

POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Papel de los ácidos orgánicos en la resistencia a
aluminio en suspensiones celulares de *Coffea*
arabica L.**

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

José Efraín Ramírez Benítez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**Mérida, Yucatán, México.
2008**



RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, a quien le agradezco su respaldo e interés mostrado en la planeación, desarrollo y evaluación de esta tesis.

Agradezco el financiamiento recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología al proyecto **C45798-Z: "La toxicidad por aluminio y el sistema de señalización a través de fosfolípidos"**, así como el apoyo económico recibido a través de la beca N° 176793 otorgada para la realización de esta Tesis. Además, agradezco el apoyo otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores a través de la beca N° 4422.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco particularmente a los miembros de mi comité tutorial y de evaluación de tesis: Dra. Ileana Echevarría Machado, Dra. Virginia Herrera, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Rafael Rojas, Dra. Elisa Valenzuela Soto y Dra. S.M. Teresa Hernández Sotomayor por sus atinadas observaciones y la revisión crítica con la que enriquecieron el presente escrito.

Especialmente agradezco a la Dra. Ileana Echevarría Machado y al Dr. Manuel Martínez Estévez por cada uno de los consejos y sugerencias aportadas en el diseño experimental de esta tesis.

A mi esposa Karen, que no sólo soportó la carga inherente a mis estudios de posgrado, sino que también fue una participante activa en su parte teórica y experimental. Gracias por tu apoyo y tu paciencia.

Agradezco a mi grupo de trabajo: Leticia, Abril, Wilberth, Fausto y Armando, por su apoyo y colaboración.

Deseo extender un reconocimiento de manera muy especial al personal docente del Posgrado en Ciencias y Biotecnología en Plantas del Centro, por los conocimientos y experiencias aportadas en la formación profesional de todos y cada uno de los estudiantes.

También agradezco el apoyo, comentarios y críticas de mis compañeros estudiantes del Posgrado, así como la colaboración y ayuda de todo el personal de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, de la Unidad de Biotecnología y la Unidad de Recursos Naturales.

Agradezco especialmente al Q.F.B. Armando Muñoz Sánchez y a la Q.F.B. Leticia Chee González por el apoyo técnico ofrecido durante mi colaboración en el grupo de la Dra. Hernández. A la M.C. Lizbeth Castro Concha por su apoyo técnico en la utilización del equipo de espectrofotometría, así como al Dr. Jorge Santamaría Fernández y al M.C. Francisco Espadas y Gil por permitirme el uso de sus instalaciones. A la M.C. Rosa María

Galaz Ávalos por su colaboración en el uso del cromatógrafo y a la Q.I. Angela Ku González por su ayuda en la operación del microscopio de barrido electrónico. Por último, agradezco al Dr. José Luis Andrade Torres por su apoyo en el uso del osmómetro de presión de vapor.

DEDICATORIA

Karen, todo en la vida lo haré junto a ti, ya que nada vale la pena si tú no estás en ella.

A mis padres, María Gerarda y Juan, mi vida es consecuencia del amor y cuidados que tuvieron en mi formación. Todos mis éxitos siempre serán en honor a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	3
1.1. LA QUÍMICA DEL ALUMINIO EN EL SUELO	3
1.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ALUMINIO EN PLANTAS	4
1.3. MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ALUMINIO A NIVEL CELULAR	6
1.4. INTERACCIÓN DEL ALUMINIO CON PROCESOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	11
1.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ALUMINIO	12
1.6. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A ALUMINIO	23
1.7. TRANSPORTADORES MEMBRANALES DE ANIONES INDUCIDOS POR ALUMINIO	28
1.8. MODELO DE ESTUDIO: LÍNEA DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ RESISTENTE A ALUMINIO	29
1.9. HIPÓTESIS	30
1.10. OBJETIVO GENERAL	30
1.11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
1.13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 2 ALUMINIUM INDUCES CHANGES IN ORGANIC ACIDS METABOLISM IN <i>Coffea arabica</i> SUSPENSION CELLS WITH DIFFERENTIAL Al TOLERANCE	45
2.1. ABSTRACT	45
2.2. INTRODUCTION	45
2.3. MATERIALS AND METHODS	49
2.4. RESULTS	52
2.5. DISCUSSION	60
2.6. REFERENCES	63
CAPÍTULO 3 EFECTO DEL ALUMINIO EN LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ	69
3.1. INTRODUCCIÓN	69
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	70
3.3. RESULTADOS	73
3.4. DISCUSIÓN	79
3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO 4 ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ	83
4.1. INTRODUCCIÓN	83
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
4.3. RESULTADOS	87
4.4. DISCUSIÓN	94
4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN GENERAL	101
5.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	113
CAPÍTULO 7 PERSPECTIVAS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. MODELO ESTRUCTURAL DE LOS COMPLEJOS Al:ÁCIDO ORGÁNICO	18
FIGURA 1.2. MODELO DE EXCLUSIÓN Y DESTOXI-FICACIÓN INTERNA PARA EL ALUMINIO BASADO EN LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE Al^{3+} CON ÁCIDOS ORGÁNICOS	23
FIGURA 1.3. ESQUEMA DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LAS RAÍCES	25
FIGURA 1.4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
FIGURE 2.1. MALATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN PROTEIN EXTRACTS OF THE L2 AND LAMt LINES DURING A CULTURE CYCLE	53
FIGURE 2.2. CITRATE SYNTHASE ACTIVITY IN PROTEIN EXTRACTS OF THE L2 AND LAMt LINES DURING A CULTURE CYCLE	54
FIGURE 2.3. SHORT-TERM EFFECT OF $AlCl_3$ (100 μ M) ON MDH ACTIVITY IN 7-DAY OLD CELLS OF THE L2 AND LAMt LINES	55
FIGURE 2.4. SHORT-TERM EFFECT OF $AlCl_3$ (100 μ M) ON CS ACTIVITY IN 7-DAY OLD CELLS OF THE L2 AND LAMt LINES	56
FIGURE 2.5. LONG-TERM EFFECT OF $AlCl_3$ (100 μ M) ON MDH ACTIVITY IN 7-DAY OLD CELLS OF THE L2 AND LAMt LINES	57
FIGURE 2.6. LONG-TERM EFFECT OF $AlCl_3$ (100 μ M) ON CS ACTIVITY IN 7-DAY OLD CELLS OF THE L2 AND LAMt LINES	58
FIGURE 2.7. SHORT-TERM EFFECT OF Al TREATMENT ON MALATE EXUDATION IN L2 AND LAMt SUSPENSION CELLS	59
FIGURE 2.8. LONG-TERM EFFECT OF Al TREATMENT ON MALATE EXUDATION IN L2 AND LAMt SUSPENSION CELLS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 3.1. PERFIL DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN EXTRACTOS CRUDOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ	74
FIGURA 3.2. EFECTO A CORTO PLAZO DEL ALUMINIO EN EL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÉLULAS DE LAS LÍNEAS L2 Y LAMt	76
FIGURA 3.3. EFECTO A LARGO PLAZO DEL ALUMINIO EN EL CONTENIDO DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÉLULAS DE LAS LÍNEAS L2 Y LAMt	78
FIGURA 4.1. MORFOLOGÍA CELULAR DE LAS LÍNEAS L2 Y LAMt DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ	88
FIGURE 4.2. CÚMULOS GLOBULARES EN SUSPENSIONES CELULARES DE LAS LÍNEAS L2 Y LAMt, OBSERVADOS MEDIANTE MICROSCOPÍA ÓPTICA EN CAMPO CLARO	89
FIGURE 4.3. CURSO TEMPORAL DE LA HIDRÓLISIS DE LA PARED CELULAR DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ (LÍNEA L2)	90
FIGURE 4.4. MORFOLOGÍA DE LAS SUSPENSIONES DE PROTOPLASTOS AISLADAS DE SUSPENSIONES CELULARES DE LA LÍNEA L2, INCUBADAS EN DIFERENTES SOLUCIONES DE LISIS	91
FIGURE 4.5. MORFOLOGÍA DE LOS PROTOPLASTOS OBTENIDOS A PARTIR DE CÉLULAS INCUBADAS EN SOLUCIÓN DE LISIS CON SORBITOL Y ADICIONADA CON RIFAMPICINA	93
FIGURE 4.6. DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DEL TAMAÑO DE LOS PROTOPLASTOS EN UNA MUESTRA DE 250 PROTOPLASTOS, AISLADOS A PARTIR DE CÉLULAS DE LAS LÍNEAS L2 Y LAMt	94

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 5.1. EFECTO A CORTO PLAZO DEL ALUMINIO EN EL FLUJO DE CARBONO DEL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXILICOS EN CÉLULAS DE LA LÍNEA LAMt DE <i>C. arabica</i>	104
FIGURA 5.2. MODELO PROPUESTO PARA LA REGULACIÓN POR RETROALIMENTACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ROS EN EL MECANISMO DE RESISTENCIA A ALUMINIO EN PLANTAS	106
FIGURA 5.3. MODELO PROPUESTO DEL PAPEL DEL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA RESPUESTA A ALUMINIO EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ	108

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1.1. VARIEDADES RESISTENTES A ALUMINIO QUE EXUDAN ÁCIDOS ORGÁNICOS DE SUS RAÍCES EN RESPUESTA A ESTE METAL	15
TABLE 2.1. MALATE EXUDATION RATES IN COFFEE SUSPENSION CELLS AFTER 4 H INCUBATION IN TREATMENT MEDIA WITH 100 μ M $AlCl_3$ AND A CONTROL	60
CUADRO 3.1. CONTENIDO BASAL DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ DEL DÍA 7 DEL CICLO DE CULTIVO	74

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
ACO	Aconitasa
AO; OA	Ácidos orgánicos
6-BAP	6-bencil aminopurina
CAT	Catalasa
CDKA	Cinasa dependiente de ciclina A
CS	Citrato sintasa
2,4-D	Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético
DAG	Diacilglicerol
DGK	Diacilglicerol cinasa
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	1,4-ditio-DL-treitol
GDH	Glutación deshidrogenasa
GSH	Glutación
GR	Glutación reductasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa
IP₃	Inositol-1,4,5-trisfosfato
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LMW	Ligandos de bajo peso molecular
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MDH	Malato deshidrogenasa
MSHIS	Medio de cultivo Murashige-Skoog a la mitad de la fuerza iónica
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida
PA	Ácido fosfatídico
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PF; FW	Peso fresco
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
UA	Unidades arbitrarias de absorbancia

RESUMEN

Uno de los principales mecanismos de resistencia de las células vegetales a concentraciones tóxicas de aluminio involucra la exudación y/o la acumulación de ácidos orgánicos específicos, los cuales forman complejos con el Al^{3+} inocuos para el metabolismo celular. En este trabajo se evaluó el papel de los ácidos orgánicos en la resistencia a aluminio de la línea LAMt de células en suspensión de café (*Coffea arabica* L.). Células de las líneas L2 (sensible a aluminio) y LAMt (resistentes a aluminio) fueron tratadas al día 7 del ciclo de cultivo con AlCl_3 (100 μM). Se encontraron diferencias significativas en los niveles de actividad de las enzimas malato deshidrogenasa y citrato sintasa (enzimas clave en el metabolismo de los ácidos orgánicos), entre extractos proteicos de células de las líneas L2 y LAMt. El análisis por HPLC de los medios de cultivo indicó que las células de ambas líneas exudan malato en un nivel basal, pero tal exudación no es inducida por el tratamiento con aluminio. Notablemente, se observaron incrementos transitorios en los contenidos intracelulares de malato, citrato y oxalato inducidos por el tratamiento con aluminio, únicamente en células de la línea LAMt. Estos incrementos en el contenido de ácidos orgánicos coincidieron con la inhibición de la malato deshidrogenasa y la citrato sintasa en las células LAMt. Los resultados indican que los cambios inducidos por aluminio en el metabolismo de los ácidos orgánicos no están involucrados en el mecanismo de resistencia en las suspensiones celulares de café. Alternativamente, en este trabajo se discute un probable efecto del aluminio en rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo de los ácidos orgánicos.

ABSTRACT

The primary mechanism of Al resistance in plants involves exudation and/or accumulation of specific organic acid species, which form non-phytotoxic complexes with Al^{3+} under physiological conditions. An evaluation was done of the role of organic acids in the resistance mechanism of a cell suspension line of coffee *Coffea arabica* that exhibits Al resistance (LAMt) by an uncharacterized metabolic mechanism. Significant differences existed in malate dehydrogenase and citrate synthase activities (key enzymes in organic acids metabolism) between protein extracts (day 7 of culture cycle) of the L2 (Al-sensitive) and LAMt (Al-tolerant) cells when cell suspensions were treated with 100 μM AlCl_3 . HPLC analysis showed that suspension cells of both lines exudate malate when incubated in a minimal solution but the exudation was not enhanced by treatment with AlCl_3 (100 μM). Unexpectedly, transitory increases in malate, citrate and oxalate contents were observed only in LAMt cells, which coincide with the inhibition of citrate synthase and malate dehydrogenase activities. Results indicate that organic acids accumulation and exudation are not involved in the resistance mechanism in coffee suspension cells. A putative effect of aluminium in organic acids-associated metabolic pathways was discussed.

INTRODUCCIÓN

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre. Una gran proporción del aluminio se encuentra formando minerales con silicio y oxígeno en el suelo, los cuales son conocidos como aluminosilicatos. Sin embargo, en suelos ácidos existe una mayor cantidad de aluminio disponible en solución, constituyendo el principal factor limitante del desarrollo de cultivos vegetales. Se ha observado que concentraciones micromolares del catión trivalente Al^{3+} inhiben el crecimiento de las raíces a nivel celular, de tejido y de órgano (Ciamporova, 2002), limitando así la toma de minerales y nutrientes de la planta.

Algunas especies vegetales que crecen en suelos ácidos presentan mecanismos metabólicos que les confieren resistencia al aluminio (Kochian *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 1997a; Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2001). Existen reportes en donde se ha demostrado que la acumulación de ácidos orgánicos (AO) en zonas particulares de la raíz está directamente relacionada con la resistencia a aluminio (Delhaize *et al.*, 1993a; Ryan *et al.*, 1995). También, se ha demostrado que variedades resistentes a Al^{3+} acumulan citrato, malato u oxalato en el apoplasto y/o el simplasto del ápice radicular, donde se presentan los principales efectos tóxicos del aluminio (Kidd *et al.*, 2001; Piñeros *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2001). Se ha observado que la acumulación de AO es inducida por la presencia de Al^{3+} en células de raíces en cultivo hidropónico (Delhaize *et al.*, 1993b; Ryan *et al.*, 1995). Posteriormente se comprobó que estos AO forman complejos estables con Al^{3+} , mediante la formación de enlaces coordinados entre el átomo de aluminio y los átomos de oxígeno de los grupos carboxilo e hidroxilo en los ácidos orgánicos. Estos complejos de coordinación son inocuos para las células vegetales, por lo que la acumulación y exudación de AO forman parte de un mecanismo de resistencia vegetal a concentraciones tóxicas de Al^{3+} (Kinraide *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1998;

Ma y Hiradate, 2000; Ma y Miyasaka, 1998).

A pesar de la creciente evidencia experimental que da soporte al papel de los ácidos orgánicos como uno de los principales mecanismos de resistencia de las plantas al aluminio, existen aún muchos elementos celulares involucrados en estos mecanismos que no han sido identificados, dada la complejidad estructural y funcional de las raíces en donde se han centrado la mayoría de los estudios científicos (Kochian *et al.*, 2004).

Con el objetivo de estudiar los procesos metabólicos involucrados en la respuesta celular a aluminio, se han aislado líneas de células en suspensión de café con diferentes niveles de resistencia a aluminio (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). La línea LAMt tuvo un crecimiento 30% mayor que la línea parental L2 en presencia de AlCl_3 (200 μM), mientras que no existieron diferencias entre el incremento en peso fresco de ambas líneas cultivadas en medio sin AlCl_3 (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Haciendo uso de este modelo de estudio, se ha comprobado que el aluminio afecta la actividad de las enzimas fosfolipasa C y fosfolipasa D (involucradas en la ruta de transducción de señales de los fosfolípidos) (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b; Ramos-Díaz, 2006), así como la síntesis de ADN (Valadez-González *et al.*, 2007). También se determinó que el aluminio afecta diferencialmente el metabolismo de los fosfolípidos de la línea L2 (sensible a Al) en comparación con la línea LAMt (resistente a Al), por lo que es de interés identificar el mecanismo de resistencia que está operando en la línea LAMt.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de los ácidos orgánicos en el mecanismo de resistencia a aluminio que está actuando en la línea LAMt de células en suspensión de café.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. LA QUÍMICA DEL ALUMINIO EN EL SUELO

El aluminio es el tercer elemento más abundante de la corteza terrestre y el principal factor limitante del crecimiento de cultivos en suelos ácidos. La concentración del aluminio en la solución del suelo suele ser menor a $37 \mu\text{M}$ cuando el pH de la misma es superior a 5.5. Sin embargo, cuando el pH disminuye, el aluminio es liberado de los minerales de aluminosilicatos y su concentración suele aumentar (Marschner, 1995a). En soluciones con pH debajo de 5.5, el aluminio adopta las formas catiónicas $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, mientras que cerca del 90% del Al total en solución se encuentra en forma de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ ó Al^{3+} a pH por debajo de 5.0 (Kinraide, 1991).

En soluciones con un pH de 7.0, el aluminio se encuentra en la forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$, mineral conocido como gibsita. En soluciones alcalinas ($\text{pH} > 8$) el aluminio adopta la forma aniónica $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ o aluminato. Una especie polinuclear sintetizada *in vitro* es el Al_{13} ó $[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}]^{7+}$, la cual es especialmente tóxica para trigo (Parker *et al.*, 1988), aunque no se sabe con certeza si el Al_{13} se encuentra en forma natural en el suelo. También se ha observado que el Al^{3+} es la especie iónica más tóxica para las raíces de plántulas de trigo (Parker *et al.*, 1988), mientras que el $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ y el $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ son tóxicos para diversas especies de dicotiledóneas (Kinraide, 1991; Kinraide y Parker, 1990). Adicionalmente, la presencia del anión aluminato en la solución del suelo ha sido relacionada con la inhibición del crecimiento de la raíz de especies monocotiledóneas cultivadas en suelos alcalinos ($\text{pH} > 9$) (Eleftheriou *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2003).

El Al^{3+} puede formar complejos con aniones tales como F^- , PO_4^{4-} , SO_4^{2-} , con algunos ácidos orgánicos, con flavonoides, así como con proteínas y lípidos (Delhaize y Ryan, 1995). Los complejos de Al^{n+} con ácidos orgánicos y flavonoides son estables a pH ácidos, y se ha demostrado que no tienen efectos tóxicos para las plantas (Hue *et al.*, 1986; Kinraide y Parker, 1990).

1.2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DEL ALUMINIO EN PLANTAS

El principal efecto del aluminio sobre el desarrollo vegetal es la inhibición del crecimiento de las raíces, lo cual afecta la toma de nutrientes y agua del suelo. El crecimiento de la raíz es el resultado de dos procesos: la división celular, cuya mayor tasa se localiza en el meristemo radicular; y la elongación celular, observándose de manera más pronunciada en células de la denominada zona de elongación (ZE) de la raíz.

Se ha observado que el aluminio bloquea el ciclo celular en los meristemos apicales de raíces (Clarkson, 1965; Morimura *et al.*, 1978; Roy *et al.*, 1989), y se ha propuesto que el aluminio puede inhibir la síntesis de ADN, en vista de que puede asociarse a los grupos fosfato de éste con una alta afinidad, y así inhibir el proceso de replicación (Kochian, 1995; Matsumoto, 1991; Zheng y Yang, 2005). Además, se demostró que la zona de las raíces que es más sensible al aluminio comprende el meristemo y el inicio de la ZE (Ryan *et al.*, 1993). Sin embargo, en vista de que el ciclo celular de las células meristemáticas en raíces de maíz tiene una duración de aproximadamente 24 h, y de que el aluminio es capaz de inhibir el crecimiento de la raíz a partir de los 30 min de exposición (Llugany *et al.*, 1996), es posible que la inhibición de la división celular no sea el evento inicial que conduce a la inhibición del crecimiento de las raíces.

Adicionalmente, se ha observado que el aluminio altera la organización de los microtúbulos y los filamentos de actina del citoesqueleto, siendo este efecto más pronunciado en células de la zona de transición distal (ZTD), la cual se

localiza entre el meristemo y la ZE (Horst *et al.*, 1999; Sivaguru *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la aplicación de aluminio solamente a la ZTD inhibe la elongación de la raíz en la ZE del mismo modo que cuando las raíces completas son expuestas al aluminio. Lo anterior sugiere que alguna ruta de señalización localizada en la ZTD es activada por el aluminio y que la señal es enviada a la ZE, donde se da lugar la respuesta fisiológica.

Por otra parte, se ha propuesto que el sistema de transporte basipetal de auxinas en las raíces podría ser afectado por la presencia de aluminio (Kollmeier *et al.*, 2002). En plantas de maíz sensibles al aluminio, un tratamiento de 5 min con AlCl_3 (50 μM) fue suficiente para inhibir la división celular en el meristemo proximal de la raíz (Doncheva *et al.*, 2005). Después de 30 min, la división celular fue estimulada en la zona de elongación distal. Posteriormente (180 min), se observó que el Al indujo la formación de raíces laterales incipientes en esta zona (Doncheva *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el aluminio induce cambios en la arquitectura radicular, provocando alteraciones en el número y posición de primordios radiculares. Cambios similares fueron observados después de suministrar ácido naftil-ftalámico a la ZTD, el cual es un inhibidor alostérico del transportador PIN de eflujo de auxinas (Doncheva *et al.*, 2005). Se ha propuesto que el aluminio, al alterar la dinámica del citoesqueleto de actina, inhibe el transporte vesicular de los transportadores de auxina hacia la membrana plasmática (Muday y DeLong, 2001), inhibiendo a su vez el transporte de auxina en la ZTD. Lo anterior sugiere que el aluminio, al inhibir el transporte polar de auxinas, induce una alteración de la arquitectura radicular, siendo la causa principal de la inhibición del crecimiento radicular (Doncheva *et al.*, 2005).

1.3. MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL ALUMINIO A NIVEL CELULAR

Vía apoplasto

Aunque los mecanismos bioquímicos de la toxicidad del aluminio no son del todo entendidos, existen evidencias de varios procesos en los cuales el aluminio pudiera intervenir. Una gran proporción del aluminio asociado a las raíces se localiza en el apoplasto (Horst, 1995; Schmohl *et al.*, 2000; Schofield *et al.*, 1998; Sivaguru y Horst, 1998), aunque una pequeña cantidad logra entrar al simplasto (Lazof *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2000). El aluminio tiene una alta afinidad por la pared celular, debido principalmente a la gran densidad de cargas negativas en los componentes de la misma. Esta propiedad de la pared celular se denomina como capacidad de intercambio catiónico (CEC). Una gran parte de la CEC es aportada por las pectinas de la pared celular, así como por la membrana plasmática (Horst, 1995). Específicamente, se ha demostrado que el aluminio se une fuertemente a los grupos -COO^- libres en los residuos péctico-urónicos de la pared celular (Schmohl y Horst, 2000). Se ha observado que la CEC de la pared celular puede determinar la cantidad de aluminio asociado a una célula en particular (Schmohl y Horst, 2000).

Schildknecht y Vidal (2002), demostraron que la plasticidad y la fortaleza mecánica de la pared celular es distinta en cultivares de maíz con diferentes grados de sensibilidad a aluminio, lo cual podría estar involucrado en la elongación celular. Se ha observado que el Al^{3+} desplaza rápidamente al Ca^{2+} asociado a los componentes de la pared celular, tales como la pectina (Blamey, 2001), haciendo más rígida y estable su estructura e inhibiendo el proceso de despolimerización de las fibras de pectina necesario para la expansión celular (Gunse *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que el aluminio altera la utilización de sacarosa en la formación de la pared celular de plántulas de algodón (Huck, 1972), e induce cambios en la síntesis y el perfil de

polisacáridos en la pared celular en raíces de *Cucurbita maxima* Duch (Hoa *et al.*, 1994), trigo (Tabuchi y Matsumoto, 2001), y eucalipto (Nguyen *et al.*, 2005). Se ha sugerido que el incremento en los contenidos de pectina, celulosa, hemicelulosa y callosa como consecuencia del tratamiento con aluminio podría disminuir la extensibilidad mecánica de la pared celular (Tabuchi y Matsumoto, 2001), afectando a su vez la expansión celular.

Se ha reportado que los compuestos pépticos controlan el flujo de agua y nutrientes a través de la pared celular debido a que el contenido de estos compuestos, y su grado de entrecruzamiento, determinan la porosidad de esta estructura (Carpita y Gibeaut, 1993). A su vez, se ha observado que el número de enlaces cruzados entre cadenas de pectina se incrementa como consecuencia del desplazamiento de los iones Ca^{2+} por Al^{3+} en los sitios de unión en la pectina (Blamey *et al.*, 1993). Por lo tanto, se ha propuesto que la disminución de la permeabilidad de la pared celular inducida por el aluminio altera la toma de nutrientes y de agua de la solución circundante a las células (Nguyen *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que el aluminio induce un incremento en la cantidad de proteínas extensinas unidas covalentemente a la pared celular en ápices radiculares de trigo (Kenzhebaeva *et al.*, 1999) y disminuye el recambio de las proteínas apoplásticas en ápices radiculares de soya (Kataoka *et al.*, 2003), lo que sugiere que el aluminio afecta la función de esta estructura en el metabolismo celular.

Por otra parte, se ha observado que la generación súbita de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) es una respuesta temprana de las células vegetales al aluminio. Por ello, este evento que ha sido utilizado como un marcador de toxicidad a este metal (Maltais y Houde, 2002). El aluminio no es un metal de transición, por lo tanto sus átomos no son capaces de generar ROS directamente mediante reacciones del tipo Fenton (Fenton, 1984; Goldstein *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha observado que el tratamiento con

aluminio induce su acumulación en células de los ápices radiculares, siendo el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido los más abundantes (Darko *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2005; Sharma y Dubey, 2007; Tamas *et al.*, 2005; Wang y Yang, 2005). La acumulación de ROS en la región apoplástica tiene como consecuencia un incremento en el nivel de peroxidación de lípidos de membrana y en la cantidad de callosa (Yamamoto *et al.*, 2003), observándose de manera más pronunciada en la región apical de las raíces (Cakmak y Horst, 1991; Chaffai *et al.*, 2005; Sharma y Dubey, 2007; Yamamoto *et al.*, 2001). El mecanismo de síntesis de ROS inducidas por aluminio no se conoce, sin embargo existen evidencias de que el aluminio induce la actividad de peroxidasas (Boscolo *et al.*, 2003; Simonovicova *et al.*, 2004), y de la oxalato oxidasa (Delisle *et al.*, 2001; Simonovicova *et al.*, 2004; Tamas *et al.*, 2005), asociadas a la pared celular. A su vez, se ha demostrado que la NADPH-oxidasa asociada a la membrana plasmática de células de tabaco está involucrada en la generación del anión superóxido en respuesta a aluminio (Kawano *et al.*, 2003).

Diversos estudios se han enfocado al efecto del aluminio sobre el transporte de iones a través de la membrana plasmática. Específicamente, se ha demostrado que el aluminio inhibe principalmente el influjo de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el ápice de la raíz (Huang *et al.*, 1992b; Huang *et al.*, 1992a; Ryan *et al.*, 1992). Aún no se conoce cómo el bloqueo del transporte de estos elementos puede resultar en la inhibición del crecimiento de la raíz. Sin embargo, en estudios realizados en raíces de trigo y en células del alga gigante *Chara corallina*, se demostró que es posible desacoplar la inhibición del crecimiento celular de la inhibición del influjo de Ca^{2+} en presencia de aluminio, respectivamente (Reid *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1994). Esto sugiere que el bloqueo de canales de Ca^{2+} y Mg^{2+} no es el principal mecanismo de toxicidad del aluminio.

Vía simplasto

El transporte del aluminio al citoplasma ocurre rápidamente, por lo que se ha propuesto que el mecanismo de toxicidad del aluminio podría llevarse a cabo en el simplasto (Kochian, 1995). Se ha sugerido que el aluminio es transportado a través de la membrana plasmática por endocitosis (Akeson *et al.*, 1989), y también se ha propuesto que el aluminio puede ingresar al simplasto mediante su asociación a canales de iones metálicos como el Fe^{3+} y el Mg^{2+} (Martin, 1992). La primera teoría se basa en el hecho de que el aluminio es adsorbido fuertemente por la capa externa de la membrana plasmática, por lo que el proceso de endocitosis incrementaría de manera importante el influjo de Al^{3+} . La segunda propuesta se fundamenta en el hecho de que los iones Al^{3+} , Fe^{3+} y Mg^{2+} tienen radios iónicos similares, propiedad que define el comportamiento biológico de los mismos. De este modo, es muy probable que el Al^{3+} compita con estos iones por el transporte a través de canales iónicos. Además se ha observado que algunos sideróforos bacterianos (moléculas que al asociarse a la membrana plasmática forman poros que permiten el paso de iones metálicos) se asocian tanto a Fe^{3+} como a Al^{3+} (Winkler *et al.*, 1986), sugiriendo que es posible que el Al^{3+} utilice este sistema de transporte para introducirse en el citoplasma celular.

Se debe considerar que el pH citosólico es de aproximadamente 7.5, por lo que la actividad de Al^{3+} debe ser mucho menor en el simplasto que en el apoplasto. Además, en el citoplasma existe una gran cantidad de metabolitos que pueden formar complejos con el aluminio, por lo que la actividad de Al^{3+} en el simplasto debe de ser del orden nanomolar o picomolar (Martin, 1988). Se ha observado que incluso actividades nanomolares de Al^{3+} citoplásmico podrían ser tóxicas como resultado del desplazamiento de los iones Mg^{2+} de los sitios de regulación en proteínas y en otros compuestos celulares. Además, se ha demostrado que la hexocinasa tiene 1000 veces mayor afinidad al complejo $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}^{4-}$ que al

complejo $\text{Mg}^{2+}:\text{ATP}^4$, siendo éste el principal modo de inhibición (Martin, 1988). En este sentido, el aluminio podría estar afectando varios procesos celulares, ya que interfiere en la función de enzimas involucradas en la transferencia de fosfatos, eventos de transducción de señales e interacciones con el citoesqueleto.

Por otra parte, se ha sugerido que el aluminio podría inhibir la expansión celular a través de la alteración de la dinámica del citoesqueleto. Se ha demostrado que el Al^{3+} promueve el ensamblaje de tubulina en microtúbulos e inhibe la subsiguiente despolimerización de los microtúbulos inducida por Ca^{2+} (MacDonald *et al.*, 1987). El ensamblaje de microtúbulos requiere de Mg^{2+} , el cual se asocia a los sitios de unión a GTP y GDP. La constante de asociación para el Al^{3+} es del orden de 10^7 veces mayor a la del Mg^{2+} y se ha observado que una actividad de Al^{3+} de 10^{-10} M compite eficientemente con actividades milimolares de Mg^{2+} (MacDonald *et al.*, 1987). Así, el aluminio interfiere con la hidrólisis de GTP en el proceso de despolimerización y confiere mayor estabilidad a los microtúbulos. Este efecto resulta en la alteración de la dinámica del citoesqueleto celular y a su vez podría tener como consecuencia una disfunción celular.

Se ha observado que raíces de maíz tratadas durante 3 h con aluminio presentan una estabilización de los microtúbulos corticales en la ZE, y que esta estabilización correlaciona con la inhibición del crecimiento de la raíz (Blancaflor *et al.*, 1998). Sin embargo, Sivaguru y Horst demostraron que la despolimerización de los microtúbulos corticales en la ZTD era inducida por Al después de 1 h del tratamiento. De este modo, la intervención de la tubulina en la toxicidad del aluminio aún no es clara (Sivaguru y Horst, 1998). Por otra parte, Grabski y Schindler (1995), demostraron que el aluminio altera la dinámica del citoesqueleto de actina en células en suspensión de soya, y propusieron que los complejos $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}^4$ y $\text{Al}^{3+}:\text{ADP}^4$ incrementan la rigidez de

los filamentos de actina, por un mecanismo similar al mencionado anteriormente para los microtúbulos.

Como se mencionó anteriormente, el aluminio induce la acumulación de ROS en células vegetales, así como tiene efectos en el metabolismo. La toxicidad por aluminio ha sido relacionada con la represión de la actividad mitocondrial, organelo clave en la producción de ROS (Boveris y Chance, 1973; Liu, 1997). Se ha demostrado que el aluminio induce una disminución de la permeabilidad de la membrana y del flujo de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual tiene como consecuencia el agotamiento de las reservas de ATP así como una disminución de la tasa de consumo de O_2 (Yamamoto *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere que la disfunción mitocondrial inducida por el aluminio podría estar directamente relacionada con la pérdida de la capacidad de crecimiento, principalmente ocasionada por la hiperacumulación de ROS (Yamamoto *et al.*, 2002).

1.4. INTERACCIÓN DEL ALUMINIO CON PROCESOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Estudios realizados en células animales han demostrado que uno de los principales mecanismos de toxicidad del aluminio es a través de su interacción con los componentes de la ruta de señalización de los fosfoinosítidos (Haug *et al.*, 1994). Esta ruta de señalización consta de los siguientes componentes: un receptor de membrana que percibe la señal y la transmite a una molécula transductora, la cual activa a la fosfolipasa C (PLC), catalizando la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) para producir dos segundos mensajeros: el inositol-1,4,5 -trisfosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG). El IP_3 activa la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, dando lugar a una respuesta celular a la señal inicial. Por otra parte, el DAG puede ser convertido en ácido fosfatídico (PA) mediante la acción de la diacilglicerol cinasa (DGK) o activar directamente

a la proteína cinasa C.

Aunque la ruta de transducción de señales de los fosfoinosítidos no se ha caracterizado completamente en plantas, se sabe que el aluminio es capaz de alterar el funcionamiento de sus componentes. Se ha reportado que el aluminio inhibe la actividad de la PLC, y se ha propuesto que el Al^{3+} interactúa directamente con la enzima (Jones y Kochian, 1995). Además, se ha propuesto que el aluminio podría formar un complejo con el PIP_2 , el cual no es metabolizado por la enzima (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b).

También se ha observado que el aluminio incrementa la actividad de la fosfatidilinositol-4-cinasa (PI4K) y de la fosfatidilinositol fosfato-5-cinasa (PIP5K), en células en suspensión de café (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b). Sin embargo, Ramos-Díaz (2006), reportó que el tratamiento con aluminio en el mismo modelo de estudio no provoca cambios significativos en la actividad específica de la DGK ni de la fosfolipasa D (PLD), por lo que el principal efecto del aluminio en la ruta probablemente se deba a la inhibición de la PLC y la subsiguiente disminución de los niveles de IP_3 y PA.

1.5. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ALUMINIO

Kochian (1995), definió a la resistencia al aluminio como la capacidad de exhibir un crecimiento radicular superior cuando las plantas son cultivadas en suelos o soluciones ácidas con concentraciones tóxicas del metal. Kochian sugirió que existen al menos dos estrategias fisiológicas de resistencia al aluminio: mecanismos que facilitan su exclusión en la rizósfera, y mecanismos que permiten su compartimentalización en la vacuola. Existe mucha especulación acerca de cuál es el mecanismo de resistencia principal en las plantas y la evidencia científica acumulada sugiere que múltiples mecanismos están actuando en diferentes especies (Kochian *et al.*, 2004).

Muchas especies vegetales secretan aniones orgánicos de bajo peso molecular en respuesta a la presencia de aluminio en la solución del suelo, los cuales se asocian a las formas catiónicas de aluminio (principalmente Al^{3+}). Estos compuestos forman complejos estables con el Al^{3+} , disminuyendo su actividad extracelular ($a_{\text{Al}^{3+} \text{ ext}}$) y disminuyendo la asociación del aluminio a la pared celular y a la membrana plasmática, así como su entrada al simplasto. El catión Al^{3+} es un ión metálico sin estados de transición, con la capacidad de asociarse especialmente a grupos funcionales cargados negativamente. Los grupos carboxilato, fenolato, catecolato y fosfato tienen una alta afinidad de asociación por el Al^{3+} (Rubini *et al.*, 2002). Los ácidos orgánicos, especialmente el malato, el citrato y el oxalato han sido relacionados con la resistencia al aluminio, en vista de que variedades vegetales resistentes a este metal los secretan y/o los acumulan en sus tejidos cuando son expuestos (Kochian *et al.*, 2004). Por otra parte, compuestos fenólicos como el catecol y diversas antraquinonas han sido relacionadas con la resistencia al aluminio en raíces (Ofei-Manu *et al.*, 2001; Tolrá *et al.*, 2005).

Exclusión del aluminio y la exudación de ácidos orgánicos

La prueba científica inicial que dio lugar a la teoría de exclusión del aluminio fue el hecho de que plántulas de variedades de trigo resistentes acumulaban de tres a ocho veces menos cantidad de aluminio en el ápice radicular (Delhaize *et al.*, 1993a; Rincón y González, 1992). Este fenómeno fue observado únicamente en el ápice de las raíces, por lo que se sugirió que alguna especie de ligando orgánico era secretado continuamente hacia la rizósfera y formaba complejos con el Al^{3+} y cationes derivados, evitando así su entrada al citoplasma (Delhaize *et al.*, 1993a; Rincón y González, 1992). La exclusión del aluminio coincidió con la exudación de malato, observándose este fenómeno únicamente en las variedades resistentes. Estudios posteriores demostraron que la exudación del malato se localizó en los primeros milímetros del ápice

radicular, y que este fenómeno fue inducido específicamente por el tratamiento con aluminio (Ryan *et al.*, 1995). Posteriormente, se demostró que la adición de ácidos orgánicos (citrato, malato y oxalato) a cultivos hidropónicos de variedades sensibles disminuyó los efectos tóxicos del aluminio en el crecimiento radicular, sugiriendo que la interacción aluminio:ácidos orgánicos en el medio de cultivo podría representar un mecanismo de resistencia a este metal (Pellet *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1998b). En plántulas de trigo, se observó que la capacidad de exudar malato en presencia de aluminio es una característica fenotípica que cosegregó con la resistencia y exclusión del aluminio (Delhaize *et al.*, 1993a; Delhaize *et al.*, 1993b). En líneas ditelosómicas de trigo, se ha observado que la pérdida de brazos cromosómicos específicos resultó en la disminución de la resistencia al aluminio, lo cual coincidió con una disminución en las velocidades de exudación de malato y en la exclusión de aluminio en el ápice radicular (Papernik *et al.*, 2001).

Numerosos reportes sobre la exudación de ácidos orgánicos inducida por aluminio involucran a este proceso con la resistencia a aluminio en otras especies vegetales (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Variedades resistentes al aluminio que exudan ácidos orgánicos de sus raíces en respuesta a este metal.

Espece	Genotipo	Anión exudado
<i>Triticum aestivum</i>	Línea ET3	Malato (Ryan <i>et al.</i> , 1993; Ryan <i>et al.</i> , 1995)
	Atlas 66	Malato (Pellet <i>et al.</i> , 1996)
	Kitakami B	Malato (Ishikawa <i>et al.</i> , 2000)
	Chinese Spring	Malato (Papernik <i>et al.</i> , 2001)
<i>Zea mays</i>	SA3	Citrato (Pellet <i>et al.</i> , 1996)
	IAC-TAIUBA	Citrato (Jorge y Arruda, 1997)
	Cateto-Colombia	Citrato (Piñeros <i>et al.</i> , 2002)
	ATP-Y	Citrato (Kollmeier <i>et al.</i> , 2001)
	DK789	Citrato (Ishikawa <i>et al.</i> , 2000)
	Sicuani	Citrato, Oxalato (Kidd <i>et al.</i> , 2001)
<i>Avena sativa</i>		Citrato, Malato (Zheng <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Secale cereale</i>		Citrato, Malato (Li <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sorghum bicolor</i>	SC283	Citrato (Magalhaes, 2002)
<i>Triticale ssp</i>		Citrato, Malato (Ma y Hiradate, 2000)
<i>Colocasia esculenta</i>		Oxalato (Ma y Miyasaka, 1998)
<i>Nicotiana tabacum</i>		Citrato (Delhaize <i>et al.</i> , 2001)
<i>Cassia tora</i>		Citrato (Ishikawa <i>et al.</i> , 2000; Ma <i>et al.</i> , 1997a)
<i>Glycine max</i>	PI 41,6937	Citrato (Silva <i>et al.</i> , 2001)
	Suzunari	Citrato (Yang <i>et al.</i> , 2000)
<i>Helianthus annuus</i>		Citrato, Malato (Saber <i>et al.</i> , 1999)
<i>Fagopyrum esculentum</i>		Oxalato (Ma <i>et al.</i> , 1997c; Zheng <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Raphanus sativus</i>		Citrato, Malato (Zheng <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Brassica napus</i>		Citrato, Malato (Zheng <i>et al.</i> , 1998a)
<i>Arabidopsis thaliana</i>		Malato (Hoekenga <i>et al.</i> , 2003)

Los ácidos orgánicos son compuestos de carbono que poseen al menos un grupo carboxilo, comprendiendo una amplia variedad de moléculas desde ácidos grasos y aminoácidos hasta metabolitos secundarios. Sin embargo, la mayoría de los ácidos orgánicos secretados por las raíces se caracterizan por

ser moléculas sin grupos amino y de bajo peso molecular, tales como el citrato, el malato, el oxalato, el malonato y el fumarato, Por ello, en adelante la denominación de ácidos orgánicos se referirá a este tipo de compuestos.

Estos ácidos orgánicos están directa o indirectamente involucrados en diversos procesos metabólicos tales como la asimilación de carbono y nitrógeno, la regulación del pH citosólico y el potencial electroquímico, la respiración celular y el suministro de energía a organismos simbióticos. Debido a su papel central en el metabolismo celular, la concentración de los ácidos orgánicos es estrictamente regulada, así como su distribución en los diferentes compartimientos subcelulares. Las concentraciones de ácidos orgánicos en el citosol son relativamente estables, mientras que su concentración en organelos como la vacuola varía considerablemente en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y actividad metabólica (Gerhardt *et al.*, 1987). Con la excepción de células de especies vegetales tipo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) las cuales poseen un alto contenido de ácidos orgánicos, la concentración de ácidos orgánicos en el citosol se mantiene en un intervalo de 5 a 50 mM (Jones, 1998). A pH citosólico (aprox. 7.2) cerca del 80% del ácido cítrico se encuentra como el anión citrato³⁻ y el 99% del ácido málico se encuentra en forma de malato²⁻. La gran diferencia de potencial eléctrico entre el citosol y el espacio extracelular crea un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática que favorece el transporte pasivo de aniones orgánicos hacia el apoplasto (Ryan *et al.*, 2001).

Existen tres estímulos ambientales relacionados con la exudación de aniones orgánicos en raíces: 1) deficiencia de nutrientes, particularmente fósforo (Marschner, 1995b; Neumann y Römheld, 1999), 2) exposición a cationes tóxicos, especialmente Al³⁺ (Kochian, 1995), y 3) anoxia (Neumann y Römheld, 2000). Los aniones orgánicos exudados benefician a las plantas bajo estas condiciones al incrementar la disponibilidad de nutrientes en la solución del

suelo, al reducir la concentración de los cationes tóxicos, o al reducir las concentraciones de metabolitos potencialmente tóxicos en el citoplasma. Los primeros dos procesos se deben principalmente a la gran capacidad de los grupos carboxilo e hidroxilo en los aniones orgánicos de unirse a los cationes Al^{3+} , Fe^{3+} y Ca^{2+} en la rizósfera. El número y la disposición de estos grupos funcionales en la molécula determinan la estabilidad del complejo catión:ligando (Ryan *et al.*, 2001). Generalmente, los aniones tricarboxílicos (citrato³⁻) se asocian a estos cationes metálicos con mayor estabilidad que los aniones dicarboxílicos (malato²⁻, oxalato²⁻, malonato²⁻), mientras que los aniones monocarboxílicos (acetato⁻) se asocian débilmente a ellos (Ryan *et al.*, 2001). Los aniones orgánicos interactúan con los cationes metálicos a través de enlaces coordinados con los átomos de oxígeno en los grupos COO^- . En el caso específico de los complejos de Al^{3+} : anión orgánico, se ha determinado que se encuentran en una proporción de 1:3 para el oxalato²⁻ (Figura 1.1A), y en proporción 2:2 para el malato²⁻ (Figura 1.1B), mientras que en los complejos Al^{3+} :citrato³⁻ la proporción es 3:2 (especie dimérica) y 3:3 (especie trimérica) (Figura 1.1C), dependiendo del pH de la solución (Malone *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2002; Tashiro *et al.*, 2007).

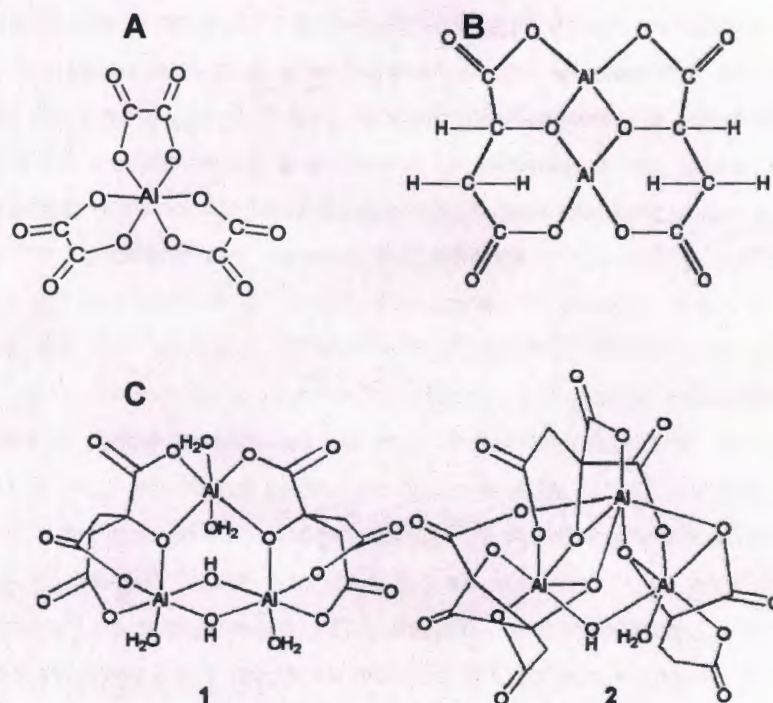


Figura 1.1. Modelo estructural de los complejos Al:ácido orgánico. A) Complejo Al^{3+} : oxalato $^{2-}$ (Shen *et al.*, 2002). B) Complejo Al^{3+} :malato $^{2-}$ (Tashiro *et al.*, 2007). C) Complejo Al:citrato $^{3-}$ en su forma dimérica (1) y trimérica (2) (Malone *et al.*, 2003). Los enlaces entre el átomo de aluminio y los átomos de oxígeno en los grupos carboxilo y las moléculas de agua son enlaces de coordinación. Se omitieron las cargas de los iones para mayor claridad.

Se han observado dos patrones de exudación de ácidos orgánicos distintos en plantas resistentes al aluminio (Ma, 2000; Ma *et al.*, 2001). En el patrón I, observado en trigo (Delhaize *et al.*, 1993b), *Fagopyrum scullentum* (Zheng *et al.*, 1998b), y cebada (Zhao *et al.*, 2003), la exudación de ácidos orgánicos se activa rápidamente (15 a 30 min después del tratamiento con aluminio) y la velocidad de exudación permanece constante. En el patrón II, observado en *Cassia tora* (Ma *et al.*, 1997b), centeno (Li *et al.*, 2000), y *Triticale* (Ma *et al.*,

2000), la exudación es tardía, presentándose un incremento de la velocidad de exudación a través del tiempo. En *Cassia tora* y centeno, la velocidad de exudación de ácidos orgánicos incrementó a las 4 y 10 h de tratamiento, mientras que en *Triticale*, la exudación de malato y citrato se incrementó a las 6 y 12 h de tratamiento, respectivamente. Las diferencias entre los patrones de exudación I y II pueden deberse a la presencia previa de las proteínas involucradas en la respuesta al aluminio y en la necesidad de sintetizarlas *de novo*.

La hipótesis de partida para este mecanismo de resistencia fue que la exudación de ácidos orgánicos disminuía la actividad del Al^{3+} en la superficie de la raíz ($a_{\text{Al}^{3+}\text{root surface}}$) a niveles no tóxicos (Kochian *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2001). Sin embargo, un análisis fisicoquímico más detallado del problema demostró que la concentración de ácidos orgánicos secretados a la solución del suelo no fue lo suficientemente elevada para reducir en los niveles requeridos la actividad del Al^{3+} en la superficie de las raíces (Kinraide *et al.*, 2005). Kinraide y colaboradores elaboraron un modelo matemático de difusión denominado “modelo de difusión bifásica”, para explicar el comportamiento observado en plantas de maíz (Kinraide *et al.*, 2005). Este modelo establece que en respuesta a aluminio, los ácidos orgánicos secretados en las células de la corteza de la raíz se difunden a través de los espacios extracelulares en la epidermis (primera fase) y posteriormente hacia fuera de la raíz, a través de la llamada “capa no agitada” (segunda fase). Debido a que el coeficiente de difusión para solutos en los espacios extracelulares de la epidermis es mucho menor que el de la capa no agitada, se crea un gradiente de concentración de ácidos orgánicos al interior de las raíces. Esto provoca la acumulación de éstos en las células corticales en concentraciones suficientes para disminuir la actividad de Al^{3+} a niveles no fitotóxicos. Este modelo también explica la mayor acumulación de Al^{3+} en las células epidérmicas, las cuales son relativamente resistentes, debido a una mayor concentración de ácidos orgánicos en esta zona.

Otros mecanismos de exclusión del aluminio

Además de los ácidos orgánicos, existen otros compuestos orgánicos que tienen la capacidad de formar complejos con el aluminio *in vivo*. Entre los más importantes se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales se caracterizan por contener uno o más anillos aromáticos hidroxilados, comprendiendo un amplio espectro de compuestos incluyendo alcaloides, flavonoides y terpenoides. Aunque se ha implicado la formación de complejos Al^{3+} :fenoles con la destoxificación interna del aluminio en plantas de té y otras especies relacionadas (Matsumoto *et al.*, 1976; Ofei-Manu *et al.*, 2001), a la fecha existen pocos reportes que relacionen estos compuestos con la exclusión del aluminio. Recientemente, Kidd y colaboradores (2001), encontraron que la exudación de los flavonoides catequina y quercetina mostró una mejor correlación con la resistencia al aluminio que la exudación de ácidos orgánicos, analizando tres genotipos de maíz con diferentes grados de resistencia. Esto sugiere que la exudación de compuestos fenólicos podría ser el principal mecanismo de exclusión de aluminio en algunas especies.

Por otra parte, algunos estudios sugieren que el incremento del pH en la rizósfera podría ser un mecanismo de exclusión del aluminio, en vista que la actividad del Al^{3+} es menor en un pH alcalino. Se ha observado que en una mutante resistente al aluminio de *Arabidopsis*, la cual no presenta un incremento en la exudación de ácidos orgánicos, existió un incremento en el influjo de H^+ en las células del ápice radicular (Larsen *et al.*, 1998). Este influjo de H^+ resultó en un incremento del pH de la rizósfera en la superficie del ápice de la raíz, en un nivel suficiente para disminuir la actividad de Al^{3+} así como sus efectos en el crecimiento de la raíz. Éste es el único reporte a la fecha en el que se comprueba que el aumento del pH en la rizósfera también podría ser un mecanismo de exclusión del aluminio en especies vegetales.

Mecanismos de detoxificación interna del aluminio

Algunas especies vegetales se caracterizan por su acumulación de altas cantidades de aluminio en la parte aérea, por lo que existe un creciente interés en investigar los mecanismos de resistencia presentes en sus células. *Hydrangea*, una especie ornamental cuyas flores cambian de color rojo a azul en suelos ácidos, puede llegar a acumular hasta 3,000 ppm de aluminio en sus hojas, principalmente en forma de complejos 1:1 de Al:citrato (Ma *et al.*, 1997a). Este complejo tiene una mayor constante de estabilidad que el complejo $\text{Al}^{3+}:\text{ATP}^{4-}$, por lo que es posible que su formación proteja al metabolismo celular de los efectos del aluminio. En sépalos de esta especie, el aluminio se acumula en forma de complejos con la antocianina 3-O-glucosil-delfinidina y con el ácido 3-O-cafeoil-quínico, de la ruta de los fenilpropanoides (Takeda *et al.*, 1985). El pigmento azul se debe principalmente a la acumulación del complejo formado entre el aluminio, la antocianina y el éster quínico, cuando estas plantas crecen en suelos ácidos (Takeda *et al.*, 1985). La concentración de Al^{3+} en los sépalos determina el color de las flores de *Hydrangea* (Toyama-Kato *et al.*, 2003), lo cual es una medida indirecta de la cantidad de aluminio que la planta absorbe de la solución del suelo. En *F. esculentum*, el aluminio es acumulado principalmente en forma de complejos 1:3 de Al:oxalato (Ma *et al.*, 1998), y puede llegar a acumular hasta 15,000 ppm de aluminio en sus hojas cuando las plantas son cultivadas en suelos ácidos (Ma *et al.*, 2001). En otros estudios realizados en protoplastos de esta especie, más del 80% del aluminio en la célula se encontró formando complejos 1:3 de Al:oxalato, encontrándose en su mayoría compartamentalizado en la vacuola (Shen *et al.*, 2002). A su vez, en plantas de té (*Camellia sinensis* L.) la mayor parte del aluminio intracelular se encuentra en forma de complejos con catequina (Nagata *et al.*, 1992).

Con base en las evidencias científicas, Kochian y colaboradores propusieron un modelo de resistencia al aluminio mediado por ácidos orgánicos (Figura 1.2) (Kochian *et al.*, 2004). El mecanismo de exclusión involucra la exudación de ácidos orgánicos a través de un canal de membrana activado por la presencia de aluminio por tres diferentes procesos: interacción directa del aluminio con el canal o con un receptor acoplado al mismo (Figura 1.2 ruta 1), interacción del aluminio con una ruta de transducción de señales presente en la membrana plasmática que resulta en la activación del canal (Figura 1.2 ruta 2) y/o interacción del aluminio con una cascada de transducción de señales que involucre componentes citoplasmáticos (Figura 1.2 ruta 3). El mecanismo de detoxificación interna involucra la formación de complejos Al:ácido orgánico en el citosol, seguido de su compartimentalización en la vacuola mediante transportadores desconocidos. Los autores también sugieren que las cascadas de señalización reguladas por el aluminio dan lugar a cambios de la expresión génica, con un incremento en la expresión de genes que codifican para transportadores de AO así como de enzimas involucradas en el metabolismo de los mismos.

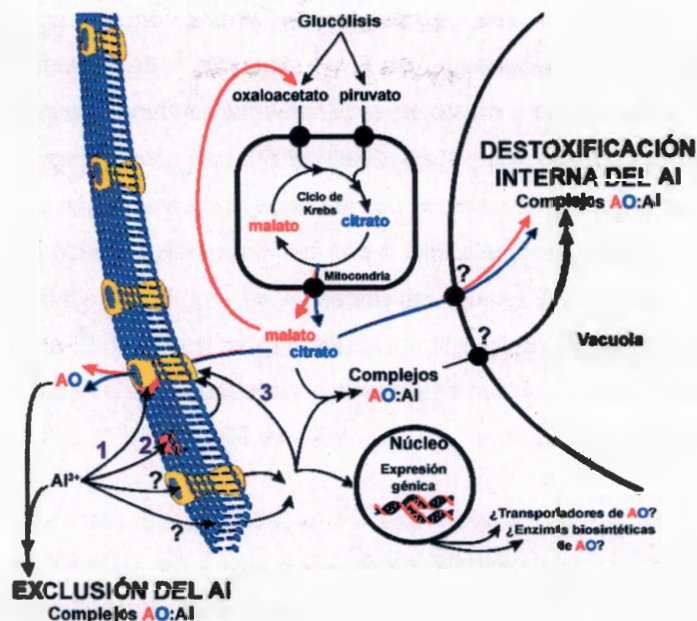


Figura 1.2. Modelo de exclusión y detoxificación interna para el aluminio basado en la formación de complejos de Al^{3+} con ácidos orgánicos (modificado de Kochian *et al.*, 2004). Detalles en el texto.

1.6. METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A ALUMINIO

En células vegetales, es probable que el malato es el producto terminal de la glucólisis y el sustrato primario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Lance y Rustin, 1984; Martinoia y Rentsch, 1994). El malato presente en las raíces puede proceder de dos rutas independientes (Figura 1.3). La primera involucra la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato y su subsecuente entrada al ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La segunda ruta involucra la carboxilación del fosfoenolpiruvato a oxaloacetato por la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la conversión del oxaloacetato en malato por la malato deshidrogenasa (MDH). Para mantener el flujo de carbono a través de la glucólisis, el malato debe de

ser usado (ciclo de Krebs, excreción de ácidos orgánicos, síntesis de aminoácidos) o almacenado en la vacuola. La acumulación de fosfoenolpiruvato, malato y citrato en el citoplasma conduce a la inhibición de la glucólisis (Douce y Neuburger, 1989; Gietl, 1992). Las condiciones en las cuales los ácidos orgánicos son exudados por las raíces requieren que el carbono sea suministrado ya sea por fotosíntesis o por fijación no fotosintética de CO₂ por la fosfoenolpiruvato carboxilasa en las raíces. A su vez, la β -oxidación de lípidos junto con la ruta del glioxilato están involucradas en la acumulación de citrato en embriones cigóticos de algodón (Miernyk y Trelease, 1981), *Ricinus communis* (Fritsch y Beevers, 1979), maíz y soya (Nelson y Rinne, 1977).

En general, las diferentes isoformas de la MDH se agrupan en seis clases dependiendo de su localización dentro de la célula y del sistema de cofactores utilizado (Miller *et al.*, 1998; Scheibe, 2004; Schulze *et al.*, 2002): 1) NAD⁺-MDH citosólica (cMDH), involucrada en el transporte de equivalentes de reducción mediante las lanzaderas malato/aspartato; 2) NAD⁺-MDH mitocondrial (mMDH) que participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; 3) NADP⁺-MDH cloroplástica (clMDH), la cual participa en el balance de equivalentes de reducción entre el estroma y el citosol en presencia de luz; 4) NAD⁺-MDH plastídica (plMDH), presente en todos los plástidos y que a diferencia de su contraparte cloroplástica, no es regulada por luz y es activa en oscuridad y en tejidos no fotosintéticos; 5) NAD⁺-MDH glioxisomal (gMDH) y peroxisomal (pMDH), que participan en el ciclo del glioxilato; y 6) NAD⁺-MDH de nódulos de raíz (neMDH), involucrada en la fijación de nitrógeno. Por su parte, la citrato sintasa (CS), la cual cataliza la condensación de acetil-CoA y oxaloacetato para la producción de citrato, existe en dos diferentes isoformas en las células vegetales: 1) la mitocondrial (mCS), la cual participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; y 2) la glioxisomal (gCS), la cual participa en el ciclo del glioxilato.

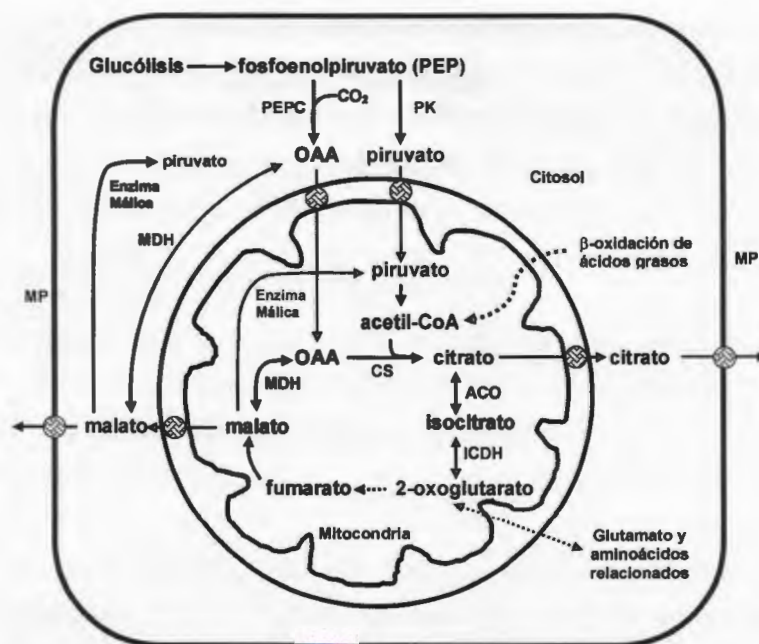


Figura 1.3. Esquema del metabolismo de los ácidos orgánicos en las raíces (modificado de Mariano *et al.*, 2005). PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; CS: citrato sintasa; ACO: aconitasa hidratasa; NADP-ICDH: isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺; MDH: malato deshidrogenasa; PK: piruvato cinasa; MP: membrana plasmática; OAA: oxaloacetato.

Hasta ahora, no ha sido posible identificar el mecanismo mediante el cual el aluminio afecta el metabolismo de los ácidos orgánicos. En centeno y *Triticale*, se ha observado que induce un aumento en la exudación de citrato y malato (diez veces sobre los valores del control), sin un cambio apreciable en las actividades de la PEPC, la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la CS (Hayes y Ma, 2003; Li *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios hechos en raíces de soya y células de zanahoria han demostrado que existe un incremento en la actividad de la CS, inducido por la presencia de aluminio (Silva *et al.*, 2001; Takita *et al.*, 1999). A su vez, en raíces de *Cassia tora* se ha observado un incremento en la actividad de esta enzima después de 3 h de tratamiento con

aluminio, mientras que la velocidad de exudación de citrato incrementa a las 6 h de exposición (Yang *et al.*, 2004). Además, la aconitasa, encargada de convertir citrato en isocitrato, resultó inhibida durante el tratamiento, por lo que posiblemente un aumento en la síntesis de citrato y una disminución en su catabolismo pudieran dar lugar a la acumulación y exudación observada (Mariano *et al.*, 2005).

Se ha observado que algunas especies vegetales que se desarrollan en suelos donde la concentración de P disponible es limitante presentan adaptaciones metabólicas como son el desarrollo de raíces proteoides (con una mayor área superficial para la absorción de nutrientes) y la exudación de malato y citrato hacia la rizósfera (Ryan *et al.*, 2001; Skene, 2001; Watt y Evans, 1999). De esta manera, la cantidad de ácidos orgánicos liberados en la rizósfera representa aproximadamente el 25% del total de carbono fijado fotosintéticamente (Gardner *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1996). Este incremento en la exudación de malato y citrato está relacionado con un aumento en la actividad de la cMDH, la PEPC y la mCS (Johnson *et al.*, 1996). Por otra parte, una disminución de la actividad de la aconitasa coincide con un aumento en la cantidad de citrato exudado (Neumann y Römheld, 1999). En estudios de marcaje *in vivo* realizados a raíces proteoides, se demostró que el malato y citrato exudado, en respuesta a ayuno de fósforo, son producto principalmente de la fijación no fotosintética de CO₂ por la PEPC y catálisis vía cMDH y mCS, respectivamente (Schulze *et al.*, 2002). No obstante, es posible que la síntesis de malato y citrato en respuesta a aluminio no dependa de un incremento en la actividad de la MDH y la CS mitocondriales, puesto que existen isoenzimas en otros compartimientos subcelulares involucrados en su síntesis.

Por otra parte, se ha observado que durante la maduración del embrión cigótico de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) existe una acumulación de citrato en el citosol, relacionada con un incremento en la actividad de la gCS y de la malato

sintasa glioxisomal (Miernyk y Trelease, 1981). Estudios de marcaje demostraron que el citrato fue producido a partir de acetil-CoA y glicina, por lo que se propuso que la β -oxidación de lípidos suministró los átomos de carbono necesarios, mientras que las enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs participaron en una ruta alterna para proveer de metabolitos al ciclo del glioxilato (Miernyk y Trelease, 1981). Además, en raíces de *Lupinus albus* sometidas a ayuno de fósforo, se ha observado un incremento en la expresión del gen que codifica para la malato sintasa (Uhde-Stone *et al.*, 2003), y en hojas de chícharo expuestas a metales pesados se ha observado un aumento en los niveles de transcritos de la gMDH (Sävenstrand y Strid, 2004), por lo que es posible que las enzimas del ciclo del glioxilato estén involucradas en la síntesis de ácidos orgánicos en respuesta a estrés ambiental. Es necesario investigar cuál es el efecto del aluminio en las actividades de estas otras isoformas de la MDH y la CS para determinar cuál es la participación del ciclo del glioxilato en la síntesis de los ácidos orgánicos exudados, en respuesta a aluminio.

Adicionalmente, otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de la CS y la mMDH en plantas transgénicas de tabaco, alfalfa, papaya, zanahoria, *Arabidopsis thaliana* y canola resulta en un incremento en el contenido y exudación de los ácidos orgánicos en las raíces, así como en un aumento en la resistencia a aluminio (Anoop *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2000; Tesfaye *et al.*, 2001). Sin embargo, Delhaize y colaboradores (2001), observaron que plantas transgénicas de tabaco de la línea CSb, sobreexpresando la CS de *Pseudomonas aeruginosa*, no presentaron resistencia al aluminio, difiriendo de los resultados obtenidos por de la Fuente y colaboradores (1997) en esta línea. Tal discrepancia sugiere que la actividad de la CS de *P. aeruginosa* es sensible a factores ambientales, o que la resistencia reportada por de la Fuente y colaboradores (1997) dependió de otra variable.

1.7. TRANSPORTADORES MEMBRANALES DE ANIONES INDUCIDOS POR ALUMINIO

Se ha propuesto que los ácidos orgánicos excretados en respuesta a aluminio proceden de depósitos intracelulares. A su vez, esta hipótesis implica la activación de proteínas transportadoras y canales aniónicos de ácidos orgánicos. Estudios de electrofisiología han denotado la existencia de un canal aniónico en protoplastos obtenidos a partir de raíces de trigo resistentes a aluminio, el cual facilita el transporte de malato hacia el apoplasto (Ryan *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). El uso de diversos antagonistas de canales aniónicos tales como el ácido nifúlmico (NA) y el ácido 5-nitro-2-(3-fenil-propilamino)-benzoico, provocó una disminución en el transporte de malato inducido por aluminio, demostrando que el gradiente electroquímico de aniones dependía de este tipo de transportadores de membrana (Ryan *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1997). A su vez, la exudación de malato y citrato en respuesta a aluminio en raíces de maíz fue dependiente de la actividad de canales aniónicos en la membrana plasmática (Kollmeier *et al.*, 2001; Piñeros *et al.*, 2002; Piñeros y Kochian, 2001).

Recientemente, el gen que codifica la proteína responsable del transporte de malato inducido por aluminio fue aislado en trigo (Sasaki *et al.*, 2004). Este gen, designado como *TaALMT1*, codifica para una proteína hidrofóbica que se localiza en la membrana plasmática de células de la raíz (Yamaguchi *et al.*, 2005). La expresión de *TaALMT1* fue de 5 a 10 veces más alta en genotipos de trigo resistentes en comparación con genotipos sensibles (Raman *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2004). La expresión heteróloga de *TaALMT1* en plantas de arroz, cebada y en células en suspensión de tabaco incrementó el transporte de malato inducido por aluminio y la resistencia a aluminio en estos sistemas (Delhaize *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2004). Genes ortólogos a *TaALMT1* han sido identificados en otras especies monocotiledóneas (arroz y cebada) así

como en dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* (Hoekenga *et al.*, 2007; Ligaba *et al.*, 2006). El genoma de *A. thaliana* contiene al menos 14 genes homólogos de transportadores membranales de aniones, cuyas secuencias de aminoácidos predichas tienen una identidad de aproximadamente 30 a 40% con TaALMT1. Una de estas proteínas, codificada por el gen *At1g08430*, ha sido implicada en un mecanismo de resistencia en *A. thaliana*, debido a que plantas con mutaciones de eliminación parcial en este gen, pierden la capacidad de exudar malato en respuesta a aluminio y son significativamente más sensibles (Hoekenga *et al.*, 2007).

1.8. MODELO DE ESTUDIO: LÍNEA DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ RESISTENTE A ALUMINIO

Martínez-Estévez y colaboradores (2003a), diseñaron un método para la selección de suspensiones celulares de café resistentes a aluminio. El método consistió en subcultivos alternados de células en suspensión en medio MS modificado (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), conteniendo o no AlCl_3 (25 μM). Después de 25 subcultivos de 12 días de duración cada uno, las suspensiones celulares fueron caracterizadas para determinar el efecto del aluminio en su crecimiento. La línea LAMt tuvo un crecimiento 30% mayor que la línea parental L2 en presencia de AlCl_3 (200 μM), mientras que no existieron diferencias entre el incremento en peso fresco de ambas líneas cultivadas en medio sin AlCl_3 (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Además, el tratamiento tuvo un menor efecto en la integridad de membrana de las células LAMt comparada con la de las células L2 (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). El mecanismo de resistencia a aluminio presente en la línea LAMt es desconocido, por lo que este estudio tiene el fin de determinar si el aluminio afecta el metabolismo de los ácidos orgánicos de manera diferencial en las líneas L2 y LAMt, para poder determinar si existe un mecanismo de resistencia en café donde estén involucrados los ácidos orgánicos.

1.9. HIPÓTESIS

Si el aluminio provoca cambios en el metabolismo y/o en la exudación de ácidos orgánicos en la línea LAMt, diferentes a la línea L2, entonces estos compuestos están participando en el mecanismo de resistencia.

1.10. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de los ácidos orgánicos en la resistencia a aluminio en suspensiones celulares resistentes y sensibles a este metal de *Coffea arabica* L.

1.11. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del aluminio en la actividad enzimática de la MDH y la CS de extractos proteicos de suspensiones celulares sensibles y resistentes de café.
- Determinar el efecto del aluminio en la exudación y la acumulación de ácidos orgánicos en suspensiones celulares sensibles y resistentes a aluminio.

1.12. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental desarrollada en el presente trabajo se ilustra en la Figura 1.4. Brevemente, para determinar el papel de los ácidos orgánicos en la resistencia a aluminio de las suspensiones celulares de café, se determinaron los contenidos de ácidos orgánicos en los extractos crudos de células tratadas con aluminio, así como en los medios de cultivo de las células. A su vez, se analizaron las actividades enzimáticas de la MDH y la CS en extractos proteicos de células en suspensión.

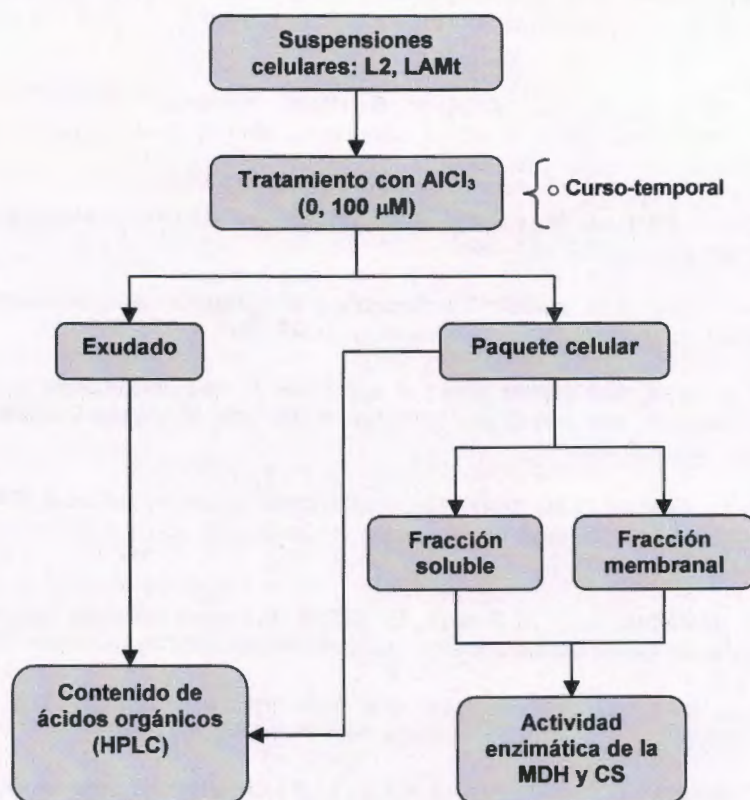


Figura 1.4. Estrategia experimental.

1.13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akeson, M., Munns, D.N., y Burau, R.G. (1989). Adsorption of Al^{3+} to phosphatidylcholine vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 986: 33-40.
- Anoop, V.M., Basu, U., McCammon, M.T., McAlister-Henn, L., y Taylor, G.J. (2003). Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132: 2205-2217.
- Blamey, F.P.C. (2001). The role of the root cell wall in aluminum toxicity. En: N. Ae, J. Arihara, K. Okada, y Srinivasan A. (Eds.). *Plant nutrient acquisition. New Perspectives.* Springer-Verlag. Tokio. pp. 201.
- Blamey, F.P.C., Asher, C.J., Edwards, D.G., y Kerven, G.L. (1993). In vitro evidence of aluminium effects on solution movement through root cell walls. *J. Plant Nutr.* 16: 555-562.
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L., y Gilroy, S. (1998). Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol.* 118: 159-172.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M., y Jorge, R.A. (2003). Aluminium induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62: 181-189.
- Boveris, A. y Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Cakmak, I. y Horst, W.J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.
- Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls of flowering plants, consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J.* 3: 1-30.
- Chaffai, R., Marzouk, B., y El Ferjani, E. (2005). Aluminum mediates compositional alterations of polar lipids classes in maize seedlings. *Phytochemistry* 66: 1903-1912.
- Ciamporova, M. (2002). Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. *Biol. Plant.* 45: 161-171.
- Clarkson, D.T. (1965). The effect of aluminium and some trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Ann. Bot.* 29: 309-315.
- Darko, E., Ambrus, H., Stefanovits-Banyai, E., Fodor, J., Bakos, F., y Barnabas, B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat

genotype and in Al-tolerant lines developed by *in vitro* microspore selection. Plant Sci. 166: 583-591.

de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., y Herrera-Estrella, L. (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. Science 276: 1568.

Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C.D., Bennet, R.J., Jagdish, V.C., y Randall, P.J. (1993a). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. Plant Physiol. 103: 685-693.

Delhaize, E., Hebb, D.M., y Ryan, P.R. (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. Plant Physiol. 125: 2059-2067.

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

Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Y., Sasaki, T., y Matsumoto, H. (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 15249-15254.

Delhaize, E., Ryan, P.R., y Randall, P.J. (1993b). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. Plant Physiol. 103: 695-702.

Delisle, G., Champoux, M., y Houde, M. (2001). Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. Plant Cell Physiol. 42: 324-333.

Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., y Barcelo, J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. J. Exp. Bot. 56: 1213-1220.

Douce, R. y Neuburger, M. (1989). The uniqueness of plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40: 371-414.

Eleftheriou, E.P., Moustakas, M., y Fragiskos, N. (1993). Aluminate-induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. J. Exp. Bot. 44: 427-436.

Fenton, H.J.H. (1984). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc. Trans. 65: 899-911.

Fritsch, H. y Beevers, H. (1979). ATP citrate lyase from germinating castor bean endosperm. Localization and some properties. Plant Physiol. 63: 687-691.

Gardner, W.K., Barber, D.A., y Parberry, D.G. (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. Plant Soil 70: 107-124.

- Gerhardt, R., Stitt, M., y Heldt, H.W. (1987).** Subcellular metabolite levels in spinach leaves. *Plant Physiol.* 83: 399-407.
- Gietl, C. (1992).** Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular location and role in the flow of metabolites between cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta* 110: 217-234.
- Goldstein, S., Meyerstein, D., y Gidon, C. (1993).** The Fenton reagents. *Free Radic. Biol. Med.* 15: 435-445.
- Grabski, S. y Schindler, M. (1995).** Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiol.* 108: 897-901.
- Gunse, B., Poschenrieder, C., y Barcelo, J. (1997).** Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiol.* 113: 595-602.
- Haug, A., Shi, B., y Vitorello, V. (1994).** Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.* 68: 1-7.
- Hayes, J.E. y Ma, J.F. (2003).** Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in *Triticale* roots. *J. Exp. Bot.* 54: 1753-1759.
- Hoa, L.V., Kuraishi, S., y Sakurai, N. (1994).** Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of squash seedlings. *Plant Physiol.* 106: 971-976.
- Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Cançado, G.M.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., y Sasaki, T. (2007).** AtALMT1 (At1g08430) is a novel, essential factor for aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* and encodes an aluminum-activated malate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9734-9743.
- Hoekenga, O.A., Vision, T.J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., y Lee, G.P. (2003).** Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg erecta x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* 132: 936-948.
- Horst, W.J. (1995).** The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. *Z. Pflanzenemahr. Bodenk.* 158: 419-428.
- Horst, W.J., Schmohl, N., Baluska, F., y Sivaguru, M. (1999).** Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? *Plant Soil* 215: 163-174.
- Hossain, M.A., Hossain, A.K.M.Z., Kihara, T., Koyama, H., y Hara, T. (2005).** Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51: 223-230.

Huang, J.W., Grunes, D.L., y Kochian, L.V. (1992a). Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of wheat root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. *Planta* 188: 414-421.

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

Huck, M.G. (1972). Impairment of sucrose utilization for cell wall formation in the roots of aluminum-damaged cotton seedlings. *Plant Cell Physiol.* 13: 7-14.

Hue, N.V., Craddock, G.R., y Adams, F. (1986). Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50: 28-34.

Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Sasaki, R., y Ofei-Manu, P. (2000). Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars, each in five plant species. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46: 751-758.

Johnson, J.F., Allan, D.L., Vance, C.P., y Weiblen, G. (1996). Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiol.* 112: 19-30.

Jones, D.L. (1998). Organic acids in the rhizosphere-a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.

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

Jorge, R. y Arruda, P. (1997). Aluminum induced organic acid exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. *Phytochemistry* 45: 675-681.

Kataoka, T., Furukawa, J., y Nakanishi, T.M. (2003). The decrease of extracted apoplast protein in soybean root tip by aluminium treatment. *Biol. Plant.* 46: 445-449.

Kawano, T., Kadono, T., Furuichi, T., Muto, S., y Lapeyrie, F. (2003). Aluminum-induced distortion in calcium signaling involving oxidative bursts and channel regulation in tobacco BY-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 308: 35-42.

Kenzhebaeva, S.S., Yamamoto, Y., y Matsumoto, H. (1999). Aluminum-induced changes in cell wall glycoproteins in the root tips of Al-tolerant and Al-sensitive wheat lines. *Russ. J. Plant Physiol.* 48: 441-447.

Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunse, B., y Barcelo, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 52: 1339-1352.

Kinraide, T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil* 134: 178.

Kinraide, T.B. y Parker, D. (1990). Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxyaluminum to four dicotyledonous species. *Physiol. Plant.* 79: 283-288.

Kinraide, T.B., Parker, D., y Zobel, R.W. (2005). Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *J. Exp. Bot.* 56: 1853-1865.

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

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., y Piñeros, M.A. (2004). Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J., y Hedrich, P. (2001). Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126: 397-410.

Kollmeier, M., Felle, H.H., y Horst, W.J. (2002). Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is induced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* 122: 945-956.

Koyama, H., Kawamura, A., Kihara, T., Hara, T., Takita, E., y Shibata, D. (2000). Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol.* 41: 1030-1037.

Koyama, H., Takita, E., Kawamura, A., Hara, T., y Shibata, D. (1999). Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* 40: 482-488.

Lance, C. y Rustin, P. (1984). The central role of malate in plant metabolism. *Physiol. Veg.* 22: 625-664.

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

Lazof, D.B., Goldsmith, J.G., Ruffy, T.W., y Linton, R.W. (1996). The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiol.* 112: 1289-1300.

Li, X.F., Ma, J.F., y Matsumoto, H. (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol.* 123: 1537-1544.

Ligaba, A., Katsuhara, M., Ryan, P.R., Shibasaka, M., y Matsumoto, H. (2006). The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate

transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* 142: 1294-1303.

Liu, S.S. (1997). Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Biosci. Rep.* 17: 259-272.

Llugany, M., Poschenrieder, C., y Barcelo, J. (1996). Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiol. Plant.* 93: 265-271.

Ma, G., Rengasamy, P., y Rathjen, A.J. (2003). Phytotoxicity of aluminium to wheat plants in high-pH solutions. *Aust. J. Exp. Agric.* 43: 497-501.

Ma, J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41: 383-390.

Ma, J.F. y Hiradate, S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211: 355-360.

Ma, J.F., Hiradate, S., y Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* 117: 753-759.

Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., y Matsumoto, H. (1997a). Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: identification of Al form in leaves. *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.

Ma, J.F., Ryan, P.R., y Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.

Ma, J.F., Taketa, S., y Yang, Z.M. (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in *Triticale*. *Plant Physiol.* 122: 687-694.

Ma, J.F., Zheng, S.J., y Matsumoto, H. (1997b). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1019-1025.

Ma, J.F., Zheng, S.J., Matsumoto, H., y Hiradate, S. (1997c). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* 390: 569-570.

Ma, Z. y Miyasaka, S.C. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* 118: 861-865.

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

Magalhaes, J. V. (2002). Molecular genetic and physiological investigations of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Cornell University. pp. 192.

Malone, S.A., Cooper, P., y Heath, S.L. (2003). Synthesis and structure of a new aluminium citrate trimer from aqueous solution at very low pH. *Dalton Trans.* 24: 4572-4573.

Maltais, K. y Houde, M. (2002). A new biochemical marker for aluminium tolerance in plants. *Physiol. Plant.* 115: 81-86.

Mariano, E.D., Jorge, R., Keltjens, W.G., y Menossi, M. (2005). Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 157-172.

Marschner, H. (1995a). Beneficial mineral elements. En: H. Marschner (Ed.). *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. San Diego. pp. 405.

Marschner, H. (1995b). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, USA. pp.605.

Martin, R.B. (1988). Bioinorganic chemistry of aluminum. En: H. Sigel y A. Sigel (Eds.). *Metal ions in biological systems: aluminum and its role in biology.* Marcel Dekker. New York. pp. 2.

Martin, R.B. (1992). Aluminium speciation in biology. En: D. J. Chadwick y J. Whelan (Eds.). *Aluminium in biology and medicine.* Wiley. New York. pp. 5.

Martínez-Estévez, M., Ku-González, A., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Escamilla-Bencomo, J.A., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003a). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97: 69-78.

Martínez-Estévez, M., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 469-474.

Martínez-Estévez, M., Racagni-Di Palma, G., Muñoz-Sánchez, J.A., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V.M., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003b). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *J. Plant Physiol.* 160: 1297-1303.

Martinoia, E. y Rentsch, D. (1994). Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 447-467.

Matsumoto, H. (1991). Biochemical mechanism of the toxicity of aluminum and the sequestration of aluminum in plant cells. En: R. J. Wright, V. C. Baligar, y R. P. Murmann (Eds.). *Plant-soil interactions at low pH.* Kluwer-Academic. Dordrecht. pp. 825.

Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S., y Takahashi, E. (1976). Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.

Miernyk, J.A. y Trelease, R.N. (1981). Role of malate synthase in citric acid synthesis by maturing cotton embryos: a proposal. *Plant Physiol.* 67: 875-881.

Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gantt, J.S., y Vance, C.P. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J.* 15: 173-184.

Morimura, S., Takahashi, E., y Matsumoto, H. (1978). Association of aluminum with nuclei and inhibition of cell division in onion (*Allium cepa*) roots. *Z. Pflanzenemahr. Bodenk.* 88: 395-401.

Muday, G.K. y DeLong, A. (2001). Polar auxin transport: Controlling where and how much. *Trends Plant Sci.* 6: 535-542.

Nagata, T., Hayatsu, M., y Kosuge, N. (1992). Identification of aluminium in tea leaves by ^{27}Al NMR. *Phytochemistry* 31: 1215-1218.

Nelson, D.R. y Rinne, R.W. (1977). Improved analysis of citrate and aconitase in plant tissues. *Plant Cell Physiol.* 18: 393-397.

Neumann, G. y Römheld, V. (1999). Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211: 121-130.

Neumann, G. y Römheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. En: R. Pinton, Z. Varanini, y Z. Nannipieri (Eds.). *The rhizosphere: Biochemistry and organic substances in the soil-plant interface.* Marcel Decker. New York. pp. 41.

Nguyen, N.T., Dudzinski, M.J., Mohapatra, P.K., y Fujita, K. (2005). Distribution of accumulated aluminum and changes in cell wall polysaccharides in *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi* under aluminum stress. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51: 737-740.

Ofei-Manu, P., Wagatsuma, T., Ishikawa, S., y Tawaraya, K. (2001). The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47: 359-376.

Papernik, L.A., Bethea, A.S., Singleton, T.E., Magalhaes, J.V., Garvin, D.F., y Kochian, L.V. (2001). Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. *Planta* 212: 829-834.

Parker, D., Zelazni, L.W., y Kinraide, T.B. (1988). Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminum solutions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 438-444.

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

Piñeros, M.A. y Kochian, L.V. (2001). A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize, identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. *Plant Physiol.* 125: 292-305.

Piñeros, M.A., Magalhaes, J.V., Alves, V.M.C., y Kochian, L.V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* 129: 1194-1206.

Raman, H., Zhang, K., Cakir, M., Appels, R., Garvin, D.F., Maron, L.G., Kochian, L.V., Moroni, J.S., Raman, S., y Imtiaz, M. (2005). Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 48: 781-791.

Ramos-Díaz, A. L. (2006). Efecto de la adición de cloruro de aluminio sobre la transducción de señales fosfolipídicas en células en suspensión de *Coffea arabica* L. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp. 96 pp.

Reid, R.J., Tester, M.A., y Smith, F.A. (1995). Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*. *Planta* 195: 362-368.

Rincón, M. y González, R. (1992). Aluminum partitioning in intact roots of aluminium-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Plant Physiol.* 99: 1021-1028.

Roy, A.K., Sharma, A., y Talukder, G. (1989). A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*. *Mutat. Res* 227: 221-226.

Rubini, P., Lakatos, A., Cahmpmartin, D., y Kiss, T. (2002). Speciation and structural aspects of interactions of Al(III) with small biomolecules. *Coord. Chem. Rev.* 228: 137-152.

Ryan, P.R., Delhaize, E., y Jones, D.L. (2001). Function and mechanism of organic acid exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 527-560.

Ryan, P.R., Delhaize, E., y Randall, P.J. (1995). Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196: 103-110.

Ryan, P.R., DiTomaso, J.M., y Kochian, L.V. (1993). Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446.

Ryan, P.R., Kinraide, T.B., y Kochian, L.V. (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.

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

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

Saber, N., Abdel-Moneim, A., y Barakat, S. (1999). Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals. *Biol. Plant.* 42: 65-73.

Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., y Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37: 645-653.

Sävenstrand, H. y Strid, A. (2004). A *Pisum sativum* glyoxysomal malate dehydrogenase induced by cadmium exposure. *DNA Sequence* 15: 206-208.

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* 120: 21-26.

Schildknecht, P.H.P.A. y Vidal, B.C. (2002). A role for the cell wall in Al^{3+} resistance and tolerance: Crystallinity and availability of negative charges. *Int. Arch. Biosci.* 1: 1087-1095.

Schmohl, N. y Horst, W.J. (2000). Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell Environ.* 23: 735-742.

Schmohl, N., Pilling, J., y Horst, W.J. (2000). Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 109: 419-427.

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

Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R.H.M.G., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Samac, D.A., Allan, D.L., y Vance, C.P. (2002). Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant Soil* 247: 133-139.

Sharma, P. y Dubey, R.S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.* 26: 2027-2038.

Shen, R., Ma, J.F., Kyo, M., y Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 215: 394-398.

Silva, I.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., y Rufty, T.W. (2000). Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiol.* 123: 543-552.

Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., y Rufty, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiol. Plant.* 112: 200-210.

Simonovicova, M., Tamas, L., Huttova, J., y Mistrik, I. (2004). Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biol. Plant.* 48: 261-266.

Sivaguru, M., Baluska, F., Volkmann, D., Felle, H.H., y Horst, W.J. (1999). Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol.* 119: 1073-1082.

Sivaguru, M. y Horst, W.J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116: 155-163.

Skene, K.R. (2001). Cluster roots: model experimental tools for key biological problems. *J. Exp. Bot.* 52: 479-485.

Tabuchi, A. y Matsumoto, H. (2001). Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition. *Physiol. Plant.* 112: 353-358.

Takeda, K., Kariuda, M., y Itoi, H. (1985). Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry* 24: 2251-2254.

Takita, E., Koyama, H., Shirano, Y., Shibata, D., y Hara, T. (1999). Structure and expression of the mitochondrial citrate synthase gene in carrot cells utilizing Al-phosphate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45: 197-205.

Tamas, L., Budikova, S., Huttova, J., Mistrik, I., Simonovicova, M., y Siroka, B. (2005). Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate-mediated hydrogen peroxide production. *Plant Cell Rep.* 24: 189-194.

Tashiro, M., Furihata, K., Fujimoto, T., Machinami, T., y Yoshimura, E. (2007). Characterization of the malate-aluminium(III) complex using ^1H and ^{27}Al NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 45: 518-521.

Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., y Elmore, D. (2000). Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123: 987-996.

Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P., y Samac, D.A. (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol.* 127: 1836-1844.

Tolrá, R.P., Poschenrieder, C., Luppi, B., y Barceló, J. (2005). Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environ. Exp. Bot.* 54: 231-238.

Toyama-Kato, Y., Yoshida, K., Fujimori, E., Haraguchi, H., Shimizu, Y., y Kondo, T. (2003). Analysis of metal elements of hydrangea sepals at various growing stages by ICP-AES. *Biochem. Engineer. J.* 14: 237-241.

Uhde-Stone, C., Zinn, K.E., Ramírez-Yáñez, N., Li, A., Vance, C.P., y Allan, D.L. (2003). Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* 131: 1064-1079.

Valadez-González, N., Colli-Mull, J.G., Brito-Argáez, L., Muñoz-Sánchez, J.A., Zúñiga-Aguilar, J.J., Castaño, E., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2007). Differential effect of aluminium on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. *J. Plant Growth Reg.* 26: 69-77.

Wang, Y.S. y Yang, Z.M. (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 46: 1915-1923.

Watt, M. y Evans, J.R. (1999). Proteoid roots: physiology and development. *Plant Physiol.* 121: 317-323.

Winkler, S., Ockels, W., Budzikiewicz, H., Korth, H., y Pulverer, G. (1986). 2-hydroxy-4-methoxy-5-methylpyridine-N-oxide: an aluminum complexing metabolite from *Pseudomonas cepacia*. *Z. Naturforsch. Teil C.* 41: 807-808.

Yamaguchi, M., Sasaki, T., Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Osawa, H., Ahn, S.J., y Matsumoto, H. (2005). Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant Cell Physiol.* 46: 812-816.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., y Matsumoto, H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128: 63-72.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., y Matsumoto, H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant Soil* 255: 239-243.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., y Matsumoto, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125: 199-208.

Yang, Z., Sivaguru, M., Horst, W.J., y Matsumoto, H. (2000). Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.* 110: 72-77.

Yang, Z., Yang, H., Wang, J., y Wang, Y. (2004). Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Sci.* 166: 1589-1594.

Zhang, W.H., Ryan, P.R., y Tyerman, S.D. (2001). Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiol.* 125: 1459-1472.

Zhao, Z., Ma, J.F., Sato, K., y Takeda, K. (2003). Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 207: 794-800.

Zheng, S.J., Ma, J.F., y Matsumoto, H. (1998a). Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. *Physiol. Plant.* 103: 209-214.

Zheng, S.J., Ma, J.F., y Matsumoto, H. (1998b). High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745-751.

Zheng, S.J. y Yang, J.L. (2005). Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biol. Plant.* 49: 321-331.

CAPÍTULO 2

ALUMINIUM INDUCES CHANGES IN ORGANIC ACIDS METABOLISM IN *Coffea arabica* SUSPENSION CELLS WITH DIFFERENTIAL AL TOLERANCE

Este capítulo fue aceptado para su publicación en la revista Journal of Inorganic Biochemistry

2.1. ABSTRACT

The primary Al tolerance mechanism in plants involves exudation and/or accumulation of specific organic acid species, which form non-phytotoxic complexes with Al^{3+} under physiological conditions. An evaluation was done of the role of organic acids in the tolerance mechanism of a cell suspension line of coffee *Coffea arabica* that exhibits Al tolerance (LAMt) but for which the metabolic tolerance mechanism remains unknown. Significant differences existed in malate dehydrogenase and citrate synthase activities (key enzymes in organic acids metabolism) between protein extracts (day 7 of culture cycle) of the L2 (Al-sensitive) and LAMt (Al-tolerant) cells when cell suspensions were treated with $100 \mu\text{M AlCl}_3$. HPLC analysis showed that the suspension cells of both lines exudate malate when incubated in a minimal solution but that exudation was not enhanced by treatment with AlCl_3 ($100 \mu\text{M}$). This is the first study demonstrating that plant Al tolerance may be associated with down-regulation of malate dehydrogenase and citrate synthase activities.

2.2. INTRODUCTION

Aluminium is the most abundant metal in the Earth's crust and its high availability in acid soils is the main factor limiting growth in plant crops. In soil

solutions with $\text{pH} > 5.5$, Al concentration is lower than $37 \mu\text{M}$, but as pH decreases Al is released into soil solution from soil minerals (Marschner, 1995), mainly in the cationic forms Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ and $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ (Kinraide, 1991). Micromolar concentrations of Al^{3+} in soil solution inhibit root development at the organ, tissue and cellular level, limiting water and nutrient uptake from soils (Ciamporova, 2002).

Several plant species that grow in acid soils have developed metabolic adaptations to resist high Al^{3+} availability in soil solution (Delhaize and Ryan, 1995). Most of these resistance mechanisms involve the accumulation and/or secretion of low molecular weight (LMW) organic ligands with high affinity for Al cations; these ligands are considered to be a major factor in plant Al resistance. Among these organic compounds are organic acids (OA's) such as citrate, malate and oxalate (Barcelo and Poschenrieder, 2002; Kochian *et al.*, 2004); simple phenolics such as catechol (Ofei-Manu *et al.*, 2001; Tolrá *et al.*, 2005); flavonoid phenolics such as catechin, rutin, quercetin and anthraquinone (Barcelo and Poschenrieder, 2002; Kidd *et al.*, 2001; Tolrá *et al.*, 2005); and LMW polypeptides (Basu *et al.*, 1994; Basu *et al.*, 1999). The complexation of Al cations by these organic ligands is generally believed to decrease Al^{3+} extracellular activity and therefore reduce Al association to the cell wall and plasma membrane, limiting Al internalization to the symplast.

Metal ligand complex stability constants are used as theoretical measures of organic ligand effectiveness in ameliorating metal toxicity. These constants indicate that citrate, oxalate and malate are the most relevant ligands in soil solution Al detoxification. Organic acids accumulation in specific regions of the roots of Al-resistant plants is probably strongly associated with Al resistance (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995). In response to aluminium, organic acids such as citrate, malate and oxalate are specifically secreted from the root apex, which is most affected by Al toxicity (Kidd *et al.*, 2001; Piñeros *et al.*, 2002;

Ryan *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2001). Recent research on the chemical structure of Al^{3+} :OA complexes has shown that the Al atom binds to oxygen atoms in carboxyl groups by coordinated bonds (Kinraide *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 1998; Ma and Hiradate, 2000; Ma and Miyasaka, 1998). These coordination complexes are innocuous to cell metabolism, which is consistent with the role of organic acids in mitigating Al toxicity (Delhaize and Ryan, 1995; Kochian *et al.*, 2004).

Citrate and malate accumulated in root tissues can be synthesized by means of two metabolic pathways (Mariano *et al.*, 2005). The first involves conversion of phosphoenolpyruvate to pyruvate in the cytosol and is catalysed by the pyruvate dehydrogenase complex and the tricarboxylic acid (TCA) cycle enzymes to produce malate and citrate. The second pathway involves generation of oxalacetate through phosphoenolpyruvate carboxylation by the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and reduction of oxalacetate to malate by the enzyme malate dehydrogenase (MDH). The PEPC enzyme is highly expressed in root tissue due to its crucial role in maintaining carbon supply in roots exuding organic compounds into the rhizosphere (Mariano *et al.*, 2005). An increase in the enzymatic activities of cytosolic MDH (cMDH), PEPC and mitochondrial citrate synthase (mCS) has been linked to exudation of malate and citrate in response to both aluminium stress (Mariano *et al.*, 2005), and phosphorus starvation (Johnson *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1996). In addition, it has been suggested that a decrease in activity of the mitochondrial enzyme aconitase is associated to higher citrate exudation levels due to a putative change in the TCA cycle carbon flux toward citrate accumulation (Neumann *et al.*, 1999). Moreover, experimental data from $^{14}\text{CO}_2$ radiolabelling showed that most malate and citrate molecules exudated by proteoid roots in response to phosphorus starvation are synthesized by the coordinated action of PEPC, cMDH and mCS (Schulze *et al.*, 2002). Transgenic lines overexpressing mitochondrial CS and MDH genes are reported to have increased Al resistance, which correlates with higher organic acids content and exudation than in wild-

type lines (Anoop *et al.*, 2003; de la Fuente *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 1999; Koyama *et al.*, 2000; Tesfaye *et al.*, 2001).

As part of ongoing research into the metabolic processes occurring in cellular response to aluminium, we produced two suspension cell lines from coffee calli (*Coffea arabica* L.) with differential Al sensibility (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a): LAMt, an Al-tolerant line; and L2, an Al-sensitive line. We have also observed that aluminium alters the phospholipids signal transduction pathway, mainly by inhibition of phospholipase C (PLC) activity (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b; Ramos-Díaz, 2006). PLC catalyses hydrolysis of the phospholipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate membrane to produce inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). DAG can be phosphorylated by diacylglycerol kinase (DGK) to produce phosphatidic acid (PA), which, together with IP₃, has been shown to be involved in regulation of calcium homeostasis, protein kinase activation and membrane channels activation (Loussouarn *et al.*, 2003). We observed that the LAMt has higher basal PLC activity than the L2, and that aluminium inhibits PLC activity in both cell lines to the same extent (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b; Ramos-Díaz, 2006). Analysis using [³H]-thymidine incorporation demonstrated that Al has an inhibitory effect on DNA synthesis in L2 cells, but an enhancing effect in LAMt cells. In addition, biochemical studies showed that Al inhibits cyclin-dependent kinase A (CDKA) activity only in the L2 cell line, but induces kinase activity in the LAMt line (Valadez-González *et al.*, 2007). Other recent research indicates that Al may also affect other signalling pathways (Arroyo-Serralta *et al.*, 2005). Aluminium has also been shown to activate a mitogen-activated protein kinase (MAPK)-like protein in L2 cells. Protein phosphorylation via the MAPK signalling pathway precedes the organic acid efflux in response to aluminium, suggesting that the MAPK phosphorylation cascade contributes to setting up the cellular mechanisms involved in the Al resistance response (Osawa and Matsumoto, 2001). The tolerance mechanism actually operating in the Al-tolerant cell line,

however, remains unknown. The objective of the present study was to determine the possible role of organic acids in aluminium tolerance in these two *Coffea arabica* L. suspension cell lines.

2.3. MATERIALS AND METHODS

Plant materials and growth conditions

Cell suspensions from the L2 (Al-sensitive) and LAMt (Al-tolerant) lines of *C. arabica* cv. Catuai were cultivated in a modified MS medium at half ionic strength (MSHIS) (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 3 % sucrose, 140 μ M cysteine-HCl, 560 μ M myo-inositol, 30 μ M thiamine-HCl, 13.6 μ M 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (2,4-D) and 4.4 μ M 6-benzyl-aminepurine (6-BAP). The pH of all media was adjusted to 4.3 before autoclaving. Suspension cells were grown in darkness at 100 rpm and subcultivated every 14 days for maintenance. The growth ability of the two cell lines (L2 and LAMt) in the presence of 100 μ M AlCl_3 for 14 days was determined. There has been no changes in Al sensitivity of the two cell lines along the years.

Treatments

Cells from cultures at day 7 of the culture cycle were separated from the used medium by decanting, and washed twice with sterile treatment medium (TM) containing 3% sucrose, 10 mM NH_4NO_3 , 10 mM KCl and 0.625 mM KH_2PO_4 at pH 4.3. Approximately 1 g of washed cells was inoculated in 25 mL of treatment solution supplemented with 100 μ M AlCl_3 and a control with no AlCl_3 . Cell suspensions were cultivated in darkness at 100 rpm and evaluated at different points in time to determine medium organic acid content and enzymatic activities. Treatments were repeated three times with an interval of 60 d.

Cell extracts

After each treatment, cells were filtered by vacuum filtration, quick frozen with liquid nitrogen, macerated and resuspended in extraction buffer [1 g of tissue/ 2.5 mL; containing 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 10% v/v glycerol, 0.2 mM Na_3VO_4 , 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.5 mM 1,4-dithio-DL-treitol (DTT), 10 mg L^{-1} aprotinin, 1 mg L^{-1} pepstatin and 5 mg L^{-1} leupeptin]. The macerate was homogenized with an UltraTurrax T-25 homogenizer (IKA-Labortechnik, Germany) at 15,000 rpm for 1 min. Extracts were centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C and the pellets discarded. The supernatant was centrifuged at 100,000 x g for 50 min at 4 °C to separate the soluble fraction (supernatant) and membrane-associated fraction (pellet). The pellets were solubilised in extraction buffer supplemented with 0.3% triton X-114, and incubated 10 min in ice and 15 min at room temperature. They were then centrifuged at 2,000 x g for 5 min and the aqueous, peripheral protein-rich supernatants collected. Protein extracts from the soluble and membrane-associated fractions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the activity assays. Sample protein content was measured with a modified bicinchoninic acid assay (Smith *et al.*, 1985). Aliquots of protein extracts were diluted in 50 μL of distilled water and mixed with 500 μL of A:B (50:1) reagent (BCATM Protein Assay Kit, PIERCE). Samples were then incubated at 30 °C for 30 min and their optical density at 562 nm measured in a spectrophotometer. Bovine serum albumin was used as protein content standard.

Organic acid content determination by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

After the corresponding treatment time, the media and cells were separated by gravity filtration and stored at -20 °C until analysis. Aliquots were filtered using Millex syringe-driven filter units (Millipore Corp., USA) with a cellulose

acetate/cellulose nitrate membrane (pore size = 0.45 μm). A 20 μL aliquot was injected into an ionic exchange column (300 x 78 mm inner diam.; SUPELCOGEL C-610H; SUPELCO, USA) attached to a HPLC device (Agilent 1100, Agilent Co, USA). Chromatographic partition was done isocratically for 30 min at a 0.5 mL min^{-1} flow rate and 30 $^{\circ}\text{C}$, using 0.1% H_3PO_4 solution as mobile phase. Analytes in the eluent were detected with a UV-detection module at 210 nm. Analyte identification and quantification were done according to retention times and absorbances of chemical standards. Raw data were analyzed with the Agilent ChemStation software and standardized with a fresh weight of cell pack.

Enzymatic activity measurement

Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) activity was assayed following Davies (Davies, 1967), with minor modifications. Briefly, protein samples were incubated in a pre-heated reaction mixture (2 mL) containing 100 mM K_2HPO_4 (pH 7); 200 μM reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), and 600 μM oxalacetate. Quantification of NADH oxidation, an indirect measure of oxalacetate conversion to malate, was done based on the decrease in optical density at 340 nm. Mixture optical density was recorded every 15 s for 3 min at 34 $^{\circ}\text{C}$, and the raw data analyzed to determine MDH activity. To evaluate NADH oxidase activity, protein samples were incubated in a reaction mixture lacking oxalacetate and its value subtracted from total MDH activity.

Citrate synthase (EC 4.1.3.7) activity was measured according to Srere (Srere, 1967), with modifications. Membrane-associated protein samples were pre-incubated for 10 min at 30 $^{\circ}\text{C}$ and added to pre-heated reaction mixture (190 μL) in a 96-well plate, containing 100 mM Tris-HCl (pH 8.1), 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 0.3 mM Acetyl-CoA. The reaction was triggered by adding 10 μL of 10 mM oxalacetate solution (final concentration, 0.5 mM). Trinitrobenzoic acid, the reaction product, exhibits intense absorption at 412 nm,

and therefore optical density at 412 nm was recorded every 30 s for 2 min at 30 °C, using a 96-well plate spectrophotometer. The raw data were analyzed to calculate CS activity. Deacetylase activity was measured by assaying protein samples in reaction mixture lacking oxalacetate and subtracting its total value from CS activity.

2.4. RESULTS

MDH and CS activities in suspension cells during culture cycle

The culture cycles of both cell lines (L2 and LAMt) exhibited a 4 d lag phase, followed by an linear growth phase extending to day 16 of culture, and then a stationary phase beginning at day 18 (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Both the L2 and LAMt had similar growth rates and behaved in a comparable fashion (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Membrane-associated and soluble MDH activities were measured in cell extracts from both cell lines. In the L2 cell membrane fraction, MDH activity remained at similar levels (10-25 nkat·[mg protein]⁻¹) until day 16 of culture, when it increased to 35 nkat·[mg protein]⁻¹, and then decreased gradually to 10 nkat·[mg protein]⁻¹ by day 20 (Figure 2.1A). Membrane-associated MDH activity in the LAMt cell extracts exhibited similar behaviour (Figure 2.1A). Soluble MDH specific activity was higher than membrane-associated activity (5 to 9-fold) in both cell extracts (Figures 2.1A and 2.1B). As occurred in the membrane fraction, soluble fraction MDH activity levels remained within a narrow range (100-150 nkat·[mg protein]⁻¹) for the first 14 d of culture, increased slightly at days 16 and 18, and then decreased to 62 nkat·[mg protein]⁻¹ at day 20 (Figure 2.1B). The MDH activity levels in the L2 soluble cell fractions were similar to those observed in the LAMt soluble cell fractions (Figure 2.1B) throughout the suspension culture cycle.

Citrate synthase activities were very similar in both cell lines (Figure 2.2). Membrane-associated CS activity in the L2 cell extracts increased rapidly at day

2 of culture ($9.713 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$), decreased continuously to $3.508 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$ at day 8, remained constant to day 14, and then increased slowly to $7.975 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$ at day 20. Membrane-associated CS activity in the LAMt cell extracts was similar (Figure 2.2). At day 2, CS activity in the LAMt cell extracts increased to $6.399 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$, decreased to $3.425 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$ at day 8, remained constant to day 14, and then increased to $7.605 \mu\text{kat} [\text{mg protein}]^{-1}$ at day 20.

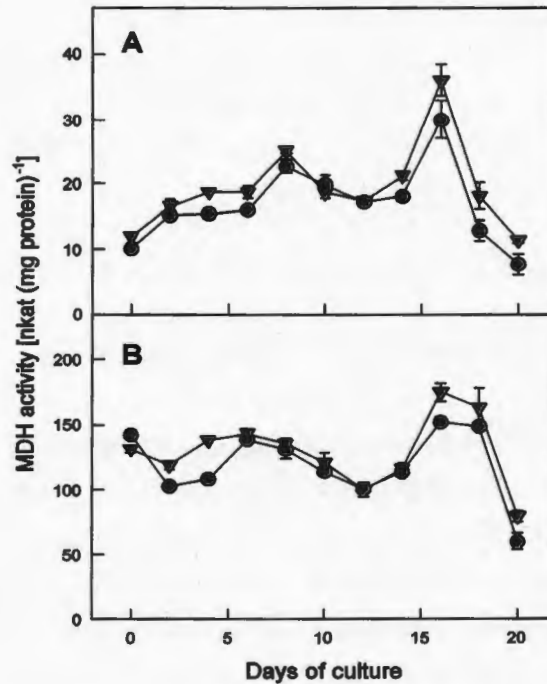


Figure 2.1. Malate dehydrogenase activity of protein extracts of the L2 (▼) and LAMt (●) lines during a culture cycle. Total membrane-associated (A) and soluble (B) MDH activity was measured in cell extracts as described in "Materials and methods". Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

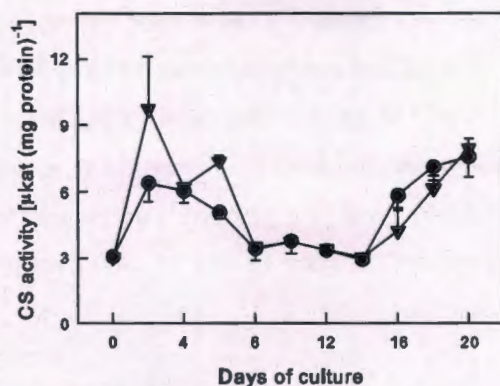


Figure 2.2. Citrate synthase activity in protein extracts of the L2 (▼) and LAMt (●) lines during a culture cycle. Total membrane-associated CS activity was measured in cell extracts as described in "Materials and Methods". Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

Short-term effect of Al on MDH and CS activities

After short-term (4 h) treatment with AlCl_3 , no effect was observed on soluble MDH activity in L2 or LAMt cells (Figure 2.3A). In contrast, aluminium differentially affected membrane-associated enzyme activities in the extracts (Figure 2.3B). Membrane-associated MDH activity in L2 cells was rapidly inhibited by Al treatment after the first 15 min (64% of control), and then returned to control levels after 30 min (Figure 2.3B). In LAMt cells, Al treatment induced an increase in membrane-associated MDH activity at 15 min (112% of control), followed by a decrease in activity levels at 30 min (54% of control), after which it remained constant (Figure 2.3B).

Membrane-associated CS activity in the L2 cells decreased to 65% of control activity after 30 min, and then recovered to control levels at 2 h (Figure 2.4). For the LAMt cell extracts, membrane-associated CS activity decreased after 15 min (46% of control), and then remained constant (Figure 2.4).

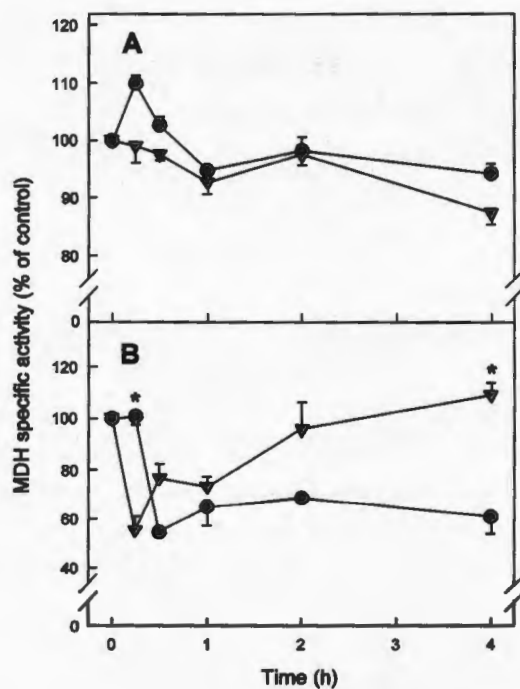


Figure 2.3. Short-term effect of AlCl_3 (100 μM) on MDH activity in 7-day old cells of the L2 (▼) and LAMt (●) lines. Soluble (A) and total membrane-associated (B) MDH activity was measured in cell extracts as described in "Materials and methods". A) 100% of control = 140 nkat $[\text{mg protein}]^{-1}$; B) 100% of control = 28 nkat $[\text{mg protein}]^{-1}$. Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE. An asterisk(*) indicates statistical differences between data means as determined by an ANOVA ($P < 0.005$).

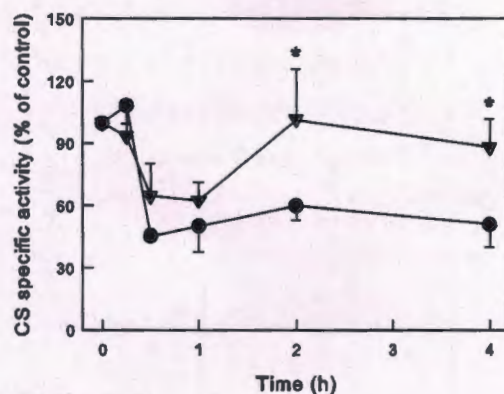


Figure 2.4. Short-term effect of AlCl_3 (100 μM) on CS activity in 7-day old cells of the L2 (▼) and LAMt (●) lines. Total membrane-associated CS activity was measured in cell extracts as described in "Materials and methods". 100% of control = 3210 nkat [mg protein]⁻¹. An asterisk(*) indicates statistical differences between data means as determined by an ANOVA ($P < 0.005$).

Long-term effect of Al on MDH and CS activities

Long-term (4 days) treatment with AlCl_3 caused soluble MDH activity in L2 cells to remain at basal levels for 24 h, after which it increased slightly to 116% of the control after 4 d (Figure 2.5A). In LAMt cells, by contrast, soluble MDH activity increased suddenly at 24 h (121% of control) and then returned to control levels after 4 d (Figure 2.5A). The difference between soluble MDH activity at 1 day in LAMt cells (147 nkat·[mg protein]⁻¹) and L2 cells (108 nkat·[mg protein]⁻¹) was significantly different. Membrane-associated MDH activity was not affected by long-term Al treatment (Figure 2.5B) in either L2 or LAMt cells. Aluminium, therefore, only modifies MDH activity (over the short- and long-terms) in the LAMt cells.

Long-term AlCl_3 treatment induced membrane-associated CS activity in both cell lines (Figure 2.6) with no significant differences between them. After 1 d, membrane-associated CS activity in L2 cells was activated and reached 132%

of control level at day 2. In the LAMt cell membrane extracts, CS activity increased at day 2 to 162% of control level, followed by a slight decrease at day 4.

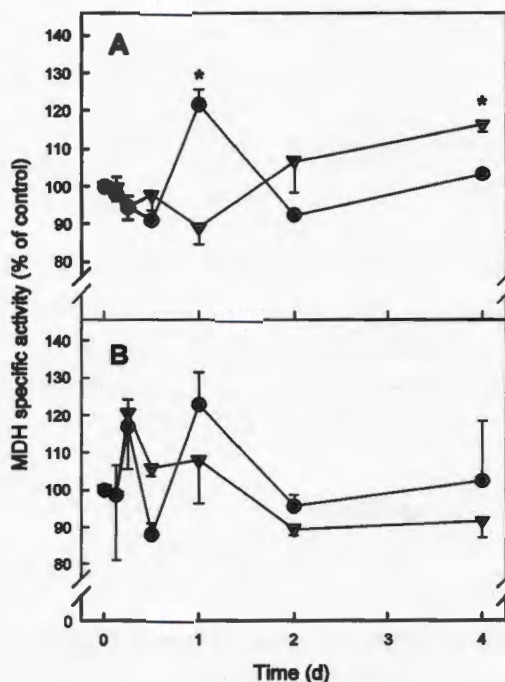


Figure 2.5. Long-term effect of AlCl_3 (100 μM) on MDH activity in 7-day old cells of the L2 (▼) and LAMt (●) lines. Soluble (A) and total membrane-associated (B) MDH activity was measured in cell extracts as described in "Materials and methods". A) 100% of control = 122 nkat $[\text{mg protein}]^{-1}$; B) 100% of control = 7 nkat $[\text{mg protein}]^{-1}$. Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE. An asterisk(*) indicates statistical differences between data means as determined by an ANOVA ($P < 0.005$).

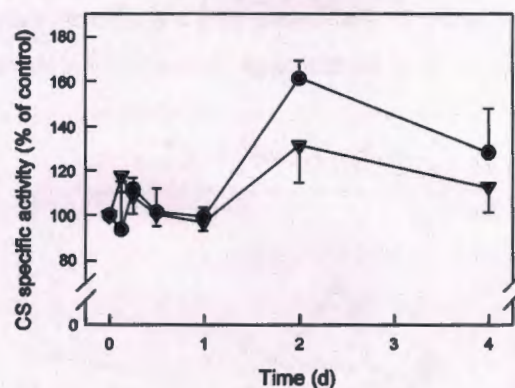


Figure 2.6. Long-term effect of AlCl_3 (100 μM) on CS activity in 7-day old cells of the L2 (▼) and LAMt (●) lines. Total membrane-associated CS activity was measured in cell extracts as described in "Materials and methods". 100% of control = 3520 nkat [mg protein] $^{-1}$. Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

Al effect on organic acid exudation

Media from the short- and long-term treatments were analyzed by HPLC to determine organic acid content. Only two compound peaks were observed in the chromatograms. The first (8.3 min retention time) corresponded to an unknown compound in the autoclaved medium. The presence of this compound in the medium samples did not interfere with identification of organic acids such as citrate, oxalate and malate, which have larger retention times (data not shown). Based on the standard, the second peak corresponded to malate (12.7 min retention time). We observed no other organic acids in exudates from the treated cells, and therefore focused further analysis on malate exudation changes in response to aluminium.

Cells from the L2 and LAMt lines exhibited relatively constant increases in basal malate exudation levels (126 nmol [h·g FW] $^{-1}$, and 85 nmol [h·g FW] $^{-1}$, respectively) (Figure 2.7) over 4 h (Table 2.1). These increasing malate

exudation rates remained relatively constant to 2 d (Figure 2.8), when medium malate contents reached maximum values, and then did not change significantly over the following 48 h. At 4 h, aluminium did induce a slight increase in malate content in the L2 cell media (Figure 2.7), and a minor decrease in those from LAMt cells (Figure 2.7), however, no statistical differences were observed. In addition, the short-term malate exudation rates in both cell lines were not significantly affected by aluminium (Table 2.1).

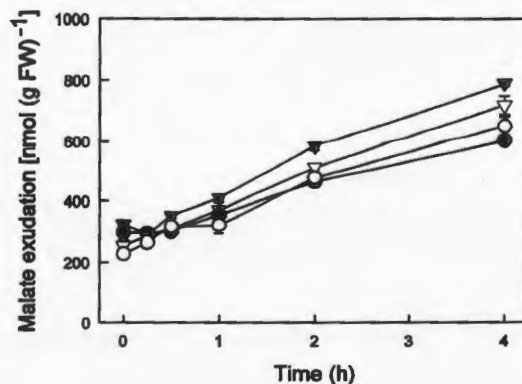


Figure 2.7. Short-term effect of Al treatment on malate exudation in L2 (▼) and LAMt (●) suspension cells. Seven-day old cells were incubated in treatment solution with 100 μ M AlCl_3 (closed symbols) and a control (open symbols), as described in "Materials and methods". Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

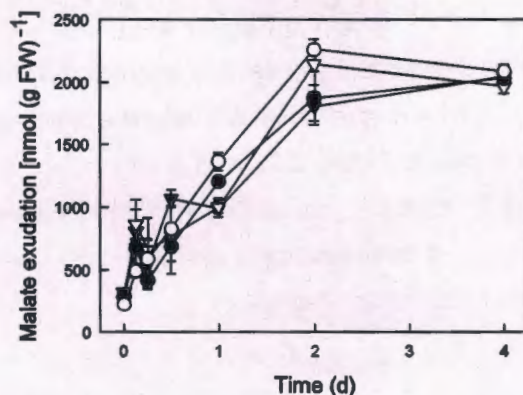


Figure 2.8. Long-term effect of Al treatment on malate exudation in L2 (▼) and LAMt (●) suspension cells. Seven-day old cells were incubated in treatment solution with 100 μM AlCl_3 (closed symbols) and a control (open symbols), as described in "Materials and methods". Each point represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

Table 2.1. Malate exudation rates in coffee suspension cells after 4 h incubation in treatment media with 100 μM AlCl_3 and a control. Each value represents the mean of three independent experiments with two replicates each $\pm$ SE.

Cell line	Exudation rate (nmol malate [g FW·h] ⁻¹)	
	Control (no Al)	100 μM AlCl_3
L2	126 $\pm$ 2	118 $\pm$ 8
LAMt	85 $\pm$ 7	105 $\pm$ 7

2.5. DISCUSSION

The MDH and CS activities in the L2 and LAMt suspension cells changed very little throughout the culture cycle (Figures 2.1 and 2.2). Soluble MDH activity in the cell extracts was probably due to the presence of cytosolic MDH, a soluble form of the MDH enzyme, whereas membrane-associated MDH activity was likely due to the isolation of mitochondrial MDH in the lipid phase of the cell

extracts (Miller *et al.*, 1998; Scheibe, 2004; Schulze *et al.*, 2002). In previous research, we found no glyoxisomal structures in L2 and LAMt cells, implying that glyoxisomal forms of MDH and CS contribute only a minor portion of the membrane-associated enzyme activity we have measured. No characterization of MDH and CS enzyme activity in suspension cell models has been previously reported. It has been demonstrated, however, that relative carbon fluxes through the TCA cycle in tomato suspension cells are fairly constant during culture cycle, with a slightly higher level in the linear and pre-stationary growth phases (40% and 51% of glucose influx) and a lower level at the cell division arrest phase, when anabolic pathways are down-regulated (28% of glucose influx) (Rontein *et al.*, 2002). The same authors also concluded that metabolite flux rates in central metabolic pathways (glycolysis, pentose-phosphate pathways, TCA cycle) are highly dependent on nutritional status, relative fluxes are generally constant, and anabolic pathways (polysaccharides and amino acid biosynthesis) have metabolite fluxes that are smaller and more variable than in the central metabolism (Rontein *et al.*, 2002). Our results suggest that differences in basal MDH and CS enzyme activity levels were due to slight adjustments in organic acid metabolism and depended on cell nutritional requirements in specific growth phases.

In the short-term experiment, treatment with aluminium did induce a decrease in soluble MDH and membrane-associated CS activities, but had no such effect on membrane-associated MDH activity (Figures 2.3 and 2.4). Aluminium treatment impaired a rapid effect (15-30 min) in soluble MDH (Figure 2.3A) and membrane-associated CS (Figure 2.4) activities in both cell lines, but only in L2 cells did both enzymes return to basal levels after 2 h. This rapid effect of aluminium on enzymatic activities was probably associated with a general response to metal stress, but only Al-tolerant cells can maintain the metabolic response after stimuli perception. The nature of the metabolic response through MDH and CS is not completely clear. Inhibition of mitochondrial CS leads to a

shift in the carbon flux to production of malate by mitochondrial MDH. The accumulated malate can then be transported across the mitochondrial membrane to serve as an aluminium chelator in cytosol or can be exudated to culture media to prevent aluminium entry, as proposed by Kochian *et al.* (Kochian *et al.*, 2004). A decrease in oxalacetate reduction by cytosolic MDH (reaction thermodynamically favoured at cytosolic neutral pH) and/or an induction of oxalacetate synthesis by PEP carboxylase may be needed to supply oxalacetate molecules to the malate/oxalacetate shuttle system (Martinoia and Rentsch, 1994). Similar to our observations in coffee suspension cells (Figures 2.3, 2.4 and 2.5), other authors have reported alterations in organic acid metabolism in Al-tolerant soybean plants and mutant carrot cell lines, which exudate citrate in response to aluminium stress (Silva *et al.*, 2001; Takita *et al.*, 1999). In these studies, high citrate exudation was correlated to an increase in citrate synthesis by mitochondrial citrate synthase. Although the above does open the possibility of organic acid exudation as an Al-tolerance response, no differences in malate exudation were observed here between the control and Al-treated cells, or between the L2 and LAMt lines (Figures 2.7 and 2.8). We believe, therefore, that the Al-tolerance mechanism operating in the LAMt cells does not involve organic acid exudation.

The observed long-term effect of aluminium treatment on membrane-associated MDH activity is quite intriguing. In LAMt cells, aluminium treatment induced an increase in membrane-associated MDH activity at day 1, but this ceased at day 2 (Figure 2.5B). Use of broad-range genetic screening in identifying Al-responsive genes in Al-tolerant rye plants has shown a slight induction of mitochondrial MDH gene expression (Rodriguez-Milla *et al.*, 2002), and aluminium stimuli induce genetic expression of PEPC in tolerant soybean plants (Ermolayev *et al.*, 2002). The possibility therefore exists that long-term Al treatment of tolerant coffee cells induces expression of a repertory of genes

involved in the central metabolism, although its role in aluminium tolerance is still unclear.

Due to the regulatory role of organic acids in the primary metabolic pathways, the cytosolic concentration of organic acids remains relatively constant during the cell cycle (Douce and Neuburger, 1989; Gerhardt *et al.*, 1987; Gietl, 1992; Kaiser *et al.*, 1981), except under stress conditions such as osmotic stress or alterations in cytosolic pH value (Asai *et al.*, 1999; Britto and Kronzucker, 2005; Gerendás and Ratcliffe, 2002). By comparison, malate and citrate concentrations in organelles such as vacuoles, glyoxysomes and peroxysomes are highly variable and depend on cell physiological status. A number of studies indicate that organic acid chelation of internalized Al cations and subsequent storage of Al-OA complexes in the vacuole constitutes an internal detoxification mechanism in many crop plants (Ma *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2001; Ma and Hiradate, 2000; Shen *et al.*, 2002). Our results suggest that an internal detoxification mechanism involving organic acids may be acting in the LAMt cells perhaps due to an internal compartmentation of Al into the vacuole. This is the first study suggesting that Al-tolerance in plants may be associated with down-regulation of malate dehydrogenase and citrate synthase activities.

2.6. REFERENCES

- Anoop, V.M., Basu, U., McCammon, M.T., McAlister-Henn, L., and Taylor, G.J. (2003). Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol.* 132: 2205-2217.
- Arroyo-Serralta, G.A., Ku-González, A., Hernández-Sotomayor, S.M.T., and Zúñiga-Aguilar, J.J. (2005). Exposure to toxic concentrations of aluminum activates a MAPK-like protein in cell suspension cultures of *Coffea arabica*. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 27-35.
- Asai, N., nakajima, N., Kondo, N., and Kamada, H. (1999). The effect of osmotic stress on the solutes in guard cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 40: 843-849.

Barcelo, J. and Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environ. Exp. Bot.* 48: 75-92.

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

Basu, U., Good, A.G., Aung, T., Slaski, J.J., Basu, A., Briggs, K.G., and Taylor, G.J. (1999). A 23-KDa, root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 106: 53-61.

Britto, D.T. and Kronzucker, H.J. (2005). Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant Cell Environ.* 28: 1396-1409.

Ciamporova, M. (2002). Morphological and structure responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. *Biol. Plant.* 45: 161-171.

Davies, D.D. (1967). Malate dehydrogenase from pea epicotyls. *Methods Enzymol.* 13: 148-150.

de la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera-Ponce, J.L., and Herrera-Estrella, L. (2006). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.

Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C.D., Bennet, R.J., Jagdish, V.C., and Randall, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.* 103: 685-693.

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

Douce, R. and Neuburger, M. (1989). The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 371-414.

Ermolayev, V., Weschke, W., and Manteuffel, R. (2002). Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54: 2745-2756.

Gerendás, J. and Ratcliffe, R.G. (2002). Root pH regulation. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafafi (Eds.). *Plant roots: the hidden half.* Marcel Dekker. New York, USA . pp. 553.

Gerhardt, R., Stitt, M., and Heldt, H.W. (1987). Subcellular metabolite levels in spinach leaves. *Plant Physiol.* 83: 399-407.

Gietl, C. (1992). Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular location and role in the flow of metabolites between cytoplasm and cell organelles. *Biochim. Biophys. Acta* 110: 217-234.

Johnson, J.F., Allan, D.L., and Vance, C.P. (1994). Phosphorus Stress-Induced Proteoid Roots Show Altered Metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* 104: 657-665.

Johnson, J.F., Allan, D.L., Vance, C.P., and Weiblen, G. (1996). Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiol.* 112: 19-30.

Kaiser, G., Martinoia, E., and Wiemken, A. (1981). Rapid appearance of photosynthetic products in the vacuoles isolated from barley mesophyll protoplast by a new fast method. *Z. Pflanzenphysiol.* 107: 103-113.

Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunse, B., and Barcelo, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 52: 1339-1352.

Kinraide, T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil* 134: 167-178.

Kinraide, T.B., Parker, D., and Zobel, R.W. (2005). Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer. *J. Exp. Bot.* 56: 1853-1865.

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., and Piñeros, M.A. (2004). Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Koyama, H., Kawamura, A., Kihara, T., Hara, T., Takita, E., and Shibata, D. (2000). Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol.* 41: 1030-1037.

Koyama, H., Takita, E., Kawamura, A., Hara, T., and Shibata, D. (1999). Overexpression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* 40: 482-488.

Loussouarn, G., Park, K.H., Bellocq, C., Baro, I., Charpentier, F., and Escande, D. (2003). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *EMBO J.* 22: 5412-5421.

Ma, J.F. and Hiradate, S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211: 355-360.

Ma, J.F., Hiradate, S., and Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* 117: 753-759.

Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., and Matsumoto, H. (1997). Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: identification of Al form in leaves. *Plant Physiol.* 113: 1033-1039.

Ma, J.F., Ryan, P.R., and Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.

Ma, Z. and Miyasaka, S.C. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* 118: 861-865.

Mariano, E.D., Jorge, R., Keltjens, W.G., and Menossi, M. (2005). Metabolism and root exudation of organic acid anions under aluminium stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 17: 157-172.

Marschner, H. (1995). Beneficial mineral elements. In: H. Marschner (Ed.). *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press. San Diego . pp. 405.

Martínez-Estévez, M., Ku-González, A., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Escamilla-Bencomo, J.A., and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003a). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97: 69-78.

Martínez-Estévez, M., Racagni-Di Palma, G., Muñoz-Sánchez, J.A., Brito-Argáez, L., Loyola-Vargas, V.M., and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003b). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *J. Plant Physiol.* 160: 1297-1303.

Martinoia, E. and Rentsch, D. (1994). Malate compartmentation-responses to a complex metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 447-467.

Miller, S.S., Driscoll, B.T., Gregerson, R.G., Gantt, J.S., and Vance, C.P. (1998). Alfalfa malate dehydrogenase (MDH): molecular cloning and characterization of five different forms reveals a unique nodule-enhanced MDH. *Plant J.* 15: 173-184.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Neumann, G., Massonneau, A., Martinoia, E., and Römheld, V. (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208: 373-382.

Ofei-Manu, P., Wagatsuma, T., Ishikawa, S., and Tawaraya, K. (2001). The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with al tolerance in several common woody plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 47: 359-376.

Osawa, H. and Matsumoto, H. (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux. *Plant Physiol.* 15: 473-495.

Piñeros, M.A., Magalhaes, J.V., Alves, V.M.C., and Kochian, L.V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* 129: 1194-1206.

Ramos-Díaz, A. L. (2006). Efecto de la adición de cloruro de aluminio sobre la transducción de señales fosfolipídicas en células en suspensión de *Coffea arabica* L. Ph.D Thesis, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México, pp. 96.

Rodriguez-Milla, M.A., Butler, E., Rodriguez-Huete, A., Wilson, C.F., Anderson, O., and Gustafson, J.P. (2002). Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. *Plant Physiol.* 130: 1706-1716.

Rontein, D., Dieuaide-Noubhani, M., Dufourc, E.J., Raymond, P., and Rolin, D. (2002). The metabolic architecture of plant cells. Stability of central metabolism and flexibility of anabolic pathways during the growth cycle of tomato cells. *J. Biol. Chem.* 277: 43948-43960.

Ryan, P.R., Delhaize, E., and Randall, P.J. (1995). Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196: 103-110.

Scheibe, R. (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* 120: 21-26.

Schulze, J., Tesfaye, M., Litjens, R.H.M.G., Bucciarelli, B., Trepp, G., Miller, S., Samac, D.A., Allan, D.L., and Vance, C.P. (2002). Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant Soil* 247: 133-139.

Shen, R., Ma, J.F., Kyo, M., and Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 215: 394-398.

Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., and Ruffy, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiol. Plant.* 112: 200-210.

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

Srere, P.A. (1967). Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-11.

Takita, E., Koyama, H., Shirano, Y., Shibata, D., and Hara, T. (1999). Structure and expression of the mitochondrial citrate synthase gene in carrot cells utilizing Al-phosphate. *Soil Sci. Plant Nutr.* 45: 197-205.

Tesfaye, M., Temple, S.J., Allan, D.L., Vance, C.P., and Samac, D.A. (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol.* 127: 1836-1844.

Tolrá, R.P., Poschenrieder, C., Luppi, B., and Barceló, J. (2005). Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environ. Exp. Bot.* 54: 231-238.

Valadez-González, N., Colli-Mull, J.G., Brito-Argáez, L., Muñoz-Sánchez, J.A., Zúñiga-Aguilar, J.J., Castaño, E., and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2007). Differential effect of aluminium on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. J. Plant Growth Reg. 26: 69-77.

CAPÍTULO 3

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE CAFÉ

3.1. INTRODUCCIÓN

Kochian (1995), definió a la resistencia al aluminio como la capacidad de las plantas de exhibir un crecimiento radicular superior cuando son cultivadas en suelos o soluciones ácidas con concentraciones tóxicas de aluminio y sugirió que existen al menos dos estrategias fisiológicas de resistencia al aluminio: mecanismos que facilitan la exclusión del aluminio en la rizósfera, y mecanismos que permiten compartamentalizar al aluminio en la vacuola. Existe mucha especulación acerca de cuál es el mecanismo de resistencia principal en las plantas y la evidencia científica sugiere que éste es particular para cada especie (Kochian *et al.*, 2004). El mecanismo de exclusión externa al aluminio mejor estudiado involucra la exudación de aniones de ácidos orgánicos hacia la rizósfera, donde forman complejos estables con Al. El ácido orgánico excretado es específico de la especie vegetal: citrato en *Phaseolus vulgaris* (Miyasaka *et al.*, 1991), maíz (Pellet *et al.*, 1995), y *Casia tora* (Ma *et al.*, 1997a); malato en trigo (Delhaize *et al.*, 1993); y oxalato en *Fagopyrum esculentum* (Ma *et al.*, 1997b), y en *Colocasia esculenta* (Ma y Miyasaka, 1998). Otro mecanismo de exclusión que se ha observado es la disminución de la actividad de Al a través de la alcalinización de la rizósfera (Degenhardt *et al.*, 1998).

Con respecto a los mecanismos internos de destoxificación del aluminio, éstos generalmente se presentan en especies nativas de suelos ácidos. En las células de estas plantas, el aluminio absorbido es compartamentalizado en forma de complejos con aniones de ácidos orgánicos o con aniones silicato. Entre Éstas se incluye *Hydrangea macrophylla* (Ma *et al.*, 2001), *F. esculentum* (Ma *et al.*,

1997b), *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.*, 1998), y *Fareamea marginata* (Britez *et al.*, 2002). Estas especies se denominan hiperacumuladoras de aluminio, debido a que se pueden encontrar grandes cantidades de éste, principalmente en tejido foliar y órganos reproductivos ([Al] > 3000 ppm) (Jansen *et al.*, 2002). En plantas de *F. esculentum*, el aluminio se acumula principalmente en forma de complejos 1:3 de Al:oxalato (Ma *et al.*, 1998), acumulando en sus hojas hasta 15,000 ppm de este metal cuando las plantas son cultivadas en suelos ácidos (Ma *et al.*, 2001). En estudios realizados en protoplastos de *F. esculentum*, más del 80% del aluminio en la célula se encontró formando complejos 1:3 de Al:oxalato, encontrándose en su mayoría compartimentalizado en la vacuola (Shen *et al.*, 2002).

En suspensiones celulares de *Coffea arabica*, se ha determinado que la exudación de ácidos orgánicos al medio de cultivo no está involucrada en el mecanismo de resistencia a aluminio (Capítulo 2). Sin embargo, se observó que el aluminio induce cambios en las actividades de la malato deshidrogenasa y la citrato sintasa de manera diferencial en dos líneas de suspensiones celulares con diferente sensibilidad a este metal (Capítulo 2), lo cual sugiere que existe un cambio en el metabolismo de los ácidos orgánicos en respuesta a aluminio en nuestro modelo de estudio. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del aluminio en el contenido de ácidos orgánicos en suspensiones celulares de café con diferente sensibilidad a aluminio.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Suspensiones celulares de *C. arabica* L. cv. Catuai de las líneas L2 y LAMt (sensible y resistente a Al, respectivamente), fueron cultivadas en medio MS modificado a la mitad de la fuerza iónica (MSHIS) (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), adicionado con sacarosa (30 g/L), 140 µM cisteína-HCl, 560 µM myo-

inositol, 30 μM tiamina-HCl, 13.6 μM ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y 4.4 μM 6-bencil-aminopurina (6-BAP). El pH del medio fue ajustado a 4.3 antes de su esterilización. Las suspensiones celulares fueron cultivadas en oscuridad a 100 rpm y subcultivadas cada 14 días para su mantenimiento. La capacidad de crecimiento de las líneas celulares (L2 y LAMt) fue evaluada en presencia de 100 μM de AlCl_3 . No ha habido cambios significativos en la sensibilidad de las líneas al aluminio a lo largo de años de subcultivo.

Tratamientos con AlCl_3

Células de las líneas L2 y LAMt en el día 7 del ciclo de cultivo fueron separadas del medio por filtración al vacío en condiciones estériles y lavadas dos veces con agua destilada estéril. Aproximadamente 1 g de células fue inoculado en 25 mL de medio de cultivo MSHIS adicionado con 100 μM AlCl_3 , incluyéndose controles incubados en medio MSHIS sin AlCl_3 . Las suspensiones celulares fueron incubadas en oscuridad a 100 rpm a 25 °C. Después del tratamiento, las células fueron separadas del medio por filtración al vacío, lavadas con agua destilada en 3 ocasiones, pesadas, congeladas rápidamente con nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C.

Extracción de metabolitos intracelulares de células en suspensión

Las células fueron congeladas rápidamente con nitrógeno líquido, maceradas y resuspendidas en 1 mL de ácido perclórico al 70%. El homogenizado se incubó por 10 min en baño de hielo y se agitó en vortex durante 1 min. Las muestras fueron centrifugadas a 15,000 x g durante 15 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo de 50 mL conteniendo 0.88 g de NaHCO_3 . Para acelerar la neutralización, se adicionó 1 mL de agua destilada y las muestras se agitaron durante 2 min. Los extractos neutralizados fueron transferidos a tubos de 2 mL y centrifugados a 10,000 x g durante 15 min. El sobrenadante fue colectado y

almacenado a -20 °C hasta la cuantificación de ácidos orgánicos mediante HPLC.

Cuantificación del contenido de ácidos orgánicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Alícuotas de extractos celulares fueron filtradas en unidades Corning (Corning Inc., USA), con una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 μm de diámetro de poro. Una alícuota de 20 μL del extracto filtrado fue inyectada a un sistema cromatográfico, consistiendo de una precolumna mod. SUPELGUARD C610H (50 mm largo x 4.6 mm diámetro interno; SUPELCO, USA) y una columna analítica de intercambio iónico mod. FAST ACID ANALYSIS (100 mm largo x 7.8 mm diámetro interno; BIORAD, USA). El sistema cromatográfico estuvo acoplado a un dispositivo de HPLC mod. Agilent 1100 (Agilent Co., USA). La partición cromatográfica fue llevada a cabo isocráticamente durante 9 min a una velocidad de flujo de 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y 40 °C, usando 0.01 M H_2SO_4 como fase móvil. Los analitos en el efluente fueron detectados con un módulo de detección UV a 210 nm. La identificación y cuantificación de los analitos fueron determinadas de acuerdo a los tiempos de retención (TR) y absorbancias de estándares químicos. Los datos fueron analizados utilizando el software Agilent ChemStation asociado al equipo.

Análisis estadístico

Los datos del contenido de ácidos orgánicos (nmol) fueron estandarizados con el peso fresco del paquete celular extraído, utilizando el programa Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Los gráficos fueron elaborados utilizando el programa SigmaPlot v.10 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Se analizó la diferencia de medias de los contenidos de ácidos orgánicos entre tratamientos mediante la prueba de *t* de Student no apareada, utilizando el programa SigmaStat v. 3.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

3.3. RESULTADOS

Perfil de ácidos orgánicos detectados en extractos celulares

Extractos crudos de células procedentes de los diferentes tratamientos fueron analizados mediante HPLC para determinar el contenido de ácidos orgánicos. Se observaron ocho picos en los cromatogramas (Figura 3.1A y 3.1B), de los cuales tres pudieron ser identificados: oxalato (TR = 3.418 min), citrato (TR = 4.241 min) y malato (TR = 4.743 min). Los otros cinco picos no pudieron ser identificados de acuerdo a los estándares utilizados (glioxilato, succinato, fitato y succinato). Sin embargo, la cantidad relativa de analitos no identificados no vario en los tratamientos, por lo cual no se consideraron para su análisis. El pico correspondiente a oxalato tuvo un área mucho mayor que el área de los picos de los demás compuestos (Figura 3.1A). Sin embargo, de acuerdo a las curvas de calibración de los distintos compuestos, la concentración de oxalato fue similar en magnitud de la observada para citrato y malato (Cuadro 3.1).

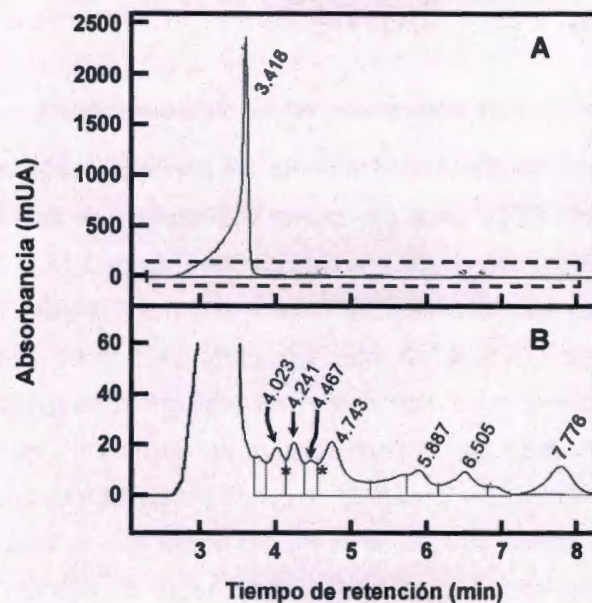


Figura 3.1. Perfil de ácidos orgánicos en extractos crudos de células en suspensión de café. A) Cromatograma obtenido a partir de extracto celular de la línea L2. El pico observado corresponde a oxalato (TR = 3.418 min). El área punteada se muestra ampliada en B), en donde se observan 7 picos representativos. Los picos denotados con un asterisco corresponden a citrato (TR = 4.241 min) y a malato (TR = 4.743 min). Los demás picos corresponden a compuestos no identificados.

Cuadro 3.1. Contenido basal de ácidos orgánicos en suspensiones celulares de café del día 7 del ciclo de cultivo. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos réplicas $\pm$ DE.

Línea celular	Contenido de ácidos orgánicos (nmol [g FW] ⁻¹)		
	Oxalato	Citrato	Malato
L2	63.6 $\pm$ 9.2	9.1 $\pm$ 1.0	30.3 $\pm$ 3.4
LAMt	61.7 $\pm$ 7.5	6.9 $\pm$ 0.6	34.2 $\pm$ 4.5

Efecto a corto plazo del aluminio en el contenido intracelular de ácidos orgánicos

Los contenidos intracelulares de oxalato, citrato y malato fueron muy similares en células de las líneas L2 y LAMt (Cuadro 3.1), no mostrando diferencias significativas al inicio del tratamiento. En los tratamientos a corto plazo (2 h), se observaron diferentes comportamientos en el contenido de oxalato, citrato y malato de las células en respuesta a aluminio (Figura 3.2). Se pudo observar que el contenido de oxalato incrementa significativamente ($P < 0.01$) a los 30 minutos de tratamiento con aluminio únicamente en células de la línea LAMt, mientras que en la línea L2 el contenido de este ácido orgánico no varió a lo largo del tratamiento (Figura 3.2A). El incremento en el contenido de oxalato fue transitorio, disminuyendo a los niveles del control a 1 h de tratamiento.

Por otra parte, el contenido de citrato aumentó súbitamente después de 1 h de tratamiento con aluminio en ambas líneas (L2: 203 % del control; LAMt: 223 % del control), abatiéndose a niveles similares al control a las 2 h de tratamiento (Figura 3.2B). Sin embargo, el análisis estadístico de los datos indicó que no existieron diferencias significativas entre los niveles de citrato de ambas líneas durante el tratamiento.

Adicionalmente, se observó que el contenido de malato en las células de la línea LAMt incrementó a los 30 min de tratamiento con aluminio ($P < 0.001$), disminuyendo a los niveles basales después de 1 h de exposición con aluminio (Figura 3.2C). De manera similar a lo observado para el contenido de citrato, no existieron diferencias significativas en el contenido de malato en las células de la línea L2 a lo largo del tratamiento.

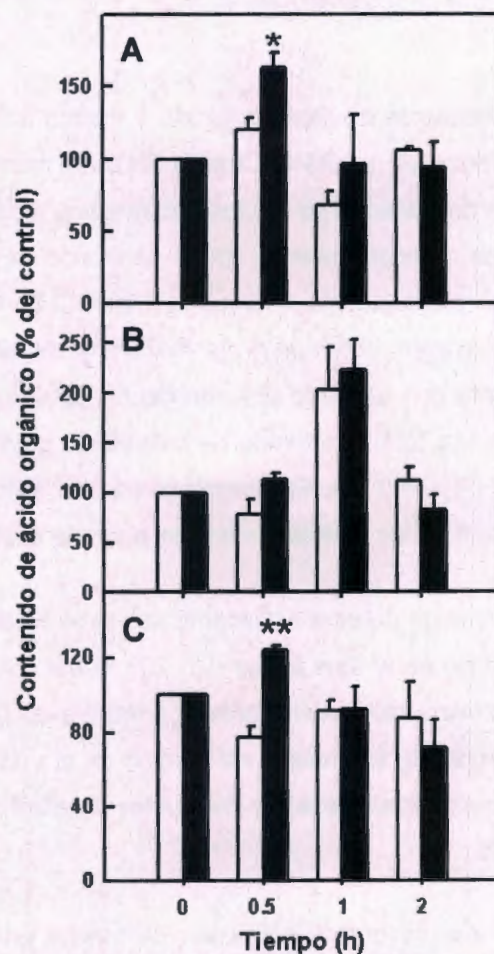


Figura 3.2. Efecto a corto plazo del aluminio en el contenido de ácidos orgánicos en células de las líneas L2 (barras blancas) y LAMt (barras negras). A) Oxalato; B) Citrato; C) Malato. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos réplicas $\pm$ DE. Los niveles del 100 % de control para ambas líneas se describen en el cuadro 3.1. Diferencias significativas entre las medias de los niveles de ácidos orgánicos se denotan con asteriscos. (*) $P < 0.01$; (**) $P < 0.001$.

Efecto a largo plazo del aluminio en el contenido intracelular de ácidos orgánicos

En los tratamientos de largo plazo (24 h), el aluminio tuvo efectos más notables en los niveles intracelulares de oxalato, citrato y malato (Figura 3.3). Se pudo observar que el contenido de oxalato incrementa significativamente ($P < 0.02$) a las 6 h de tratamiento con aluminio solamente en células de la línea LAMt, mientras que el contenido de oxalato en células de la línea L2 se mantiene en los niveles basales a lo largo del tratamiento (Figura 3.3A). El contenido de oxalato en la línea LAMt disminuyó a los niveles del control a las 12 h de tratamiento.

Por otra parte, el contenido de citrato en la línea L2 disminuye dramáticamente a las 6 h de tratamiento con aluminio (46% del control), mientras que en la línea LAMt el contenido de citrato incrementa súbitamente (131% del control) a las 6 h de tratamiento (Figura 3.3B). Los niveles de citrato regresaron paulatinamente a los del control en ambas líneas a las 24 h de tratamiento.

De manera similar a lo observado para el contenido de citrato, los niveles de malato disminuyeron drásticamente (31% del control) en células de la línea L2 a las 6 h de tratamiento con aluminio (Figura 3.3C). Aunque esto contrasta con un súbito incremento de los niveles de malato a las 12 h en células de esta línea (149% del control), el análisis estadístico de los datos indicó que no existen diferencias significativas entre los niveles de malato de ambas líneas a las 12 h de tratamiento. El contenido de malato en células de la línea L2 es significativamente menor ($P < 0.01$) al de las células de la línea LAMt a las 6 h de tratamiento. Adicionalmente, se observó que el contenido de malato en las células de la línea LAMt no varía a lo largo del tratamiento con aluminio.

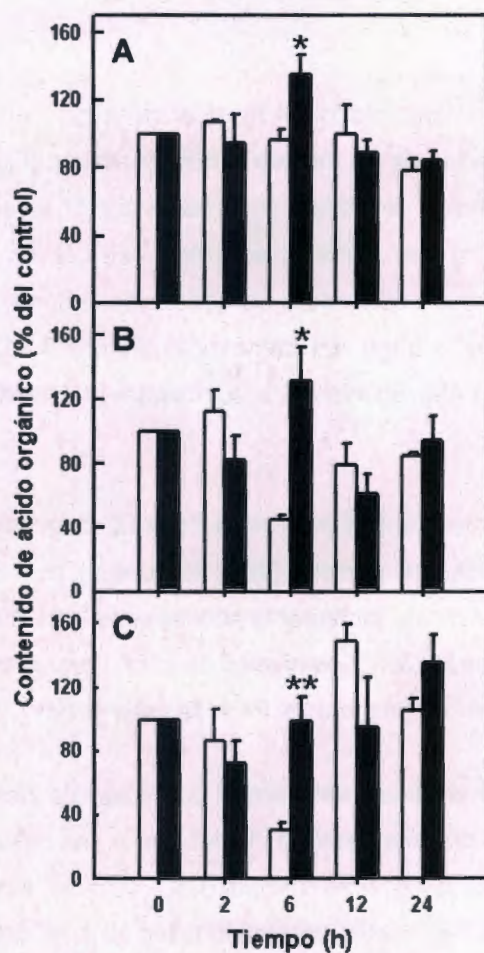


Figura 3.3. Efecto a largo plazo del aluminio en el contenido de ácidos orgánicos en células de las líneas L2 (barras blancas) y LAMt (barras negras). A) Oxalato; B) Citrato; C) Malato. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos réplicas $\pm$ DE. Los niveles del 100 % de control para ambas líneas se describen en el cuadro 3.1. Diferencias significativas entre las medias de los niveles de ácidos orgánicos se denotan con asteriscos. (*) $P < 0.02$; (**) $P < 0.01$.

3.4. DISCUSIÓN

Los resultados indicaron que el aluminio afectó de manera diferencial el contenido de citrato y malato, y en menor medida de oxalato, en las células de las líneas L2 y LAMt. Se observó una dramática disminución del contenido de malato y citrato en células en suspensión de la línea L2 (Figura 3.3B y 3.3C) a las 6 h de tratamiento con aluminio, lo cual podría indicar que el aluminio afectó el flujo de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En suspensiones celulares de tabaco sensibles a aluminio, se ha demostrado que la inhibición de la capacidad de crecimiento está asociada con la disminución de las actividades mitocondriales y de la tasa de respiración, así como un descenso en el contenido de ATP (Yamamoto *et al.*, 2002). El mismo efecto fue observado en ápices radiculares de plantas de chícharo expuestas a concentraciones tóxicas de aluminio (Yamamoto *et al.*, 2002), por lo que es muy probable que la concentración de metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos también disminuya como una consecuencia de la disfunción mitocondrial asociada a la toxicidad por aluminio. A diferencia de lo observado en tabaco y chícharo, la disminución en el contenido de malato y citrato en las células de la línea L2 de café es transitoria (Figura 3.3B y 3.3C), sugiriendo que no hay disfunción mitocondrial sino un cambio temporal del metabolismo de estos ácidos orgánicos en respuesta al aluminio.

En plantas de *Melastoma mebalathricum* (una especie hiperacumuladora de aluminio), se ha observado una correlación positiva entre el contenido de aluminio y el contenido de oxalato en tejidos foliares (Watanabe *et al.*, 1998). A su vez, en especies del género *Brachiaria*, el tratamiento con aluminio indujo un incremento significativo en el contenido de citrato de los ápices radiculares, sin observarse exudación significativa de citrato a la rizósfera, lo que sugiere la acción de un mecanismo de destoxificación interna (Wenzl *et al.*, 2002). Algunas variedades de plantas resistentes muestran una correlación positiva

entre el incremento del contenido de citrato y malato en raíces con respecto a la concentración de aluminio en la solución del suelo (Silva *et al.*, 2001). Este efecto no ha sido observado en variedades sensibles, sugiriendo que el aluminio afecta el metabolismo de los ácidos orgánicos de manera específica en las variedades resistentes (Silva *et al.*, 2001). En contraste, los cambios en los niveles de ácidos orgánicos de las células de la línea LAMt fueron transitorios, no observándose una acumulación constante de éstos como se podría esperar si un mecanismo de destoxificación interna operara en esta línea (Figura 3.2 y 3.3).

Por otra parte, se ha observado que en plantas de *Fagopyrum esculentum* probablemente estén funcionando dos mecanismos de resistencia a aluminio. En tratamientos con aluminio cortos se ha observado la inducción de la exudación de oxalato en raíces (Peng *et al.*, 2003). Sin embargo, en periodos prolongados de exposición a aluminio (10 d), la exudación de oxalato no es diferente a la exudación basal, mientras que se observó la acumulación del metal en las vacuolas (Peng *et al.*, 2003). Notablemente, el contenido de oxalato en estas plantas no tuvo cambios por efecto del aluminio a los 10 d de tratamiento (Peng *et al.*, 2003). Debe de considerarse que el contenido de oxalato de *F. esculentum* es hasta 5 veces mayor en comparación con otros cultivos de interés (trigo, maíz, soya, centeno y cebada) (Chai y Liebman, 2005), por lo que probablemente los depósitos intracelulares de oxalato son suficientes para neutralizar las formas catiónicas de aluminio que ingresan a la célula. Dado que los contenidos basales de los ácidos orgánicos evaluados fueron similares en células de las líneas L2 y LAMt (Cuadro 3.1), y a que los cambios en su contenido durante el tratamiento fueron transitorios, es muy probable que la destoxificación interna del aluminio con ácidos orgánicos no sea el mecanismo de resistencia de la línea LAMt.

3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Britez, R.M., Watanabe, T., Jansen, S., Reissmann, C.B., y Osaki, M. (2002). The relationship between aluminum and silicon accumulation in leaves of *Faramea marginata* (Rubiaceae). *New Phytol.* 156: 437-444.

Chai, W. y Liebman, M. (2005). Oxalate content of legumes, nuts, and grain-based flours. *J. Food Comp. Anal.* 18: 723-729.

Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., y Kochian, L.V. (1998). Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117: 19-27.

Delhaize, E., Ryan, P.R., y Randall, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.

Jansen, S., Broadley, M.R., Robbrecht, E., y Smets, E. (2002). Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Bot. Rev.* 68: 235-269.

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

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., y Piñeros, M.A. (2004). Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Ma, J.F., Hiradate, S., y Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiol.* 117: 753-759.

Ma, J.F., Ryan, P.R., y Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.

Ma, J.F., Zheng, S.J., y Matsumoto, H. (1997a). Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 38: 1019-1025.

Ma, J.F., Zheng, S.J., Matsumoto, H., y Hiradate, S. (1997b). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* 390: 569-570.

Ma, Z. y Miyasaka, S.C. (1998). Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiol.* 118: 861-865.

Martínez-Estévez, M., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 469-474.

Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K., y Foy, C.D. (1991). Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. *Plant Physiol.* 96: 737-743.

Pellet, D.M., Grunes, D.L., y Kochian, L.V. (1995). Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196: 788-795.

Peng, X., Yu, L., Yang, C., y Liu, Y. (2003). Genotypic difference in aluminum resistance and oxalate exudation of buckwheat. *J. Plant Nutr.* 26: 1767-1777.

Shen, R., Ma, J.F., Kyo, M., y Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 215: 394-398.

Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., y Rufty, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: An evaluation of the role of organic acids. *Physiol. Plant.* 112: 200-210.

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

Wenzl, P., Chaves, A., Patino, G., Mayer, J., y Rao, I. (2002). Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 165: 582-588.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., y Matsumoto, H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128: 63-72.

CAPÍTULO 4

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFÉ

4.1. INTRODUCCIÓN

El aislamiento de protoplastos vivos, los cuales son células desprovistas de la pared celular, constituye una herramienta biotecnológica cuyo desarrollo comprende los últimos 100 años, a partir de que Klercker (1892) aisló los primeros a partir de hojas de la planta acuática *Stratiotes aloides* (Klercker, 1892). Desde entonces, el desarrollo de protoplastos a partir de diferentes tejidos ha incrementado la versatilidad de las plantas para su uso en investigación bioquímica y genética, siendo estas herramientas indispensables para la ingeniería genética y el mejoramiento de cultivos.

De todos los modelos de estudio utilizados para la manipulación genética, los protoplastos son los únicos que permiten sacar provecho de todas las tecnologías desarrolladas hasta la fecha (Davey *et al.*, 2005). Además, los protoplastos son especialmente útiles en el desarrollo de híbridos interespecíficos e intergenéricos, cuando la incompatibilidad sexual impide la hibridación por métodos convencionales (Medina-Urrutia *et al.*, 2004).

Los protoplastos son el único sistema que permite la obtención de híbridos citoplasmáticos, resultado de la fusión entre protoplastos enucleados de una especie y protoplastos completos de otra (Guo *et al.*, 2004; Wang y Binding, 1993). Los híbridos citoplasmáticos son generados con el objetivo de seleccionar caracteres codificados en genomas organelares, tales como esterilidad sexual en mitocondria (Bhattacharjee *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2004), y resistencia a herbicidas en cloroplasto (Fayez y Hassanein,

2000; Menczel *et al.*, 1986; Thomzik y Hain, 1988). Por otra parte, los protoplastos son específicamente usados para estudiar la ultraestructura celular, fisiología e interacciones planta-patógeno (en especial la interacción membrana plasmática-partícula viral).

La digestión controlada de la pared celular permite el aislamiento de membranas celulares, organelos y vacuolas intactas, para su uso en estudios de electrofisiología concernientes al transporte de iones a través de membranas, y a la regulación del potencial osmótico celular. Por ejemplo, protoplastos de células guarda han sido ampliamente utilizados como modelo para estudiar la regulación del transporte de K^+ en la apertura estomatal (McAinsh *et al.*, 1997) así como para estudiar los efectos del aluminio en la permeabilidad de la membrana plasmática (Ishikawa y Wagatsuma, 1998).

En la respuesta a estrés por metales como Cd, Zn y Al, los protoplastos ofrecen ventajas en el estudio de la interacción entre los iones metálicos con sus distintos blancos en la membrana plasmática (Ishikawa y Wagatsuma, 1998; Kollmeier *et al.*, 2001; Lindberg y Strid, 1997; Piñeros *et al.*, 2002; Piñeros y Kochian, 2001; Ryan *et al.*, 1997). Además, el aislamiento de vacuolas intactas a partir de protoplastos constituye una herramienta necesaria para estudios de compartimentalización de iones metálicos tóxicos y de sus ligandos orgánicos en estos organelos (Ma *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2002; Wherrett *et al.*, 2005), lo cual ha enriquecido la comprensión de los mecanismos de detoxificación interna de metales en plantas (Kochian *et al.*, 2002; Kochian *et al.*, 2004; Kochian *et al.*, 2005; Ma, 2005).

El objetivo de este trabajo es la obtención de un protocolo para el aislamiento de protoplastos a partir de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L., como herramienta para estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos de la respuesta

a aluminio en nuestro modelo de estudio.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo

Suspensiones celulares de *C. arabica* L. cv. Catuai de las líneas L2 y LAMt (sensible y resistente a aluminio, respectivamente), fueron cultivadas en medio MS modificado a la mitad de la fuerza iónica (MSHIS) (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), adicionado con sacarosa (30 g/L), 140 μ M cisteína-HCl, 560 μ M myo-inositol, 30 μ M tiamina-HCl, 13.6 μ M ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D) y 4.4 μ M 6-bencil-aminopurina (6-BAP). El pH del medio fue ajustado a 4.3 antes de su esterilización. Las suspensiones celulares fueron cultivadas en oscuridad a 100 rpm y subcultivadas cada 14 días para su mantenimiento.

Digestión enzimática de la pared celular y purificación de protoplastos

Células del día 7 del ciclo de cultivo fueron separadas del medio de cultivo por filtración al vacío en condiciones estériles y lavadas dos veces con agua estéril. Un gramo de paquete celular fue resuspendido en 5 mL de solución de lisis, la cual consistió de 87 mM sacarosa, 10 mM NH_4NO_3 , 10 mM KCl, 625 μ M KH_2PO_4 , 6 mM CaCl_2 y 10 g/L albúmina de suero bovina (ABS), adicionada con 390 mM sorbitol (solución A) ó 240 mM KCl (solución B). El pH de la solución fue ajustado a 4.3 previo a la adición de las enzimas. Se determinó experimentalmente que la osmolaridad fue de 500 mOsm/Kg H_2O en ambas soluciones de lisis. Las enzimas hidrolíticas utilizadas fueron 10 g/L celulisina (CALBIOCHEM, 10 KU/g), 2 g/L macerasa (CALBIOCHEM, 3 KU/g), 2 g/L driselasa (SIGMA, Cat. N° D-8037) y 10% (v/v) pectinasa (SIGMA, Cat. N° P2611). La solución de lisis adicionada con las enzimas hidrolíticas fue esterilizada mediante filtración a través de una membrana de nylon de 0.22 μ m

de diámetro de poro. Las suspensiones celulares fueron incubadas en oscuridad a 30 °C durante 12 h, en agitación moderada (20 inversiones/min). Posteriormente, la suspensión de protoplastos fue filtrada a través de 0.5 g de lana de vidrio empacada en una jeringa de 5 mL para eliminar el debris celular. El filtrado fue colocado en un tubo nuevo y la suspensión de protoplastos se dejó sedimentar en baño de hielo durante 2 h. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de protoplastos se resuspendió en solución de lisis sin enzimas ni ABS. La concentración de protoplastos fue determinada con un hematocitómetro haciendo uso de un microscopio de luz transmitida Revelation III (LW Scientific, Tucker, GA, USA). Para verificar la reproducibilidad del método, los experimentos se repitieron cada 15 días en tres ocasiones, obteniendo resultados similares.

Microscopía electrónica de barrido y Microscopía de contraste de fases

Para analizar su morfología, células de las líneas L2 y LAMt (día 7 del ciclo de cultivo) fueron deshidratadas en soluciones seriadas de etanol (30 %, 50 %, 70 %, 80 % y 90 % durante 1 h; etanol absoluto durante 1 h en dos ocasiones). Las muestras fueron secadas en un desecador de punto crítico Sandri795 (Tousimis, Rockville, MD, USA), colocadas en un soporte de bronce y recubiertas con una capa de 10 nm de oro en un metalizador Denton Vacuum Desk II (LLC, Moorestown, NJ, USA). Las muestras metalizadas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6360LV (JEOL Techniques Ltd, Tokio, Japón), utilizando el software asociado para el procesamiento de imágenes.

Las características morfológicas de las células en suspensión y de los protoplastos fueron observadas haciendo uso de un microscopio de luz transmitida Carl Zeiss Axioplan II (Carl Zeiss Microimaging Inc, Thornwood, NY,

USA), utilizando condiciones ópticas en campo claro y de contraste de fases. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Axiocam MRm acoplada al instrumento y procesadas con el software asociado.

Determinación de la osmolaridad de las soluciones

La osmolaridad de las soluciones utilizadas en la obtención de protoplastos fue determinada mediante el uso de un osmómetro de presión de vapor VAPRO 5520 (WESCOR Inc., Logan, UT, USA), calibrado con agua destilada y desionizada (0 mOsm/Kg) y con un estándar de cloruro de sodio (1000 mOsm/Kg). Para tal efecto, 10 μ L de solución fueron colocados en un disco de papel filtro y colocados en el instrumento. Las mediciones fueron realizadas por triplicado y reportadas como mOsmoles/Kg H₂O.

Análisis estadístico

Las medias y las desviaciones estándar de los diámetros de las poblaciones de protoplastos (n = 250) fueron calculadas en el programa Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA). El análisis de la distribución de diámetros en las poblaciones de protoplastos fue llevado a cabo mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, utilizando el programa SigmaStat v. 3.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

4.3. RESULTADOS

Características morfológicas de las células en suspensión de café

Se observó que las suspensiones celulares de café utilizadas en este trabajo no se desarrollan en forma de células individuales, sino que forman filamentos constituidos por células cilíndricas alargadas (70 μ m largo x 30 μ m diámetro),

unidas secuencialmente por los extremos (Figura 4.1A y 4.1B). Estos filamentos se pliegan sobre sí mismos para formar cúmulos globulares, presumiblemente por efecto de las condiciones de agitación (Figura 4.1C). Estas características fueron observadas en ambas líneas celulares, sin diferencias aparentes en morfología (Figura 4.1D y 4.1E). En ambas líneas, los cúmulos globulares constaron de 10 a 15 células (Figura 4.2A y 4.2B), generando nuevos grupos celulares por partición de un grupo celular preexistente, debido presumiblemente al régimen de agitación mantenido en el medio de cultivo.

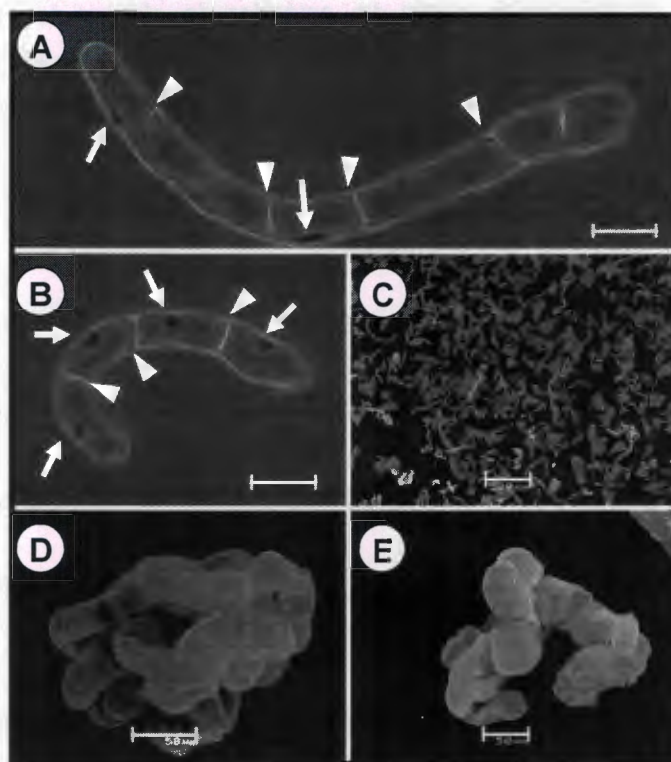


Figura 4.1. Morfología celular de las líneas L2 y LAMt de suspensiones celulares de café. Filamentos celulares de las líneas A) L2 y B) LAMt, observados con microscopía óptica de contraste de fases. Las flechas apuntan hacia el núcleo, mientras que las cabezas de flecha apuntan hacia la placa de división celular. C) Apariencia de las

suspensiones celulares de café visualizadas mediante microscopía de barrido electrónico. Cúmulos globulares de células de las líneas D) L2 y E) LAMt visualizados mediante microscopía de barrido electrónico. Las barras representan 50 μm en A, B, D, y E, mientras que en C la barra representa 500 μm .

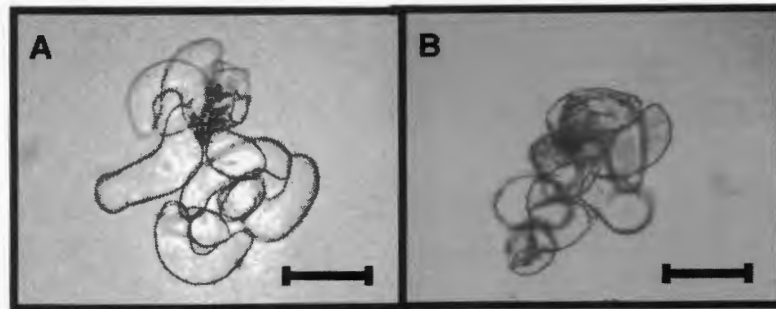


Figura 4.2. Cúmulos globulares en suspensiones celulares de las líneas A) L2 y B) LAMt, observados mediante microscopía óptica en campo claro. Las composiciones ilustradas son producto de la mezcla de imágenes fotográficas tomadas desde varios planos de enfoque. Las barras representan 50 μm .

Condiciones experimentales para el aislamiento de protoplastos de las líneas L2 y LAMt

Células de la línea L2 fueron incubadas en solución A (sorbitol) adicionada con enzimas hidrolíticas para la digestión de la pared celular durante 2, 4, 6 y 12 h. Se observó distensión de las paredes celulares a partir de las 4 h de digestión (Figura 4.3B), formándose grupos de protoplastos embebidos en una matriz extracelular a las 6 h de incubación (Figura 4.3C). Esta matriz probablemente estuvo constituida por componentes de la pared celular semidigerida. A las 12 h de incubación, protoplastos aislados se observaron en la solución (Figura 4.3D), sin una cantidad apreciable de células con pared, sugiriendo una hidrólisis total de las paredes celulares.

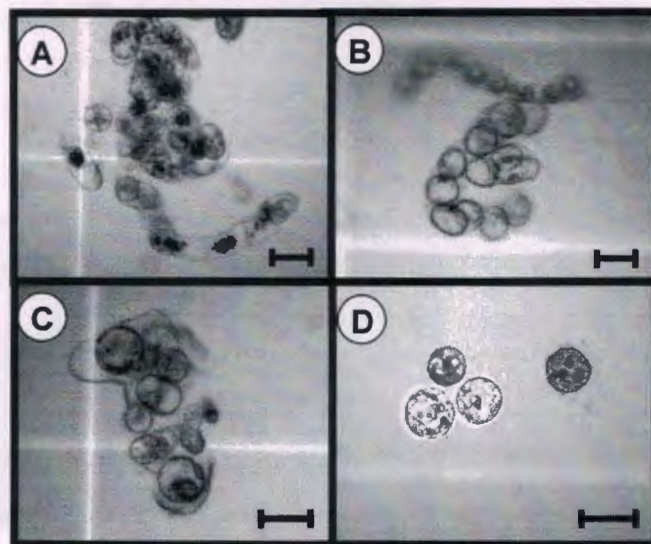


Figura 4.3. Curso temporal de la hidrólisis de la pared celular de suspensiones celulares de café (línea L2). Morfología de las células al ser incubadas en solución de lisis durante A) 2 h, B) 4 h, C) 6 h, y D) 12 h. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía óptica en campo claro. Las barras representan 50 μm .

Posteriormente, células de la línea L2 fueron incubadas durante 12 h en la solución A (sorbitol; $\rho = 1.0301 \text{ g/mL}$) y en la solución B (KCl; $\rho = 1.0195$), adicionadas con enzimas hidrolíticas, para la digestión de la pared celular. Después de la incubación se observó una cantidad considerable de protoplastos íntegros resuspendidos únicamente en células incubadas en la solución A + enzimas (Figura 4.4A), mientras que en células incubadas en la solución B + enzimas se observaron grandes cantidades de restos celulares, sin presencia aparente de protoplastos íntegros (Figura 4.4C). El rendimiento de protoplastos en la solución de lisis A fue de $1.88 \times 10^5 \text{ protoplastos} \cdot (\text{g PF células})^{-1}$. Sin embargo, la suspensión de protoplastos contenía a su vez células bacterianas en gran cantidad, algunas de éstas rodeando protoplastos deteriorados y restos celulares en la suspensión (Figura 4.4B, 4.4C y 4.4D). Dado que el

procedimiento fue realizado en condiciones de esterilidad, se concluyó que la contaminación probablemente fue consecuencia del crecimiento de una población microbiana endógena de los cultivos celulares de café y no reportada a la fecha.

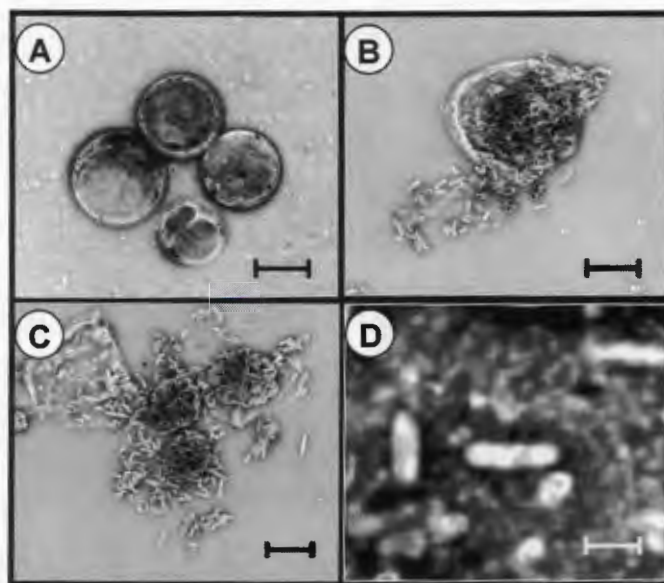


Figura 4.4. Morfología de las suspensiones de protoplastos aisladas de suspensiones celulares de la línea L2, incubadas en diferentes soluciones de lisis. Las suspensiones celulares fueron incubadas en solución de lisis con sorbitol (A y B) ó con KCl (C). Las estructuras con forma de bastón que rodean a los protoplastos son bacilos bacterianos, amplificados en D. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de fases, mostrándose la imagen negativa para mayor claridad. Las barras representan 20 μm en A, B y C, mientras que representan 2 μm en D.

En consideración a lo anterior, las soluciones de lisis fueron adicionadas con rifampicina (4 mg/L) durante la digestión de la pared celular, debido a este antibiótico resultó ser el más efectivo para el control del crecimiento bacteriano de acuerdo al antibiograma realizado para tal efecto.

Células de las líneas L2 y LAMt fueron incubadas en solución de lisis A (sorbitol) y B (KCl) adicionada con enzimas y rifampicina durante 12 h, como se describe en “Materiales y Métodos”. Mientras que en la solución de lisis que contenía KCl como principal osmolito sólo se observaron protoplastos lisados y debris celular después de la incubación, en la solución de lisis con sorbitol como osmolito se obtuvieron protoplastos íntegros, turgentes y en gran cantidad (Figura 4.5A y 4.5B). El rendimiento obtenido fue de 1.99×10^8 protoplastos·(g PF células)⁻¹ para la línea L2 y de 2.06×10^8 protoplastos·(g PF células)⁻¹ para la línea LAMt, notablemente mayor que en células incubadas en solución de lisis sin rifampicina. Los protoplastos de ambas líneas fueron esféricos, turgentes, observándose claramente estructuras como el núcleo y la vacuola principal, la cual constituía la mayor parte del volumen celular (Figura 4.5C y 4.5D). Es de importancia resaltar que los protoplastos más grandes de la población (entre 40 y 60 μm de diámetro) en su mayoría no contenían una vacuola principal, sino que poseían múltiples vacuolas y un citoplasma aparentemente segmentado (Figura 4.5E), lo cual sugiere que estas células se encontraban en proceso de división celular.

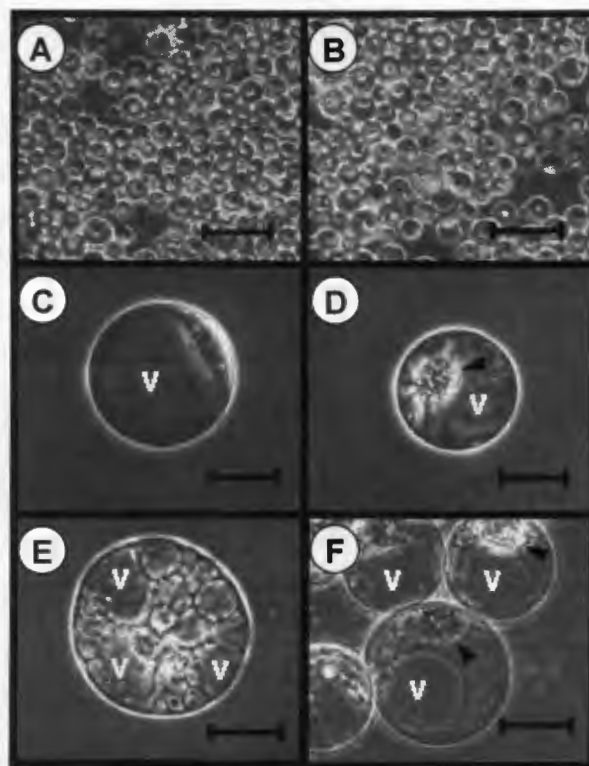


Figura 4.5. Morfología de los protoplastos obtenidos a partir de células incubadas en solución de lisis con sorbitol y adicionada con rifampicina. Población de protoplastos obtenida a partir de células de las líneas L2 (A, C y E) y LAMt (B, D y F). Las fotografías fueron tomadas utilizando microscopía de contraste de fases. Las cabezas de flecha apuntan hacia el núcleo, mientras que las vacuolas se señalan con una "v". Las barras representan 100 μm en A y B, mientras que en C, D, E y F representan 20 μm .

La prueba de Kolmogorov-Smirnov indicó que los diámetros de los protoplastos de las líneas L2 y LAMt describieron una distribución normal (Figura 4.6A y 4.6B). El diámetro promedio ($\bar{X}$) de los protoplastos de la línea L2 fue de 32.88 μm ($\sigma = 4.65$), mientras que el de los protoplastos de la línea LAMt fue de 33.03 μm ($\sigma = 4.71$). El intervalo intercuartílico ($I_{C25-C75}$: intervalo de valores en los cuales se localizó el 50 % de las observaciones en la parte media de la

distribución) fue de 29.41-35.29 μm de diámetro para la línea L2, y de 30.39-35.29 μm de diámetro para la línea LAMt, mientras que el coeficiente de variación ($CV = \sigma / X$) fue de 14.1 % para la línea L2 y de 14.3 % para la línea LAMt. Estas medidas de dispersión poblacional indican que ambas poblaciones fueron relativamente homogéneas con respecto al diámetro de protoplastos.

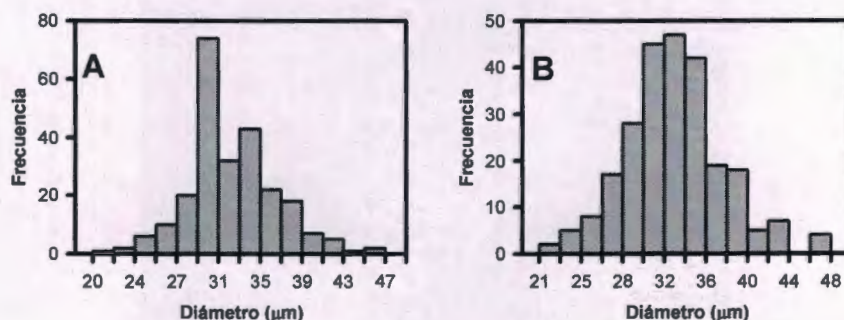


Figura 4.6. Distribución de frecuencias del tamaño de los protoplastos en una muestra de 250 protoplastos, aislados a partir de células de las líneas A) L2 y B) LAMt.

4.4. DISCUSION

El crecimiento del tipo filamentoso exhibido por las células en suspensión de café es debido a la división unidireccional de estas células, con la formación de las placas de división celular en un sentido transversal con respecto al filamento (Figura 4.1A y 4.1B). Este comportamiento ha sido observado en otros sistemas de células en suspensión, y se ha comprobado que la respuesta morfogénica de estos sistemas depende enormemente del balance de auxinas en el medio de cultivo (Nishi y Sugano, 1970; Petrasek *et al.*, 2002). En estudios realizados con suspensiones celulares filamentosas de zanahoria y tabaco, al variar el tipo y la cantidad de fitohormonas en el medio de cultivo es posible inducir cambios en el plano de división de las células (Magyar *et al.*, 2005; Nishi y Sugano, 1970; Petrasek *et al.*, 2002). Debido al crecimiento libre de los filamentos celulares y a

su alta polaridad en la división celular, el uso de suspensiones celulares filamentosas es especialmente atractivo en el estudio de procesos morfogénicos en células vegetales, con énfasis en los procesos de división celular, citocinesis y la determinación del plano de división (Ito *et al.*, 1998; Magyar *et al.*, 2005; Petrasek *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 2004). Por ello, nuestro modelo podría ser especialmente útil para el estudio de los mecanismos mediante los cuales el aluminio afecta los procesos morfogénicos en células vegetales.

El éxito de un sistema de aislamiento de protoplastos se basa en la obtención de poblaciones uniformes de protoplastos, así como de un alto rendimiento de protoplastos por gramo de tejido vegetal. A su vez, la cantidad y calidad de los protoplastos obtenidos es dependiente del tiempo de incubación con las enzimas hidrolíticas así como de la cantidad de pasos de manipulación de las muestras. Específicamente en *Coffea arabica*, varios protocolos para el aislamiento de protoplastos han sido desarrollados utilizando como explante hojas (Orozco y Schieder, 1984; Toruan-Mathius, 1992), callos embriogénicos (Tahara *et al.*, 1994; Yasuda *et al.*, 1987) y suspensiones celulares (Acuña y de Pena, 1991; Grezes *et al.*, 1994). Grezes y colaboradores (1994), reportaron un rendimiento de 4.6×10^6 protoplastos·(g PF células)⁻¹, en células en suspensión de café incubadas durante 15 h en una solución de lisis conteniendo celulasa R10 (1%), macerozima R10 (0.8%) y driselasa (0.5%). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un mayor rendimiento (1.99×10^8 protoplastos·[g PF células]⁻¹), obtenido en un menor tiempo de digestión (12 h), lo cual puede ser debido a diferencias en la temperatura de incubación, y a la mayor cantidad de enzimas utilizadas en este trabajo. Además, el protocolo descrito aquí requiere de menos pasos de manipulación a diferencia del reportado por Grezes y colaboradores (1994), en donde se incluye un paso de plasmólisis de las células previo a la digestión enzimática de la pared.

Por otra parte, las poblaciones de protoplastos obtenidas a partir de la línea L2 y LAMt fueron homogéneas (Figura 4.6), lo cual incrementa la reproducibilidad de los datos experimentales de los estudios a realizar utilizando este sistema. Esta propiedad de las poblaciones de protoplastos sugiere que la mayor parte de las células se encontraron en una fase específica del ciclo celular al momento de la digestión de la pared celular. Ambas líneas celulares, previamente caracterizadas por Martínez-Estévez y colaboradores (2003), exhiben una curva de crecimiento típica, con una fase de retardamiento que termina a los 6 d, y una fase exponencial que se extiende hasta los 12 d. Posteriormente, Valadez-González y colaboradores (2007), determinaron que la mayor tasa de incorporación de [^3H]-timidina se observó en el período comprendido entre el tercer y el decimosegundo día de cultivo en ambas líneas celulares. Lo anterior sugiere que la mayor parte de la población celular se encontró en la fase S del ciclo celular, a los 7 d de cultivo. Esto explica la homogeneidad de las poblaciones de protoplastos (Figura 4.6), debido a que proceden de células en una fase preparativa para la división celular. Como parte complementaria de este trabajo, es necesario caracterizar los protoplastos obtenidos con respecto a su densidad relativa, su capacidad de regenerar pared celular, así como las condiciones de aislamiento de vacuolas intactas, para poder llevar a cabo estudios de compartimentalización de metabolitos en estos organelos en respuesta a metales tóxicos como el aluminio.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, J.R. y de Pena, M. (1991). Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. caturra. *Plant Cell Rep.* 10: 345-348.

Bhattacharjee, B., Sane, A.P., y Gupta, H.S. (1999). Transfer of wild abortive cytoplasmic male sterility through protoplast fusion in rice. *Mol. Breed.* 5: 319-327.

Cai, X.D., Fu, J., Deng, X.X., y Guo, W.W. (2007). Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy *Citrus* cultivars. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90: 275-283.

Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B., y Lowe, K.C. (2005). Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiol. Plant* 27: 117-129.

Fayez, K.A. y Hassanein, A.M. (2000). Chlorophyll synthesis retardation and ultrastructural alterations to *Solanum tuberosum* chloroplasts in *Solanum nigrum* cells. *Phytosynthetica* 38: 37-44.

Grezes, J., Thomas, D., y Thomasset, B. (1994). Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 36: 91-97.

Guo, W.W., Prasad, D., Cheng, Y.J., Serrano, P., Deng, X.X., y Grosser, J.W. (2004). Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep.* 22: 752-758.

Ishikawa, S. y Wagatsuma, T. (1998). Plasma membrane permeability of root-tip cells following temporary exposure to Al ions is a rapid measure of Al tolerance among plant species. *Plant Cell Physiol.* 39: 516-525.

Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., y Watanabe, A. (1998). A novel *cis*-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* 10: 331-341.

Klercker, J.A.F. (1892). Eine methode zur isolierung lebender protoplasten. *Ofvers. Vetensk. Akad. Forh. Stokh.* 9: 463-475.

Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., y Piñeros, M.A. (2004). Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Kochian, L.V., Pence, N.S., Letham, D.L.D., Piñeros, M.A., Magalhaes, J.V., Hoekenga, O.A., y Garvin, D.F. (2002). Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil* 247: 109-119.

Kochian, L.V., Piñeros, M.A., y Hoekenga, O.A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274: 175-195.

Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J., y Hedrich, P. (2001). Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum resistant cultivar. *Plant Physiol.* 126: 397-410.

Lindberg, S. y Strid, H. (1997). Aluminium induces rapid changes in cytosolic pH and free calcium concentrations in root protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant.* 99: 405-414.

Ma, J.F. (2005). Physiological mechanisms of Al resistance in higher plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51: 609-612.

Ma, J.F., Ueno, D., Zhao, F.J., y McGrath, S.P. (2005). Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220: 731-736.

Magyar, Z., De Veylder, L., Atanasova, A., Bako, L., Inze, D., y Bogre, L. (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17: 2527-2541.

Martínez-Estévez, M., Ku-González, A., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Escamilla-Bencomo, J.A., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97: 69-78.

Martínez-Estévez, M., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 469-474.

McAinsh, M.R., Brownlee, C., y Hetherington, A.M. (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol. Plant.* 100: 16-29.

Medina-Urrutia, V., Madera, K.F.L., Serrano, P., Ananthakrishnan, G., Grosser, J.W., y Guo, W.W. (2004). New intergeneric somatic hybrids combining amblycarpa mandarin with six trifoliate/trifoliate hybrid selections of lime rootstock improvement. *HortScience* 39: 355-360.

Menczel, L., Polsby, L.S., Steinback, K.E., y Maliga, P. (1986). Fusion-mediated transfer of triazine-resistant chloroplasts: characterization of *Nicotiana tabacum* cybrid plants. *Mol. Gen. Genet* 205: 201-205.

Nishi, A. y Sugano, N. (1970). Growth and division of carrot cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 11: 757-765.

Orozco, F.J. y Schieder, O. (1984). Isolation of mesophyll protoplasts of the genus *Coffea*. *Turrialba* 34: 534-536.

Petrasek, J., Elckner, M., Morris, D.A., y Zazimalova, E. (2002). Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta* 216: 302-308.

Piñeros, M.A. y Kochian, L.V. (2001). A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize, identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. *Plant Physiol.* 125: 292-305.

Piñeros, M.A., Magalhaes, J.V., Alves, V.M.C., y Kochian, L.V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* 129: 1194-1206.

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

Shen, R., Ma, J.F., Kyo, M., y Iwashita, T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 215: 394-398.

Tahara, M., Yasuda, T., Uchida, N., y Yamaguchi, T. (1994). Formation of somatic embryos from protoplasts of *Coffea arabica* L. *HortScience* 29: 172-174.

Thomzik, J.E. y Hain, R. (1988). Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in *Brassica napus* L. *Theor. App. Genet.* 76: 165-171.

Toruan-Mathius, N. (1992). Isolation and protoplast culture of *Coffea arabica* L. *Biotechnol. Forest. Tree Improv.* 49: 89-98.

Valadez-González, N., Colli-Mull, J.G., Brito-Argáez, L., Muñoz-Sánchez, J.A., Zúñiga-Aguilar, J.J., Castaño, E., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2007). Differential effect of aluminium on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. *J. Plant Growth Reg.* 26: 69-77.

Van Damme, D., Bouget, F.Y., Van Poucke, K., Inze, D., y Geelen, D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* 40: 386-398.

Wang, G. y Binding, H. (1993). Somatic hybrids and cybrids of *Senecio fuchsii* Gmel. (x) *jacobaea* L. *Theor. App. Genet.* 87: 561-567.

Wherrett, T., Shabala, S., y Pottosin, I. (2005). Different properties of SV channels in root vacuoles from near isogenic Al-tolerant and Al-sensitive wheat cultivars. *FEBS lett.* 579: 6890-6894.

Yasuda, T., Tahara, M., Uchida, N., y Yamaguchi, T. (1987). Somatic embryogenesis from coffee callus and protoplast. En: C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, y D. D. Biesboer (Eds.). *Plant tissue and cell culture.* Alan R. Liss Inc. New York, USA. pp. 137.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

En los Capítulos 2, 3 y 4 se realizó una discusión detallada de los resultados obtenidos en cada uno de estos trabajos. Por ello, este capítulo se centra en la discusión integral de todos los resultados, con énfasis en el papel del metabolismo de los ácidos orgánicos en la respuesta al aluminio.

En el Capítulo 2 se reportó que la exudación de malato fue similar en las líneas L2 y LAMt, incluso durante periodos prolongados de tratamiento con aluminio (Figuras 2.7 y 2.8). Estos resultados contrastan con los obtenidos en variedades resistentes de maíz, trigo, centeno y *Arabidopsis* (Delhaize et al., 1993; Hoekenga et al., 2007; Li et al., 2002; Ryan et al., 1995), lo cual sugiere que la exudación de ácidos orgánicos no es el mecanismo de resistencia a aluminio utilizado por la línea LAMt de café.

En el Capítulo 3 se reportó que el tratamiento con aluminio indujo cambios significativos en los contenidos de malato, citrato y, en menor medida, de oxalato en las células de las líneas LAMt y L2. En general, se observó un incremento en el contenido de malato y citrato a 30 min y a 6 h de tratamiento únicamente en la línea LAMt, mientras que el contenido de estos ácidos orgánicos disminuyó en células de la línea L2 a las 6 h (Figuras 3.2 y 3.3). Sin embargo, los cambios en el contenido de ácidos orgánicos fueron transitorios, a diferencia de lo observado en variedades resistentes donde la acumulación constante de estos ácidos orgánicos estuvo relacionada la compartimentalización progresiva del aluminio en la vacuola (Silva et al., 2001; Watanabe et al., 1998; Wenzl et al., 2002). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la acumulación de ácidos orgánicos en la línea LAMt no es un mecanismo de detoxificación interna del aluminio.

Sin embargo, es de interés analizar con más detalle los efectos que tuvo el aluminio en el metabolismo de los ácidos orgánicos en nuestro modelo de estudio. En el Capítulo 2 se mostró que las actividades de la MDH y la CS disminuyeron a los 30 min de tratamiento con aluminio en ambas líneas (Figuras 2.3 y 2.4). La inhibición de la actividad de ambas enzimas se revirtió únicamente en las células de la línea L2 a las 2 h de tratamiento (Figuras 2.3 y 2.4), mientras que en la línea LAMt el efecto del aluminio fue más prolongado, donde ambas enzimas recuperaron su actividad basal hasta las 6 h de tratamiento (Figuras 2.5 y 2.6). La CS, la cual cataliza la reacción irreversible de condensación del acetil-CoA y oxaloacetato para producir citrato. Este es un punto clave de regulación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Por lo tanto, la inhibición de su actividad implicaría una disminución del flujo de carbono procedente de la glucólisis y alternativamente de la β -oxidación de ácidos grasos, cuya consecuencia inmediata sería el descenso de los contenidos de citrato y otros intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Sorprendentemente, el contenido de malato se incrementó significativamente a los 30 min de tratamiento únicamente en células de la línea LAMt (Figura 3.2), manteniéndose sin cambios en la línea L2. Dado que la exudación de malato fue similar en ambas líneas incluso en períodos prolongados de tratamiento con aluminio (4 d), el incremento en el contenido de malato en la línea LAMt probablemente se debió a una mayor síntesis y/o un menor consumo de este metabolito al interior de las células. En vista de que el flujo de carbono procedente de la glucólisis disminuyó por efecto de la disminución de la actividad de la CS, los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de malato pudieron provenir de la ruta de la glutaminólisis (Ireland, 1997).

En la glutaminólisis, el aminoácido glutamato es convertido a α -cetoglutarato mediante transaminación o mediante su oxidación directa catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH). Las transaminasas o α -cetoácido aminotransferasas son enzimas que transfieren el grupo NH_4^+ del glutamato al

carbono alfa de un α -cetoácido, produciendo α -cetoglutarato, que a su vez es un cetoácido, y un nuevo aminoácido. Esta reacción es indispensable para la síntesis de familias de aminoácidos a partir de α -cetoácidos intermediarios de la glucólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (piruvato, oxaloacetato y α -cetoglutarato). El α -cetoglutarato producido por esta vía ingresa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, suministrando esqueletos de carbono al ciclo para la obtención de energía y poder reductor.

Se ha observado en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* sometidas a ayuno de fósforo que la glutaminólisis es la principal ruta anaplerótica que suministra sustratos al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Nagano y Ashihara, 1993). En estas células, las actividades de la fosfoenolpiruvato hidrolasa y de la fosfoenolpiruvato carboxilasa fueron inducidas por la limitación de fósforo, llevando a cabo el reciclaje del grupo PO_4^{3-} . A su vez, estudios de marcaje con $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glutamina indicaron que una gran parte de los sustratos respiratorios podrían ser suministrados por la enorme poza de aminoácidos durante el ayuno a fósforo (Nagano y Ashihara, 1993). Hasta el momento, éste es el único estudio donde se sugiere que la glutaminólisis está involucrada en la respuesta a un tipo de estrés abiótico.

En vista de que el contenido de malato fue cinco veces mayor que el contenido de citrato en células de la línea LAMt (Tabla 3.1), y que las actividades de la MDH y la CS fueron inhibidas en la misma proporción (Figura 2.3 y 2.4), un incremento de la concentración de malato implicaría un mayor flujo de carbono a través de la glutaminólisis en esta línea (Figura 5.1). La consecuencia directa sería la síntesis de NADH y ATP, metabolitos que regulan toda la vía en un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa. El ATP producido podría utilizarse para la provisión de energía en rutas metabólicas activadas en respuesta al estrés (expresión génica, síntesis de proteínas, transporte activo,

transducción de señales), mientras que el NADH y el malato podrían suministrar equivalentes de reducción al sistema redox.

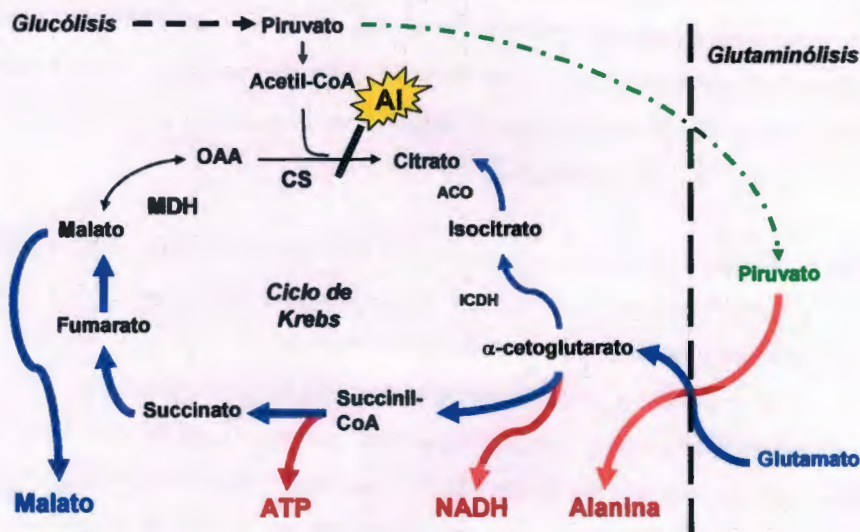


Figura 5.1. Efecto a corto plazo del aluminio en el flujo de carbono del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en células de la línea LAMt de *C. arabica*. El grosor de las flechas indica la magnitud del flujo de carbono en cada una de las rutas metabólicas. ACO: aconitasa; CS: citrato sintasa; ICDH isocitrato deshidrogenasa; MDH: malato deshidrogenasa.

En respuesta al estrés oxidativo, los sistemas de control de ROS son activados en las células, entre los cuales se encuentran las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y el antioxidante glutatión (GSH). La reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la oxidación del glutatión constituye el principal mecanismo no enzimático de control de especies reactivas de oxígeno. La conversión de glutatión oxidado (GS-SG) a glutatión reducido (GSH) se lleva a cabo mediante la acción de la glutatión reductasa (GR). La reacción catalizada por la GR consume NADPH, por lo que para un control efectivo de las ROS es necesario el suministro constante de poder reductor al sistema redox.

Se ha observado que el aluminio es capaz de alterar el balance redox en células vegetales, al inducir la acumulación de ROS tales como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Cakmak y Horst, 1991; Darko *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2005; Sharma y Dubey, 2007; Tamas *et al.*, 2005; Wang y Yang, 2005). La acumulación de ROS inducida por aluminio es sumamente rápida, observándose incluso a los 10 min de tratamiento (Jones *et al.*, 2006), por lo que el metabolismo celular debe ser capaz de reaccionar rápidamente con el fin de evitar los efectos nocivos de ROS.

Uno de los efectos del estrés oxidativo inducido por aluminio es la acumulación de hidroperóxidos de lípidos de membrana, así como de su producto de degradación malondialdehído (MDA) (Cakmak y Horst, 1991; Hossain *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006). En raíces de *Cassia tora* y de chícharo, se ha demostrado que la peroxidación de lípidos incrementó la permeabilidad de esta estructura, conduciendo a la pérdida de integridad de la misma (Wang y Yang, 2005; Yamamoto *et al.*, 2001). Mientras que la generación de ROS se ha observado tanto en variedades sensibles como resistentes a aluminio, aparentemente sólo las variedades resistentes son capaces de controlar de manera efectiva el estrés oxidativo (Dong *et al.*, 2002; Meriga *et al.*, 2004). Esto puede ser por poseer un sistema redox más robusto o bien por establecer una respuesta más rápida al aluminio, en comparación con las variedades sensibles.

Recientemente, en nuestro grupo hemos propuesto que las ROS inducidas por aluminio participan en la percepción y el establecimiento de los mecanismos de resistencia a aluminio en raíces de líneas resistentes a este metal (Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008). En el modelo propuesto (Figura 5.2), la acumulación de ROS es momentánea en las líneas resistentes, relacionada con la percepción del aluminio, e induce rutas de transducción de señales para el establecimiento del mecanismo de resistencia. El mecanismo de resistencia disminuye los efectos del aluminio en el metabolismo celular y la acumulación

de ROS se abate, sugiriendo que la señalización por éstas es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa (Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008). En variedades sensibles, el control de las ROS es menos efectiva y/o no se puede establecer un mecanismo de resistencia. Por lo tanto, la acumulación progresiva de las ROS, en conjunto con otros efectos del aluminio en el metabolismo celular, conducen a la inhibición del crecimiento de la raíz (Figura 5.2).

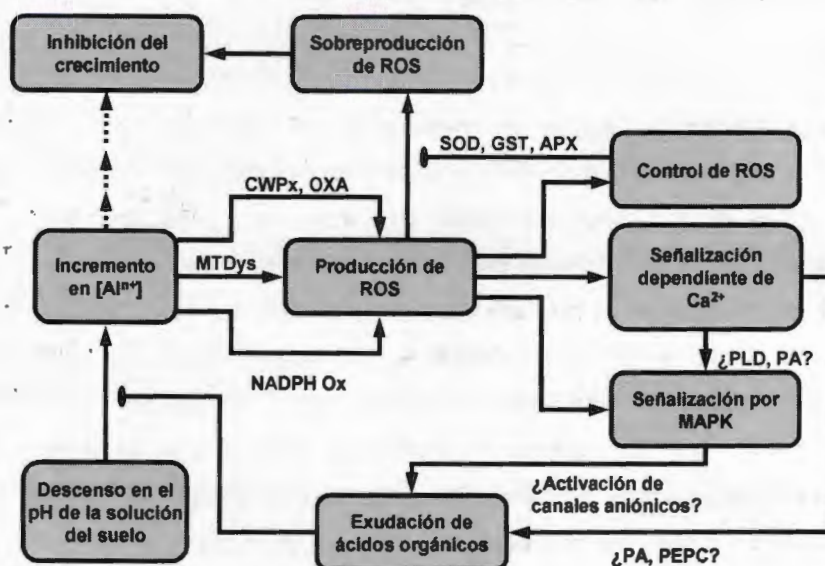


Figura 5.2. Modelo propuesto para la regulación por retroalimentación de la producción de ROS en el mecanismo de resistencia a aluminio en plantas (tomado de Ramírez-Benítez y Hernández-Sotomayor, 2008). APX: ascorbato peroxidasa; CWPx: peroxidasas asociadas a pared celular; GST: glutatión S-transferasa; MAPK: cinasa de proteínas activada por mitógeno; MTDys: disfunción mitocondrial; NADPH Ox: NADPH-oxidasa; OXA: oxalato oxidase; PLD: fosfolipasa D; PA: ácido fosfatídico; PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa; SOD: superóxido dismutasa.

En este trabajo no se determinó la acumulación de ROS en las suspensiones celulares de café. Sin embargo, Martínez-Estévez y colaboradores (2003),

demostraron que la resistencia al aluminio en la línea LAMt estuvo relacionada con una mayor estabilidad de la membrana plasmática, contrario a lo observado en la línea sensible L2. Lo anterior sugiere que un estrés oxidativo inducido por el aluminio estuvo asociado a la pérdida de integridad de membrana en la línea L2, de una manera similar a lo que se ha observado en raíces de *C. tora* y chícharo (Wang y Yang, 2005; Yamamoto *et al.*, 2001). Del mismo modo, la resistencia de la línea LAMt podría estar asociada a un mejor control del estrés oxidativo, como se ha observado en variedades resistentes de trigo y arroz (Dong *et al.*, 2002; Meriga *et al.*, 2004).

En células en suspensión de café, es probable que el efecto del aluminio en el metabolismo de los ácidos orgánicos sea una consecuencia de una mayor demanda de poder reductor, para el control efectivo de las ROS presuntamente inducidas por el metal. Como se mencionó anteriormente, el efecto del aluminio es más prolongado en las células LAMt, por lo que es posible que el control de las ROS sea más eficiente en esta línea celular. En consideración a lo anterior, es posible proponer un nuevo modelo en el cual el metabolismo de los ácidos orgánicos no esté involucrado directamente en un mecanismo de resistencia (exclusión o detoxificación) al aluminio. No obstante, podría estar involucrado en el control de las ROS presuntamente inducidas por el aluminio en la línea LAMt (Figura 5.3). Este efecto no es observado en células de la línea L2, lo cual explicaría las diferencias en la sensibilidad del aluminio entre ambas líneas, dada la capacidad de las líneas LAMt a responder de manera más rápida y eficiente al estímulo impartido por la presencia del aluminio en el medio de cultivo (Figura 5.3). El estudio del efecto del aluminio en el balance redox celular, así como el papel de la glutaminólisis en el suministro de poder reductor en respuesta a aluminio, constituyen un buen punto de partida para la elaboración de nuevos proyectos de investigación en nuestro modelo de estudio, para una comprensión más clara de los efectos del aluminio en el metabolismo de células vegetales.

Con respecto al mecanismo de resistencia operando en la línea celular LAMt, es posible que otros ligandos orgánicos, como los flavonoides y compuestos fenólicos estén involucrados en la exclusión y/o en la compartimentalización interna del aluminio, como se ha observado en otras especies como maíz, té y *Rumex acetosa* (Kidd *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 1976; Nagata *et al.*, 1992; Tolrá *et al.*, 2005). En este aspecto, el protocolo para la obtención de protoplastos reportado en el Capítulo 4 será especialmente útil para determinar la distribución del aluminio en los diferentes compartimientos subcelulares así como para la identificación de posibles ligandos orgánicos con los que forma complejos *in vivo*.

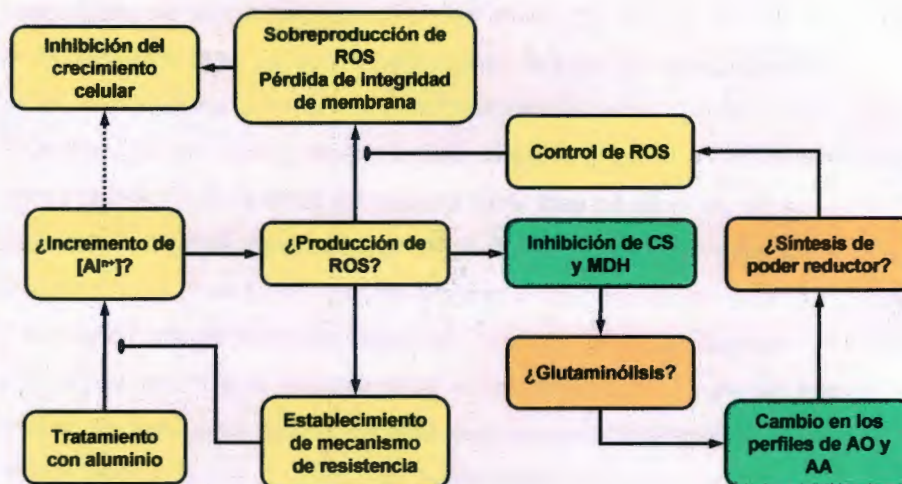


Figura 5.3. Modelo propuesto del papel del metabolismo de los ácidos orgánicos en la respuesta a aluminio en células en suspensión de café. AA: aminoácidos; AO: ácidos orgánicos.

5.1. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cakmak, I. y Horst, W.J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glicine max*). *Physiol. Plant.* 83: 463-468.

Darko, E., Ambrus, H., Stefanovits-Banyai, E., Fodor, J., Bakos, F., y Barnabas, B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Sci.* 166: 583-591.

Delhaize, E., Ryan, P.R., y Randall, P.J. (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.

Dong, B., Sang, W.L., Jiang, X., Zhou, J.M., Kong, F.X., Hu, W., y Wang, L.S. (2002). Effects of aluminum on physiological metabolism and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 47: 87-92.

Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Cançado, G.M.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., y Sasaki, T. (2007). AtALMT1 (At1g08430) is a novel, essential factor for aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* and encodes an aluminum-activated malate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 9734-9743.

Hossain, M.A., Hossain, A.K.M.Z., Kihara, T., Koyama, H., y Hara, T. (2005). Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. *Soil Sci. Plant Nutr.* 51: 223-230.

Ireland, R. (1997). Amino acid and ureide biosynthesis. En: D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, y D. B. Layzell (Eds.). *Plant metabolism*. Addison Wesley Longman. Essex, UK. pp. 478.

Jones, D.L., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., y Gilroy, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environ.* 29: 1309-1318.

Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunse, B., y Barcelo, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 52: 1339-1352.

Li, X.F., Ma, J.F., y Matsumoto, H. (2002). Aluminum-induced secretion of both citrate and malate in rye. *Plant and Soil* 242: 235-243.

Martínez-Estévez, M., Ku-González, A., Muñoz-Sánchez, J.A., Loyola-Vargas, V.M., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Escamilla-Bencomo, J.A., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2003). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97: 69-78.

- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S., y Takahashi, E. (1976).** Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiol.* 17: 627-631.
- Meriga, B., Reddy, K., Rao, K.R., Reddy, L.A., y Kishor, P.B.K. (2004).** Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *J. Plant Physiol.* 161: 63-68.
- Nagano, M. y Ashihara, H. (1993).** Long-term phosphate starvation and respiratory metabolism in suspension-cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Cell Physiol.* 34: 1219-1228.
- Nagata, T., Hayatsu, M., y Kosuge, N. (1992).** Identification of aluminium in tea leaves by ^{27}Al NMR. *Phytochemistry* 31: 1215-1218.
- Ramírez-Benítez, J.E. y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2008).** Role of reactive oxygen species (ROS) in aluminium-induced signalling and aluminium resistance in plants. *Curr. Top. Biochem. Res.* En prensa.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., y Randall, P.J. (1995).** Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196: 103-110.
- Sharma, P. y Dubey, R.S. (2007).** Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Rep.* 26: 2027-2038.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Israel, D.W., Raper, C.D., y Rufty, T.W. (2001).** Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation in roots. *Plant Cell Physiol.* 42: 546-554.
- Tamas, L., Budikova, S., Huttova, J., Mistrik, I., Simonovicova, M., y Siroka, B. (2005).** Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate-mediated hydrogen peroxide production. *Plant Cell Rep.* 24: 189-194.
- Tolrá, R.P., Poschenrieder, C., Luppi, B., y Barceló, J. (2005).** Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environ. Exp. Bot.* 54: 231-238.
- Wang, Y.S. y Yang, Z.M. (2005).** Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 46: 1915-1923.
- Watanabe, A., Osaki, M., Yoshihara, T., y Tadano, T. (1998).** Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil* 201: 165-173.
- Wenzl, P., Chaves, A., Patino, G., Mayer, J., y Rao, I. (2002).** Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 165: 582-588.

Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., y Matsumoto, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125: 199-208.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de los ácidos orgánicos en la tolerancia a aluminio en suspensiones celulares resistentes y sensibles a este metal de *Coffea arabica* L. La hipótesis de partida fue que si el aluminio provoca un incremento en la acumulación de ácidos orgánicos en suspensiones celulares de la línea LAMt, entonces los ácidos orgánicos participan en el mecanismo de resistencia a aluminio en células de cafeto. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, y a lo discutido anteriormente, las principales conclusiones son las siguientes:

- La acumulación de ácidos orgánicos no es un mecanismo de destoxificación interna del aluminio en suspensiones celulares de café resistentes a este metal.
- La exudación de ácidos orgánicos en células de café de la línea LAMt no es un mecanismo de exclusión del aluminio.
- Los cambios en el metabolismo de los ácidos orgánicos están involucrados en la respuesta y resistencia al aluminio en las líneas L2 y LAMt.

La evidencia experimental obtenida contribuye a la comprensión de los eventos involucrados en la respuesta celular a aluminio, específicamente en como éste altera el metabolismo primario del carbono. A su vez, descarta a la participación directa de los ácidos orgánicos en la exclusión y destoxificación interna del aluminio en nuestro modelo de estudio. Por último, el trabajo aporta indicios de la probable conexión entre el efecto inhibitorio del aluminio en la actividad de la CS, el cambio en los perfiles de ácidos orgánicos y la alteración del balance redox en células en suspensión de café.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el aluminio podría estar afectando otras rutas metabólicas relacionadas con los ácidos orgánicos. Como se mencionó en el Capítulo 5, la glutaminólisis es la ruta metabólica que podría estar siendo afectada por la presencia del aluminio. Dado que se ha observado que el aluminio induce ROS, es posible que la resistencia a aluminio en suspensiones celulares de café esté relacionada con la eficiencia en el control del estrés oxidativo. A su vez, es posible que la glutaminólisis esté involucrada en el suministro de equivalentes de reducción para el control del estrés oxidativo. En conjunto, es posible que la resistencia a aluminio en suspensiones celulares de café se relacione con el efecto del aluminio en el metabolismo de los aminoácidos y el sistema redox. Por lo tanto, se plantean las siguientes perspectivas:

- **Analizar el efecto del aluminio en el metabolismo de aminoácidos a través de la glutaminólisis**
 - Estrategia experimental:
 - Efecto del aluminio en el perfil de aminoácidos, mediante espectrofotometría y HPLC.
 - Efecto del aluminio en el flujo de carbono a través de la glutaminólisis, mediante estudios de marcaje con [U-¹⁴C]-glutamina.
 - Efecto del aluminio en la actividad de enzimas aminotransferasas y glutamato deshidrogenasa.

- **Determinar el efecto del aluminio en la acumulación de especies reactivas de oxígeno y en el metabolismo redox**

- Estrategia experimental:

- Acumulación de peróxido de hidrógeno y anión superóxido en respuesta a aluminio, mediante microscopía confocal y fluorometría.
- Efecto del aluminio en la peroxidación de lípidos de membrana, mediante espectrofotometría.
- Efecto del aluminio en la actividad de la superóxido dismutasa, de la catalasa y de la glutatión deshidrogenasa.
- Efecto del aluminio en los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GS-SG), mediante espectrofotometría y HPLC.

- **Determinar el papel de la glutaminólisis en la adaptación metabólica al estrés oxidativo inducido por aluminio**

- Estrategia experimental:

- Efecto del aminooxiacetato, inhibidor de aminotransferasas, en la acumulación de especies reactivas de oxígeno inducida por aluminio, mediante microscopía confocal y fluorometría.
- Efecto del aminooxiacetato en las actividades de enzimas del metabolismo redox, en suspensiones vegetales tratadas con aluminio, mediante espectrofotometría.
- Efecto del aminooxiacetato en los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado, en suspensiones celulares tratadas con aluminio, mediante espectrofotometría y HPLC.
- Efecto del aminooxiacetato en la capacidad de crecimiento de suspensiones celulares tratadas con aluminio.

Por otra parte, para determinar si el mecanismo de resistencia a aluminio en suspensiones celulares de café involucra la acumulación de ligandos orgánicos distintos a los ácidos orgánicos, se plantean las siguientes perspectivas:

- **Determinar el papel de ligandos orgánicos de bajo peso molecular en la resistencia a aluminio**
 - Estrategia experimental:
 - Análisis de la distribución intracelular del aluminio en suspensiones celulares, mediante microscopía confocal y microanálisis de dispersión de rayos X (XDMA).
 - Análisis del contenido de aluminio en compartimientos subcelulares de protoplastos tratados con aluminio, mediante fluorometría.
 - Identificación de los principales ligandos orgánicos para el aluminio en suspensiones celulares, mediante resonancia magnética nuclear (^{27}Al).
 - Efecto del aluminio en el perfil de flavonoides y fenilpropanoides en suspensiones celulares, mediante espectrofotometría y HPLC.

