces de quelar al Al^{3+} y de esta forma no está disponible para ser absorbido por la planta. Se ha reportado que la adición de Al^{3+} a una solución nutritiva, estimula la excreción de ácido málico y ácido succínico, por las raíces de las plantas tolerantes de trigo, de 5 a 10 veces más que las plantas sensibles (Delhaize *et al.*, 1993b).

También, la exposición al Al^{3+} estimula la exudación de citrato en el meristemo de las raíces de plantas de maíz tolerantes a este metal (Pellet *et al.*, 1994). Zheng *et al.*, (1998b), reportaron que el Al^{3+} en concentraciones de 150 μM induce la excreción de ácido málico en *Fagopyrum esculentum*. La excreción de ácido oxálico también fue estimulada por el Al^{3+} en plantas tolerantes de esta especie y esta tolerancia estuvo dada por la formación de un complejo Al-oxalato, no tóxico para la planta (Zheng *et al.*, 1998a).

Por último, la acumulación de Al^{3+} en las raíces de las mutantes *alr* de *Arabidopsis* es menor que en los genotipos silvestres debido a que las primeras excluyen al Al^{3+} por quelación con ácidos orgánicos (citrato, malato y piruvato) (Larsen *et al.*, 1998). Existen otros mecanismos de tolerancia de las plantas a la intoxicación por aluminio los cuales se muestran en el cuadro 1.2A y 1.2B.

Cuadro 1.2 A. Algunos de los mecanismos más estudiados en plantas monocotiledóneas para la tolerancia al efecto del aluminio.

Tipo de plantas	Autores	Especie	Año	Mecanismo de tolerancia
M O N O C O T I L E D Ó N E A S	Miyasaka <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1989(a)	Control del pH de la rizósfera y aumento de la capacidad de las plantas tolerantes para mantener un flujo normal de iones y el potencial a través de la membrana plasmática.
	Rincón <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1992	Exclusión del aluminio dependiente del metabolismo de los meristemos de las plantas tolerantes.
	Delhaize <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1993b	El gen <i>alt1</i> codifica para una proteína que es capaz de excluir al aluminio de las células de los meristemos de las raíces.
	Delhaize <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1993a	El aluminio estimula la excreción de ácido málico por las raíces.
	Pellet <i>et al.</i> ,	<i>Zea mays</i>	1995	El aluminio estimula la excreción de ácidos orgánicos (malato y citrato) y de fosfatos por las raíces.
	Archambault <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1996	El aluminio es inmovilizado por el mucigel de las raíces de la planta.
	Archambault <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1997	El aluminio es excluido de las raíces de la planta a través de proteínas transportadoras.
	Coker <i>et al.</i> ,	<i>Triticum aestivum</i>	1998	El aluminio estimula la excreción de ácido málico por las células de la raíz.

Cuadro 1.2 B. Algunos de los mecanismos más estudiados en plantas dicotiledóneas por la tolerancia de las plantas al efecto del aluminio.

Tipo de plantas	Autores	Especie	Año	Mecanismo de tolerancia
D I C O T I L E D Ó N E A S	Miyasaka <i>et al.</i> ,	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1991	El aluminio estimula la excreción de ácido cítrico.
	Larsen <i>et al.</i> ,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1996	El aluminio induce la acumulación de callosa en las células de las raíces.
	Fuente <i>et al.</i> ,	<i>Nicotiana tabacum</i>	1997	Las plantas transformadas con el gen de la citrato sintasa aumentan la excreción de citrato confiriéndole mayor resistencia.
	Zheng <i>et al.</i> ,	<i>Fagopyrum esculentum</i>	1998(a)	El aluminio induce la excreción de ácido oxálico.
	Ma <i>et al.</i> ,	<i>Fagopyrum esculentum</i>	1998	La formación de complejos no tóxicos entre aluminio y ácido oxálico en el interior de las células.
	Larsen <i>et al.</i> ,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1998	El aluminio induce la acumulación y excreción de ácidos orgánicos por la raíz.
	Richards <i>et al.</i> ,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1998	El aluminio induce la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo.
	Degenhardt <i>et al.</i> ,	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1998	El aluminio induce un aumento en el pH de la rizósfera.
	Yamamoto <i>et al.</i> ,	<i>Nicotiana tabacum</i>	1998	La acumulación de fenilpropanoides está dada por un aumento en la actividad de la PAL.
	Yang <i>et al.</i> ,	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1998	El aluminio induce la excreción de ácido cítrico.

HIPÓTESIS

Si el aluminio afecta la vía de transducción de señales que involucra a la PLC, y por lo tanto la homeostasis del Ca^{2+} en diferentes organismos, entonces la presencia de Al en el medio de cultivo de suspensiones celulares de café podría provocar cambios en la actividad de la PLC así como de la fosforilación calcio dependiente de proteínas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar si los efectos tóxicos del aluminio están mediados por cambios en procesos involucrados en las vías de transducción de señales en células de café cultivadas *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones del aluminio sobre el crecimiento de suspensiones celulares de café.
2. Determinar si la vía de transducción de señales que involucra a la enzima fosfolipasa C (PLC) se ve afectada por el aluminio en las células de café.
3. Determinar como afecta la toxicidad por aluminio la fosforilación calcio-dependiente de proteínas en las células de café.

CAPITULO II

MODIFICATION OF THE CULTURE MEDIUM TO PRODUCE ALUMINUM TOXICITY IN CELL SUSPENSIONS OF COFFEE (*COFFEA ARABICA L.*)

Manuel Martínez-Estévez.^{1,2}, J. Armando Muñoz-Sánchez¹, Victor M. Loyola-Vargas¹ and S. M. Teresa Hernández-Sotomayor^{1*}.

Este capítulo fue aceptado para su publicación en Plant Cell Report.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea arabica*) plants are usually grown in soils containing high levels of organic materials. Under these conditions, aluminum (Al) is toxic because of the acidic nature of the soils. Aluminum is the most abundant metal in the earth's crust and occurs in a number of different forms in the soil. Al toxicity is a global problem that limits crop productivity on acid soils. A major problem in obtaining cellular lines with Al tolerance in culture is the composition of the medium. In this work, we modify the composition of the culture medium for a *C.arabica* cell line to produce aluminum toxicity. The media used for these experiments was Murashige-Skoog, complete (MS) and half ionic strength (MSHIS), at either pH 5.8 or 4.3. We found that culture medium at half ionic strength (MSHIS) and pH 4.3 provided the optimal conditions to obtain Al toxicity as measured by the ability to grow in a range of Al concentrations (25-1000 μ M). The lethal dose (LD_{50}) under these conditions was 25 μ M. The concentrations of free Al in the culture medium were corroborated by the fluorescent compound Morin. It was found that Al enters the cell after 30 min and the signal was then retained for up to 2 h.

Key words: Al toxicity, *Coffea arabica*, suspension culture, Morin,
Abbreviations: MS, Murashige and Skoog (1962) media; MSHIS, Murashige and Skoog Half Ionic Strength; SH, Schenk and Hildebrandt (1972) media.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) toxicity is the major factor limiting crop productivity on acid mineral soils, which comprise up to 40% of the world's arable lands (Conner and Meredith 1985). Many wild plants and crops exhibit a genetically-based variability in Al tolerance that has allowed plant breeders to develop resistant crops (Foy et al. 1993). In recent years, as a result of a higher awareness of environmental issues in agriculture, a significant amount of research has focused on the mechanisms of aluminum phytotoxicity at the cellular level (Szatanik-Kloc and Józefaciuk 1997). The most prominent symptom of Al toxicity is inhibition of root elongation and this has become a widely accepted measure of Al stress in plants.

In vitro cell and tissue cultures may provide adequate systems to perform studies on aluminum toxicity (Ojima and Ohira 1983, 1985; Ojima et al. 1984) but, due to the composition of the culture media, supplying Al in a chemical form that remains toxic may require certain modifications (Koyama et al. 1988). In order to maximize Al toxicity, it is necessary to use unchelated iron, to adjust phosphate to 10 μM , calcium concentration to 0.1 μM , and decrease the pH to 4.0 (Conner and Meredith 1985).

There are other media modifications designed to reproduce the conditions found by plants growing on acid soils, where aluminum toxicity is at a maximum. For example, MS medium at half ionic strength (Espino et al. 1995; Van Saint Jan et al. 1997), RMNO medium that is used for culture of rice, and a mixture of different media such as MS: RMNO (2: 5) (Conner and Meredith 1985).

Coffee (*Coffea arabica* L.) is one of the most important major economic crops in the world. Coffee plantations are mainly confined to acid soils, where several toxic forms of aluminum, such as $\text{Al}(\text{OH})_3$ are present. Although Al toxicity is a real problem for coffee producing countries, there are only a few reports regarding the response of coffee plants to aluminum (Pavan et al. 1982). Mexico is the fifth largest coffee producing country in the world. It has 13,128,300 Ha dedicated to silviculture, cattle and agriculture that are affected by Al toxicity

(López 1994). This toxicity is the main factor that affects the development of different crops, like coffee, in the states of Chiapas, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Puebla and Tabasco (Aguilar-Noh 1991).

The main goal of this work was to determine the experimental conditions in which to study the effects of aluminum on coffee cellular growth and to maximize Al toxicity as a model for biochemical and molecular studies.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture. The embryogenic suspension cell line 2 of *Coffea arabica* var. Catuai was obtained from dispersed callus. The callus was obtained from cotyledonary leaves of zygotic embryos of seed cultured *in vitro* in MS media supplemented with 100 mg.L⁻¹ myo-inositol, 10 mg.L⁻¹ thiamine, 25 mg.L⁻¹ cysteine, 3% sucrose, 0.01 mg.L⁻¹ biotin, 0.2% gelrite, 0.5 mg.L⁻¹ kinetin and 0.1 mg.L⁻¹ α -naphthalene acetic acid at pH 5.8. Callus was subcultured several times each 14 d in the same media before transfer to liquid media to obtain the cell suspension. The cell suspension produced was maintained in MS medium (Murashige and Skoog 1962) at pH 5.8 as modified by Santana (1993), including 100 mg.L⁻¹ myo-inositol, 10 mg.L⁻¹ thiamine, 25 mg.L⁻¹ cysteine, 3% sucrose, 3 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1 mg.L⁻¹ 6-benzylamine purine. Transfer to fresh media was done every 14 d at a density of 2.5 g fresh weight / 250 mL. The culture cycle was determined by measuring fresh and dry weight, as well as by the residual medium conductivity during a 24 d period. The pH was also determined.

Growth parameters. Fresh weight was measured by taking the total cellular weight of five flasks per treatment. The pH was measured in a potentiometer (Beckman) using the media from each flask and conductivity was measured in a conductimeter (Cole-Parmer mod. 4070) in each of the five flasks. Growth index is calculated by the final weight minus the initial weight divided by the initial weight (Fw-Iw/w). μ is the slope of the exponential phase (maximum velocity of growth). Duplication time was calculated as $\ln 2/\mu$.

Media modifications to produce aluminum toxicity. To obtain aluminum toxicity, media were prepared using **MSHIS** (MS at half ionic strength) at pH 4.3 and 5.8 and **MS** medium at pH 4.3. Cellular suspensions were cultured in **MSHIS** at pH 4.3 with different concentrations of AlCl₃, ranging from 25 to 1000 μ M.

Determination of Al³⁺ concentration in the culture medium. The concentration of Al³⁺ was determined using Morin (2',3',4',5,7-pentahydroxyflavone), a

fluorescent histochemical indicator for Al (Browne *et al.* 1990; Larsen *et al.* 1998). Morin was prepared as a solution at 0.1 M in dimethylsulfoxide. The media was made with aluminum at different concentrations. The pH was not adjusted after sterilization. Aliquots of 5 ml of media with different concentrations of AlCl_3 were used and Morin was added at 0.1 mM final concentration, and incubated for 1 h. The media turned yellow when Morin formed a complex with free aluminum. The free aluminum concentration was measured in a fluorometer (Turner mod. 111). The standard curve was obtained, using increasing AlCl_3 concentrations in distilled water.

Determination of Al accumulation in coffee cells. To determine whether Al was taken up by the cells, the suspension culture was exposed for different periods of time to 25 μM AlCl_3 in MSHIS media, after which the cells were washed in MES buffer at pH 5.5 for 10 min, stained with Morin (0.1 mM) and visualized by fluorescence microscopy in an invertoscope (Zeiss ICM-405) with an excitation wavelength of 436 nm, and an emission wavelength of 470 nm.

Data presentation.

Results are the means (\pm SE) of duplicate assays from 3-5 experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the cell suspensions of coffee, line 2

As a first approach to the characterization of cell line 2, different parameters were measured, such as fresh and dry weight, pH and conductivity. Figure 1 shows a typical growth curve, where the lag phase continues to the sixth day and the logarithmic growth phase finishes on day 12, after which there is a linear phase from day 14 to day 20 and a stationary phase that starts around day 22. As shown in this figure, conductivity can be used to measure cell growth, since it follows an inverse pattern relative to those of fresh and dry weights. The pH in the media used for this particular experiment decreased sharply in the first 2 d, then returned

to a value close to the original. The maximal growing speed (μ), doubling time (d) and growth index for cell line 2 were 0.097 ± 0.026 , 7.55 ± 1.69 and 12.30 ± 1.90 respectively.

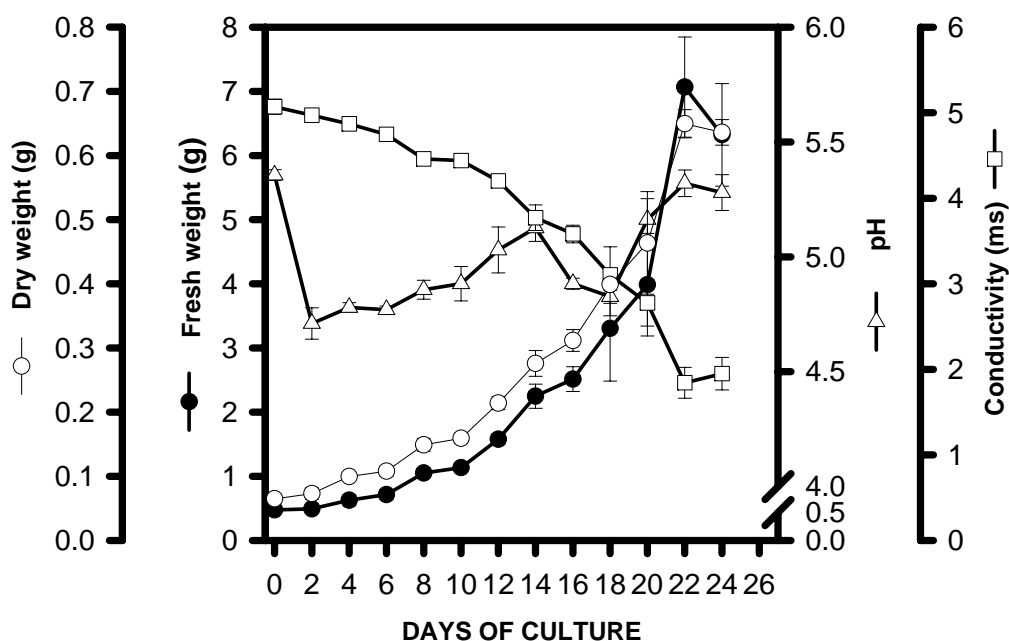


Figure 2.1. Characterization of cell suspension lines of coffee (*C. arabica*). The experiment was initiated with cells from day 14 of a suspension cycle. Cells were maintained in culture for 24 d.

Characterization of cell line 2 under different culture conditions

Conditions of the culture media were modified to achieve the research goal of obtaining conditions in which the cells were exposed to maximum Al toxicity similar to the conditions present in acid soils.

Coffee cells were unable to grow in Schenk and Hildebrandt (1972) (SH) modified medium (data not shown), a medium used to obtain Al toxicity, with a very high concentration of phosphate compared with half strength MS (Kamp-Glass et al. 1993). As a consequence, the cells were cultured using media at half ionic strength (MSHIS) and with the calcium and phosphate concentrations

reduced from 2.9 mM and 1.2 mM to 1.45 mM and 0.6 mM, respectively, as reported by Santana (1993). As mentioned before, a critical parameter for Al toxicity is the pH value. In our experiment the original pH of 5.8 was reduced to 4.3.

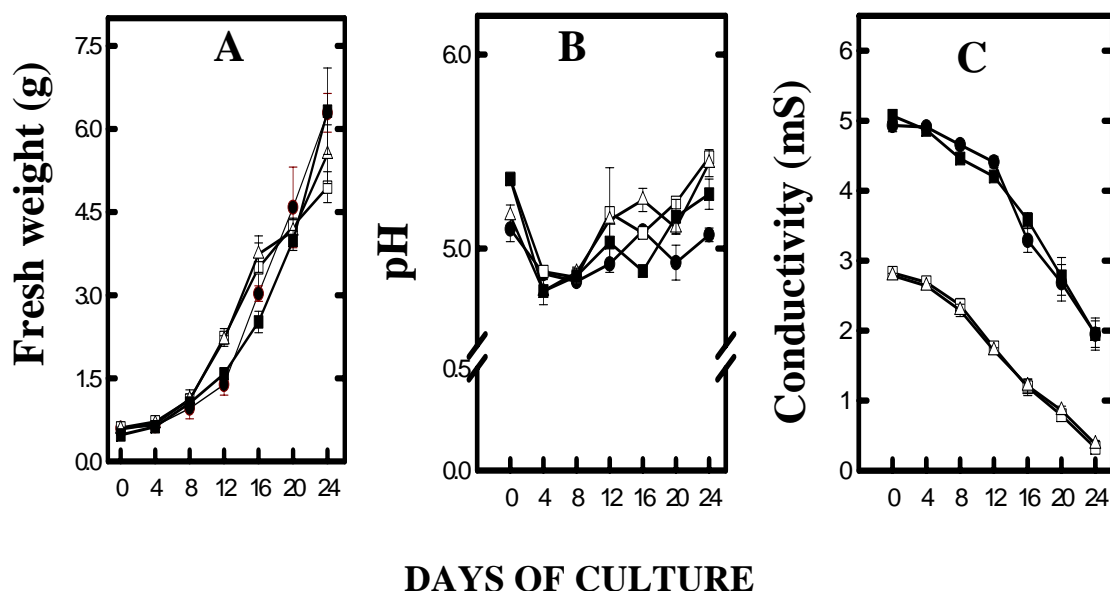


Figure 2.2. The effects of medium modifications on cell suspension lines of coffee (*C. arabica*) during a culture cycle. A) Fresh weight. B) pH of the medium. C) Conductivity of the medium. The experiment was initiated with cells from day 14 of a suspension cycle. Cells were maintained in culture for 24 d. (●) pH 4.3 complete MS salts, (□) pH 5.8 MSHIS salts, (▽) pH 4.3 MSHIS salts, (■) pH 5.8 complete MS salts.

Figure 2 shows the effects of media modifications on growth and pH in a suspension cell line of coffee during a culture cycle. Cells were maintained in culture for 24 d. Slight variations in the fresh weight values were observed during the culture cycle (Fig. 2A). These changes were mainly between the media with different ionic strengths. Also, during the linear phase of the culture cycle, the cells cultured in the half ionic strength media grew faster than those cultured in other media. By day 24 of the culture cycle the nutrients of the half ionic strength media were almost exhausted at both pH values, suggesting that pH is not a factor for growth (Fig. 2C).

After cell inoculation, the pH value of the culture media increased from 4.3 to 5, but after 2 d in culture, the pH value of the media decreased from 5 to 4.1. It is important to note that this is the pH we expect to favor aluminum toxicity (Fig. 2B and Table 1).

Table 2.1. Growth parameters of the coffee cell line cultivated in different conditions.

	pH 4.3	pH 5.8 ½ salts	pH 4.3 ½ salts	pH 5.8
Maximal growing speed (μ)	.10±0.14	0.12±.00	0.12±0.00	0.10±0.01
Doubling time (d)	7.12±0.96	5.68±0.13	5.79±0.13	7.08±0.69
Growth index	10.03±1.40	7.35±0.42	8.16±1.12	12.30±1.90

Growth parameters of the line under different culture conditions are shown in Table 1. Cells cultured in a half ionic strength media have a greater growth velocity (0.12 and 0.12) than the cells cultured in a complete ionic strength media (0.10), regardless of the pH of the culture media.

The cellular suspensions of coffee grew normally in MSHIS at low pH (4.3), (Fig. 2A). This is a major achievement since cell culture under these conditions is crucial to study Al toxicity. This finding supports the fact that the decrease in growth is due to the effect of the metal, not nutrients like phosphate or calcium (Conner and Meredith 1985).

Table 1 shows the growth parameter data of coffee suspension cells at different concentrations of the culture media and at different pH levels. The lack of nutrients is the fundamental reason why the fresh weight of the cultivated cells in half ionic strength media is different from the original (Fig. 2C). The pH of the media, even if not a parameter of cell growth, does indicate that aluminum is

always available, independent of the initial pH, if the pH of the media is maintained below 5 for the first 8 d.

Since the cells were able to grow in the modified media at half ionic strength (MSHIS), the effects of aluminum on the cell suspensions in media at half ionic strength and pH 4.3 were investigated further.

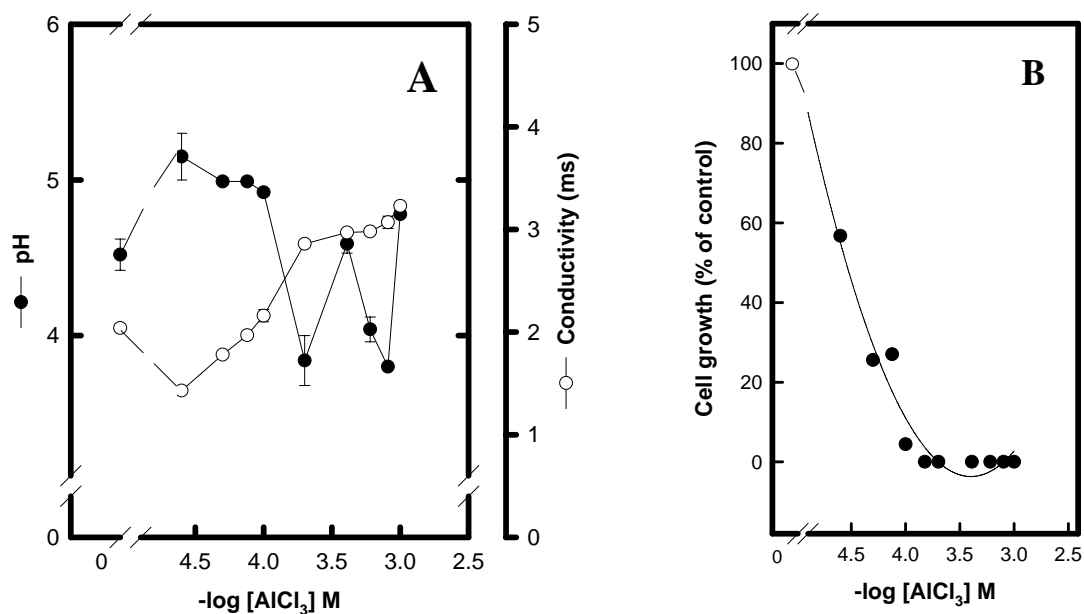


Figure 2.3. Effect of AlCl_3 on pH, conductivity and growth. A) Cells were maintained in culture for 14 d in modified media (MSHIS and pH 4.3) in the presence of increasing concentrations of AlCl_3 . At day 14, pH and conductivity of the media were measured. B) Cells were maintained as in A, and cell growth measured as fresh weight. The results are expressed as a percentage of the control which was 3.34 g in cells grown in the absence of AlCl_3 . (○) Cells cultured in the absence of AlCl_3 to day 14 and (●) cells cultured in the presence of AlCl_3 to day 14.

Dose-response curve of the aluminum effect on the line 2 cells

Cell suspensions were cultured in media supplemented with different concentrations of aluminum (25-1000 μM) during a culture cycle (14 d). Fresh and dry weight as well as pH and conductivity were measured. Figure 3A shows the effects of the presence of AlCl_3 on the media, after cells were cultured in these conditions for 14 d. In cells grown in the absence of AlCl_3 the pH increases up to 5.2, probably due to the excretion of organic acids. When the concentration of

AlCl_3 was higher than 100 μM , the pH dramatically dropped and started to behave without a pattern. This is probably due to the fact that the cells stop growing and most of them are dead. The conductivity increased because the cells were dying and their contents were entering the media. As shown in Figure 3B, the growth rate of the cells diminished in a dose-responsive fashion in the presence of Al^{3+} . The lethal dose 50 of aluminum (LD_{50}) was 25 μM .

Determination of the free concentration of Al in the culture media

Exact concentration of free Al in the culture media was determined because aluminum can form complexes with different reagents. The fluorescent compound Morin was used because it fluoresces only when it forms a complex with free Al (Browne *et al.* 1990; Larsen *et al.* 1998). The initial Al concentrations and the concentrations of free aluminum are presented in Table 2. At pH 4.3, in both total ionic strength and half-ionic strength media, the free aluminum concentrations were close to the theoretical Al concentrations. In contrast, at pH 5.8 free aluminum concentration was very low in both total ionic strength and half ionic strength media. This observation further confirms that pH is a key factor for the availability of free Al^{3+} .

Table 2.2. Determination of concentration of free Al in the different culture media using Morin.

AlCl_3 INITIAL CONCENTRATIONS (μM)	FINAL CONCENTRATIONS (μM)			
	Total salts pH 5.8	Half salts pH 4.3	Total salts pH 4.3	Half salts pH 5.8
25	7.84	21.19	17.25	9.14
50	10.81	49.15	32.00	11.32
75	14.51	62.72	51.00	14.00
100	19.49	76.25	64.52	18.70

Although media conditions may be adequate to maintain Al toxicity similar to that of the mineral acid soils, frequently some of the initial aluminum will eventually precipitate, when it forms a complex with phosphates. We needed to know how much of the initial Al was readily available, as it is an important parameter to be determined in this type of study. The low concentration of phosphate, calcium and others ions is also influenced by the availability of Al to the cells.

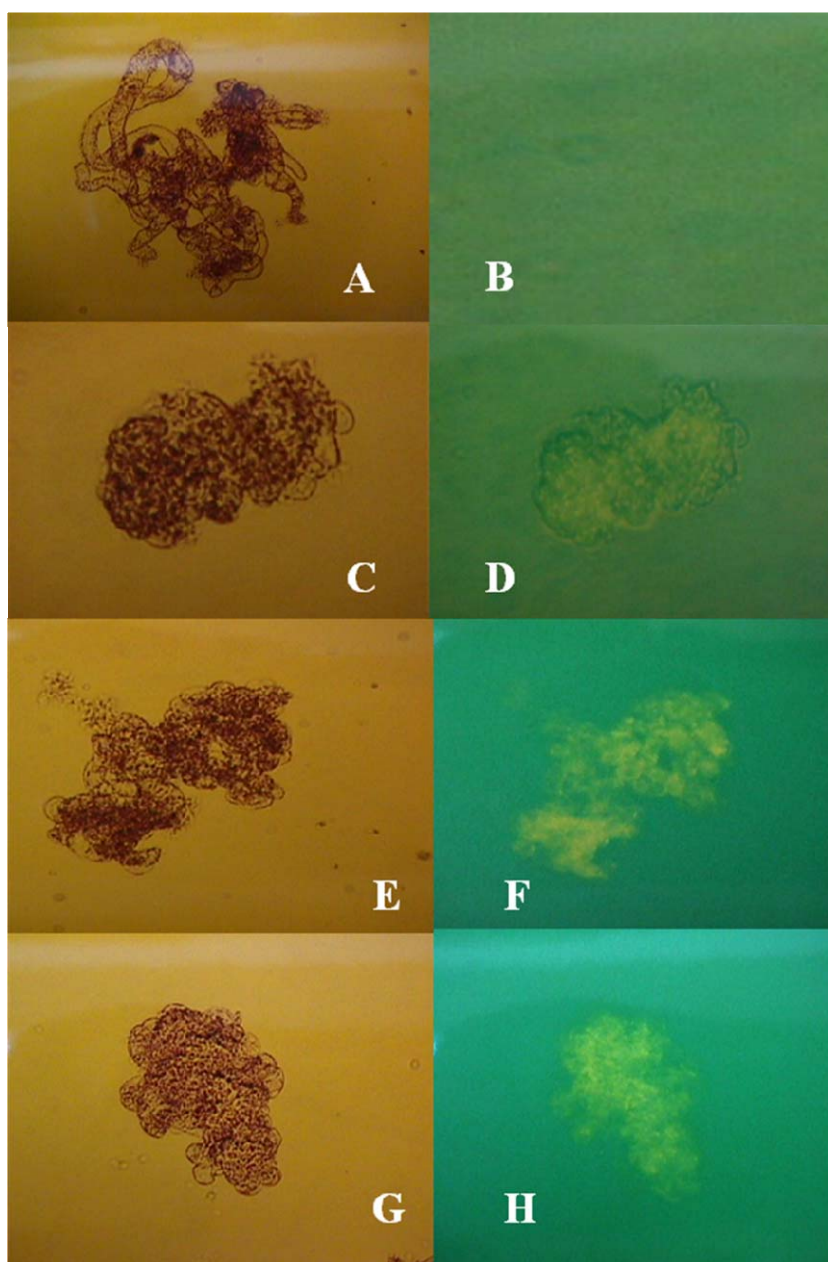


Figure 2.4. Accumulation of Al in cells after exposure to AlCl_3 . Staining of cells of Al-treated cellular suspension with the Al indicator dye Morin. Cells from day 14 of the culture cycle were exposed for different times (30, 60, and 120 min) to $25 \mu\text{M AlCl}_3$ in medium, except in the first panel (A, B). Cells were stained with Morin ($100 \mu\text{M}$). Panels A, C, E & G imaged with visible light; panels B, D, F & H imaged with UV light.

Determination of Al in the cells

As it was critical to know if free Al was entering the cells, the fluorescent compound Morin was used. In the presence of 25 μM of aluminum, Morin fluorescence increased when the duration of cell incubation increased (Fig. 4). At 30 min, Al enters into the cell and the signal increases progressively up to 120 min.

It is important in any study regarding Al toxicity to have conditions that assure that Al is soluble. It is also fundamental to know how much of this metal, in its free form, is available to the cells and, most importantly, how much enters into the cells. Figure 4 shows that the entry of Al positively correlates with the time that the cells are exposed.

The present work is a prerequisite to determine the effect of this metal at the cellular level. With these results we can study in depth the effect of aluminum on different biochemical pathways and try to better understand aluminum toxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

The technical assistance of Angela Ku González is greatly appreciated. Supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (333646-N) and a fellowship to M.M.E. (117158).

REFERENCES

Aguilar-Noh A (1991) La acidez del suelo y su fertilidad. In: Memories of the first seminary about management of tropical soils in Chiapas, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Chiapas, México, pp. 40-45

Browne BA, McColl JG, Driscoll CT (1990) Aluminum speciation using Morin: Morin and its complexes with aluminum. *J Environ Qual* 19: 65-72

Conner AJ, Meredith CP (1985) Strategies for the selection and characterization of aluminum-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 166: 466-473

Espino FJ, Gonzalez-Jaen MT, Ibañez J, Sendino AM, Vazquez AM (1995) Aluminum effects on *in vitro* tissue cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Current Issues Plant Mol and Cell Biol* 545-549

Foy CD, Carter JR, Duke E, Devine TE (1993) Correlation of shoot and root growth and its role in selecting for aluminum tolerance in soybean. *J Plant Nutrition* 16: 305-325

Kamp-Glass M, Powell D, Reddy GB, Baligar VC, Wright RJ (1993) Biotechniques for improving acid aluminum tolerance in alfalfa. *Plant Cell Rep* 12: 590-592

Koyama H, Okawara R, Ojima R, Yamaya T (1988) Reevaluation of characteristics of a carrot line previously selected as aluminum-tolerant cells. *Plant Physiol* 74: 683-687

Larsen PB, Degenhardt J, Tai CY, Stenzler LM, Howell SH, Kochian LV (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol* 117: 9-18

López W (1994) Socioeconomic aspects of acid soil management: the case of southeast Mexico. In: *Memories of the 15th World Congress of Soil Science*. International Science and the Mexican Society of Soil Science, Acapulco, México, 5^a: 520-535

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth on bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 608-612

Ojima K, Ohira K (1983) Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant Cell Physiol* 24: 789-797

Ojima K, Abe H, Ohira K (1984) Release of citric acid into the medium by aluminum-tolerant carrot cells. *Plant Cell Physiol* 25: 855-858

Ojima K, Ohira K (1985) Reduction of aluminum toxicity by addition of a conditioned medium from aluminum-tolerant cells of carrot. *Plant Cell Physiol* 26: 281-286

Pavan MA, Bingham FT, Pratt PF (1982) Toxicity of aluminum to coffee in ultisoils and oxisols amended with CaCO₃, MgCO₃ and CaSO₄ 2H₂O. *Soil Sci Soc Amer J* 46: 1201-1207

Santana N (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto. PhD Thesis. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba

Schenk BV, AC Hildenbrant (1972) Médium and techniques for induction and groth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50: 199-204

Szatanik-Kloc G, Józefaciuk G (1997) Effect of pH and aluminum on surface properties of barley roots as determined from water vapor adsorption. *Acta Phys Plant* 19 (3): 327-332

Van Saint Jan V, Costa de Macedo C, Kinet JM, Bouharmont J (1997) Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponics cultures. *Euphytica* 97 (3): 303-310

CAPÍTULO III

Phospholipase C activity in a cellular suspension of coffee (*Coffea arabica* L.): Aluminum effect.

Manuel Martínez Estévez, J. A. Muñoz-Sánchez, V.M. Loyola-Vargas and S.M.T. Hernández-Sotomayor

Parte de este capítulo forma parte de un artículo enviado a Plant Physiology.

KEYWORDS

Aluminum, signal transduction, phospholipase C, *Coffea arabica*, cellular suspensions.

ABBREVIATIONS

PLC, phospholipase C; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; DAG, diacylglycerol ; PIP₂, phosphatidilinositol 4,5-bisphosphate.

ABSTRACT

The effect of aluminum on PLC enzyme activity was examined in 7 and 14 days old coffee cell suspension. In 14th day of culture which display a high PLC activity, aluminum reduces enzyme activity in a dose- dependent manner when cells were incubated in the presence of AlCl₃. However, it was not inhibited when day 7 cells were incubated with AlCl₃. Indeed, there was slight PLC activity at low concentrations. PLC activity was also inhibited when protein extracts were incubated *in vitro* with different concentrations of AlCl₃. Our data suggest that PLC may be a target for aluminum toxicity.

INTRODUCTION.

Aluminum (Al) toxicity is among the most important factors determining the distribution of plant species and ecotypes as well as the growth and yield of crops on acid mineral soils (Haug, 1984). A characteristic of Al phytotoxicity is the rapid inhibition of root elongation. The basis for the growth inhibition mechanism still remains as a matter of speculation (Ryan *et al.*, 1994).

Several hypotheses for Al³⁺ toxicity have been suggested. These include: alteration of the cation-exchange capacity of the cell walls; changes in the membrane potential which directly affects the uptake of the cations such as Ca²⁺ and /or Mg²⁺ (Kuhn *et al.*, 1995), induction of oxidative stress via lipid peroxidation; replacement of Mg²⁺ or Fe³⁺ in cellular reactions; interaction with signal transduction pathways (Jones and Kochian, 1995): and direct binding to DNA and/or RNA. In fact there is only indirect evidence supporting each of these possibilities (Delhaizer and Ryan, 1995, Kochian, 1995).

Phospholipase C plays a key role in the signal transduction pathway in animal cells. PLC catalyses the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate generating two potential intracellular secondary messengers: diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5, trisphosphate (IP₃) (Berridge, 1993). Via this pathway, DAG activates protein kinase C, (which phosphorylates and thereby regulates a variety of proteins) and IP₃ raises cellular free Ca²⁺ levels (thereby regulating proteins sensitive to Ca²⁺ and to Ca²⁺/calmodulin, or sensitive to phosphorylation by Ca²⁺-dependent protein kinases). In neuroblastoma cells it had been demonstrated that aluminum interacts with the phosphoinositide associated signal transduction pathway. A guanine nucleotide-binding protein (G-proteins) and a phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP₂)-specific phospholipase C are the probable interaction sites for inhibitory actions of aluminum ions (Shi and Haug, 1992; Haug *et al.*, 1994).

In plants, specifically wheat roots, PLC activity has been assayed directly in the presence of Al^{3+} in microsomal membranes. It was shown that AlCl_3 inhibited PLC activity in a dose-dependent manner and at physiologically relevant Al^{3+} levels, suggesting that Al exposure may specifically target PLC (Jones and Kochian, 1995). Also, in *Catharanthus roseus* transformed roots, Al^{3+} inhibited the enzymatic activity in a concentration- and time-dependent fashion, in both soluble- and membrane-associated activities (Piña-Chable and Hernández-Sotomayor, in press).

A molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato and aluminum was used in competition experiments. A significant inhibition of PIP_2 hydrolysis, starting at equimolar concentrations of Al^{3+} was observed for all PLC isoenzymes (Kopka et al., 1998).

There are reports where aluminum inhibited PLC activity. One was associated with signal transduction in neuroblastoma cells when the effects of aluminum on inositol phosphate formation were examined in murine neuroblastoma cells labeled with [^3H]-myo-inositol. In aluminum pretreated cells, IP_3 was released and the intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ changes were appreciably less than for the control group (Shi and Haug, 1992). The second report is associated with the characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato when PLC activity that were inhibited by Al^{3+} in equimolar amounts (Kopka et al., 1998).

The goal of this work was to test the effect of different concentrations of aluminum on PLC activity in a cell suspension of coffee.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture: Embryogenic suspension cultures, line 2, of *Coffea arabica* were obtained by desegregation of callus and maintained in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) at pH 5.8, as described in chapter two. To obtain a high aluminum toxicity this cell suspension was cultured in a modified medium (half ionic strength) at pH 4.3. These medium was supplemented with 100 mg.L⁻¹ myo-inositol, 10 mg.L⁻¹ thiamine, 25 mg.L⁻¹ cysteine, 3% sucrose, 3 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 1 mg/l 6- benzylamino purine (6-BAP).

Preparation of tissue and cell extracts: Cells were quick-frozen with liquid nitrogen and homogenized with a politron in buffer A (1 g of tissue in 2.5 ml; 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.2 mM orthovanadate). Extracts were centrifuged at 14,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant (protein: 3-5mg/ml) was recovered, quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The protein concentration of the samples was measured by BCA using bovine serum albumin as standard (Smith *et al.*, 1985).

PLC assay: The hydrolysis of [³H]PIP₂ was measured as described by Hernández-Sotomayor *et al.*, (1999) in a reaction mixture (50 µL) that contained 35 mM NaH₂PO₄ (pH 6.8), 70 mM KCl, 0.8 mM EGTA, 0.8 mM CaCl₂ (final concentration 25 µM) 200 µM PIP₂ (aprox. 333.3 Bq), 0.08% deoxycholate. The reaction was stopped with 100 µL of 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 250 µL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA). Precipitates were removed by centrifugation (4,000 rpm for 10 min) and the supernatants collected for quantification of [³H]IP₃ release by liquid scintillation counting Aquasol.

RESULTS.

PIP₂-PLC activity was detected in the total protein extract of line 2 cells. The period of PLC activity during the growth culture peaked at days 14 and 24. The lowest specific activity was detected during the lag phase of culture. The activity increased dramatically on day 14, when the exponential phase of the culture occurred (Figure 3.1).

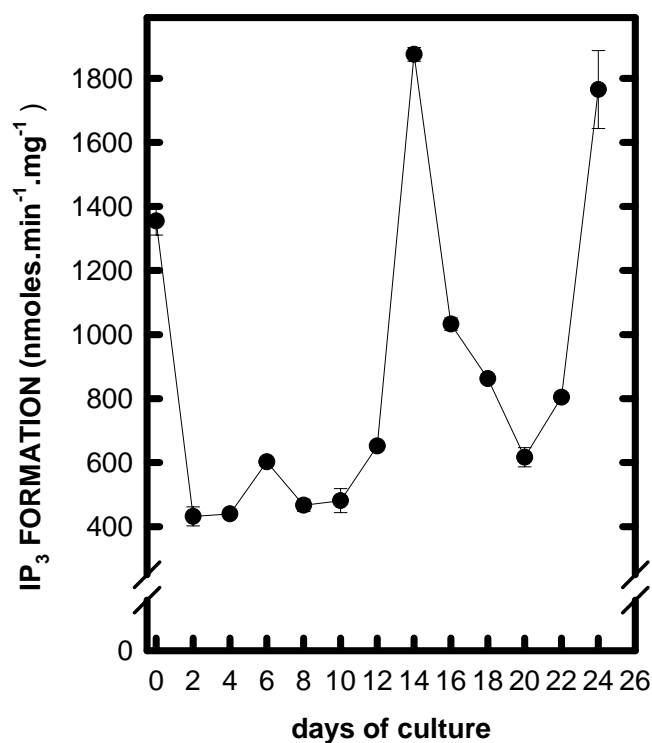


Figure 3.1 Change in PIP₂-PLC activity in coffee cell suspensions of line 2 during a culture cycle. PLC activity is expressed in absolute values of IP₃.

Once PLC activity was characterized during a culture curve, the effect of *in vivo* treatment of the cells with AlCl₃ was tested. Cells from day 14 of the curve were incubated for one hour in the presence of increasing concentrations of aluminum.

After the cells were exposed to AlCl_3 , the protein extract was obtained and the PLC activity measured. Results are presented in Figure 3.2 A.

A dramatic inhibition of the enzyme was observed depending on which AlCl_3 concentrations was used. The fact that the enzyme was inhibited when assayed *in vitro*, suggests that aluminum may be interacting directly with the enzyme, in a manner that induces it to remain inhibited even when isolated from cells (Figure 3.2 B). In another set of experiments, PIP_2 was incubated with AlCl_3 for 1 hour and the protein extract was added (Figure 3.2 C), under these conditions the enzymatic activity was also inhibited. This experiment suggests that aluminum may be directly interacting with PIP_2 .

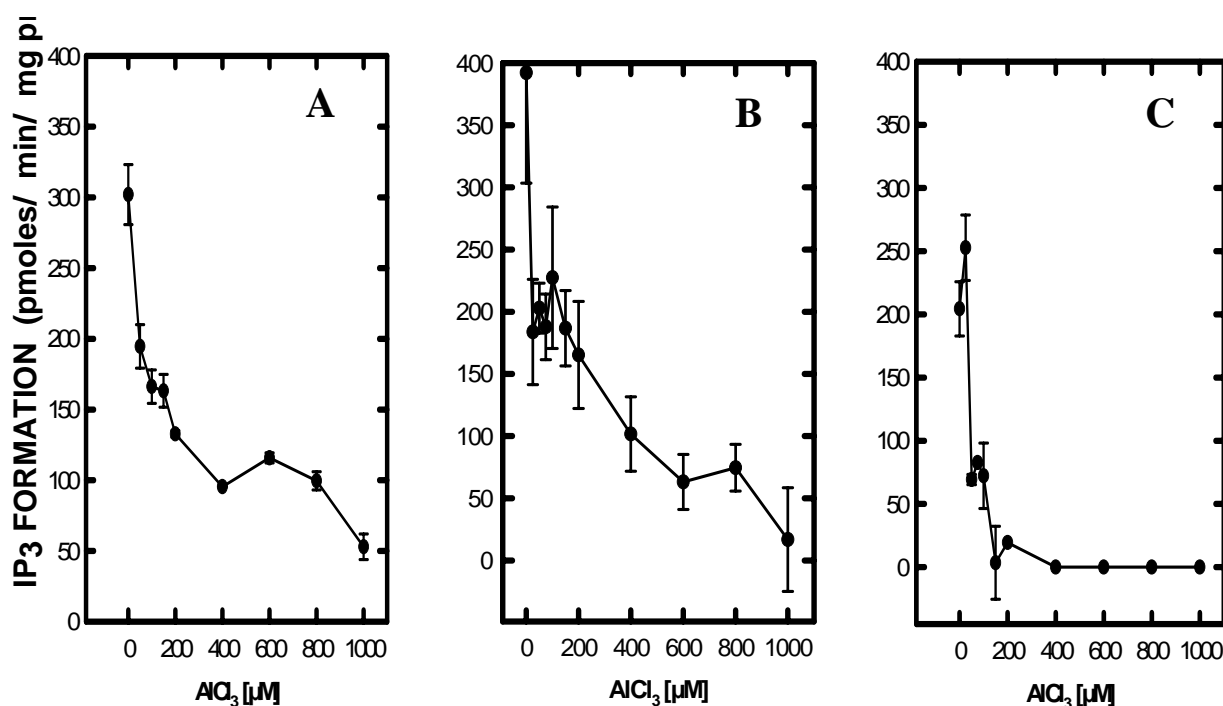


Figure 3.2 Effect of AlCl_3 on PIP_2 -PLC activity. (A) Cells from day 14 of the culture cycle incubated in the presence of increasing concentrations of AlCl_3 . After 1 hour total extract was obtained and PLC activity was determined as described in Materials and Methods. (B) The total extract from cells from day 14 of culture was incubated for 1 hour with AlCl_3 and PLC activity initiated with the addition of the substrate. (C) PIP_2 -PLC activity *in vitro*. The reaction mix was incubated with increasing concentrations of aluminum.

The presence, for 1 hour, of different concentrations of aluminum in the cellular suspension also affected the PLC activity in a manner dependent on the concentration (Figure 3.2 A). As our previous results show, aluminum can interfere with the hydrolysis of PIP_2 , a IP_3 for specific PLC enzyme.

When the total extract was incubated with increased aluminum concentrations for one hour (Figure 3.2 B) we observed that PLC activity reduced more rapidly than as shown in Figure 3.2 A. On the other hand, when we incubated the reaction mixture, that contained the PIP_2 , with aluminum concentrations (figure 3.2 C) the activity was also inhibited. In both experiments (Figures 3.2 B as 3.2 C) the substrate of the enzyme was in contact with increasing concentrations of aluminum for one hour. This showed that aluminum can bind to phospholipids through one of their electric charges inhibiting the recognition of the substrates by the enzyme.

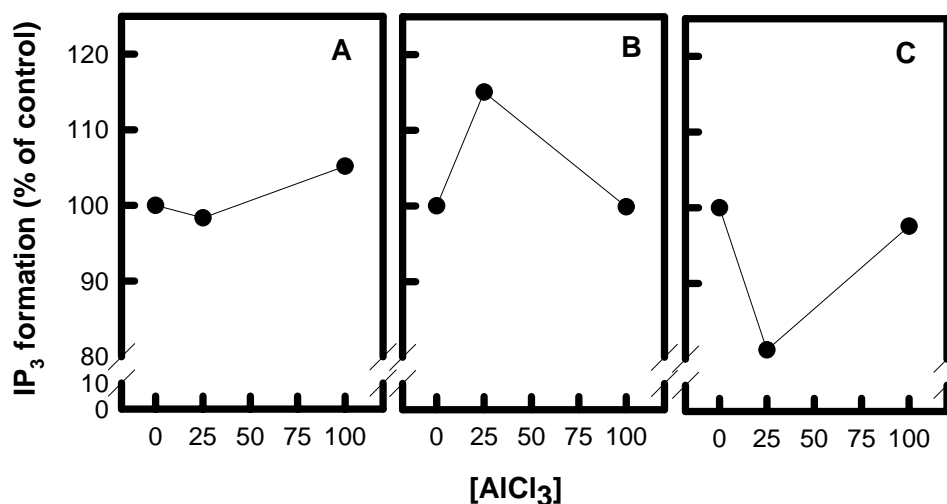


Figure 3.3 Change in PIP₂-PLC activity on day 7 cell suspensions of line 2 coffee cultures in the presence of different concentrations of AlCl₃ (0, 25, 100 μM). PIP₂-PLC activity was measured in a crude extract that was incubated in the presence of different concentrations of aluminum for different times. Above-left. PIP₂-PLC activity of control. The extract of the cells was made after incubation. (A) PIP₂-PLC activity. The extract was incubated with different concentrations of aluminum for 15 min. (B) PIP₂-PLC activity after 30 minutes of incubation and (C) PIP₂-PLC activity after 60 minutes of incubation. Basal activity was 442 pmol. mg⁻¹. min⁻¹.

This study is part of ongoing research in our laboratory that involves the study of aluminum toxicity on the phosphoinositide- signal pathway. The effect of AlCl₃ on the lipid kinases that regulates PIP₂ levels was investigated (Racagni *et al.*, 2001 submitted). In coffee cells, PI-4 kinase and PIP-5 kinase activities reach a maximum at day 7 of the culture cycle. Aluminum treatment of cells increase these two lipid kinase activities. For these reasons, we decided to explore the effect of AlCl₃ on PLC activity, using day 7 cells of the culture cycle.

The cells were incubated for different periods of time with two concentrations of AlCl₃, in the same conditions that induced activation of the lipid kinases. The results

are presented in Figure 3.3, and show that no inhibition of the PLC enzyme was obtained. Surprisingly, a slight increase of PLC activity was detected after 30 minutes of incubation with 25 μM of AlCl_3 . These results were corroborated by measuring IP_3 levels *in vivo* (Racagni *et al.*, 2001).

In the same way we determined the PLC activity on day 14 cells of the cycle culture incubated in increasing concentrations 25, 50, 75, 100 μM and for shorter times (0, 5, 10, 30 minutes) to compare with the kinases. We observed that at 30 minutes it is easy to see a dose response; the activity of the enzyme decreases while the aluminum concentration increases. These results are similar to those show in Figure 3.2 at one hour.

It is interesting to see in this case that at initial time there is an increase of enzyme activity of 60 % (25 μM) and 80 % (50 μM). These could be due to the stress of the cells in the presence of aluminum for few minutes and could explain the increase in activity of some calcium dependent protein kinases in the presence of this metal (see chapter VI). There is no evidence that aluminum increases the activity of these enzymes.

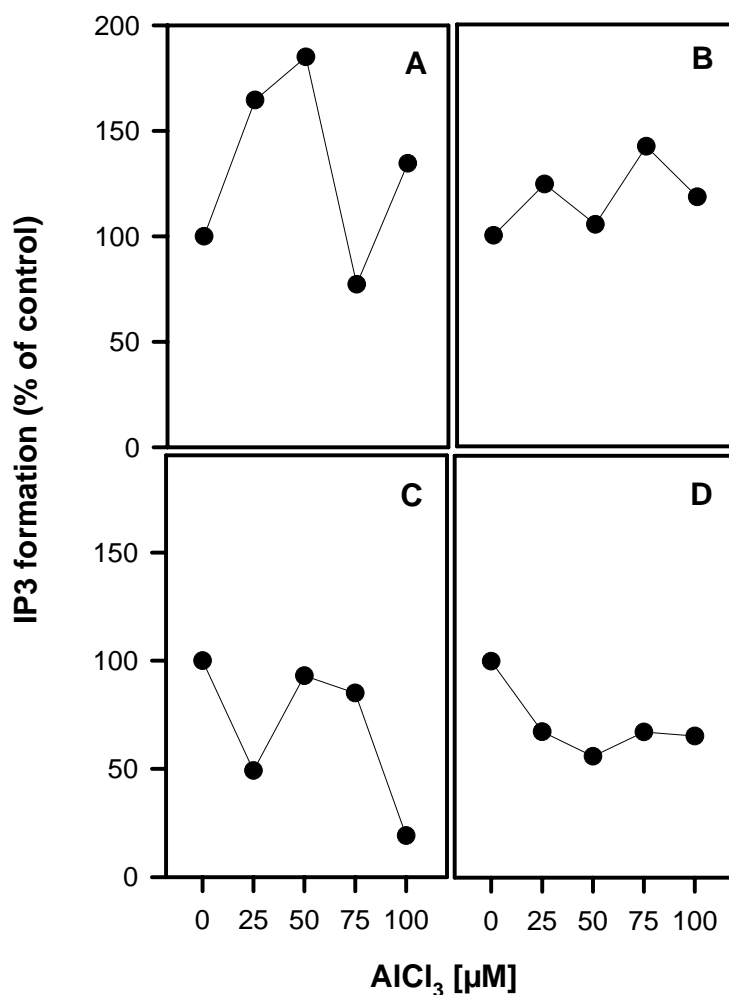


Figure 3.4 Change in PIP₂-PLC activity in a cell suspensions at day 14 of the culture line 2 of coffee at different concentrations of AlCl₃ (0, 25, 50, 75, 100 μM). PIP₂-PLC activity was measured in crude extract and was incubated in the presence of different concentrations of aluminum for different times. (A) PIP₂-PLC activity of control: all the extracts were made after incubation. (B) PIP₂-PLC activity: The extract was incubated with different concentrations of aluminum for 5 min. (C) PIP₂-PLC activity after 10 minutes of incubation (D) PIP₂-PLC activity after 30 minutes of incubation.

DISCUSSION

There are reports that indicate that the application of 50 μM of AlCl_3 inhibits PLC activity in wheat root cells. This inhibition did not affect the dephosphorylation of IP_3 suggesting that the Al acts directly on the PLC enzyme (Jones y Kochian, 1995). Haug et al, (1994) also proposed that the G protein and the inositol 4,5 biphosphate (PIP_2) are primary targets for Al inhibition of PLC activity.

The results shown here for the enzyme activity indicate that the incubation of the cells with Al inhibits IP_3 formation, both *in vivo* and *in vitro*, (Figures 3.2 A and B). This suggests that in our model the PLC enzyme may also be a target for aluminum toxicity.

Aluminum could be acting directly on the PLC enzyme as suggested by Kochian, (1995) or by competition for Mg^{2+} via the G-protein (Macdonald et al., 1987; Haug et al., 1994). However, in plants it has not been fully demonstrated that the PLC isoforms are regulated by G-proteins.

Another possibility is that Al may, through its charges with the substrate PIP_2 , impair the recognition of the substrate by the enzyme (Figure 3.2 C).

It is clear from studies in yeast and animal cells that the presence of PIP_2 and IP_3 are a pre-requisite for a number of cellular events such as fertilization, development, cell growth, differentiation, phototransduction and neuromodulation (Uno et al., 1988; Berridge, 1993). It is possible that aluminum can reduce cell growth via PLC as it has been suggested that PLC in plant cells may be involved in the regulation of cell growth.

We can conclude that aluminum inhibits PLC activity and that this inhibition is dependent on incubation times the concentration of AlCl₃ used and the stage of the cellular culture.

REFERENCES.

Berridge M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.

Delhaize E. and P. R. Ryan, (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* **107**: 315 - 321.

Haug A., B. Shi, and V. Vitorello, (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide - associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* **68**: 1 - 7.

Haug A. (1984) Molecular aspects of aluminum toxicity. *Crit. Rev. Plant Sci.* **1** : 345-373.

Hernández-Sotomayor S. M. T., C. De Los Santos-Briones, J. A. Muñoz-Sánchez and V. M. Loyola-Vargas (1999) Kinetic analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots using different assays. *Plant Physiol.* **120**: 1075-1081.

Jones D. L. and L. V. Kochian (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* **7**:1913-1922.

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

Kopka J., C. Pica, J.E. Gray and B. Muller-Rober (1998) Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide- specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol.* **116**: 239-250.

Kuhn, A.,J. Bauch and W. Schroder (1995) Monitoring uptake and contents of Mg, Ca, and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant Soil* **168**: 135-150.

MacDonald, T.L, W.G. Humphreys, and R.B. Martin (1987) Promotion of tubulin assembly by aluminum ion in vitro. *Science* **236**, 183-186.

Martínez-Estévez M., J. A. Muñoz-Sánchez, V. M. Loyola-Vargas and S. M. T. Hernández –Sotomayor (2001) Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity on cellular suspension of coffee (*Coffea arabica* L.). Plant Cell Reports in press.

Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 608-612

Piña-Chaple M. L. and S. M. T. Hernández-Sotomayor (2001) Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Planta* in press.

Ryan P. R., T. B. Kinraide and L. V. Kochian (1994) Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminum rhizotoxicity. I. inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta.* **192**: 98-103.

Shi B. and A. Haug (1992) Aluminum interferes with signal transduction in *Neuroblastoma* cells. *Pharm. Toxicol.* **71**: 308 - 313.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Malia, F. H. Gartner, M. D. Provensano, E. K. Fujimoto, M. N. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Biochemistry J.* **150**:76-85.

Uno I., T. Oshima, and T. Ishikawa (1988) Localization of the regulatory subunit of c-amp-dependent protein kinase in *Saccharomyces cereviceae*. *Exp. Cell. Res.* **176**: 360- 365.

CAPITULO IV

Aluminum increases phosphorylation of particular proteins in cellular suspension cultures of coffee (*Coffea arabica* L.)

Manuel Martínez-Estévez, Victor M. Loyola-Vargas and S.M.Teresa Hernández-Sotomayor.

Este capítulo está sometido para su publicación a la revista Journal of Plant Physiology.

KEY WORDS: aluminum, *Coffea arabica*, protein phosphorylation

ABBREVIATIONS: SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; PLC, phospholipase C.

ABSTRACT

Aluminum (Al) is the most abundant metal in the earth's crust and occurs in a number of different forms in the soil. Al toxicity is a global problem that limits crop productivity in acid soils. Coffee is a plant which grows in soils with a high organic matter content and Al is available in these soils because they are acidic. In the present work, we demonstrate the effect of aluminum toxicity on the phosphorylation protein pattern. *Coffea arabica* suspension cells were incubated with increasing concentrations of AlCl_3 (200-1000 μM) and an *in vitro* phosphorylation reaction with cell extracts was initiated. There was no change in the proteins present in extracts from cells treated with AlCl_3 , compared with untreated cells, however the protein phosphorylation patterns did change. The phosphorylation proteins with a molecular mass of 18, 31 and 53 kDa increased dramatically after the *in vivo* treatment of the cells with AlCl_3 . Yet when AlCl_3 was added to the reaction mixture, no differences in the phosphorylation patterns were observed. These results suggest that *in vivo* treatment of the cells with AlCl_3 regulates the activity of some protein kinases.

INTRODUCTION

Aluminum (Al) toxicity is widely considered to be the most important growth-limiting factor for plants in highly acid soils (Conner and Meredith 1985, Matsumoto 2000). A characteristic of Al phytotoxicity is rapid inhibition of root elongation and, as the most easily recognized symptom of Al toxicity, this has become a widely accepted measure of Al stress in plant. This inhibition could be related to different biochemical process, such as signal-transduction mechanisms (Jones and Kochian 1995). The basis for Al toxicity in cell growth is not clear, but it has been suggested that it affects cell division. Covalent modification of proteins by phosphorylation/dephosphorylation, through which physiological and biochemical events are regulated, implies that protein kinases are essential for cellular activities.

Protein kinase activity has been reported in *Nicotiana tabacum*, *Datura innoxia* (Bocher et al. 1985, Heim et al. 1985) and potato (Ulloa et al. 1997) cells or tissues cultured *in vitro*. In these reports, changes in either kinase activity (Bocher et al. 1985, Heim et al. 1985, Ulloa et al. 1997) or in the protein phosphorylation pattern (Kuo et al. 1995) were observed during growth or differentiation. In recent years, plant biologists have become more aware of the importance of environmental issues in agriculture and a significant part of research in this area has focused on the mechanisms of aluminum phytotoxicity at the cellular level. The pathway that has been most studied to date involves phosphoinositide turnover (Jones and Kochian 1995) and it is well known that protein phosphorylation is one of the postransductional modifications that regulates such physiological events in the cell (Sopory and Munshi 1998). Studies on the effect of aluminum toxicity and protein phosphorylation are not yet available. Genetic, biochemical and pharmacological analyses have shown that protein kinases and protein phosphatases play important roles in environmental stress response.

In this study we focus on this, using *Coffea arabica* suspension cells to study the effect of aluminum on protein phosphorylation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture: Embryogenic suspension culture line 2 of *Coffea arabica* L. was obtained by desegregation of callus and maintained in MS medium (Murashige and Skoog 1962) at pH 4.3 and half ionic strength (Martínez-Estévez et al. 2001) supplemented with 100 mg.L⁻¹ myo-inositol, 10 mg.L⁻¹ thiamine, 25 mg.L⁻¹ cysteine, 3% sucrose, 3 mg.L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and 1 mg.L⁻¹ 6-benzylamine purine (6-BAP). The embryogenic suspension culture was subcultured every 14 days.

Tissue homogenization: Cells were either treated or not treated with different concentrations of AlCl₃ after which they were quick frozen with liquid nitrogen and homogenized with a politron in buffer A (1g of tissue in 2.5 mL; 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 250 mM sucrose, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate and 0.2 mM orthovanadate). Extracts were centrifuged at 1000 g for 30 minutes at 4°C to remove debris. The supernatant (protein: 3-5 mg/mL) was used for the *in vitro* phosphorylation experiments. All steps during the extraction were performed at 4°C. Cell extracts were quick frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein concentrations of samples were measured with the bicinchoninic acid protein assay reagent (Smith et al. 1985) using bovine serum albumin as standard. The total protein pattern was analyzed by SDS-PAGE using 12% acrylamide gels according to the Laemmli method (1970) using a Mini Protean II Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Gels were stained with silver (Bloom et al. 1987).

***In vitro* phosphorylation assay:** Aliquots of crude extract were incubated with phosphorylation buffer containing 20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM sodium orthovanadate, 50 μM [³²P]ATP (10 μCi.nmol⁻¹). After 30 minutes the

reaction was stopped with Laemmli buffer (Laemmli 1970). In some experiments, the *in vitro* phosphorylation reaction started on aliquots of crude extract from cells not treated with AlCl_3 , or with different concentrations of AlCl_3 for 1 hour at 30°C . In all experiments, after the separation of phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE, the proteins were electroblotted on nylon membrane for 5 hours at 50 volts. Phosphoprotein bands were visualized by autoradiography on KODAK Ektagraphic films.

RESULTS

In vitro phosphorylation pattern

As previously shown (Martínez-Estevéz et al. 2001) we modified the composition of the culture medium of a *C. arabica* cell line to produce aluminum toxicity, as measured by the reduced ability to grow in a range of Al concentrations from 25 to 1000 μM . Under these conditions the lethal dose 50 of aluminum (LD_{50}) was 25 μM . In the previous work (Martínez-Estevéz et al. 2001), we also measured the free concentrations of Al in the culture media using the fluorescent compound Morin, which fluoresces only when forming a complex with free Al (Browne et al. 1990, Larsen et al. 1998). At pH 4.3 and with half ionic strength media, the free aluminum concentrations were close to the theoretical Al concentrations (Martínez-Estevéz et al. 2001) For example, the free Al concentration was 77 μM of the total 100 μM AlCl_3 .

The general patterns of total proteins and *in vitro* protein phosphorylation during a culture cycle of *C. arabica* cells is presented in Figure 4.1. Protein patterns were obtained by SDS-PAGE and subsequent staining of gels with silver nitrate solution. In Figure 4.1A, the protein pattern is presented. Although there are small changes in some proteins, depending on the culture day, in general there were no dramatic changes throughout the culture period.

Once we determined the general protein pattern, aliquots of the total extract from cells from different days of the culture cycle were incubated with [^{32}P]-ATP as described in Materials and Methods. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE using 12% acrylamide gels and electroblotted on nylon membranes. Phosphoprotein bands were visualized by autoradiography. This *in vitro* phosphorylation assay detected several labeled phosphoproteins (Fig. 4.1B). The high molecular weight phosphoproteins were not modified by the culture day on which the extract was made. However, low molecular weight phosphoproteins had

changed, particularly when compared to day zero. A 41 kDa phosphoprotein appeared at day two.

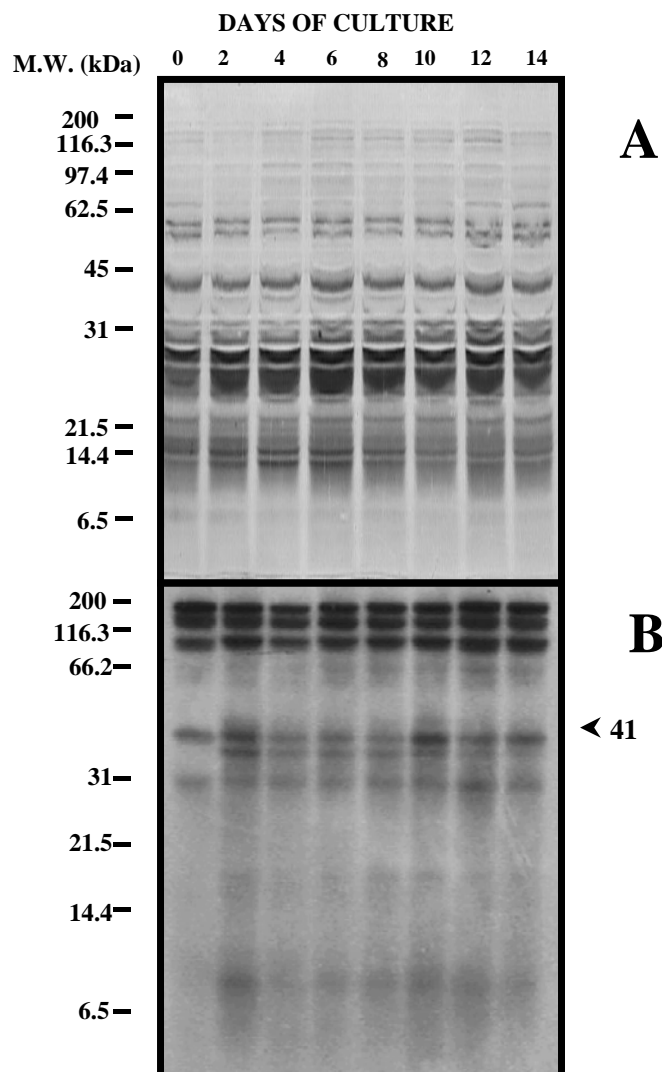


Figure 4.1A. General pattern of total proteins from crude extracts of cellular suspensions of Line 2 during a culture cycle. Total proteins (30µg) were separated in 12% SDS-PAGE and stained with silver nitrate solution. **B.** Comparison of phosphorylation pattern proteins from the crude extract of Line 2 during a culture cycle. Total proteins (100 µg) were phosphorylated *in vitro* in the presence of [³²P]-ATP as described in Material and Methods. Proteins were separated in 12

% SDS-PAGE and electroblotted on nylon membranes. Kodak film was exposed for autoradiography for 3 days. The results represent three separate experiments

Effect on protein and in vitro phosphorylation patterns. of cells treated with aluminum.

We chose day 14 of the culture cycle to see the effect of cell treatment with Al on the protein pattern and *in vitro* phosphorylation, as this was the day when we found changes in other enzymatic activities, such as phospholipase C (Racagni et al. 2001, in preparation), The exponential phase of cell growth also started on day 14 (Martínez-Estevez et al. 2001)

Cells were treated with increasing concentrations of Al for 1 hour. Figure 4.2 shows the total protein pattern of the cell suspension of line 2 of coffee incubated with different aluminum concentrations for 1 hour. We can observe in panel A that Al treatment did not modify the general protein pattern. High molecular weight proteins disappeared.

Figure 4.2B, shows the phosphoprotein pattern when extracts, obtained from cells treated with different concentrations of Al, were incubated *in vitro* with [³²P] □ATP. As with the general protein pattern, there were no changes in the phosphoproteins of high molecular weight (> 70 kDa) even when cells were treated with very high aluminum concentrations, but there was an increment in the phosphoproteins (<70 kDa) of low molecular weight (18, 31, and 53 kDa).

As stated in the introduction, because Al may modify the signal transduction pathway linked to Ca²⁺ and phospholipids, we wanted to test how it affected the calcium dependent phosphorylation pattern. An *in vitro* experiment was designed to do this. Total protein extract from cells of the 14th day, treated with AlCl₃ or

untreated, were incubated with [^{32}P]ATP in conditions in which calcium dependent phosphorylation can be seen. Since the real concentration of calcium in the extract is not known, we used a calcium chelator, EGTA (1 mM), to fix a known calcium concentration *in vitro*. Under these conditions, most of the phosphobands found in the total extract were present (Fig. 4.3). The calcium free concentration was fixed at 25 μM . This concentration was achieved using 1 mM EGTA plus 1 mM CaCl_2 , as calculated by EqCal program.

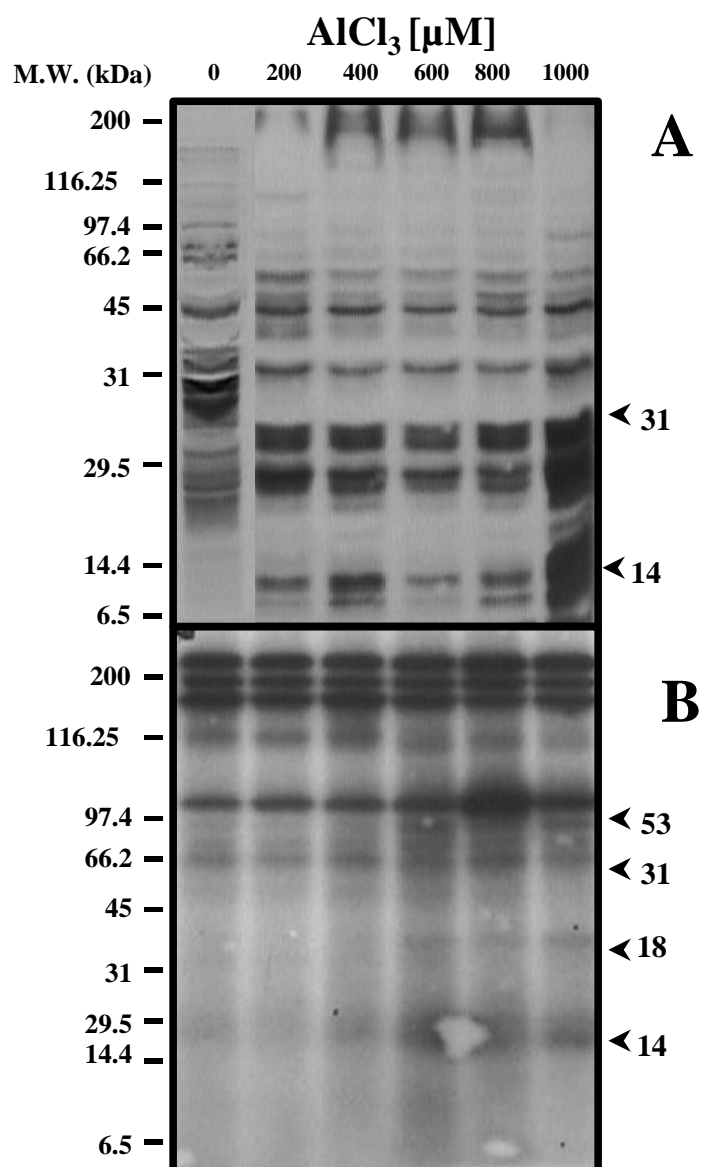


Figure 4.2. Effect of aluminum on the phosphorylation pattern of suspension cells line 2. Cells from day 14 of the culture cycle were or were not treated with increasing concentrations of AlCl₃. After 1 hour of incubation, the total extract was prepared and separated on 12% SDS-PAGE for silver nitrate staining (30 µg) (A) or phosphorylated *in vitro* (100 µg) in the presence of [³²P]-ATP as described in Materials and Methods (B). Other indications are as in figure legend 1.

When calcium was added an 18 kDa phosphoband appeared (Fig. 4.3). This seemed to be the only phosphoband in which phosphorylation was calcium-dependent. Protein extracts from cells treated with increased concentrations of Al were incubated under these conditions (EGTA plus Ca²⁺) to observe *in vitro* phosphorylation. We saw a clear increase in the content of ³²P in the 18 kDa band, while most of the proteins were not affected.

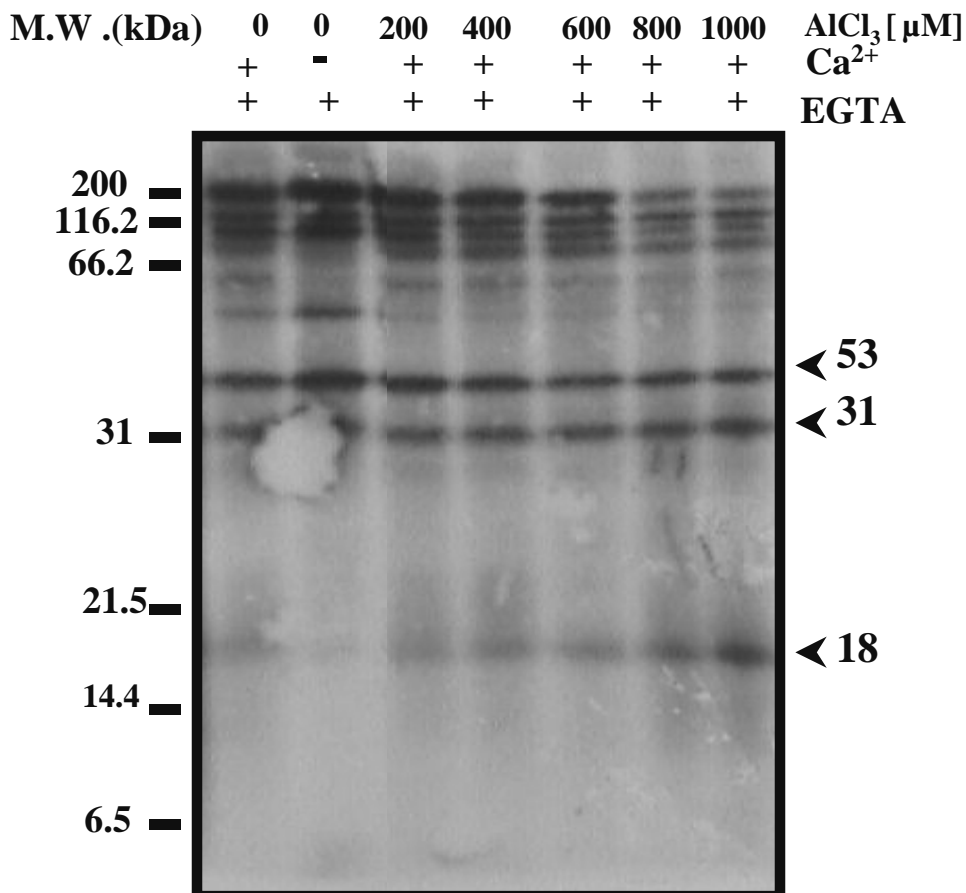


Figure 4.3. Effect of AlCl_3 on the protein phosphorylation calcium dependent pattern. Cells from day 14 of the culture cycle that were incubated with or without increasing concentrations of AlCl_3 . After 1 hour, the total extract was prepared and the phosphorylation reaction initiated as described in Materials and Methods. Total calcium and EGTA concentration during the incubation with AlCl_3 was 1 mM (calcium free concentration 25 μM). Other indications are as figure legend 1.

To determine if the increase in the protein kinase activities in Figure 4.2 B was due to an *in vivo* signal, the phosphorylation reaction mixture was incubated with increasing concentrations of AlCl_3 . The enzymatic reaction was then initiated with the addition of protein extract from day 14 of the culture cycle and followed for 30 min. The results are presented in figure 4 and show that there is no modification in the phosphobands observed from which it may be concluded that Al activates certain kinases *in vivo* and is not an *in vitro* artifact.

DISCUSSION

To date, there have been no reports that relate protein phosphorylation with the effect of aluminum either in animal or plant cells. Since Al may interfere with signal transduction pathways, particularly the phosphoinositide pathway (Jones and Kochian 1995), the possibility that this interaction may be reflected in the disturbance of protein phosphorylation is a reasonable hypothesis. In the present work we report, for the first time, evidence that aluminum may regulate the activity of some protein kinases.

The changes that are produced on the phosphorylation patterns during a culture cycle are due to different phases of cell development. These are similar to the changes in the total protein pattern. Similarly, the activity of enzymes such as PLC changes in a way that is dependent on the development of the cell (Racagni et al. 2001, in preparation). These changes (Figure 4.1B) during a culture cycle

(Martínez-Estevéz et al. 2001), are similar to changes reported in the phosphorylation patterns during an embryogenic process (Turner 1991). In the specific case of coconut the increment in the threonine, tyrosine and serine phosphorylation patterns of zygotic embryos suggests that protein phosphorylation, and in particular, tyrosine phosphorylation, could play an important role in the development of embryos in plants (Islas-Flores et al. 1998).

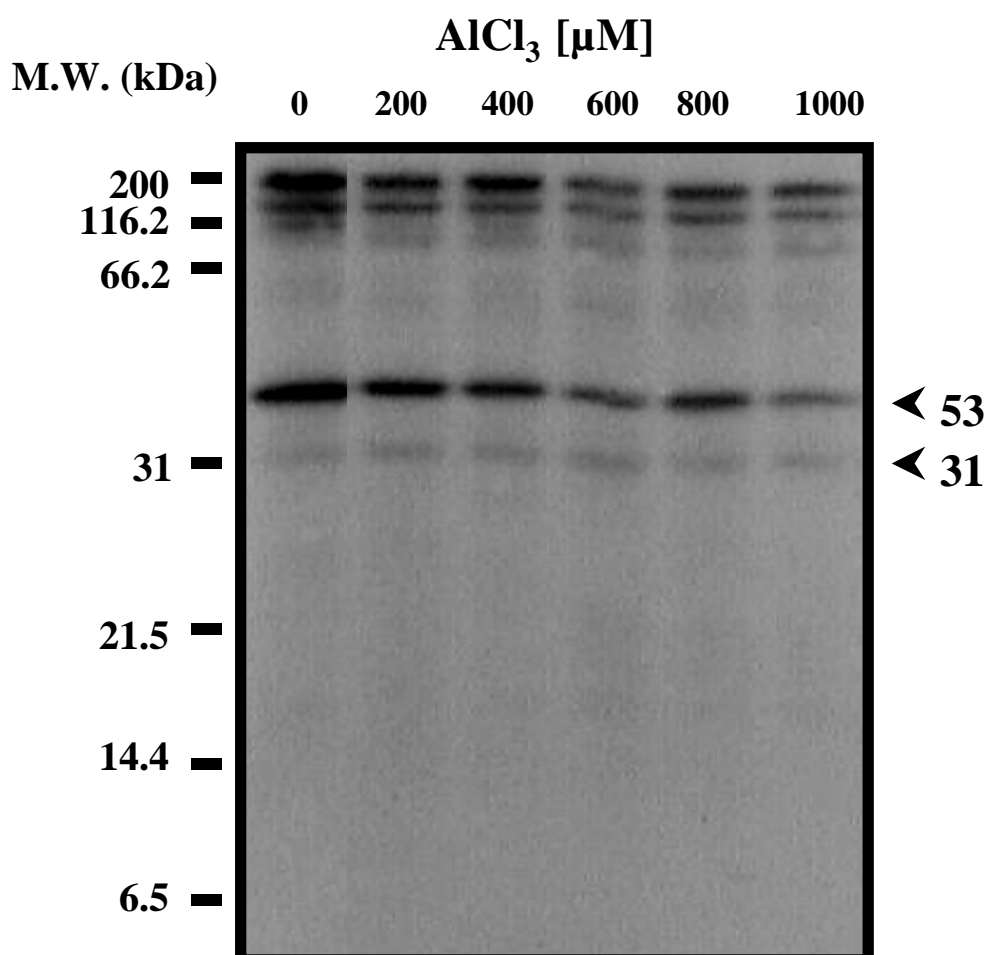


Figure 4.4. Effect of AlCl_3 on the *in vitro* phosphorylation assay. The phosphorylation mixture was incubated with or without increasing concentrations of AlCl_3 . After 1 hour of incubation the total cell extract (100 μg) was added from cells of day 14 of the culture and the phosphorylation reaction continued for 30 min, as described in Material and Methods. Other indicators are as in figure legend 1.

Protein phosphorylation is one of the most important events in the physiological/biochemical regulation of morphogenic development. Protein kinases have been isolated and characterized both in animals and plants.

Under natural growth conditions, plants encounter various stress factors such as drought, salinity, high or low temperature, dehydration and osmotic stress, which have a profound effect on their growth and development. The mechanism by which plants respond to stress has been a subject of intense study for many years due to its agronomic significance and its role in plant development. In order to cope with stress, plants employ a variety of different response mechanisms depending upon the severity of the stress (Sopory and Mushi 1998).

The symptoms of aluminum toxicity in plants are similar to those produced by dehydration or osmotic stress (Thawornwong and van Diest 1974) and it has been shown that these may affect protein phosphorylation (Mizogushi et al. 1997, Hwang and Goodman 1995). The understanding of Al stress in plants is important for stable crop production in the future. The discovery of a signal transduction pathway affected by Al will be important in understanding the specific mechanism of Al toxicity that are observed in only a few hours. Because of this, Al may play a role in the regulation of protein phosphorylation and/or dephosphorylation. There are only few examples in the literature suggesting that Al may regulate protein kinase activities. In soybean cells, the tension and organization of the actin network are modified by phosphatase and kinase. Al induced a significant increase in the tension within the transvacuolar actin network. Inhibitors of calmodulin (W-7 and calmidazolium) and calmodulin-dependent kinases (KT 5926) induced a decrease

in the tension within the actin network (Grabski et al. 1998). Al stress causes a three fold increase of the total NAD kinase activity in oats and a two fold increase in other cereals (Slaski 1990). In human brain, protein kinase C was inhibited with Al at 2×10^{-8} mol/l by 98% (Cochran et al 1990). However, the physiological role of protein kinase C has not been demonstrated in plants.

In the present work cells treated with aluminum increased the intensity of the 18, 31, and 53 kDa phosphobands. Because the aluminum treatment was *in vivo*, it suggests to us that a signal may be involved to which the cells are responding after being submitted to this particular stress and it is this that could be inducing the increase in some protein kinases.

In conclusion, the results presented here clearly demonstrate that *in vivo* treatment of *Coffea arabica* cells with aluminum modifies the activity of some protein kinases.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (333646-N) and a fellowship to M.M.E. (117 158). We acknowledge the valuable technical assistance of Armando Muñoz –Sánchez .

REFERENCES

Bloom H., Beier H., Gross H.S. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99

Bocher M., Erdmann H., Heim S. (1985) Protein kinase activity of *in vitro* culture plant cells in relation to growth and starch metabolism. *J. Plant Physiol.* **199**: 209-218

Browne B.A., McColl J.G., Driscoll C.T. (1990) Aluminum speciation using Morin: Morin and its complexes with aluminum. *J Environ Qual* **19**: 65-72

Cochran M., Elliott D.C., Brennan P., Chawtur V. (1990) Inhibition of protein kinase C activation by low concentrations of aluminum. *Clin Chim. Acta* **194**: 167-172

Conner A.J., Meredith C.P. (1985) Strategies for the selection and characterization of aluminum-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* **166**: 466-473

Grabski S., Arnoys E., Busch B., Schindler M. (1998) Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. *Plant Physiol.* **116**: 279-290

Heim S, Erdmann H., Wagner .KG. (1985) Protein kinase activities in the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Plant Sci.* **42**: 159-167

Hwang I., Goodman M.M. (1995) An *Arabidopsis thaliana* specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA and NaCl. *Plant J.* **8**: 37-43

Islas-Flores .I, Oropeza C., Hernández-Sotomayor S.M.T. (1998) Protein phosphorylation during coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo development. *Plant Physiol.* **118**: 257-263

Jones D..L, Kochian L.V. (1995) Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* **7**:1913-1922

Kuo J.L., Huang H.J., Cheng L.J., Chen L.J., Huang B.I., Huang L.C., Kuo T.T. (1995) Rejuvenation *in vitro*: modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *J. Plant Physiol.* **146**: 333-336

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

Larsen P.B., Degenhart J., Tai C.Y., Stenzler L.M., Howell S.H., Kochian L.V. (1998) Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol* **117**: 9-18

Martínez-Estévez M., Muñoz-Sánchez J.A., Loyola-Vargas V.M., Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001) Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity on cellular suspension of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*, in press.

Matsumoto H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. of Cytology* **200**: 1-46.

Mizogushi T., Ichimura K., Shinozaki K. (1997) Environmental response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Tibtech* **15**: 15-19.

Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 608-612.

Slaski J.J (1990) Response of calmoduline-dependent and calmodulin independent NAD kinase to aluminum in root tips from various cultivated plants. *J. Plant Physiol.* **136**: 40-44.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Malia A.K., Gartner F.H., Provencano M.D., Fujimoto E.K., Goeke M.N., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Biochem.* **150**:76-85.

Sopory S.K., Munshi M. (1998) Protein kinases and phosphatases and their role in cellular signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**: 245-318.

Thawornwong N., Van Diest P. (1974) Influences of high acidity and aluminum on the growth of low land rice. *Plant and Soil* **41**: 141-159.

Turner C.E. (1991) Paxilin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development. *J. Cell Biol.* **115**: 201-207.

Ulloa R.M., Mac Intosh G.C., Melchiorre M. (1997) Protein kinase activity in different stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuberization. *Plant Cell Rep.* **16**: 426-429.

CAPÍTULO V

Discusión general

En esta sección se presenta una discusión general acerca de la obtención de las condiciones de cultivo para la línea celular utilizada con el fin de poder observar el efecto del aluminio sobre su crecimiento, y de el estudio del efecto del aluminio sobre algunas de las vías de transducción de señales que involucran tanto a la enzima PLC, como a la fosforilación de proteínas.

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ

La selección de líneas tolerantes a aluminio a partir de genotipos asociados con la tolerancia al exceso de este metal se ha estudiado en un gran número de plantas y en cultivos celulares (Conner y Meredith, 1985; Ojima y Ohira, 1983, 1985; Ojima *et al.*, 1984, Koyama *et al.*, 1988; Kamp-Glass *et al.*, 1993). En nuestro caso este estudio está encaminado a conocer como afecta el aluminio a las suspensiones celulares de café con el fin de obtener líneas tolerantes a este metal para su utilización en programas de mejoramiento genético.

En el Capítulo II se determinó que las suspensiones celulares de la línea 2 de café crecen de manera satisfactoria en el medio MS a la mitad de su fuerza iónica y a un pH de 4.3. Esto permite que las respuestas de disminución del crecimiento observadas en presencia de aluminio sean por el efecto del metal y no por otras causas como la falta de fosfatos o calcio. Nuestros datos son similares a los reportados para diferentes medios en los que la disminución en las concentraciones de sales, específicamente de calcio y fósforo, mejoraron la solubilidad del aluminio y por ende su disponibilidad para las células o tejidos (Conner y Meredith, 1985; Espino *et al.*, 1995)

Al trabajar en el laboratorio con suspensiones celulares y aluminio, además de los parámetros antes mencionados, hay que considerar otros, tales como el tamaño del inóculo inicial (Conner y Meredith, 1985), ya que mientras más pequeño el inóculo, mayor será la toxicidad expresada en dichas suspensiones. La toxicidad por aluminio puede variar también dependiendo del estadio de desarrollo de los cultivos. En nuestro caso los resultados obtenidos sugieren que a medida que la concentración del inóculo inicial es menor, la toxicidad dada por el aluminio es mayor y concluimos que 5 g.L^{-1} es el inóculo más adecuado para células de café.

Aun cuando las condiciones del medio de cultivo sean las adecuadas para mantener una toxicidad del aluminio similar a las de los suelos minerales ácidos, es importante asegurarse de conocer cuál es la concentración real de aluminio libre y de que éste está disponible para las células. Utilizando el reactivo de Morin, (un compuesto fluorescente que es capaz de unirse al aluminio libre de manera específica) se pudo determinar la concentración de aluminio libre en el medio de cultivo. Se determinó que en un medio a pH 4.3 y la mitad de la fuerza iónica de las sales del medio MS se encontraba una elevada concentración de aluminio libre (Capítulo II); además, a medida que aumentaba el tiempo de exposición de las células al aluminio, su concentración interna aumentaba.

En general, las suspensiones celulares son muy sensibles al aluminio, y difícilmente crecen en presencia de concentraciones mayores a $200 \mu\text{M}$. Se determinó que: a) las condiciones óptimas para que las células en suspensión de caféto crezcan en un medio en el que el aluminio estuviera disponible y también se observó que éstas fueron incapaces de crecer a concentraciones mayores a $100 \mu\text{M}$; b) la concentración a la cual mueren el 50% de las células es de $25 \mu\text{M}$. Esta dosis letal 50 es dos ordenes de magnitud menor a las reportadas para callos de frijol ($2070 \mu\text{M}$) (Espino *et al.*, 1995) o para callos de arroz ($2000 \mu\text{M}$) (Van Sint Jan *et al.*, 1997). Esto puede a que en las suspensiones celulares las células, por estar sumergidas en el medio de cultivo, están más expuestas al aluminio.

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES QUE INVOLUCRA A LA ENZIMA FOSFOLIPASA C Y A LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS

Se sabe que a tiempos relativamente cortos de exposición de las plantas al Al^{3+} (30 minutos), se inhibe el crecimiento de la raíz; también es posible que ciertos procesos fisiológicos se alteren en cuestión de minutos, como por ejemplo el flujo de Ca^{2+} (Lazof *et al.*, 1994). Esta inhibición de la entrada de calcio a la célula pudiera estar afectando algunos procesos en los que el calcio es una molécula importante; este síntoma, de alguna manera, pudiera estar dado por un efecto del aluminio sobre algunas de las vías de señales de transducción involucradas en la regulación del crecimiento.

Existen diferentes estudios en los que se demuestra que el aluminio modifica la homeostasis del calcio (Huang *et al.*, 1992a; 1992b; Rengel y Eliot, 1992; Ryan *et al.*, 1994; 1997; Schofield *et al.*, 1998). Independientemente de las diversas hipótesis que se han planteado para explicar este efecto, en general hay una tendencia a asociarlo con la disminución en el crecimiento de las raíces.

En el Capítulo III se demostró que el aluminio inhibe la actividad de la enzima PLC de una manera dependiente de la concentración. Las razones de esta inhibición pueden ser varias. El aluminio podría estar ocupando el sitio de unión del calcio directamente sobre la enzima, o podría unirse con el sustrato formando un complejo $\text{Al}^{3+}/\text{PIP}_2$ lo cual impedirá la hidrólisis del sustrato. Sin embargo merece atención futura el resultado el hecho de que cuando las células fueron tratadas con aluminio por tiempos cortos y a concentraciones bajas, hubo un pequeño aumento en la actividad enzimática.

La enzima es inhibida por aluminio cuando éste está en contacto con las células durante una hora o más, pero la respuesta es muy diferente a tiempos pequeños. La actividad de la enzima PLC aumenta a tiempos inferiores a 30 minutos,

especulamos que a este tiempo, el aluminio no ha penetrado a través de las membranas lo suficiente como para ejercer una inhibición, y lo que se está produciendo es una activación de la enzima mediada por una señal enviada a nivel extracelular.

Existen reportes en los que se plantea que el Al^{3+} sólo se acumula en la superficie de la membrana de las células de la raíz y que la inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium cepa*, no ocurre en el interior de los meristemos radiculares, sino que en el interior de los meristemos debido a una señal iniciada o interrumpida por exceso de Al^{3+} en la periferia de los meristemos (Schofield *et al.*, 1998).

Como se mencionó anteriormente, al activarse el sistema de transducción que involucra a la PLC, la señal se propaga intracelularmente a través de la fosforilación- desfosforilación de proteínas. Por lo que en el presente trabajo, una vez que se demostró que el aluminio modificaba la actividad de la PLC, el siguiente objetivo fue determinar si dicho elemento modificaba la actividad de las cinasas de proteínas, particularmente aquellas calcio-dependientes.

En el Capítulo IV, se demuestra que en células tratadas con aluminio, hay un cambio importante en la actividad de algunas cinasas de proteínas. También se identificaron dos sustratos para esta actividad enzimática. Respecto a la actividad calcio-dependiente de proteínas cinasas, observamos que también hay una activación, aunque con relación a ésta, esperábamos que muchas de las cinasas dependientes de calcio disminuyeran su actividad por el cambio en la homeostasis del calcio intracelular, sin embargo, se observó un incremento en la actividad de algunas de ellas. Para explicar esta observación hemos elaborado dos modelos. En el primero se considera el efecto directo del aluminio, que contaría con por lo menos una hora de incubación, al aumentar la concentración de aluminio intracelular la enzima PLC se vería inhibida y la disminución en la concentración de calcio intracelular estaría dada por dos vías, la inhibición de la entrada a través de la membrana y la inhibición de la salida de las pozas intracelulares, por la

inhibición de la PLC y por consiguiente la disminución del IP_3 , encargado de sacar calcio de la vacuola, entonces el aluminio competiría con el calcio por los sitios de unión en algunas cinasas aumentando su actividad. El segundo modelo propone un efecto indirecto, el cual se llevaría a cabo a tiempos muy cortos ya que el aluminio no penetra aun al interior de la célula pero se une a un receptor y envía una señal que activa las enzimas encargadas de sacar calcio de la vacuola, y entonces se activan algunas cinasas. Esta activación no es transitoria y los efectos se pueden ver a nivel de fosforilación de proteínas tiempo después de enviado el estímulo.

En el siguiente modelo se representa de una manera general como actúa el aluminio tanto en el interior de la célula como en el exterior de ésta. El aluminio puede penetrar al interior de la célula a través de canales de calcio y magnesio; cuando las células han estado expuestas por más de 1 hora a concentraciones de 25 μM de aluminio impiden la entrada del calcio y el magnesio; lo que provoca cambio en la homeostasis intracelular de estos compuestos, ya que el aluminio está dentro de la célula inhibe la actividad de la PLC mediante: a) la unión al sitio catalítico de la enzima impidiendo la hidrólisis del sustrato PIP_2 o b) la formación de un complejo PIP_2/Al^{3+} impide el reconocimiento del PIP_2 por la enzima PLC.

El efecto del aluminio a tiempos muy cortos de incubación (<30 minutos) es diferente, en el sentido de que aumenta la actividad de la enzima PLC, este aumento pudiera estar dado por una señal a partir de la unión del aluminio a la membrana, y aun desconocemos cual es la vía de transducción de esa señal y por ende como actúa éste con la membrana. Para el caso de la fosforilación de proteínas podemos decir que nuestros resultados indican que el aluminio modifica la fosforilación de algunas proteínas y en nuestro modelo podemos explicar este aumento por una posible unión del aluminio a sitios de unión a calcio en algunas cinasas, modificando la actividad de éstas tanto en tiempos cortos como largos. A corto tiempo se incrementa la concentración del calcio intracelular a través del aumento en la actividad de la PLC, mientras que a tiempos largos hay unión del

Bibliografía.

Conner A.J., and C.P. Meredith (1985a) Strategies for the selection and characterization of aluminum-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* **166**: 466-473.

Espino F.J., M.T. Gonzalez-Jaen, J. Ibañez, A.M. Sendino, and A.M. Vazquez (1995) Aluminum effects on *in vitro* tissue cultures of *Phaseolus vulgaris*. *Curr. Issu. Plant Mol. Cell Biol.* 545-549.

Huang J. W., D. L. Grunes and L. V. Kochian, (1992a) Aluminium effects on kinetics of calcium uptake into cells on the weath root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. *Planta* **188**: 414-121.

Huang J.W., J.E. Shaff, D.L. Grunes, and L. Kochian (1992b) Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum- sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.* **98**:230-237.

Kamp-Glass M., D. Powell, G.B. Reddy, V.C. Baligar, and R.J. Wrigth (1993) Biotechniques for improving acid aluminum tolerance in alfalfa. *Plant Cell Rep.* **12**: 590-592.

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

Koyama H., R. Okawara, R. Ojima, and T. Yamaya (1988) Reevaluation of characteristics of a carrot line previously selected as aluminum-tolerant cells. *Plant Physiol.* **74**: 683-687.

Lazof D.B., J.G. Goldsmith, T.W. Rufty and R.W. Linton (1994) Rapid uptake of aluminum into cells intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectroscopy. *Plant Physiol.* **106**:1107-114.

Ojima K, and K. Ohira (1983) Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant Cell Physiol.* **24**: 789-797.

Ojima K, H. Abe, and K. Ohira (1984) Release of citric acid into the medium by aluminum-tolerant carrot cells. *Plant Cell Physiol.* **25**: 855-858.

Ojima K., and K. Ohira (1985) Reduction of aluminum toxicity by addition of a conditioned medium from aluminum-tolerant cells of carrot. *Plant Cell Physiol.* **26**: 281-286.

Rengel Z. and D. C. Ello. (1992) Mechanism of aluminium inhibition of net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol.* **98**: 632 - 638.

Ryan P.R., M. Skerrett, G.P. Findlay, E. Delhaize and S.D Tyerman (1997b) Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6547-6552.

Ryan P.R., T.B. Kinraide and L.V. Kochian (1994) Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* **192**:98-103.

Schofield R.M.S., J. Pallon, G. Fiskesjo, G. Karlsson, and K.G. Malmqvist. (1998) Aluminum and calcium distribution patterns in aluminum-intoxicated roots of *Allium cepa* do not support the calcium - displacement hypothesis and indicate signal-mediated inhibition of root growth. *Planta* **205**:175-180.

CAPÍTULO VI

Conclusiones generales

En este trabajo se presentan los resultados sobre el efecto de la toxicidad al Al^{3+} en procesos en la vía de transducción de señales que involucra a la enzima PLC y a la fosforilación de proteínas, usando como modelo suspensiones celulares de café.

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. La línea en suspensión L2 de *Coffea arabica* pudo ser cultivada en un medio MS modificado (mitad de su fuerza iónica y pH 4.3). En estas condiciones se pudo aplicar de manera confiable diferentes concentraciones de AlCl_3 obteniéndose una dosis letal₅₀ de 25 μM de aluminio.
2. El colorante fluorescente de Morin permitió demostrar que el aluminio efectivamente penetra en la célula.
3. El tratamiento de las células con AlCl_3 inhibió la actividad de la enzima fosfolipasa C y aumentó la actividad de las proteínas cinasas, las cuales fosforilan selectivamente a proteínas de 18, 31, y 53 kDa, de manera dependiente de la concentración utilizada.

CAPÍTULO VII

Perspectivas

En la actualidad, debido al incremento en la acidez de los suelos, la toxicidad por aluminio es un problema serio que afecta la productividad de las especies cultivadas en estos suelos. El conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la toxicidad por aluminio es fundamental para poder resolver este problema.

En las plantas, las vías de transducción de señales asociadas al recambio de fosfoinosítidos y a la fosforilación de proteínas, tienen una función muy importante en la regulación de procesos como el crecimiento, la división celular y la respuesta a condiciones extremas ambientales. En el presente trabajo hemos demostrado que el aluminio afecta ambos. Nuestros resultados son la base para futuros trabajos cuyas perspectivas se enlistan a continuación.

1. **DETERMINACIÓN DEL MECANISMO BIOQUÍMICO A TRAVÉS DEL CUAL EL ALUMINIO MODIFICA LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA C.** Para poder determinar el mecanismo bioquímico por el cual el aluminio afecta la actividad de la PLC, deberá trabajarse con la enzima purificada.
2. **DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE CALCIO.** Con la ayuda de técnicas de determinación de calcio intracelular, se podría medir qué tanto está afectando el aluminio la entrada de calcio al interior de la célula, también se podrían realizar experimentos con bloqueadores de canales de calcio como La^{3+} y EGTA.
3. **ESTUDIOS CINÉTICOS.** Con la enzima pura se podrían determinar los parámetros cinéticos de la enzima en presencia de aluminio. Este estudio se realizaría en correspondencia con la cinética de dilución superficial

descrita para las fosfolipasas, la cual incluye dos reacciones: primero la asociación de la enzima con la superficie micelar, y como segundo paso está la catálisis interfacial de donde se obtienen los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, pudiendo compararse estos valores con los parámetros cinéticos reportados por nuestro grupo para PLC de *C. roseus*.

- 4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE CANALES DE CALCIO DEL PLASMALEMA Y DEL TONOPLASTO EN CÉLULAS DE CAFÉ.** Se podrían caracterizar los efectos que produce el aluminio sobre los canales específicos de calcio, tanto en la membrana plasmática, como en el tonoplasto.