

# MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Efecto de la adición de fósforo sobre la toxicidad por aluminio  
en células en suspensión de *Coffea arabica* L.**

Tesis que para obtener el grado de Maestría en Ciencias  
presenta:

Leticia del Rocío Chee González

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2009





## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la asesoría de la Dra. Teresa Hernández Sotomayor.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (45798-Z) y una beca de maestría (208133) para Leticia del Rocío Chee González.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor gracias por su amistad y por todo su apoyo en la realización de este trabajo, gracias por permitirme estar en su laboratorio durante cuatro años de mi formación académica y por todo lo que he aprendido con ustedes.

A los Doctores Teresa Hernández Sotomayor, Manuel Martínez Estévez, Víctor Suarez Solís, Luisa Alhucema López y Patricia Coello Coutiño por sus sugerencias y por la revisión de este escrito.

Al Q.F.B. Armando Muñoz Sánchez por su apoyo técnico y por su valiosa amistad.

A mis compañeros de laboratorio Abril, Wilberth, Fausto, Almita, Efraín y Eduardo, fuimos un gran grupo.

## **DEDICATORIA**

A Dios primeramente por permitirme obtener tantas bendiciones y logros en mi vida, sin Él nada hubiera podido alcanzar.

A mis padres a quienes les dedico todo lo que soy, ustedes fueron mi principal motor para poder lograr mis objetivos.

A Jorge gracias por tu paciencia y apoyo que fue de gran ayuda para seguir adelante.

## RESUMEN

En este estudio se ha investigado el efecto de la temperatura y la humedad sobre el crecimiento de las larvas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en un medio de cultivo artificial. Se han estudiado las variaciones de la tasa de crecimiento, la supervivencia y el tiempo de desarrollo de las larvas en función de la temperatura y la humedad. Los resultados indican que la temperatura y la humedad tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de las larvas. La supervivencia y el tiempo de desarrollo de las larvas son mayores a temperaturas y humedades más altas.

## CONTENIDO

<b>RECONOCIMIENTOS</b>	i
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	ii
<b>DEDICATORIA</b>	iii
<b>CONTENIDO</b>	v
<b>ABREVIATURAS</b>	ix
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	xi
<b>INDICE DE CUADROS</b>	xiii
<b>RESUMEN</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPÍTULO 1. Antecedentes</b>	3
1.1 SUELOS ÁCIDOS	3
1.2 TOXICIDAD POR ALUMINIO EN SUELOS ÁCIDOS	4
1.2.1 Química del aluminio	4
1.2.2 Formas fitotóxicas de aluminio en las plantas	5
1.3 SÍNTOMAS DE TOXICIDAD INDUCIDOS POR AL EN PLANTAS	6
1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ALUMINIO	9
1.5 DEFICIENCIA DE Pi EN SUELOS ÁCIDOS	9
1.6 TRANSPORTE DE Pi EN PLANTAS	10
1.6.1 Transportadores de fosfato pertenecientes a la familia Pht1	12
1.6.2 Transporte intracelular de fosfato	14
1.7 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE Pi	15
1.7.1 Modificaciones bioquímicas para la obtención de Pi	15
1.7.2 Obtención de Pi a través de simbiosis con micorrizas	16
1.7.3 Liberación de ácidos orgánicos para la obtención de Pi	17
1.7.4 Adquisición de fosfato de fuentes orgánicas	18

1.8 INTERACCIÓN FÓSFORO-ALUMINIO	19
1.9 VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR FOSFOLÍPIDOS	20
1.9.1 Fosfolipasa C	22
1.9.2 Fosfolipasa D	24
1.10 EFECTO DEL Al Y LA DEFICIENCIA DE Pi SOBRE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR FOSFOLÍPIDOS	25
1.10.1 Efecto del Al sobre la vía de señalización	25
1.10.2 Los fosfolípidos de membrana funcionan como reserva de fosfato	26
1.11 CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE CAFETO	29
1.11.1 Cultivo de café en México	31
1.11.2 Cultivos de células en suspensión de café	32
1.12 MODELO EXPERIMENTAL	33
1.13 HIPÓTESIS	35
1.14 OBJETIVO GENERAL	35
1.15 OBJETIVOS PARTICULARES	35
1.16 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
1.17 BIBLIOGRAFÍA	38
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>53</b>
2.1 INTRODUCCIÓN	53
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	55
2.2.1 Cultivo de células en suspensión de café	55
2.2.2 Tratamientos	55
2.2.3 Evaluación del crecimiento celular, el pH y la CE	56
2.2.4 Cuantificación de Al total por absorción atómica	56
2.3 RESULTADOS	57
2.3.1 Efecto del Pi sobre el crecimiento celular	57
2.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pi sobre la CE	59
2.3.3 Efecto de la concentración de Pi sobre el pH del medio de cultivo	61

2.3.4 Cuantificación del contenido de Al en las células en suspensión	64
2.4 DISCUSIÓN	65
2.5 BIBLIOGRAFÍA	68
<b>CAPÍTULO 3</b>	73
3.1 INTRODUCCIÓN	73
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.2.1 Tratamientos con $AlCl_3$	76
3.2.2 Obtención del extracto proteico	76
3.2.3 Medición de la actividad de la PLC	76
3.2.4 Medición de la actividad de la PLD	77
3.2.5 Electroforesis	77
3.2.6 Inmunodetección de la PLC y la PLD	78
3.2.7 Obtención del extracto membranal	78
3.2.8 Determinación de las lípido cinasas	79
3.2.9 Extracción y separación de los fosfolípidos	79
3.3 RESULTADOS	80
3.3.1 Efecto combinado del Al y el Pi sobre la actividad de la PLC	80
3.3.2 Efecto de la concentración de Pi sobre la actividad de la PLD en células tratadas con Al	82
3.3.3 Efecto del Pi y el Al sobre la actividad de las lípido cinasas	84
3.4 DISCUSIÓN	87
3.5 BIBLIOGRAFÍA	89
<b>CAPÍTULO 4</b>	93
CONCLUSIONES GENERALES	93
BIBLIOGRAFÍA	97
<b>CAPÍTULO 5</b>	99
PERSPECTIVAS	100
	100



## ABREVIATURAS

- BSA.**- Albúmina sérica bovina
- DAG.**- Diacilglicerol
- DGK.**- Diacilglicerol cinasa
- DGDG.**- digalctosil diacilglicerol
- DGDGS.**- Digalactosil diacilglicerol sintasa
- DTT.**- Ditiotreitól
- EGTA.**- Etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil)- ácido tetraacético-N,N,N',N'
- EDTA.**- Ácido etilendiamino tetraacético
- [<sup>3</sup>H]-PIP<sub>2</sub>.**- Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato tritiado.
- IP<sub>3</sub>.**- Inositol 1,4,5-trifosfato
- MAPK.**- Proteínas cinasas activadas por mitógenos
- MS.**- Medio Murashige y Skoog
- MGDG.**- Monogalactosil diacilglicerol
- MGDGS.**- Monogalactosil diacilglicerol sintasa
- PC.**- Fosfatidilcolina
- PA.**- Ácido fosfatídico
- PAP.**- Ácido fosfatídico fosfatasa
- PLC.**- Fosfolipasa C
- PLD.**- fosfolipasa D
- PI.**- Fosfatidilinositol
- PI-PLC.**- Fosfolipasa C específica para fosfatidil inositol
- PIP<sub>2</sub>.**- fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
- PIP.**-Fosfatidilinositol 4-monofosfato
- PI4K.**- Fosfatidilinositol 4 cinasa
- PIP5K.**-Fosfatidilinositol 4-fosfato 5 cinasa
- PMSF.**-Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
- PAGE.**- electroforesis en gel de poliacrilamida

**$^{32}\text{P}$ - $\gamma\text{ATP}$ .**- Adenosín trifosfato marcado con fósforo radiactivo

**ROS.**- Especies reactivas de oxígeno

**SDS.**- Dodecilsulfato de sodio

**TCA.**- Ácido tricloroacético

**TLC.**- Cromatografía de capa fina

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1</b>	Página
Figura 1.1 Topología transmembranal de un transportador Pht1 de Pi	13
Figura 1.2 Sustratos lipídicos y segundos mensajeros de la acción de enzimas lipídicas y fosfolipasas	22
Figura 1.3 Posible papel de la PLC y la PLD durante la deficiencia de Pi	28
Figura 1.4 Estrategia experimental	36
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Figura 2.1 Efecto del Pi sobre el crecimiento de células tratadas con Al	58
Figura 2.2 Efecto de la concentración de Pi sobre la conductividad eléctrica del medio de cultivo	60
Figura 2.3 Cambios en la conductividad eléctrica por la presencia de Al en los tratamientos con Pi	61
Figura 2.4 Efecto de la concentración de Pi sobre el pH del medio de cultivo	62
Figura 2.5 Efecto del Al sobre el pH del medio de cultivo en los tratamientos con Pi	63
Figura 2.6 Determinación del contenido de Al total en las suspensiones celulares	65

### CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Efecto del Pi sobre la actividad enzimática y nivel de proteína de la PLC	81
Figura 3.2 Efecto del Pi sobre la actividad enzimática y nivel de proteína de la PLD	83
Figura 3.3 Autorradiografía representativa de la actividad de las lípidos cinasas	85
Figura 3.4 Actividad de la DGK, la PI4K y la PIP5K	87

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Modelo del efecto del AI y la deficiencia de Pi sobre los componentes de la vía de señalización	96
--	----

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO 1

Cuadro 1.1. Especies de Al en función del pH	5
--	---

### CAPÍTULO 2

Cuadro 2.1 Concentración de las sales del medio de cultivo Murashige & Skoog	55
---	----

ÍNDICE DE CUADROS

1. Introducción

2. Capítulo I. Estudios de Aislamiento del VIH

3. Capítulo II. Concentración de las zonas del medio de cultivo

4. Capítulo III. Estudios de Aislamiento del VIH

5. Capítulo IV. Estudios de Aislamiento del VIH

## Resumen

En muchos suelos ácidos existen varios factores que limitan el crecimiento de la planta, principalmente altos niveles tóxicos de aluminio (Al) y deficiencia de fosfato (Pi). Estos dos factores son los más importantes debido a su existencia ubicua y a su impacto sobre el crecimiento de las plantas. La toxicidad por Al limita el crecimiento de las plantas a través de sus efectos en el desarrollo de la raíz, además interrumpe procesos de transducción de señales interfiriendo con el metabolismo de la fosfolipasa C (PLC), una enzima encargada de producir segundos mensajeros. De manera similar durante deficiencia de Pi esta vía es activada induciendo la movilización de Pi de las reservas internas por la hidrólisis y reciclamiento de los fosfolípidos de membrana por medio de las enzimas PLC y PLD.

En el presente trabajo se demostró que los efectos tóxicos de Al sobre el crecimiento celular son restaurados por la adición de altas concentraciones de Pi en el medio de cultivo. Además se observó que la inhibición del crecimiento celular por la presencia de Al no es una consecuencia de la inhibición de la actividad de la PLC, ya que altas concentraciones de Pi mejoran el crecimiento celular pero no la actividad enzimática de esta enzima. Las enzimas de la vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos son reguladas de manera diferencial, el Al interrumpe la producción de los segundos mensajeros ( $IP_3$  y PA), sin embargo incrementa la actividad de la PLD y la DGK para contrarrestar los efectos del Al sobre la formación de PA, en tanto que la deficiencia de Pi estimula la actividad de la PLC y la DGK pero no parece regular la actividad de la PLD.

Finalmente se observó que tanto la deficiencia de Pi como la toxicidad por Al no modifican los niveles de las proteínas PLC y PLD sino únicamente regulan la actividad enzimática de ambas enzimas.



## Abstract

On most acid soils, there are several limiting factors for plant growth, including toxic levels of aluminum (Al) as well as phosphorus (Pi) deficiency. These constraints are the most important due to their ubiquitous existence and impact on plant growth. Aluminum toxicity limits plant growth mainly through its adverse effects on root development, also disrupt signal transduction processes by interfering with phospholipase C (PLC) metabolism, this enzyme is involved in the production of second messengers. Similarly during Pi deprivation this pathway is activated inducing the mobilization of Pi from internal reserves by the hydrolysis and the recycling of Pi from membrane phospholipids by means of the PLC and PLD activity.

Within the present investigation we showed that the effects of aluminium toxicity on cell growth are restored by the addition of higher concentrations of Pi in the culture medium. Also we observed that the inhibition of cell growth by the Al presence is not related with the PLC activity because higher concentration of Pi restores the cell growth but the PLC activity remains inhibited. The enzymes of signal transduction pathway are differentially regulated. Al disrupts the second messengers (IP<sub>3</sub> and PA) production; however increases the activity of PLD and DGK in order to counteract the effects of Al on PA formation. On the other hand Pi starvation induces PLC and DGK activation but do not affect PLD activity.

Finally Pi starvation and Al toxicity do not modify the levels of the proteins PLC and PLD only regulate the enzymatic activity of these proteins.



## INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los suelos ácidos, existen varios factores que limitan la productividad de los cultivos, entre estos factores la toxicidad por aluminio (Al) y la deficiencia de fosfato (Pi) son las más importantes debido a su existencia ubicua y al efecto drástico que provocan sobre el crecimiento de las plantas (Kochian, *et al.*, 2004).

La toxicidad por Al limita el crecimiento de las plantas principalmente a través de una disminución en el crecimiento y desarrollo de las raíces. En estos suelos ácidos son liberados diferentes formas fitotóxicas de Al, a concentraciones que inhiben el crecimiento de las raíces (Delhaize *et al.*, 1993). Otro factor muy importante que también limita el crecimiento de las plantas y que coexiste con la toxicidad por Al en suelos ácidos es la deficiencia de fosfato (Pi) debido a que los óxidos de Fe y Al se unen al Pi del suelo produciendo formas no disponibles para las plantas (Barber, 1995). Es por ello que las plantas han evolucionado diferentes mecanismos adaptativos que les permiten sobrevivir bajo estas condiciones. Entre los principales mecanismos que usan las plantas para sobrevivir a deficiencia de Pi se encuentran la exudación de varios solutos de la raíz, principalmente ácidos orgánicos, enzimas fosfatasas y otros compuestos que podrían movilizar Pi de las reservas unidas en el suelo.

Aunque se han realizado muchos estudios sobre la tolerancia a Al y la deficiencia de Pi en suelos ácidos, estos dos factores casi siempre son estudiados de forma separada como aspectos independientes (Yan *et al.*, 1995). Sin embargo la toxicidad por Al y la deficiencia de Pi a menudo coexisten en estos suelos ácidos y podrían interactuar fuertemente a través de reacciones químicas y bioquímicas. Pocos estudios se han realizado para investigar las interacciones del Pi y Al en plantas. Por una parte se ha demostrado que un incremento en el suministro de Pi mejora los efectos fitotóxicos inducidos por Al, posiblemente a través del

1990). De igual forma se ha encontrado que el contenido de Pi en el ápice de raíces de *Fygopyrum esculentum* es relacionado con la inmovilización y detoxificación de Al, lo cual indica que puede existir una interacción significativa entre el Pi y el Al en las raíces (Zheng *et al.*, 2005).

Tanto la toxicidad por Al como la deficiencia de Pi se han relacionado con los mecanismos de transducción de señales que involucran la hidrólisis de los fosfoinosítidos presentes en la membrana celular. En esta vía de transducción de señales participan la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD), enzimas que son activadas por diferentes señales ambientales. La PLC hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), para generar inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2-diacilglicerol (DAG), y la PLD hidroliza fosfatidilcolina (PC) produciendo ácido fosfátido (PA) y colina, todos estos compuestos son segundos mensajeros importantes para la célula ante diferentes tipos de estrés. Existen reportes acerca de la inhibición de la actividad de la PLC en presencia de Al en diferentes modelos de estudio (Piña-Chablé *et al.*, 2001; Martínez-Estévez, *et al.*, 2003a; Jones y Kochian, 1995) y de igual forma se ha reportado que cuando las plantas sufren de deficiencia de Pi, se activa un sistema altamente integrado para el abastecimiento de Pi desde los almacenes internos de la célula. En este sistema todo el contenido de fosfolípidos es disminuido y el contenido de galactolípidos no fosforados incrementa significativamente (Hartel *et al.*, 2000) reemplazando muchos de los fosfolípidos constitutivos de la membrana plasmática (Anderson *et al.*, 2003). Por lo cual hay incremento en la actividad de la PLD y la PLC para producir DAG como sustrato para la biosíntesis de galactolípidos y Pi disponible.

Es por ello el objetivo de este trabajo es evaluar si la adición de Pi al medio de cultivo mejora los efectos inducidos por el Al sobre el crecimiento celular y sobre las enzimas de la vía de transducción de señales en células en suspensión de *C. arabica*.

# CAPÍTULO 1

## Antecedentes

### 1.1 SUELOS ÁCIDOS

La presencia de suelos ácidos es uno de los principales factores que limitan la productividad agrícola alrededor del mundo. Aproximadamente 30 % del área total de suelo y más del 50 % de los suelos potencialmente cultivables son ácidos (Von Uexkül *et al.*, 1995). En este tipo de suelos existen varios factores que afectan la productividad de las plantas, principalmente altos niveles tóxicos de aluminio (Al), manganeso (Mn) y hierro (Fe), así como la deficiencia de varios elementos esenciales como los minerales como el fósforo (P), el nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca) y algunos micronutrientes (Kochian *et al.*, 2004). En estos suelos ácidos se observa una disminución de la disponibilidad de P y un aumento de la toxicidad de otros elementos que se encuentran en pequeña cantidad como los metales pesados (Marschner, 1995). De igual forma en muchas regiones tropicales y subtropicales húmedas donde prevalecen los suelos ácidos, las condiciones de calor y humedad provocan el deterioro de los suelos dando lugar a que los óxidos libres de Fe y Al se unan al P soluble en el suelo, formando complejos no disponibles para las plantas (Barber, 1995).

En áreas que todavía no son afectadas por la contaminación industrial, la acidificación del suelo es causada principalmente por la liberación de protones ( $H^+$ ) durante la oxidación de compuestos de carbono (C), azufre (S) y nitrógeno (N) en los suelos (Bolan y Hedley, 2003; Tang y Rengel, 2003), a un exceso en la toma de cationes sobre los aniones (Tang y Rengel, 2003), al uso de fertilizantes que contienen amonio y amidas (Mahler *et al.*, 1985), a la fijación del nitrógeno por las leguminosas (Bolan *et al.*, 1991; Tang y Rengel, 2003) y a deposiciones ácidas de la atmósfera (principalmente ácido nítrico y sulfúrico) (Alewell, 2003), las cuales son causadas por las emisiones en la atmósfera de dióxido de azufre y de óxidos

de nitrógeno y amonio. Estos ácidos bajan el pH, incrementan la concentración de aluminio (Al) y aumentan la acidificación de los suelos sensibles (Herman *et al.*, 2001). En ecosistemas terrestres con suelos ácidos, la toxicidad por Al sobre las plantas es el principal factor limitante para la producción de los cultivos alrededor del mundo (Foy, 1988).

## 1.2 TOXICIDAD POR ALUMINIO EN SUELOS ÁCIDOS

### 1.2.1 Química del aluminio

El aluminio es el metal más abundante y el tercer elemento en abundancia en la corteza terrestre, donde representa aproximadamente el 8 % en peso. En la naturaleza, este se encuentra en forma oxidada y en solución acuosa el ión se encuentra en forma de hidróxidos. En el suelo, el Al se encuentra principalmente en dos tipos de compuestos: óxidos y silicatos de aluminio. Los óxidos e hidróxidos juegan un papel significativo en la química ambiental de los iones metálicos y de los compuestos orgánicos asociados al suelo (May y Nordstrom, 1991).

El Al es un elemento anfótero que puede actuar como catión en medio ácido y como anión en medio básico. El pH del medio es lo que determina la solubilidad o insolubilidad del Al y de las distintas especies predominantes (Cuadro 1.1). La concentración del  $\text{Al}^{3+}$  en el suelo suele ser menor de  $37 \mu\text{M}$  cuando el pH es superior a 5.5. Sin embargo, cuando el pH del suelo disminuye, el aluminio es liberado de los aluminosilicatos y su concentración suele aumentar (Marschner, 1995). Cuando el pH es inferior a 5.0 el ión se encuentra mayormente en forma de complejo hexahidrato octaédrico  $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  la forma más tóxica para las plantas. Se ha observado que existen diferentes formas químicas en función del pH; cuando el Al se encuentra en un medio muy ácido se presenta en forma iónica ( $\text{Al}^{3+}$ ), o bien en forma de monómero  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  y  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ , a valores de pH entre 3.5-5.0 se favorece la formación de polímeros de hidróxidos de Al; cuando el pH

es superior a 5.0, tanto las formas monoméricas como las poliméricas disminuyen e incrementan los niveles de hidróxidos altamente básicos que son muy insolubles y precipitan fácilmente por lo que son muy poco disponibles para la planta. A pH neutro el Al se encuentra en la forma insoluble  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (gibbsite) una especie de Al no tóxica para las plantas (Driscoll y Schecher, 1988).

**Cuadro 1.1** Distribución de especies mononucleares de aluminio en base al pH del suelo en una solución  $10^{-5}$  M de Al a 25 °C (Baes y Mesmer, 1976)

pH	Especies de aluminio (Al)
3	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})^{2+}$
6.5	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3$
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$
7	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3$
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})_2^+$
	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$
10	$\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})_4^-$

### 1.2.2 Formas fitotóxicas de Aluminio en las plantas

Una gran variedad de cationes trivalentes son tóxicos para las plantas y dado que la toxicidad por Al está restringida a condiciones ácidas, se asume que el  $\text{Al}^{3+}$  es la especie mas fitotóxica. Esto ha sido muy difícil de demostrar, debido a que casi todas las especies monoméricas han sido consideradas como tóxicas (Kinraide, 1991).

La disponibilidad de varias especies químicas de Al en los suelos muestran diferentes grados de toxicidad. El ion aluminato  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  y el  $\text{Al}(\text{OH})_3$  no se consideran tóxicos para las plantas (Kinraide, 1990), sin embargo se piensa que a pH mayores a 9.0 concentraciones relativamente altas de aluminato pueden ser

tóxicas para trigo (Ma *et al.*, 2003). Además las especies monoméricas como el  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  y el  $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$  (Kinraide, 1997), así como los fosfatos de Al (Takita *et al.*, 1999) y los complejos de Al con los ácidos orgánicos (Matsumoto, 2002) no son tóxicos para las plantas. Sin embargo, los complejos de Al con el sulfato se ha demostrado que son peligrosos para el crecimiento de varias especies de plantas (Kinraide, 1997).

Respecto a los complejos de fluoruro de aluminio o fluoroaluminatos ( $\text{AlF}_x$  donde  $X=1-6$ ), varios reportes indican que no son tóxicos para las plantas (MacLean *et al.*, 1992), no obstante en reportes posteriores se confirmó que al menos algunas especies de fluoroaluminatos específicamente  $\text{AlF}_2^+$  y  $\text{AlF}_2^{2+}$  son tóxicos, por lo cual también se ha sugerido un aumento en la toxicidad de éstos complejos conforme se incrementa su carga positiva (Kinraide, 1997; Stevens *et al.*, 1997), además de que impiden el transporte de Pi debido a que son capaces de unirse a los sitios de unión de Pi de las proteínas de una manera análoga al Pi (Rocha y Orokova-Façanha, 2002). Sin embargo, aún falta por establecerse si los efectos no tóxicos de ciertas especies y complejos de Al están relacionados con una pérdida de asimilación a través de la membrana plasmática, o con una disminución (o ausencia) de la carga positiva dado que la toxicidad de los iones incrementa generalmente con la carga positiva (Kinraide, 1997). Además los complejos polinucleares de hidróxido de Al con una carga positiva alta  $\text{Al}_{13}$  [ $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ ] (Parker y Bertsch, 1992) son mas tóxicos para las plantas que las especies monoméricas, menos cargadas (Comin *et al.*, 1999).

### 1.3 SÍNTOMAS DE TOXICIDAD INDUCIDOS POR Al EN PLANTAS

A pesar de décadas de esfuerzo extensivo para entender el mecanismo (s) de toxicidad por Al sobre las plantas, las causas primarias permanecen únicamente en la especulación. La inhibición del crecimiento de la raíz es uno de los síntomas tempranos y más dramáticos exhibidos por las plantas que sufren de estrés por Al;

estos síntomas han sido observados en minutos de exposición a concentraciones micromolares de Al en la solución de cultivo (Blancaflor *et al.*, 1998; Sivaguro y Horst, 1998; Ryan *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). El ápice de la raíz es el sitio crítico de percepción de toxicidad por Al y la inhibición del crecimiento de la raíz ocurre únicamente en la parte distal de la zona de elongación del ápice expuesto a Al (Sivaguro y Horst, 1998; Kollmeier *et al.*, 2000, Ryan *et al.*, 1993).

El crecimiento de la raíz es un proceso dinámico y complejo, indicando que numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos podrían ser alterados antes de la inhibición del crecimiento de la raíz. Entre estos procesos, uno de los más importantes son la alteración del pH y de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (Rengel y Zhang, 2003), la inhibición de la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa en la membrana plasmática de las células del ápice de la raíz (Ahn *et al.*, 2002; Rengel y Zhang, 2003) y la interrupción de la dinámica del citoesqueleto (Sivaguro *et al.*, 1999; Schwarzerova *et al.*, 2002). Además la toxicidad por Al provoca un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando un estrés oxidativo (Yamamoto *et al.*, 2002), así como la peroxidación de los lípidos de membrana (Yamamoto *et al.*, 2003), siendo este efecto una causa principal de la inhibición del crecimiento de las raíces (Yamamoto *et al.*, 2003).

Recientemente, numerosos reportes en la literatura describen que los cambios inducidos por el Al ocurren particularmente en las regiones apicales, provocando la expresión de los síntomas de toxicidad inducidos por Al: cambios en el patrón celular de la raíz (Doncheva *et al.*, 2005), división celular irregular, alteraciones en la forma y vacuolización de la célula (Vázquez *et al.*, 1999; Ciamporová, 2000), deposición de callosa y pared celular más delgada (Jones *et al.*, 2006) desintegración del citoesqueleto (Sivaguro *et al.*, 1999), formación de configuraciones membranosas semejantes a figuras de mielina (probablemente ricos en fosfatidil inositol) y depósitos membranosos electro-densos (Vázquez,

2002), alteraciones en las propiedades de la membrana plasmática (Sivaguro *et al.*, 1999; Ahn y Matsumoto, 2006), así como la producción de especies reactivas de oxígeno (Darkó *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2006). Estos son algunos ejemplos de cómo el Al afecta a las células de la raíz, aunque aún no se sabe cual de todos estos procesos provocan la inhibición del crecimiento celular.

El Al se une rápidamente al apoplasto, localizándose en los compartimentos extracelulares desde un 30-90% del total del Al absorbido en el tejido de la raíz (Zheng y Yang, 2005). Dentro de la pared celular, este se une a los sitios cargados negativamente en la matriz de pectina (Schildknecht y Vidal, 2002) conduciendo al desplazamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  y reduciendo la extensibilidad de la pared (Ma *et al.*, 2004). El Al tiene una fuerte afinidad por la membrana plasmática cargada negativamente y causa despolarización de la membrana (Kochian *et al.*, 2005), resultando en una modificación de los gradientes de  $\text{H}^+$  y en los flujos de iones a través de la membrana (Ahn *et al.*, 2002) particularmente flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rengel y Zhang, 2003). También se ha demostrado que el Al se acumula rápidamente en el simplasma (Lazof *et al.*, 1994) y en el núcleo de las células del ápice de la raíz después de 30 minutos de tratamiento (Silva *et al.*, 2000). La unión del Al al núcleo podría inhibir la actividad mitótica alterando la composición del DNA, la estructura de la cromatina (Matsumoto *et al.*, 1988) o afectando los mecanismos que controlan la organización y polimerización de los microtúbulos (Frantzois *et al.*, 2000).

En cultivos *in vitro* también se ha reportado que el Al es capaz de afectar el crecimiento de células en suspensión de *Coffea arabica* L., disminuyendo la capacidad de crecimiento de una línea sensible a Al (Martínez-Estevéz *et al.*, 2003b). De igual forma en células en suspensión de *Nicotiana tabacum* se ha observado que el Al tiene un efecto sobre los microtúbulos del citoesqueleto (Schwarzerová, 2002), y además induce una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e inhibe el crecimiento celular (Jones *et al.*, 1998).

#### 1.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TOXICIDAD POR Al

La existencia de genotipos contrastantes en la resistencia a Al en varias especies de plantas ha dado lugar a la identificación de los diferentes mecanismos que usan las plantas para resistir su toxicidad. Los mecanismos de resistencia más estudiados involucran la liberación de ácidos orgánicos (por ejemplo: malato, citrato y oxalato) de la punta de la raíz, los cuales forman complejos estables con Al produciendo complejos no tóxicos. Algunas especies de plantas secretan ácidos orgánicos en la rizósfera previniendo la acumulación de Al dentro del ápice de la raíz (resistencia a Al), mientras que otros utilizan un mecanismo mediado por ácidos orgánicos para detoxificar al Al internamente (tolerancia a Al) (Kochian *et al.*, 2005). Recientemente se han identificado en varias especies de plantas numerosos transportadores que exudan ácidos orgánicos como malato (ALMT1) o citrato (FRD3). El gen ALMT1 ha sido identificado en *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana* y *Secale cereale* (Delhaize *et al.*, 2007), mientras que FRD3 únicamente se ha identificado en *Arabidopsis thaliana* y *Sorghum bicolor* (Delhaize *et al.*, 2007). Además Larsen *et al.*, (2005, 2007) identificaron dos transportadores tipo ABC de *Arabidopsis*, ALS1 y ALS3, los cuales podrían actuar movilizando y secuestrando al Al dentro de la planta para conferir tolerancia.

#### 1.5 DEFICIENCIA DE Pi EN SUELOS ÁCIDOS

El fósforo forma parte integral del metabolismo energético y es un constituyente de los ácidos nucleicos y de los lípidos de las membranas; además de que participa en la fosforilación y defosforilación de las proteínas, mecanismo esencial en las vías de transducción de señales en plantas. El fosfato inorgánico (Pi) también llamado ortofosfato ( $H_2PO_4^-$ ) o sus derivados orgánicos activan diferentes procesos bioquímicos como la fotosíntesis y la respiración. Los ésteres de fosfato en general actúan como acarreadores de energía en varias vías metabólicas. Además, los fosfolípidos juegan un papel importante en la integridad y función de

las membranas y la homeostasis de fosfato en el cloroplasto regula el transporte de azúcares fosforilados a través de la membrana y la síntesis de almidón.

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo macronutriente más limitado tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres. Este elemento es el nutriente menos accesible para las plantas dado que su disponibilidad en suelos nativos es raramente adecuado para el crecimiento óptimo. Consecuentemente, la asimilación, el almacenaje y el metabolismo del fosfato es un proceso altamente regulado que afecta directamente el funcionamiento de las plantas. La forma asimilable del fosfato para las plantas es el ortofosfato, el cual es activamente tomado alrededor del medio por los microorganismos y las raíces de las plantas. Sin embargo, el Pi es extremadamente insoluble en la mayoría de los suelos debido a que forma sales de calcio y es quelado por los óxidos de hierro y aluminio. Por ejemplo el Pi en los suelos de arcilla es esencialmente inmovilizado y la concentración de Pi en el suelo es menor de 10  $\mu\text{M}$  (Mimura *et al.*, 1996), lo cual es dos o tres ordenes de magnitud más bajo que la concentración en el medio de otros iones requeridos como Ca y K. Sin embargo, entre el 30 y el 80 % del total del fósforo en los suelos arables y en los bosques se encuentra unido en la materia orgánica recalcitrante (por ejemplo: ácido fítico), el cual requiere mineralización a Pi para que pueda ser asimilado por las plantas (Schachtman *et al.*, 1998). Paradójicamente aunque el fósforo es abundante en la litósfera, la disponibilidad de este mineral es limitado, lo cual representa un fenómeno general en la agricultura.

## 1.6 TRANSPORTE DE Pi EN LAS PLANTAS

Los factores que influyen la toma de Pi por las plantas son principalmente los factores del suelo, el suministro de Pi a las raíces por flujo de masas, la difusión, cambios en el tamaño y geometría de la raíz, la entrada de Pi en relación a la concentración de éste en la superficie de la raíz y la influencia de la competencia

de las raíces (Barber y Cushman, 1981; Barber y Silverbush, 1984; Silverbush y Barber, 1983). Ahora existen evidencias genéticas y moleculares para la presencia de transportadores que operan eficientemente a concentraciones altas y bajas de Pi en el medio. El sistema de transporte de baja afinidad parece ser expresado constitutivamente en plantas a diferencia del sistema de transporte de alta afinidad que es fuertemente expresado durante deficiencia de Pi (Furihata *et al.*, 1992; Raghotama y Karthikeyan, 2005).

Diversos estudios (Mimura *et al.*, 1996; Jeschke *et al.*, 1997) muestran una descripción de los patrones del movimiento de Pi en la planta entera. En plantas que crecen en condiciones adecuadas de Pi la mayor parte es absorbido por las raíces y transportado en el xilema hacia las hojas jóvenes. Existe también un transporte de Pi en el floema desde las hojas viejas hacia los tallos en crecimiento y de los tallos a las raíces. En plantas deficientes en Pi el transporte restringido de las raíces hacia los tallos vía el xilema es compensado por un incremento en la movilización del Pi almacenado en las hojas viejas y en su transporte hacia las hojas más jóvenes y a las raíces en crecimiento. Este proceso involucra tanto la reducción de Pi almacenado y la hidrólisis del fósforo orgánico en las hojas viejas (Jeschke *et al.*, 1997). El Pi en el xilema es transportado únicamente como Pi, mientras que cantidades significantes de P orgánico es encontrado en el floema. No se sabe mucho acerca del transporte involucrado en el cargado del xilema y floema, aunque dos mutantes de *Arabidopsis*, *pho1* y *pho2* que no tienen la capacidad de transportar Pi en el xilema evidencian eventos de transporte específicos que ocurren en interfaces del xilema y el floema (Poirier *et al.*, 1991).

El transporte de Pi dentro del simplasma involucra un transporte que mueve el Pi desde el apoplasta, donde las concentraciones de Pi son comúnmente menores a 2  $\mu\text{M}$ , hacia el citosol atravesando la membrana plasmática donde la concentración de Pi se mantiene dentro del orden de magnitud de 5-17 mM (Mimura, 1999; Mimura *et al.*, 1996). Esta gran diferencia entre la concentración

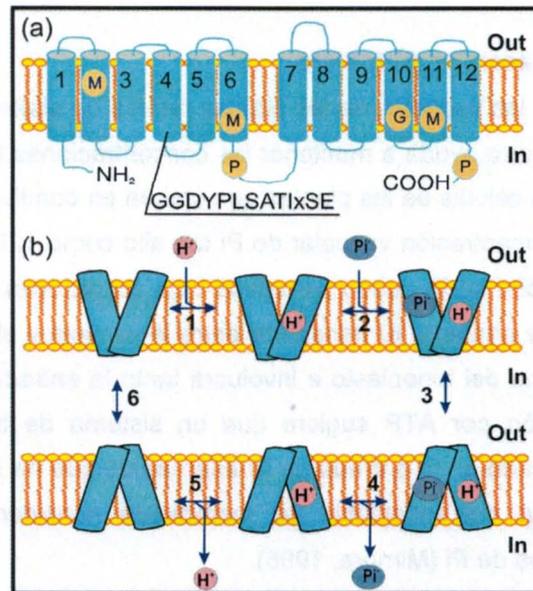
interna y la concentración externa junto con la carga negativa neta sobre la membrana plasmática necesita que un gradiente electroquímico fuerte sea usado para el transporte de aniones fosfato dentro de las células de la raíz. El transporte de Pi desde el suelo hacia la raíz de la planta requiere un mecanismo de transporte de alta afinidad manejado por energía. Esto es facilitado por numerosas proteínas pertenecientes a la familia Pht1 de transportadores de Pi en plantas (Bucher *et al.*, 2001) y para poder mantener la homeostasis de Pi es necesario que la expresión y función de los transportadores de Pi sean coordinados con cambios en la disponibilidad de Pi.

Los transportadores de Pi de alta afinidad son expresados preferencialmente en las raíces y muchos de ellos son inducidos bajo deficiencia de Pi (Daram *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998a; Muchhal *et al.*, 1996; Raghothama y Karthikeyan, 2005). También se ha visto que ellos están enriquecidos en la epidermis y en los pelos radiculares de la raíz para aumentar la toma de Pi (Daram *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998b). Transportadores como LePT1 son expresados en la epidermis y en las células corticales, sin embargo también existe evidencia de la expresión de los transportadores de Pi de alta afinidad en otras partes de las plantas incluyendo flores, hojas, cotiledones y tubérculos (Leggewie *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998a; Mudge *et al.*, 2002).

#### **1.6.1 Transportadores de fosfato pertenecientes a la familia Pht1**

Los transportadores de Pi son proteínas integrales de membrana responsables de adquirir fosfato de la rizósfera y transferirlo a diferentes tejidos u órganos. Estos transportadores son proteínas que consisten de 12 regiones que atraviesan la membrana, separadas en dos grupos de seis por una región grande cargada hidrofílicamente (Figura 1.1). Ellos pertenecen a la superfamilia de transportadores MFS (Major facilitator super family, por sus siglas en ingles) que comprenden el transporte de azúcares, antibióticos, iones y aminoácidos (Pao *et al.*, 1998). Esta es una de las familias de acarreadores más grandes facilitados por polipéptidos

simples capaces de transportar varios solutos utilizando el gradiente iónico quimiosmótico (Pao *et al.*, 1998). Estos transportadores tienen varios sitios de fosforilación y N-glucosilación de acuerdo a diferentes transportadores aislados de diversas especies de plantas. Estos transportadores son de tamaño similar (aproximadamente 518-587 aminoácidos) y todos utilizan el gradiente de  $H^+$  para manejar el proceso de transporte.



**Figura 1.1** a) Topología transmembranal de un transportador Pht1 de Pi, se indican sus sitios de fosforilación, miristoilación y glucosilación b) mecanismo putativo del simporte de protones y fosfato a través del transportador Pht1 1) protonación del transportador con el poro abierto hacia afuera, 2) unión del anión fosfato, 3) cambio conformacional para abrir el poro hacia adentro, 4) liberación de fosfato, 5) desprotonación del transportador, 6) retorno a la conformación inicial (Modificado de Karandashov y Bucher, 2005).

En plantas ya se han aislado varios miembros de la familia Pht1. En el genoma de *Hordeum vulgare* se han aislado ocho diferentes miembros de esta familia de transportadores de fosfato (Smith *et al.*, 1999) y en *Arabidopsis thaliana* han sido identificados y caracterizados nueve genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad (Karthikeyan *et al.*, 2002; Muchhal *et al.*, 1996; Mudge *et*

*al.*, 2002; Okumura *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997), que tienen una expresión diferencial a lo largo de la planta.

En general el ion ortofosfato es la forma de fosfato preferida por los transportadores y el fosfato es adquirido por un proceso de co-transporte mediado por energía y manejado por protones generados por  $^+H$ -ATPasas asociadas a la membrana plasmática (Sakano *et al.*, 1992).

### **1.6.2 Transporte intracelular de fosfato**

El Pi almacenado en las vacuolas de las plantas provee un sistema amortiguador disponible fácilmente que ayuda a mantener las concentraciones fisiológicas de Pi y la homeostasis. Las células de las plantas que crecen en condiciones altas de Pi podrían tener una concentración vacuolar de Pi tan alto como 120 mM (Mimura *et al.*, 1990). Este almacén de Pi puede ser usado bajo condiciones de estrés por Pi hasta ser virtualmente agotado. El transporte entre la vacuola y el citosol ocurre a través de la membrana del tonoplasto e involucra tanto la entrada como la salida de Pi. La estimulación por ATP sugiere que un sistema de transporte activo pudiera estar involucrado en la entrada de Pi además de que ha sido demostrado que la permeabilidad del tonoplasto se incrementa considerablemente bajo condiciones deficientes de Pi (Mimura, 1995).

El transporte de Pi entre el citosol y el estroma del cloroplasto es mediado por translocadores triosa fosfatos/Pi (Flugge, 1999; Flugge *et al.*, 1989). Estos transportes son localizados en la membrana interna de la envoltura del cloroplasto y son codificados por genes nucleares (Fisher *et al.*, 1994). Los transportadores que median el intercambio de glucosa-6-fosfato y Pi han sido aislados de plástidos de plantas, al igual que los intercambiadores de fosfoenolpiruvato/Pi (Fisher *et al.*, 1997; Kammerer *et al.*, 1998). Por otra parte el Pi también es esencial para las funciones metabólicas de la mitocondria. El movimiento de Pi dentro de la mitocondria es facilitado por transportadores de Pi mitocondriales que son

similares a los de levadura y mamíferos (Takabatake *et al.*, 1999). Todas estas proteínas que median el transporte de Pi entre el citosol y los organelos pertenecen a distintas clases de proteínas que son bastante diferentes a la familia Pht1 de transportadores involucrados en la adquisición inicial de Pi de la solución externa del suelo.

Mantener la homeostasis celular de Pi es esencial para la función del organismo (Plaxton y Carswell, 1999). La adquisición de Pi, la homeostasis y el metabolismo son altamente regulados y bien coordinados para maximizar el uso de este nutriente limitado. Las células tienen mecanismos para mantener los niveles citosólicos de Pi, a pesar de las grandes fluctuaciones en las concentraciones externas (Glass y Siddiqi, 1984). Las plantas superiores adquieren y almacenan un exceso de Pi en la vacuola, lo cual es crucial para la homeostasis citosólica de Pi bajo condiciones elevadas, donde la mayor parte del Pi celular (85 a 95%) puede ser encontrado en las vacuolas (Anghinoni y Barber, 1980; Natr, 1992). Además al almacenaje de Pi en la vacuola, la salida de Pi de la raíz también podría ayudar a las plantas a mantener la homeostasis iónica (Cogliatti y Santa María, 1990).

## **1.7 MECANISMOS DE OBTENCIÓN DE PI**

### **1.7.1 Modificaciones bioquímicas para la obtención de Pi**

La baja disponibilidad de Pi en muchos ecosistemas naturales ha provocado en las plantas la evolución de varias estrategias adaptativas a nivel morfológico, bioquímico y simbiótico para incrementar la adquisición de Pi y/o mejorar la eficiencia de la utilización interna de Pi (Smith *et al.*, 2001). Entre las adaptaciones para la obtención de Pi se encuentra la formación de raíces agrupadas para algunas especies de plantas, estas se combinan con una alta densidad de determinadas raíces laterales en un volumen de suelo localizado, con una liberación sincronizada de ácidos orgánicos y fosfatasas ácidas que incrementan

la disponibilidad de Pi en una vecindad inmediata de estas raíces (Neumann *et al.*, 2000).

Esto es evidenciado por una morfología alterada de la raíz y por la proliferación preferencial de las raíces sobre los tallos, bajo condiciones deficientes de Pi. Los factores asociados a la raíz como la morfología, arquitectura, densidad y largo de los pelos radiculares, velocidad de absorción de nutrientes, habilidad de modificar la rizósfera y simbiosis micorrízica podrían influenciar fuertemente la adquisición de Pi (Raghothama y Karthikeyan, 2005). Bajo deficiencia de Pi se observan distintos cambios en el crecimiento y la morfología de la raíz (Lynch y Beebe, 1995). Un incremento en la proporción de la masa de la raíz provoca un aumento en el área superficial de la raíz disponible para la exploración y la adquisición del Pi del suelo, relativo al área superficial de la hoja, donde la mayor parte del Pi es utilizado. En *Arabidopsis* la elongación de la raíz primaria es inhibida, mientras que la ramificación de las raíces secundarias y elongación de los pelos radiculares se incrementan. La toma de Pi es fuertemente influenciada por un incremento en la densidad de los pelos radiculares en las plantas eficientes en la adquisición de Pi (Föhse *et al.*, 1991; Gahoonia y Nielsen, 1998). En muchos casos los pelos radiculares podrían contribuir arriba del 70 % del área superficial total de la raíz, incrementando el área superficial del cilindro de la raíz cerca de 27 veces (Jungk, 2001). Hay evidencias que sugieren que los pelos radiculares formados de nuevo llegan a ser blancos para la expresión de transportadores de Pi inducidos bajo deficiencia de Pi (Daram *et al.*, 1998; Mudge *et al.*, 2002).

### **1.7.2 Obtención de Pi a través de simbiosis con micorrizas**

En respuesta a deficiencia de Pi en el suelo, muchas plantas han desarrollado una relación simbiótica con hongos micorrízicos. Análisis moleculares de transportadores de Pi en especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas han revelado la activación de transportadores de Pi durante la simbiosis micorrízica. Los transportadores de Pi de arroz (*Oryza sativa*) OsPT11, son inducidos

específicamente en respuesta a simbiosis micorrízica (Uta *et al.*, 2002). Similarmente la expresión de transportadores de Pi de alta afinidad de *Solanum tuberosum* (StPT3) y *Medicago truncatula* (MtPT4) son asociados distintamente con células de raíces que forman arbusculos (Harrison *et al.*, 2002; Rausch *et al.*, 2001). El nivel de inducción es correlacionado con el grado de colonización de las raíces por hongos micorrízicos. La expresión espacial y temporal de estos genes son consistentes con su papel en adquirir el Pi liberado por los hongos.

En estas plantas las hifas de los hongos juegan un papel importante en la adquisición de Pi por las plantas (Bolan, 1991). La simbiosis micorrízica es fundada sobre el intercambio mutualístico de C de la planta para la obtención de Pi y otros nutrientes de los hongos. La entrada de Pi en las raíces colonizadas por los hongos micorrízicos puede ser de 3 a 5 veces más alto que en raíces no micorrízicas (Smith y Read, 1997). Los pocos estudios publicados de cinéticas de obtención de Pi indican que las raíces micorrízicas y las hifas aisladas tienen sistemas de toma de Pi similares a los encontrados en raíces no micorrízicas y en otros hongos (Thomson *et al.*, 1990; Smith y Read, 1997).

### **1.7.3 Liberación de ácidos orgánicos para la obtención de Pi**

Las plantas producen y secretan ácidos orgánicos a la rizósfera (Shane y Lambers, 2005) los cuales liberan el Pi de los complejos inorgánicos en el suelo por un mecanismo de intercambio de ligandos. Las especies como *Fagopyrum esculentum*, *Brasica napus* y *Medicago sativa* son bastante eficientes en la utilización del fosfato de las rocas a través de la liberación de ácidos orgánicos (Hinsinger, 2001). Los ácidos orgánicos son secretados para quelar cationes de Fe, Al y Ca, lo que incrementa la movilización de Pi tanto de suelos ácidos como de suelos calcáreos (Jones, 1998).

Las respuestas bioquímicas a limitación de fosfato son dirigidas para mantener constantes las concentraciones citoplásmicas de Pi, independientemente de los

niveles externos y vacuolares de Pi (Schachtman *et al.*, 1998). Este fenómeno ha sido estudiado a fondo en especies de la familia de las proteáceas que son capaces de formar raíces agrupadas o proteoides (Shane y Lambers, 2005; Vance *et al.*, 2003). Estas raíces especializadas producen y exudan grandes cantidades de ácidos orgánicos en la rizósfera. La producción y secreción de ácidos orgánicos por las raíces proteoides ocurre al mismo tiempo que la liberación de fosfatasas, la salida de protones y la sobreexpresión de transportadores de Pi de alta afinidad (Miller *et al.*, 2001; Vance *et al.*, 2003).

#### **1.7.4 Adquisición de fosfato de fuentes orgánicas**

La mayor parte del Pi en el suelo podría estar presente en formas orgánicas. Los complejos orgánicos como el ácido fítico podrían contribuir a una proporción significativa (20-80 %) del Pi en el suelo (Jungk *et al.*, 1993; Richardson, 1994). Los complejos orgánicos de Pi necesitan ser hidrolizados por actividad enzimática antes de que el Pi sea liberado dentro de la rizósfera. Las fosfatasas son un grupo de enzimas producidas en grandes cantidades en plantas con deficiencia de Pi. Las fosfatasas producidas por las plantas y las bacterias podrían estar involucradas en la degradación de complejos orgánicos de Pi. La inducción de fosfatasas durante la deficiencia de Pi es una respuesta universal en plantas superiores (Duff *et al.*, 1994). Se presume que diferentes tipos de fosfatasas producidas por las plantas liberan Pi de materiales orgánicos presentes en los compartimientos intracelulares y en los espacios extracelulares (Duff *et al.*, 1994; Goldstein, 1992).

En células en suspensión, donde se ha observado que existe una inhibición del crecimiento en condiciones deficientes de Pi, se ha visto que las células tienen la capacidad de sintetizar *de Novo* enzimas fosfatasas para la obtención del Pi orgánico del medio de cultivo (Duff *et al.*, 1991).

## 1.8 INTERACCIÓN FÓSFORO-ALUMINIO

Diversos estudios han mostrado que la eficiencia de algunas especies de plantas para crecer en condiciones de baja concentración de Pi esta muy relacionada con la tolerancia a la toxicidad por Al (Miranda y Rowell, 1989). Se ha visto que un incremento en la adición de Pi provoca una disminución de la toxicidad por Al mejorando el crecimiento de la raíz y también la eficiencia en la toma de Pi (Tan y Keltjens, 1990). En otro estudio Zheng *et al.*, (2005) encontraron que el contenido de Pi en el ápice de las raíces de *Fygotyrum esculentum* estuvo relacionado con la inmovilización y destoxificación de Al, lo que indicaba que la salida de Pi podría ser otro mecanismo de tolerancia a Al. En presencia de Al la salida de Pi podría disminuir la actividad del  $Al^{3+}$  de la rizósfera vía formación de complejos  $AlPO_4$  en el apoplasta, en la superficie de la raíz o en la rizósfera (Cogliati y Santa Maria, 1990; Lüttge y Clarkson, 1992; Lindeberg, 1990). También Pettersson y Strid (1989) sugirieron que en raíces de trigo eficientes en la toma de Pi, los complejos de  $AlPO_4$  se forman debido a una salida de Pi del simplasma. De igual forma Pellet *et al.*, (1996) encontraron que la tolerancia a Al de genotipos de trigo se debe a un proceso fisiológico múltiple en donde están involucrados la liberación de malato inducido por Al y la liberación constitutiva de ortofosfato para formar complejos como los de  $AlPO_4$ . Además, la tolerancia a Al de estos genotipos de trigo podía estar controlada por genes diferentes que resultan en un aumento en la resistencia a Al. Por lo tanto aunque el Al interfiere con el metabolismo del Pi también se ha visto que podría reducir los efectos inducidos por Al en las plantas.

La exudación de ácidos orgánicos es un de los principales mecanismos de tolerancia a Al (Delhaize *et al.*, 2007) y también de la deficiencia de Pi (Raghothama *et al.*, 2005). Por lo cual se ha tratado de relacionar esta respuesta conjunta en diversas especies de plantas. En estudios recientes Dong *et al.*, (2004) mostraron evidencias de la existencia de una relación entre los efectos del Pi y el Al en el patrón de exudación de ácidos orgánicos (OA) en la raíces de

*Glycine max*, en este estudio se observó que la exudación de malato y oxalato fue inducido por deficiencia de Pi, mientras que el Al únicamente activó la exudación de citrato. En un trabajo similar Ligaba *et al.*, (2004) encontraron que la exudación de citrato es incrementado por deficiencia de Pi pero no por toxicidad por Al, Por lo que la exudación de OA puede ser inducida diferencialmente por deficiencia Pi o por Al en plantas de la misma especie y que los ácidos orgánicos son capaces de destoxificar Al y movilizar Pi de los complejos con Al (Hinsinger, 2001; Ryan *et al.*, 2001). Por otra parte en un trabajo realizado en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Carica papaya* De la Fuente *et al.*, (1999) demostraron que la sobreexpresión de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* provocaba una exudación de citrato de sus raíces de hasta seis veces mas que las plantas control en presencia de Al y que la tolerancia de estas plantas transformadas era diez veces mas que lo que toleraron las plantas control. Además las plantas de tabaco que sobre- producían citrato, mostraron un mejor crecimiento en suelos alcalinos bajos en Pi, demostrando el uso eficiente de formas de Pi insoluble, como el fosfato de calcio (Lopez-Bucio *et al.*, 2000).

Los aniones orgánicos son poderosos queladores de Al (Matsumoto, 2002), en consecuencia, el aumento en la exudación de citrato, malato y oxalato en respuesta a Al (Delhaize *et al.*, 2007) y a deficiencia de Pi (Hinsinger, 2001) ya ha sido reportado para algunas especies de plantas, sin embargo ni la deficiencia de Pi ni la toxicidad por Al inducen la exudación de aniones orgánicos en algunas otras plantas lo que indica que plantas de cultivares de la misma especie responden de manera diferente a ambos tipos de condiciones extremas.

### **1.9 VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR FOSFOLÍPIDOS**

Las células están expuestas a una gran diversidad de estímulos provenientes del medio externo. Los estímulos pueden ser bióticos o abióticos y su efecto puede variar dependiendo del tipo de célula receptora, estadio fisiológico, tipo de señal

extracelular y el tiempo de exposición. Para entender el proceso por el cual los distintos factores de estrés afectan a las plantas es necesario conocer el mecanismo de transducción de señales que estos factores ambientales desencadenan en las células (Xiong y Zhu, 2001).

La vía de transducción de señales es el proceso por el cual las células detectan la señal de estrés y la transmiten a la maquinaria celular para activar respuestas adaptativas. Se ha identificado que las señales del ambiente son primero percibidas por receptores específicos que después de ser activados inician una cascada que transmite la señal intracelularmente, estas señales son conocidas como segundos mensajeros (figura 1.2) (Xiong y Zhu, 2001). Varias vías de señalización pueden operar independientemente o modularse entre ellas; incluso pueden compartir componentes y segundos mensajeros. La interdependencia de unas vías con otras provoca que muchas señales puedan interactuar en forma cooperativa y generar respuestas divergentes en la planta (Kaur y Gupta, 2005).

Una de las principales vías de transducción de señales es la que involucra a los fosfoinosítidos de la membrana plasmática (figura 1.2). En plantas superiores y algas, la modulación de los fosfoinosítidos funciona en la transducción de estímulos ambientales como la luz, la gravedad, los patógenos, el pH, el estrés osmótico (Xiong y Zhu, 2001) y los metales (Jones y Kochian, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). El sistema de transducción de señales vía fosfolípidos consiste en la generación de segundos mensajeros a partir de la hidrólisis o cambios en el estado de fosforilación de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática, los cuales además de que constituyen una barrera semipermeable en la célula, pueden ser cofactores de enzimas membranales, servir para el anclaje de proteínas o cambiar las propiedades físicas de la membrana (Laxalt y Munnik, 2002).

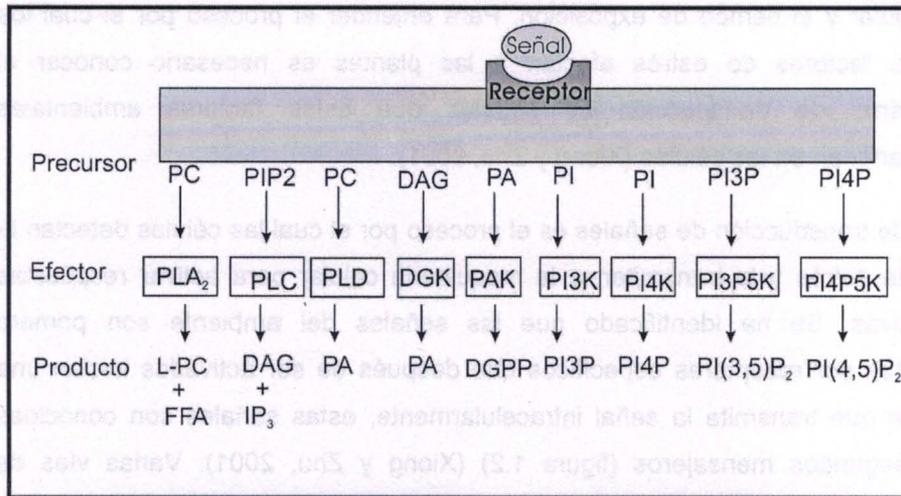


Figura 1.2 Representación esquemática de los sustratos lipídicos (precursores) y segundos mensajeros (productos) producidos por la acción de enzimas lipídicas y fosfolipasas (efectores). Vías de señalización similares existentes en levaduras y células animales, algunas de ellas todavía no son claras en plantas. Modificado de Meijer y Munnik, 2003.

### 1.9.1 Fosfolipasa C

La fosfolipasa C (PLC) es una enzima perteneciente a un grupo de isoenzimas que catalizan la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) localizado en la membrana celular generando dos componentes uno hidrofóbico y otro hidrofílico, el diacilglicerol y el inositol 1,4,5-trisfosfato respectivamente (DAG e IP<sub>3</sub>). Ambos compuestos actúan como segundos mensajeros y tienen una función dentro de la fisiología celular. Los efectos que producen estos mensajeros secundarios son el de estimular la liberación de calcio (IP<sub>3</sub>) y el de activar a la proteína cinasa C (DAG) en células animales (Rebecchi y Pentylala, 2000). En plantas, el DAG puede ser rápidamente fosforilado por medio de la actividad de una diacilglicerol cinasa (DGK) para producir ácido fosfatídico (PA) (Munnik *et al.*, 1996). El PA puede funcionar como un segundo mensajero que estimula la actividad de diferentes enzimas, que a su vez promueven la fosforilación y actividad de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) durante el estrés oxidativo (Munnik, 2001). Tanto en plantas como en animales, el IP<sub>3</sub> es después convertido por la acción de varias cinasas y fosfatasas a una variedad de fosfatos de inositol

algunos de los cuales son implicados en señales intracelulares (Harlan, 1994). Por otra parte, en plantas se sabe que el PA también puede ser formado directamente a partir de la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) por una fosfolipasa D, el cual genera PA y colina (Munnik, 2001).

La PLC comprende una familia diversa de isoenzimas que en base en la especificidad de sus sustratos y su función celular han sido clasificadas en tres grupos: PI-PLC específica para fosfoinosítidos, PC-PLC que hidroliza fosfatidilcolina (PC) y otros fosfolípidos y la glicosilfosfatidilinositol-PLC (GPI-PLC) que hidroliza el grupo glicosil (GPI) de algunas proteínas membranales (Wang, 2001). De acuerdo a la secuencia de aminoácidos y el mecanismo de activación en mamíferos se han reportado catorce isoenzimas de la PI-PLC:  $\beta$  (1, 2, 3 y 4),  $\gamma$  (1 y 2),  $\delta$  (1, 2, 3 y 4),  $\epsilon$  (1),  $\zeta$  (1) y  $\eta$  (1 y 2) (Saunders *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2005; Nakahara *et al.*, 2005).

Las PI-PLC de mamíferos presentan cinco dominios conservados: un dominio de homología a pleckstrina (PH) en la región N-terminal que permite establecer la interacción de la proteína con los fosfolípidos de membrana; un dominio EF útil en el enlazamiento a  $\text{Ca}^{2+}$ ; un dominio X y otro Y que constituyen los dominios catalíticos de la enzima y un dominio C2 de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en la región C-terminal, con excepción de la PI-PLC $\zeta$  que no posee el dominio PH, por lo que no es claro como esta enzima puede unirse a su blanco que esta anclado a la membrana (Rebecchi y Pentylala, 2000; Pan *et al.*, 2005).

Las PI-PLCs de plantas parecen corresponder a una sola familia de genes, que son muy similares a la subfamilia de la PI-PLC $\delta$  de mamíferos, sin embargo las PLCs encontradas en plantas no poseen el dominio PH y la unión con su sustrato puede ser a través del dominio C2 que interactúa con los fosfolípidos de una manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang, 2001; Pan *et al.*, 2005).

Se ha reportado que las PI-PLCs de plantas están involucradas en la señalización de diversos estímulos, como el estrés ambiental (Chapman, 1998), estrés anaeróbico (Reggiani y Laoretti, 2000), estrés por AI (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a), ataque por patógenos y polinización (Wang, 2001), gravitropismo (Repp *et al.*, 2004), señalización por ABA (Mills *et al.*, 2004) y en la germinación y crecimiento del tubo polínico (Pan *et al.*, 2005).

### 1.9.2 Fosfolipasa D

La fosfolipasa D (PLD) hidroliza lípidos de membrana, principalmente fosfatidilcolina (PC), para generar ácido fosfatídico de naturaleza hidrofóbica y un grupo polar hidrofílico. La PLD pertenece a una familia de enzimas heterogéneas con propiedades estructurales, regulatorias y bioquímicas distinguibles. Wang (2005) reportó varios procesos fisiológicos en los que está involucrado el papel regulatorio de las PLDs, éstos incluyen respuestas al estrés abiótico, flujo iónico en respuesta a defensa a patógenos, estrés oxidativo, muerte celular programada, cambios en el citoesqueleto, tráfico vesicular, señalización del ABA, alteración transcripcional, entre otros. La familia de genes de la PLD en plantas es más compleja que en otros organismos; a la fecha se conocen doce genes que codifican para PLD en *Arabidopsis thaliana*, mientras que en mamíferos se han encontrado solamente dos genes y en levaduras uno (Wang, 2005).

Las doce PLDs de *A. thaliana* se dividen en seis tipos:  $\alpha$  (3),  $\beta$  (2),  $\gamma$  (3),  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  (2). De acuerdo a la estructura de la enzima se clasifican en dos subfamilias: C2-PLD, dependiendo si la enzima posee el dominio C2 de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos o PX/PH-PLD, si presenta los dominios PX y PH que son diferentes sitios de interacción con fosfoinosítidos. Las PLDs  $\alpha$  (3),  $\beta$ (2),  $\gamma$ (3),  $\delta$ (1),  $\epsilon$ (1) poseen el dominio C2, mientras que la PLD $\zeta$  contiene los dominios PX y PH de manera similar a las PLD de mamíferos (Wang, 2005).

## 1.10 EFECTO DEL Al Y LA DEFICIENCIA DE Pi SOBRE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADA POR FOSFOLÍPIDOS

### 1.10.1 Efecto del Al sobre la vía de señalización

En plantas, animales y humanos, el Al interfiere con funciones celulares básicas, como la vía de señalización de los fosfoinosítidos y la de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, los cuales son mensajeros secundarios involucrados en numerosas funciones metabólicas (Rebecchi y Pentyala, 2000). En cepas de ratones (Huag *et al.*, 1994) y en neuroblastomas de células de humano (Wood *et al.*, 1994) la exposición a Al interfiere con la vía de señalización de fosfoinosítidos actuando sobre las proteínas G y sobre la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. Además el Al disminuye la acumulación de inositol fosfato especialmente  $\text{IP}_3$  y cambia la composición de los fosfolípidos de membrana (Shi *et al.*, 1993).

En ratones (Huag *et al.*, 1994) y humanos (Wood *et al.*, 1994) el Al interrumpe la homeostasis intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y disminuye la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , afectando la acción de la actividad del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico como segundo mensajero. En células de plantas hay varios reportes acerca de un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico como consecuencia de la toxicidad por Al (Rengel y Zhang, 2003), como se ha visto en *Triticum aestivum* (Zhang y Rengel, 1998), en *Oryza sativa* (Ma *et al.*, 2002), en pelos radiculares de *Arabidopsis* (Jones *et al.*, 1998a), en células en suspensión de *Nicotiana tabacum* (Vitorello y Huag, 1996) y en protoplastos de *T. aestivum* (Lindberg y Strid, 1997). Sin embargo, a diferencia de los reportes anteriores Jones *et al.*, (1998b) reportaron una disminución en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en un cultivo de células de *N. tabacum* en respuesta a Al.

Estudios realizados por Jones y Kochian (1995) en raíces de trigo han indicado que el mecanismo celular de toxicidad por aluminio puede involucrar interacciones entre el  $\text{Al}^{3+}$  y los componentes de la vía de transducción de señales fosfolipídicas. A pesar de que ésta señal origina una cascada de mensajeros secundarios, se

creo que el lugar donde interfiere el Al sería en el primer paso para la formación de  $IP_3$ . Además, se ha demostrado que el Al puede afectar la funcionalidad de la PLC, sustituyendo al  $Ca^{2+}$  en los lugares de unión a dicha enzima. En este mismo trabajo se demostró que el Al es capaz de inhibir todas las isoformas de PLC específicas de  $PIP_2$ , debido a que el Al probablemente está presente en el citoplasma como un complejo de peso molecular bajo, ya que aún un complejo de Al como es el Al-citrato inhibe en un 50 % la actividad de la PLC.

En raíces transformadas de *Catharanthus roseus* también se ha demostrado un efecto inhibitorio del Al sobre la actividad de la PLC sugiriendo que ésta enzima podría ser un blanco específico para la toxicidad por Al (Piña *et al.*, 2001). En células en suspensión de *C. arabica* también se ha observado este efecto, pero en diferentes componentes de esta vía, tales como la PLC y las lípido cinasas (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Cuando las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de  $AlCl_3$  se observó una inhibición de la formación de  $IP_3$  y un aumento en la actividad de las lípidos cinasas (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a) lo que indicaba que el Al interfiere con los fosfolípidos de membrana y con las diferentes enzimas que participan en esta vía. Recientemente Ramos-Díaz *et al.*, (2007) demostraron que el  $Al^{3+}$  también afecta la formación de ácido fosfatídico (PA) proveniente de la vía de la PLC, pero no por la vía de la PLD. Lo cual indica que el Al también afecta los niveles de PA, otro segundo mensajero importante en la cascada de señalización por fosfolípidos.

### **1.10.2 Los fosfolípidos de membrana funcionan como reservas de fosfato**

Ya se ha establecido en bacterias que los fosfolípidos de membrana pueden funcionar como una reserva de fosfato al ser reemplazados por glucolípidos durante la deficiencia de fosfato, mientras que en plantas son reemplazados por glucolípidos y sulfolípidos durante la deficiencia de Pi (Minnikin, 1974; Benning, 1995; López-Lara, 2003). Las funciones correspondientes de los fosfolípidos de las plantas, como reserva de fosfato ya han sido estudiadas. Cuando las plantas

son cultivadas en condiciones de deficiencia de Pi, la disminución de los fosfolípidos en los tejidos es compensado por un incremento en galactolípidos principalmente digalactosil diacilglicerol (DGDG), este mecanismo se ha reportado para *Arabidopsis thaliana*, (Hartel y Benning, 2000; Hartel *et al.*, 2000), para *Avena sativa* (Andersson, 2003) y para células en suspensión de *Acer platanus* (Jouhet, 2003).

Durante la deficiencia de Pi, el contenido total de diversos fosfolípidos como la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidil etanolamina (PE) y el fosfatidilglicerol (DAG), los cuales constituyen alrededor de un 30 % del total de moléculas que almacenan Pi en las plantas, se ven reducidos. En tanto que se observa un incremento concomitante en la síntesis de lípidos no fosforados como el galactolípidos digalactosildiactilglicerol (DGDG) y el sulfolípidos sulfoquinovosildiactilglicerol (SQDG) los cuales se sintetizan probablemente para preservar la integridad de la membrana (Essigmann, 1998; Andersson, 2003; Kelly, 2003). Aunque el DGDG es típicamente encontrado en membranas plastídicas. Se ha propuesto que durante la deficiencia de Pi, el DGDG reemplaza a los fosfolípidos de la membrana plasmática. Por lo tanto, cuando la disponibilidad de Pi es limitada, la hidrólisis de fosfolípidos puede ser considerado como la vía bioquímica principal para liberar Pi de una fuente de almacenamiento importante así como el sustrato para la biosíntesis de galactolípidos (Figura 1.3).

Los galactolípidos son sintetizados por transferencia de galactosa de UDP-glucosa al diactilglicerol (DAG) por una monogalactosildiactilglicerol sintasa (MGDS) y la digalactosildiactilglicerol sintasa (DGDGS). Bajo condiciones limitantes de Pi se ha mostrado que la expresión de genes que codifican para la MGDS y la DGDGS se incrementa significativamente y esto es correlacionado con la acumulación de DGDG (Kelly y Dörmann, 2002; Awai *et al.*, 2001). Por otra parte también se ha propuesto que parte del DAG necesario para el incremento de la biosíntesis de lípidos no fosforados es obtenido por la hidrólisis de fosfolípidos. Se han propuesto

dos vías alternativas para la producción de DAG de fosfolípidos: la hidrólisis directa por la fosfolipasa C y una reacción indirecta en dos pasos que involucra a la fosfolipasa D que produce ácido fosfatídico (PA), posteriormente este PA es defosforilado por la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) liberando DAG y Pi. El involucramiento de estas dos vías sugiere la existencia de fosfolipasas inducidas transcripcionalmente que podrían degradar fosfolípidos tanto en hojas como en raíces.

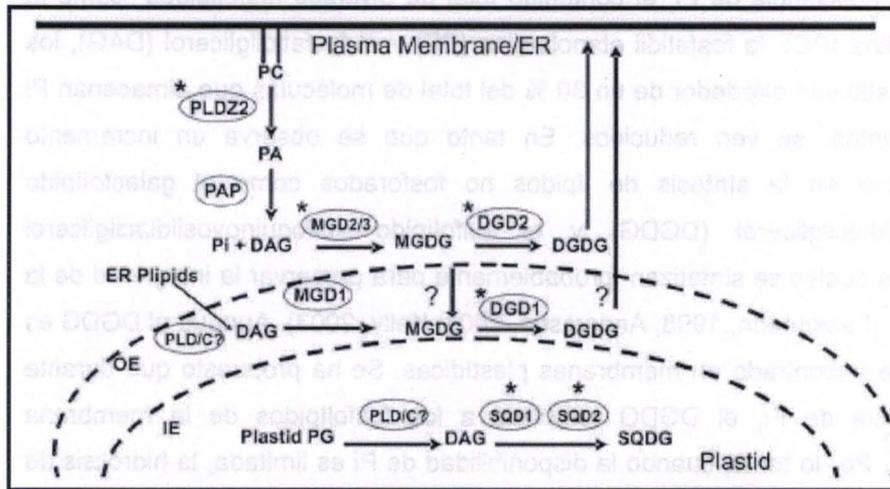


Figura 1.3 Posible involucramiento de la PLC y la PLD durante la deficiencia de Pi en la degradación de los fosfolípidos de membrana para producir PA, el cual es hidrolizado por una ácido fosfatídico fosfatasa para producir Pi. El DAG generado por la PLDz2 es el precursor para la síntesis de DGDG en una vía que es altamente regulada por la disponibilidad de Pi (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis* el gen de la familia de la PLD esta compuesta de doce miembros funcionales (Qin y Wang, 2002; Eliás *et al.*, 2002). El análisis global de la expresión de estos genes usando tecnologías de microarreglo permitió la identificación de un gen de PLD que codifica presumiblemente para una PLD que participa en la hidrólisis directa de fosfolípidos proveyendo DAG para la síntesis de galactolipidos bajo estrés de Pi; los estudios mostraron que la PLDZ2 es altamente inducida en tallos y raíces bajo condiciones de deficiencia de Pi. Una mutante de *Arabidopsis* *pldz2* se ha visto que es defectiva en la hidrólisis de fosfolípidos y

además muestra una reducción en su capacidad para acumular galactolípidos bajo condiciones limitantes de Pi. El análisis morfológico del sistema de la raíz de la mutante *pldz2* mostró un cambio prematuro en la arquitectura de la raíz en respuesta a deficiencia de Pi. Estos resultados mostraron que la *PLDZ2* esta involucrada en la vía de biosíntesis de galactolípidos en eucariontes, específicamente en la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidil etanolamina (PE) para producir diacilglicerol y para la síntesis de digalactosildiacilglicerol y Pi para sostener otros procesos que requieren Pi (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006).

La vía de degradación de fosfolípidos también ha sido estudiada para la PLC. Nakamura (2005) reportó una PLC que hidroliza PC y es inducida principalmente en respuesta a deficiencia de Pi en *Arabidopsis*. Se ha demostrado que durante la deficiencia de Pi la actividad de hidrólisis de la PC por la PLC fue altamente regulada por Pi y además la expresión de los genes de algunas PLCs fueron inducidas durante deficiencia de Pi. En el genoma de *Arabidopsis* se identificaron seis PLCs putativas, similares en secuencia de aminoácidos a la PLC que hidroliza PC en bacterias, una de las cuales NPC4, mostró una activación significativa en limitación por Pi. La clonación molecular y expresión funcional de NPC4 confirmó que es un gen que codifica para una PLC funcional que hidroliza PC y que no requiere de calcio para su actividad. El análisis de la localización subcelular mostró que la proteína NPC4 fue altamente enriquecida en la membrana plasmática. Esto sugiere que durante deficiencia de Pi la NPC4 juega un papel importante en el abastecimiento tanto de fosfato inorgánico como de DAG a partir de los fosfolípidos localizados en la membrana plasmática por medio del mecanismo de reemplazo de los lípidos polares de la raíz.

### **1.11 CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS DE CAFETO**

El café es originario de las montañas de Abisinia, África y es cultivado en muchos lugares del mundo. En la actualidad las principales áreas de producción

son África y América Tropical y de todas las especies de café, casi el 90 % de la producción mundial proviene de las plantaciones de *C. arabica*, estando el resto dividido entre otras varias especies, como *C. canephora*, *C. liberica*, *C. excelsa* y *C. stenophylla*. El genero *Coffea* consta de 25 a 40 especies en Asia y África tropicales y pertenece a la tribu *Coffeoideae* de la familia de las *Rubiaceae* (Barrientos Murrieta, 1990; Ochse *et al.*, 1976).

El café se produce en casi cualquier país de los trópicos, aunque las áreas principales están centradas en las Américas. Los países Centro y Sudamericanos producen y exportan más o menos las cuatro quintas partes de la cosecha mundial, de las cuales tan solo el Brasil llega a casi el 50 % del total. Colombia, México, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Cuba, Haití, Ecuador y Venezuela son los otros productores importantes de café arábigo en el Hemisferio Occidental.

La floración del café arábigo es marcadamente estacional, efectuándose generalmente sólo con la presencia de tiempo húmedo. Las flores de café son polinizadas por el viento y otros agentes y hay un elevado porcentaje de polinización cruzada entre las plantas adyacentes. *C. arabica* es una especie de las tierras altas con un período de floración que es marcadamente susceptible al exceso de tiempo lluvioso. Las plantas continúan su desarrollo vegetativo durante la temporada seca, pero entran en plena floración dentro de unos cuantos días o semanas después de que se ha iniciado la temporada de lluvias. El mejor café se produce en aquellas áreas que se encuentran en altitudes de 1,200 a 1,700 m, donde la precipitación pluvial anual es de 2,000 a 3,000 mm y la temperatura media anual es de 16° a 22° C (Wilson 1985).

El café prospera en un suelo profundo, bien drenado, que no sea ni demasiado ligero ni demasiado pesado. Los limos volcánicos son ideales y la reacción del suelo debe ser ácida con una variación del pH entre 4.2 a 5.1, el cual se considera el mejor para el café arábigo en Brasil y para el café robusta en el África Oriental. El café se propaga en gran escala por medio de plantas obtenidas de semilla, o

vegetativamente, por medio de injertos o estacas. El sistema actual de propagación es por medio de plantas obtenidas de semillas en las plantaciones cafetaleras e incluye el sembrar las semillas en almácigos especiales, donde las plantitas serán cuidadas hasta que se les trasplante en el campo. Cuando alcanzan una altura de 15 a 20 cm, o sea aproximadamente de seis a ocho meses después de la siembra, los arbolitos están listos para su trasplante. Los cafetos jóvenes deben tener sombra continua desde la época en que se les trasplante; consecuentemente, resulta necesario trasplantar los árboles de sombra con uno o dos años de anticipación. A menudo se les proporciona sombra temporal de manera similar a alguna otra planta de crecimiento rápido, hasta que se ha desarrollado la sombra permanente (Ochse *et al.*, 1976; Wrigley 1988).

Existe poca información en relación con las prácticas de fertilización en las plantaciones de café. Se han reportado síntomas de deficiencias de la mayoría de los elementos nutritivos esenciales. Aún en aquellos casos en que no se han desarrollado deficiencias serias, hay indicaciones de desbalance nutricional. Es bien sabido que resulta conveniente el control de la reacción del suelo, pues los árboles de café son marcadamente intolerantes a la alcalinidad, pero requieren reservas adecuadas de calcio y boro en el suelo. Una reacción del suelo mayor de pH de 5.1 generalmente da como resultado síntomas de deficiencia de hierro, mientras que un pH mas bajo de 4.2 puede producir una deficiencia típica de calcio. Los síntomas de deficiencia de este elemento son con mayor frecuencia el resultado de la toxicidad de los otros elementos, especialmente los metales pesados como el Al (Ochse *et al.*, 1976).

#### **1.11.1 Cultivo de café en México**

En México el cafeto se cultiva en los Estados de Chiapas, Michoacán, Morelos y Veracruz. Los suelos de las zonas cafetaleras de México se caracterizan por tener una topografía accidentada, lo que favorece, junto con las abundantes precipitaciones, que la capa superficial se erosione, esto es, que el agua de lluvia

tenga la facilidad para escurrir y provocar el arrastre del suelo hacia los arroyos, por lo que paulatinamente el suelo se va adelgazando y empobreciendo, puesto que la capa perdida es la más rica en nutrientes para el cafeto (Barrientos-Murrieta, 1990).

El suelo es la reserva natural de nutrimentos para las plantas, sin embargo existen suelos con bajos contenidos de nutrimentos, lo que ocasiona que los cafetos manifiesten deficiencias o mala nutrición; existen otros factores que le impiden a la planta nutrirse adecuadamente aunque el suelo contenga la cantidad suficiente de nutrientes, tales factores pueden ser: la mala formación de la raíz, el exceso de algún nutriente que impide la absorción de otros y la sequia. Un suelo representativo de las zonas cafetaleras de México posee las siguientes características: textura de migajón arcilloso o arcilloso, profundidad de 1 metro, pH entre 4.0 a 5.5, menos del 5% de materia orgánica, bajos contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio y contenidos medios de calcio y magnesio (Barrientos-Murrieta, 1990).

En forma visual se pueden identificar en el follaje de los cafetos los síntomas de deficiencias nutrimentales. Los suelos muy arcillosos ocasionan que la proliferación de raicillas secundarias o pelos absorbentes sea mínima con lo que se limita la capacidad de la planta para la absorción. Un mal trasplante o raíces mal formadas también colaboran a reducir la capacidad de absorción del cafeto. Largos períodos de sequia también acusan a una disminución en la absorción de nutrientes. Las plantas de café presentan los siguientes síntomas de deficiencias de fósforo: se observan de forma inicial en las hojas más viejas y se presentan como manchas rojizas o pardo rojizas. También se ha observado deficiencia de N, K, Ca, S, B, Fe y Zn (Barrientos-Murrieta, 1990).

#### **1.11.2 Cultivos de células en suspensión de café**

El café es uno de los cultivos más importantes de interés económico en el mundo y ha sido objeto de investigación extensiva respecto a su mejoramiento genético

con el propósito de incrementar su producción, además es muy escaso el conocimiento acerca de los procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados en las respuestas de este cultivo a diferentes tipos de condiciones extremas. Los pocos estudios relacionados con esta área se resumen en tres tópicos: la vía biosintética de la teobromina y la cafeína (Keller *et al.*, 1972), los cambios durante la embriogénesis somática (Sreenath *et al.*, 1995) y la toxicidad del aluminio sobre cultivos de café *in vitro* (Martínez-Estévez *et al.*, 2003a y b).

La regeneración de plantas vía cultivo de tejidos debería ser muy efectiva para la propagación y mejoramiento de las plantas de café. Aunque el principal objetivo de los primeros estudios fue establecer protocolos para regenerar especies de café, el desarrollo de estos protocolos y los recientes avances hicieron posible aplicar estas técnicas para el estudio de otros aspectos a nivel bioquímico y molecular.

El establecimiento de cultivos de células en suspensión ha sido usado en café para diferentes propósitos, como son la obtención de embriones somáticos (Sreenath *et al.*, 1995), el aislamiento de protoplastos (Söndahl *et al.*, 1980; Acuña y Peña, 1987) y la regeneración de plantas tolerantes a diferentes condiciones extremas (Spiral y Pétiard, 1991), etc. Además, se le ha utilizado para la producción y liberación de cafeína (Keller *et al.*, 1972) y para el aislamiento y cultivo de protoplastos de café. Por su capacidad de regeneración y homogenización, los cultivos celulares de café han sido utilizados para el estudio de mecanismos bioquímicos y enzimáticos de la toxicidad por Al (Martínez-Estévez *et al.*, 2001, 2003a y b).

## **1.12 MODELO EXPERIMENTAL**

El modelo experimental utilizado para este trabajo de investigación son células en suspensión de la línea L2 (sensible a Al), las cuales se obtienen a partir de callos obtenidos de hojas cotiledonares de *C. arabica*. Para obtener las células en

suspensión, los callos son subcultivados varias veces en un medio sólido y luego se transfieren a medio líquido para su disgregación.

Martínez-Estévez *et al.*, (2001) modificaron la composición del medio de cultivo de una línea de células en suspensión de *C. arabica* para establecer las condiciones de toxicidad con Al en términos de concentración y tiempo. Se disminuyó la concentración del medio Murashige & Skoog a la mitad de su fuerza iónica y se ajustó el pH a 4.3. Con estas modificaciones se establecieron las condiciones óptimas para realizar estudios de toxicidad por Al en células en suspensión de *C. arabica* de una forma semejante a las condiciones de toxicidad en el suelo.

Como se mencionó en el apartado 1.10.1 se ha observado que el Al inhibe el crecimiento de esta línea de células en suspensión de café en comparación con células control que no son tratadas con Al (Martínez-Estevés *et al.*, 2001) y que este efecto ha sido relacionado con la inhibición de la actividad de la PLC así como con la inhibición de la formación de segundos mensajeros como el  $IP_3$  y el DAG en presencia de Al (Martínez-Estevéz *et al.*, 2003a). Además en reportes recientes se observó que el Al es capaz de inhibir la formación de PA proveniente específicamente de la vía PLC y no de la vía PLD (Ramos-Díaz *et al.*, 2007).

En células en suspensión no se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad por Al y la deficiencia de Pi de manera conjunta por ello es importante evaluar si los efectos tóxicos del Al sobre el crecimiento celular son debidos a un efecto del Al sobre la toma de Pi y si la adición de este nutriente es capaz de mejorar los efectos del Al sobre la vía de transducción de señales.

### 1.13 HIPÓTESIS

Si el fósforo disminuye la toxicidad por Al, entonces altas concentraciones de éste nutriente en el medio de cultivo de las células en suspensión disminuirán los efectos tóxicos inducidos por Al sobre la vía de transducción de señales y sobre el crecimiento celular de las células en suspensión de *C. arabica*.

### 1.14 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la adición de fósforo sobre la toxicidad por Al en la vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos en células en suspensión de *C. arabica* L.

### 1.15 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar el efecto de la adición de  $AlCl_3$  sobre el crecimiento celular, la conductividad eléctrica y el pH en suspensiones celulares de *C. arabica* cultivadas con diferente concentración de Pi.
- ❖ Determinar la concentración de Al total en las células de café cultivadas con diferente concentración de Pi.
- ❖ Evaluar la actividad de la PLC y la PLD en suspensiones celulares de *C. arabica* cultivadas con diferentes concentraciones de Pi y tratadas con  $AlCl_3$ .
- ❖ Evaluar los niveles de las proteínas PLC y PLD por inmunodetección en células cultivadas con diferentes concentraciones de Pi y sometidas a estrés por Al.
- ❖ Evaluar el efecto del Pi sobre la actividad de las lípidos cinasas en extractos proteicos de suspensiones celulares tratadas con  $AlCl_3$ .

## 1.16 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se seguirá en el siguiente trabajo se ilustra en la figura 1.4.

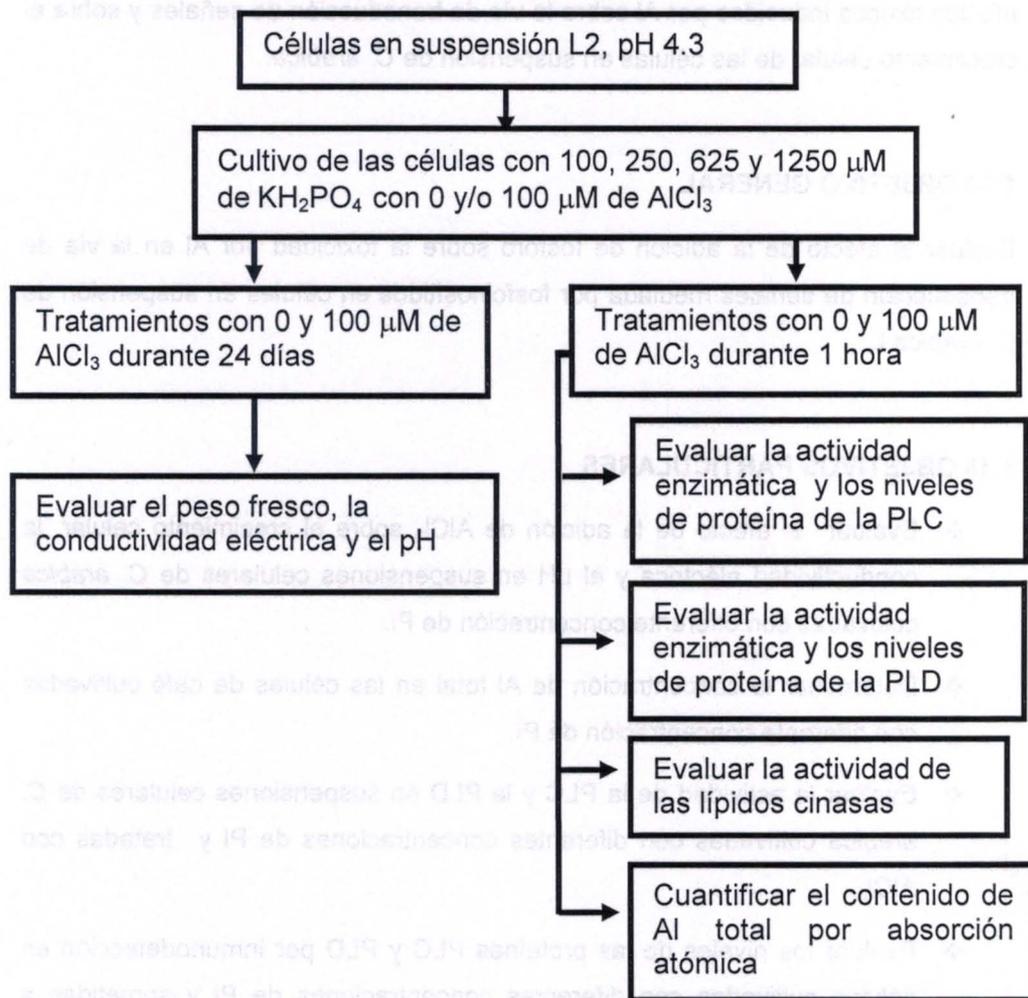


Figura 1.4 Estrategia experimental del trabajo

## 1.17 BIBLIOGRAFÍA

Acuña JR, de Peña M (1987) Isolation and culture of coffee protoplast. En: Abstr. Int. Congr. Plant. Tissue Cult., Tropical species. Bogotá, Colombia, pp. 34-35.

Alewel C (2003) Acid input into the soil from acid rain. En: Rangel Z (Ed.) Handbook of soil acidity. Marcel Decker, New York, pp. 83-115.

Ahn SJ, Sivaguro M, Osawa H, Chung GC y Matsumoto H (2001) Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol.* 126: 1381-1390.

Ahn SJ y Matsumoto H (2006) The role of the plasma membrane in the response of plant roots to aluminum toxicity. *Plant Signaling and Behavior* 1: 37-45.

Ahn SJ, Sivaguru M, Chung GC, Rengel Z y Matsumoto H (2002) Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H<sup>+</sup> across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* 53:1959-1966.

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C y Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537: 128-132.

Anghinoni y Barber SA (1980) Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. *Agron. J.* 172: 655-668.

Awai K, Marechal E, Block MA, Brun D, Masuda T, Shimada H, Takamiya K, Ohta H y Joyard J (2001) Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10960-10965.

Baes CF y Mesmer R (1976) The hydrolysis of cations. John Wiley y Sons (Eds.) New York, pp. 112.

Barber SA (1995) Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach. Wiley J y Sons (Ed.) New York, pp. 202-230.

Barber SA y Cushman J (1981) Nitrogen uptake model for agronomic crop. En: Iskander IK (Ed.) Modeling waste water renovation land treatment. Wiley-Interscience, New York, pp. 382-409.

Barber SA y Silverbush M (1984) Plant root morphology and nutrient uptake. En: Roots, nutrient and water influx and plant growth. ASA Special Publication 49, Wiley-Interscience, Madison, pp. 65-88.

Barrientos-Murrieta E. (1990) Manejo de suelos cafetaleros. En: Sáenz-Colín A. (Ed.) El cultivo del café en México, Instituto Mexicano del Café. México.

Benning C, Huang ZH y Gage DA (1995) Accumulation of a novel glycolipid and a betaine lipid in cells of *Rhodobacter sphaeroides* grown under phosphate limitation. Arch. Biochem. Biophys. 317: 103-111.

Blancaflor EB, Jones DL y Gilroy S (1998) Alteration in the cytoskeleton accompany aluminium-induced growth inhibition and morphological roots of maize. Plant Physiol. 118: 159-172.

Bolan NS (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. Plant Soil 134: 189-207.

Bolan NS, Hedley MJ y White RE (1991) Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pasture. Plant Soil 134: 53-63.

Bolan NS y Hedley MJ (2003) Role of carbon, nitrogen and sulfur cycles in soil acidification. En: Rengel Z (Ed.) Handbook of soil acidity. Marcel Decker, New York, pp. 29-56.

Bucher M, Rausch C y Daram P (2001) Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. J. Plant Nutr. Soil Sci. 164: 209-217.

Ciamporová M (2000) Diverse response of root cell structure to aluminium stress. Plant Soil 226: 113-116.

Chapman KD (1998) Phospholipase C activity during plant growth and development and in response to environmental stress. Trends Plant Sci. 3: 419-426.

Comin JJ, Barloy J, Bourrie G y Trolard F (1999) Differential effects of monomeric and polymeric aluminium on the root growth and the biomass production of root and shoot of corn in solution culture. Eur. J. Agron. 11: 115-122.

Cogliatti DH y Santa Maria GE (1990) Influx and efflux of phosphorus in roots of wheat plants in non-growth limiting concentrations of phosphorus. J. Exp. Bot. 41: 601-607.

Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E y Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 6765-6770.

Daram P, Brunner S, Ararhein N y Bucher M (1998) Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. Planta 206: 225-233.

Darkó É, Ambrus H, Stefanovits-Bányai É, Fodor J, Bakos F y Barnabás 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, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC y Randall PJ (1993) Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and distribution in root apices. Plant Physiol. 103: 685-693.

Delhaize E, Gruber BD y Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. FEBS Lett. 12: 2255-2262.

De la Fuente JM y Herrera-Estrella L (1999). Advances in the understanding of aluminum toxicity and the development of aluminum tolerant transgenic plants. Advances in Agronomy. Vol 66, Academic Press, pp. 103-119.

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

Dong D, Peng X y Yan X (2004) Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminum toxicity in two contrasting soybean genotypes. Physiol. Plant 122: 190-199.

Driscoll C y Schecher W (1988) Aluminium in the environment. En: Siegel y Siegel A (Ed.) Metal ions in biological systems. Aluminium and its role in biology. Marcel Dekker, New York, pp. 59-122.

Duff SMG, Plaxton WC y Lefebvre D (1991) Phosphate-starvation response in plant cells: De novo synthesis and degradation of acid phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9538-9542.

Duff S MG, Sarath G y Plaxton WC (1994) The role of acid phosphatase in plant phosphorus metabolism. Physiol. Plant. 90: 791-800.

Eliáš M, Potocký M, Cvrčková F y Žárský V (2002) Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. BMC Genomics 3: 1-15.

Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D y Benning C (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1950-1955.

Fischer K, Arbinger B, Kammerer B, Busch C, Brink S, Wallmeier H, Sauer N, Eckerskorn C y Flugge UI (1994) Cloning and *in vivo* expression of functional triose phosphate/phosphate translocators from C3- and C4-plants: Evidence for the putative participation of specific amino acid residues in the recognition of phosphoenolpyruvate. Plant J. 5: 215-226.

Fischer K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinger B, Weber A, Hausler RE and Flugge UI (1997) A new class of plastidic phosphate translocators: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. Plant Cell 9: 453-462.

Flugge UI (1999) Phosphate translocators in plastids. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 27-45.

Flugge UI, Fischer K, Gross A, Sebald W, Lottspeich F y Ackerskorn C (1989) The triose-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the *in vitro* synthesized precursor protein into chloroplasts. EMBO J. 8: 39-46.

Frantz G, Galatis B y Apostolakis P (2000) Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. I. Mitotic cells. New Phytol. 145: 211-224.

Föhse D, Claassen N y Jungk A (1991) Phosphorus efficiency of plants. II. Significance of root radius, root hairs and cation-anion balance for phosphorus influx in seven plant species. Plant Soil 132: 261-272.

Foy CD (1988) Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. Commun Soil Sci. Plant Anal. 19: 959-987.

Furihata T, Suzuki M y Sakurai H (1992) Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. Plant Cell Physiol. 33: 1151-1157.

Gahoonia TS y Nielsen NE (1998) Direct evidence on participation of root hairs in phosphorus ( $^{32}\text{P}$ ) uptake from soil. Plant Soil 198: 147-152.

Glass ADM y Siddiqi MY (1984) The control of nutrient uptake rates in relation to the inorganic composition of plants. Adv. Plant Nutr. 1: 103-147.

Goldstein AH (1992) Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. En: Wray JL (Ed.) Society for Experimental Biology Seminar Series 49: Inducible Plant Proteins. Cambridge University Press, pp. 25-44.

Harlan JE, Hajduk PJ, Yoon HS y Fesik SW (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol (4,5) biphosphate. *Nature* 371: 168-70.

Harrison MJ, Dewbre GR, y Liu J (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429.

Hartel H, Dörmann P y Benning C (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplasmidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10649-10654.

Hartel H y Benning C (2000) Complex lipid biosynthesis: glycosylglycerides. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 729-732.

Herman F, Smidt S, Huber S, Englisch M y Knowflacher M (2001) Evaluation of pollution-related stress factors for forest ecosystems in central Europe. *Env. Sci. Poll. Res. Intern.* 8: 231-242.

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173-195.

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

Hwang JI, Oh YS, Shin KJ, Kim H, Riu SH y Suh PG (2005) Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- $\eta$ . *Biochem. J.* 389: 181-186.

Jeschke W, Wirkby E, Peuke A, Pate J y Hartung W (1997) Effects of P efficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) *J. Exp. Bot.* 48: 75-91.

Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J y Block MA (2003) Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.* 544: 63-68.

Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV y Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production, and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment* 29: 1309-1318.

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

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

Jones DL, Gilroy S, Larsen PB, Howell SH, y Kochian LV (1998a) Effect of aluminum on cytoplasmic  $Ca^{2+}$  homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Planta* 206: 378-387.

Jones DL, Kochian LV y Gilroy S (1998b) Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiol.* 116: 81-89.

Jungk A, Seeeling B y Gerke J (1993) Mobilization of different phosphate fractions in the rhizosphere. *Plant Soil* 155/156: 91-94

Jungk A (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164: 121-129.

Kammerer B, Fischer K, Hilpert B, Schubert S, Gutensohn M, Weber A y Flugge UI (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* 10: 105-107.

Kaur N y Gupta AK (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Curr. Sci.* 88: 1771-1780.

Karandashov V y Bucher M (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* 10: 22-29.

Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo M, Damaz B y Raghothama KG (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* 130: 221-233.

Kinraide TB (1990) Assesing the rhizotoxicity of the aluminate ion  $Al(OH)^4-$ . *Plant Physiol.* 93: 1620-1625.

Kinraide TB (1991) Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134: 167-178.

Kinraide TB (1997) Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *J. Exp. Bot.* 48: 1115-1124.

Kelly AA, Froehlich JE y Dörmann P (2003) Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals

the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *Plant Cell* 15: 2694-2706.

Kelly AA y Dörmann P (2002) DGD2, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *J. Biol. Chem.* 277: 1166-1173.

Keller H, Wanner H y Baumann TW (1972) Kaffeinsynthese in fruchten und gewebeulturen von *Coffea arabica*. *Planta* 108: 339-350.

Kochian LV, Hoekenga OA y Piñeros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Kochian LV, Piñeros MA y Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274: 175-195.

Kollmeier M, Felle HH y Horst WJ (2000) Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol.* 122: 945-956.

Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM y Cancel JD (2005) ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 353-363.

Larsen PB, Cancel J, Rounds M y Ochoa V (2007) *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225: 1447-1455.

Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW y Linton RW (1994) Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips: A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. *Plant Physiol.* 106: 1107-1114.

Laxalt AM y Munnik T (2002) Phospholipid signaling in plant defense. *Curr. Opin. Plant Mol. Biol.* 5: 1-7.

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

Liu H, Trieu AT, Blaycock LA y Harrison MJ (1998a) Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in

response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 14-22.

Liu C, Muchhal US, Mukatira U, Kononowicz AK y Raghothama KG (1998b) Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol.* 116: 91-99.

Leggiewie G, Willmitzer L y Riesmeier JW (1997) Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: Identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* 9: 381-392.

Ligaba A, Yamaguchi M, Shen H, Sasaki T, Yamamoto Y y Matsumoto H (2004) Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus pilosus*). *Funct. Plant Biol.* 31: 1075-1083.

Lopez-Bucio J, Martínez-De la Vega O, Guevera-Garcia A y Herrera-Estrella L (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotech.* 18: 450-453.

Lopez-Lara IM, Sohlenkamp C y Geiger O (2003) Membrane lipids in Plant-associated bacteria: Their biosyntheses and possible functions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 567-579.

Lüttge U y Clarkson DT (1992) B. Physiology I. Mineral nutrition: aluminium. En: Behnke HD, Esser K, Kubitzki K, Runge M, Ziegler H (Eds.) *Progress in botany.* Springer-Verlag, Berlin New York, pp. 53: 63-67.

Lynch JP y Beebe SE (1995) Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort. Sci.* 30: 1165-1171.

Ma QF, Rengel Z y Kuo J (2002) Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in intact root tips. *Ann. Bot.* 89: 241-244.

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

Ma JF, Shen R, Nagao S y Tanimoto E (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiol.* 45: 583-589.

MacLean DC, Hansen KS, Schneider RE (1992) Amelioration of aluminium toxicity in wheat by fluoride. *New Phytol* 121: 81-88.

Mahler RL, Halvorson AR y Koehler F (1985) Long-term acidification of farmland in northern Idaho and eastern Washington. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 16: 83-95.

Martínez-Estévez M, Muñoz-Sánchez JA, Loyola-Vargas VM y Hernández-Sotomayor SMT (2001) Modification of the culture medium to produce aluminium toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 469-474.

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

Martínez-Estévez M, Ku-González A, Muñoz-Sánchez JA, Loyola-Vargas VM, Pérez-Brito D, Tapia-Tussell R, Escamilla-Bencomo JA, y Hernández-Sotomayor SMT (2003b) Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *J. Inorg. Biochem.* 97:6 9-78.

Matsumoto H (2002) Metabolism of organic acids and metal tolerance in plant exposed to aluminium. En: Prasad MNV, Strzalka K (Eds). *Physiology and Biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 95-109.

Matsumoto H (1988) Changes of the structure of pea chromatin by aluminum. *Plant Cell Physiol.* 29: 281-287.

Marschner H (1995) Beneficial mineral elements. En: Marschner (Ed). *Mineral nutrition of higher plants.* 2<sup>a</sup> Ed. Academic Press, London, pp. 405-434.

May HM y Nordstrom (1991) Assessing the solubilities and reaction kinetics of aluminous minerals in soils. En: Ulrich B, Sumner ME (Eds.) *Soil acidity.* Berlin: Springer Verlag, pp. 125-148.

McLean DC, Hansen KS y Schneider RE (1992) Amelioration of aluminium toxicity in wheat by fluoride. *New Phytol.* 121: 81-88.

Meijer HJ y Munnik T (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 265- 306.

Mimura T, Dietz KJ, Kaiser W, Schramm MJ, Kaiser G y Heber U (1990) Phosphate transport across biomembranes and cytosolic phosphate homeostasis in barley leaves. *Planta* 180: 139-146.

Mimura T (1995) Homeostasis and transport of inorganic of inorganic phosphate transport in plants. *Plant Cell Physiol.* 36: 1-7.

- Mimura T, Sakano K y Shimmen T (1996) Studies on the distribution, re-translocation and homeostasis of inorganic phosphate in barley leaves. *Plant Cell Environ.* 19: 311-320.
- Mimura T (1999) Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 191: 149-200.
- Miranda LN, Rowell DL (1989) Aluminium-phosphate interaction in wheat. *New Phytol.* 113: 7-12.
- Mills LN, Hunt L, Leckie CP, Aitken FL, Wentworth M, McAinsh MR, Gray JE y Hetherington AM (2004) The effect of manipulating phospholipase C on guard cell ABA-signalling. *J. Exp. Bot.* 55: 199-204.
- Miller SS, Allan PL, Menzhuber CJ, Fedorova M y Vance CP (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus stressed white lupin. *Plant Physiol.* 127: 594-606.
- Minnikin D, Abdolrahimzadeh H, y Baddiley J (1974) Replacement of acidic phospholipids by acidic glycolipids in *Pseudomonas diminuta*. *Nature* 249: 268-269.
- Muchhal US, Pardo JM y Raghothama KG (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10519-10523.
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E y Smith FW (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. 31: 341-353.
- Munnik T, De Vrije T, Irvine RF y Musgrave A (1996) Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J. Biol. Chem.* 271: 15708-15715.
- Munnik T (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *T. Plant Sci.* 6: 227-233.
- Nakahara M, Shimosawa M, Nakamura Y, Irino Y, Morita M, Kudo Y, y Fukami K (2005) A novel phospholipase C, PLC $\eta$ 2, is a neuron-specific isozyme. *J. Biol. Chem.* 280: 29128-29134.
- Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K y Ohta H (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 280: 7469-7476.

Natr L (1992) Mineral nutrients a ubiquitous stress factor for photosynthesis. *Photosynthetica* 27: 271-294.

Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Romheld V y Martinoia E (2000) Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupins (*Lupinus albus* L). *Ann. Bot.* 85: 909-919.

Ochse JS, Soule MJ, Dijkman MJ y Wehlburg C. (1976) Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Vol. II, LIMUSA, México.

Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y y Shibata D (1998) Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5: 1-9.

Pan YY, Wang X, Ma LG, y Sun DY (2005) Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Lilium daviddi* pollen. *Plant Cell Physiol.* 46: 1657-1665.

Pao SS, Paulsen IT y Saier MH (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.

Parker DR y Bertsch PM (1992) Formation of the 'Al<sub>13</sub>' tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. *Env. Sci. Technol.* 26: 914-921.

Pellet DM, Papernik LA y Kochian LV (1996) Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol.* 112: 591-597.

Petterson S y Strid H (1989) Initial uptake of aluminium in relation to temperature and phosphorus status of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *J. Plant Physiol.* 134: 672-677.

Piña-Chablé ML y Hernández-Sotomayor SMT (2001) Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Prostaglandins & Others Lipid Mediators* 65: 45-56.

Plaxton WC y Carswell MC (1999) Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plants. En: Lerner HR (Ed.) *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*. Dekker, New York, pp. 349-372.

Poirier Y, Somervffie C y Schiefelbein J (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 97: 1087-1093.

Qin C y Wang X (2002) The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD $\zeta$  with distinct regulatory domains. *Plant Physiol.* 128: 1057-1068.

Raghothama KG y Karthikeyan AS (2005) Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274: 37-49.

Ramos-Díaz A, Brito-Argaez L, Munnik T y Hernández-Sotomayor SMT (2007) Aluminium inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 225: 393-401.

Rausch C, Daram P, Brunner S, Jansa J, Lalal M, Leggewie G, Amrhein N y Bucher M (2001) A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* 414: 462-466.

Rebecchi MJ y Pentylala SN (2000) Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80: 1291-1335.

Reggiani R y Laoreti P (2000) Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 41: 1392-1396.

Rengel Z y Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159: 295-314.

Repp A, Mikami K, Mittman F y Hatmann E (2004) Phosphoinositide-specific phospholipase C is involved in cytokinin and gravity responses in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 40: 250-259.

Richardson AE (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. En: Gupta V y Grace PR (Eds.) *Soil Biota management in sustainable farming systems*. Pankhurst CE, Doube BM, CSIRO, Australia, pp. 50-62.

Rocha Façanha A y Okorokova-Façanha AL (2002) Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. *Plant Physiol.* 129: 1736-1772.

Ryan PR, DiTomaso JM y Kochian LV (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitive and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44: 437-446.

Ryan PR, Delhaize E y Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 527-560.

Sakano K, Yazaki Y y Mimura T (1992) Cytoplasmic acidification induced by inorganic phosphate uptake in suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol.* 99: 672-680.

Schachtman DP, Reid RJ y Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.

Schwarzerova K, Zelenkova S, Nick P y Opatrny Z (2002) Aluminum induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol.* 43: 207-216.

Schildknecht PH y Vidal BC (2002) A role for the cell wall in  $Al^{3+}$  resistance and toxicity: crystallinity and availability of negative charges. *Int. Arch. Biosci.* 2000: 1087-1095.

Shane MW y Lambers H (2005) Cluster roots: a curiosity in context. *Plant Soil* 274: 101-125.

Shi B, Chou K y Huag A (1993) Aluminum impacts elements of the phosphoinositide signalling pathway in neuroblastoma cells. *Mol. Cell Biochem.* 121: 109-118.

Silva IR, Smyth TJ, Moxley DF, Carter TE, Allen NS y Rufty TW (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.

Silverbush M y Barber SA (1983) Sensitivity of simulated phosphorus uptake to parameters used by a mechanistic mathematical model. *Plant Soil* 74: 93-100.

Sivaguro M y Horst WJ (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiol.* 116: 155-163.

Sivaguro M, Baluska F, Volkmann D, Felle H y Horst W (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. *Plant Physiol.* 119: 1073-1082.

Smith FW, Cybinski D y Rae AL (1999) Regulation of expression of genes encoding phosphate transporters in barley roots. En: Gissel-Nielsen G y Jensen A (Ed.) *Plant nutrition—molecular biology and genetics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 145-150.

Smith FW, Baling PM, Dong B y Delhaize E (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J.* 11: 83-92.

Smith SE y Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. 2a Ed. Academic Press, San Diego USA, pp. 605.

Smith FW (2001) Plant responses to nutritional stress. En: Hawkesford MJ y Buchner P (Ed.) Molecular Analysis of plant adaptation to the environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 249-269.

Söndahl MR, Chapman M y Sharp WR (1980) Protoplast liberation, cell wall reconstitution, and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus tissues. Turrialba. 30: 161-165.

Spiral J y Pétiard V (1991) Protoplast culture and regeneration in *Coffea* species. In. Proc. XIV Colloq. Sci. Int. Coffee. San Francisco. pp. 1-6.

Stevens DP, McLaughlin MJ y Alston AM (1997) Phytotoxicity of aluminium-fluoride complexes and their uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esculentum*. Plant Soil 192: 81-93.

Sreenath HL, Shanta HM, Babu KH y Naidu MM (1995) Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. Plant Cell Rep. 14: 670-673.

Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K y Lai FA (2002) PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. Develop. 129: 3533-3544.

Tan K y Keltjens WG (1990) Interaction between aluminium and phosphorus in sorghum plants. I. Studies with the aluminium sensitive sorghum genotypes TAM428. Plant Soil 124: 15-23.

Tang C y Rengel Z (2003) Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. En: Rengel Z (Ed.) Handbook of soil Acidity. Marcel Decker, New York. pp. 57-81.

Takita E, Koyama H y Hara T (1999) Organic acid metabolism in aluminum phosphate utilizing cells of carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Physiol. 40: 489-495.

Takabatake R, Hata S, Taniguchi M, Kouchi H, Sugiyama T y Izui K (1999) Isolation and characterization of cDNAs encoding mitochondrial phosphate transporters in soybean, maize, rice and *Arabidopsis*. Plant Mol. Biol. 40: 479-486.

Thomson BD, Clarkson DT y Brain P (1990) Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular fungus *Gigaspora margarita*. New Phytol. 116: 647-653.

Uta P, Kroken S, Roux C y Briggs SP (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13324-13329.

Vance CP, Uhde-Stone C y Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* 157: 423-447.

Vazquez MD (2002) Aluminum exclusion mechanism in root tip of maize (*Zea mays* L.): lysigeny of aluminum hyperaccumulator cells. *Plant Biology* 4: 234-249.

Vazquez MD, Poschenrieder C, Corrales I y Barcelo J (1999) Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119: 435-444.

Vitorello VA y Haug A (1996) Short-term aluminium uptake by tobacco cells: growth dependence and evidence for internalization in a discrete peripheral region. *Physiol. Plant.* 97: 536-544.

Von Uexküll HR y Mutert E (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171: 1-15.

Wang X (2001) Plant phospholipases. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.* 52: 211-231.

Wang X (2005) Regulatory function of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* 139: 566-573.

Willson KC (1985) Climate and soil. En: Clifford MN y Willson KC (Eds). *Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage*. The AVI Publishing Company, Inc., Westport, CN. pp. 97-107.

Wrigley G (1988) *Coffee. Tropical Agricultural Series*. Longman Scientific Technical and John Wiley & Sons, Inc. New York. pp. 639.

Wood PC, Wojcikiewicz RJ, Burgess J, Castleden CM y Nahorski SR (1994) Aluminium Inhibits Muscarinic Agonist-Induced Inositol 1,4,5-Trisphosphate Production and Calcium Mobilization in Permeabilized SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *J. Neurochem.* 62: 2219-2223.

Xiong L y Zhu JK (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112: 152-166.

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

Yan X, Lynch JP y Beebe SE (1995) Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: I. Vegetative response. *Crop Sci.* 35: 1086-1093.

Zhang WH, Rengel Z (1998) Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 401-409.

Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF y Matsumoto H (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol.* 138: 297-303.

Zheng SJ y Yang JL (2005) Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biol. Plant.* 49: 321-331.

## CAPÍTULO 2

### **El fósforo restaura el crecimiento celular de una línea de células en suspensión de *Coffea arabica* L. sometida a estrés por aluminio**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

El Al es el tercer elemento mas abundante en la corteza terrestre, solo después del oxígeno y el silicio, con una abundancia por arriba del 8 %. La mayor parte del Al se encuentra en forma de óxidos de Al y aluminosilicatos, los cuales no son solubles en el suelo, sin embargo cuando los suelos se tornan ácidos como resultado de los procesos naturales y por las actividades humanas (Bolan y Hedley, 2003; Herman *et al.*, 2001) el Al es solubilizado en la forma de catión trivalente ( $Al^{3+}$ ), el cual es tóxico para las plantas (Kinraide, 1991). En los suelos ácidos existen varios factores que afectan la productividad de diversos cultivos de importancia agrícola siendo los mas importantes la toxicidad por Al, el cual ha sido reconocido como el principal factor limitante de la productividad de las plantas y la deficiencia de fosfato (Pi) (Balliger y Ahlrichs, 1998, Kochian *et al.*, 2004; Foy, 1992). En cuanto a la toxicidad por Al se ha observado que concentraciones micromolares de  $Al^{3+}$  pueden inhibir el crecimiento de la raíz de muchas especies de plantas (Delhaize *et al.*, 1995; Kochian, 1995), al igual que afecta muchos procesos celulares en diversos cultivos *in vitro* donde también se ha observado que el Al inhibe el crecimiento celular de *Glycine max*, *Coffea arabica*, *Lycopersicum esculentum* y *Nicotiana tabacum* (Stass y Horst, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2001; Yakimova *et al.*, 2007; Ikegawa *et al.*, 2000).

Diversos estudios han tratado de identificar los mecanismos de tolerancia a Al que poseen diversos cultivares de plantas y se ha visto que uno de los principales mecanismos involucrados es la exudación de ácidos orgánicos, así como la modificación de las enzimas del ciclo del ácido cítrico (Delhaize *et al.*, 2007). Sin

embargo también se trató de evaluar el papel que juega el Pi en la capacidad que tienen muchas plantas eficientes en la toma de Pi para tolerar la presencia de Al, debido a la alta afinidad que tiene el Pi por el Al para formar complejos muy estables de fosfatos de Al (Cogliati y Santa María, 1990; Lutge y Clarkson, 1992). Se ha visto que la deficiencia de Pi así como la toxicidad por Al provocan una liberación de ácidos orgánicos de manera muy similar (Hinsinger, 2001; Delhaize *et al.*, 2007) y que al aumentar la concentración de Pi en el medio de cultivo disminuye la exudación de ácidos orgánicos provocado por la presencia de Al, por lo cual se le ha considerado un factor importante de tolerancia a Al. Se han realizado varios estudios en donde se evalúa el papel del Pi sobre la toxicidad por Al en el patrón de exudación de ácidos orgánicos, sin embargo los resultados muestran que el patrón de exudación de ácidos orgánicos es diferente para cada especie de planta y que cultivares de la misma especie responden diferencialmente a la toxicidad por Al y a la deficiencia de Pi (Wang *et al.*, 2007, Ligaba *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004).

El papel del Pi sobre la toxicidad por Al ya ha sido evaluado en diversas especies de plantas. En genotipos de *Glycine max* se ha visto que el Pi disminuye los efectos del Al sobre el crecimiento de las raíces y también permite que las raíces acumulen una menor cantidad de Al que los genotipos que crecen en condiciones deficientes de Pi (Liao *et al.*, 2006). En otro trabajo realizado en *Fygotyrum esculentum* (Zheng *et al.*, 2005) se ha reportado que la salida de Pi de los tallos hacia las raíces permite que las plantas toleren la presencia de Al a través de la inmovilización del Al en las raíces de las plantas, lo cual también se ha observado para *Triticum aestivum* (Pellet *et al.*, 1996). En cuanto al efecto del Pi en células en suspensión, se ha visto que las células en suspensión de *N. tabacum* que crecen en condiciones deficientes de Pi pueden tolerar la presencia de Al y tienen un aumento en la viabilidad y en el crecimiento celular cuando estas son tratadas con Al. En base a los antecedentes descritos el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del Pi sobre la toxicidad por Al como un factor resistencia a Al.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Cultivo de células en suspensión de café

Las células en suspensión de la línea L2 fueron resembradas cada 14 días en un medio de cultivo Murashige & Skoog preparado de forma casera (Cuadro 2.1) a pH 4.3. Para la preparación del medio de cultivo se disolvieron los reactivos descritos en el cuadro 2.1 en 1 L de agua destilada adicionando 3 mg de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D 13.57  $\mu\text{M}$ ), 1 mg de 6-bencil amino purina (6-BAP 4.43  $\mu\text{M}$ ), 30 g de sacarosa (87.66 mM), 0.95 g de nitrato de potasio (9.93 mM) y 0.82 g de nitrato de amonio (10.24 mM). Para preparar los medios con diferentes concentraciones de P, se agregó la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que se requiere de una solución stock 100 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los cultivos se mantuvieron a 25°C, en agitación constante a 100 rpm y en oscuridad absoluta en un cuarto para cultivos *in vitro*.

**Cuadro 2.1** Concentración de las sales del medio de cultivo Murashige & Skoog.

Solución	Componentes	Concentración (mg/L)	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220	1496
B	KI	0.415	2.5
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0125	0.052
C	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170, 85, 34 y 13.6	100, 250, 625 y 1250
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	3.1	50
	$\text{NaMoO}_4$	0.125	0.68
D	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185	750.9
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	7.8	46.155
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.3	14.96
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0125	0.05
E	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	13.9	51.12
	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	18.65	59.17
F	Tiamina HCl	0.25	0.74
	Mio inositol	100	554.9
	Cisteína	0.10	0.56

### 2.2.2 Tratamientos

Para evaluar el efecto P en la toxicidad por aluminio, las células fueron cultivadas en medio MS preparado con diferentes concentraciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100, 250, 625

y 1250  $\mu\text{M}$ ) y al momento de la resiembra se agregó 100  $\mu\text{M}$  de Al de una solución stock estéril de  $\text{AlCl}_3$ , se cultivaron 5 mL de células en suspensión en 50 mL de medio de cultivo y se dejaron crecer durante un ciclo de cultivo de 24 días evaluando el peso fresco, la conductividad eléctrica y el pH cada dos días del ciclo de cultivo.

### **2.2.3 Evaluación del crecimiento celular, el pH y la conductividad eléctrica**

Las células se cultivaron con las concentraciones de P descritas previamente, durante un período de 24 días. Cada dos días se evaluó el peso fresco, la conductividad eléctrica y el pH separando a las células del medio de cultivo por filtración al vacío. El peso fresco de las células se usó como parámetro de crecimiento y el medio de cultivo se utilizó para medir el pH en un potenciómetro (Beckman) y la conductividad eléctrica en un conductímetro (Cole-Parmer modelo 4070).

### **2.2.4 Cuantificación de Al total por absorción atómica**

Para la cuantificación de Al, las células de 14 días cultivadas con las concentraciones de P descritas fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante una hora en un agitador a 100 rpm. Después de este tiempo se pesó un gramo de las células y se secó en un horno a una temperatura de 80 °C durante dos días para obtener el peso seco, posteriormente se pasó a una mufla a 300 °C durante 1 hora y después a 500 °C por 3 horas para obtener las cenizas. Estas cenizas fueron digeridas en una placa de calentamiento con 5 mL de HCl al 40 % hasta sequedad, posteriormente las muestras se redisolviéron en 1 mL de HCl Q.P. y se aforaron hasta 5 mL con agua destilada y la concentración fue determinada a través de espectrometría de absorción atómica (PERKIN ELMER).

Para la cuantificación de Al se utilizó un estándar de  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  en ácido nítrico al 2 % (PERKIN ELMER). Se prepararon diluciones para una curva estándar de 5, 10, 15, 25, 50 y 100 ppm de Al en una matriz de cloruro de lantano al 0.1 % para

evitar la ionización de los estándares. La curva de calibración se realizó hasta una concentración 100 ppm debido a que el equipo de absorción atómica empleado exhibe un rango lineal hasta esta concentración. Las absorbancias de las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 309.3 nm en un espectro de absorción atómica. La concentración de Al en las muestras se determinó aplicando un análisis de regresión lineal de las absorbancias obtenidas (Quintal-Tun *et al.*, 2007).

## **2.3 RESULTADOS**

### **2.3.1 Efecto del Pi sobre el crecimiento celular**

Las células en suspensión de *C. arabica* son cultivadas normalmente en un medio de cultivo MS a la mitad de su fuerza iónica con una concentración de Pi de 625  $\mu\text{M}$ . En estas condiciones de cultivo se ha observado que el Al inhibe el crecimiento celular de las suspensiones de *C. arabica* cuando estas son tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b). Por lo cual era importante determinar la concentración mínima de Pi con la que las células lograban crecer, para esto se evaluaron cuatro diferentes concentraciones de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y se determinó que la concentración mínima era de 100  $\mu\text{M}$  debido a que a concentraciones menores de Pi el crecimiento de las células era inhibido por completo. Se realizó una curva de crecimiento de 24 días usando diferentes concentraciones de Pi; se utilizó 100  $\mu\text{M}$  como indicador de deficiencia de Pi, 250  $\mu\text{M}$ , 625  $\mu\text{M}$  como una concentración testigo y se evaluó una concentración de 1250  $\mu\text{M}$ , la cual es la concentración de Pi del medio MS a su fuerza iónica completa, para estudiar si los efectos del Al sobre el crecimiento celular eran compensados por concentraciones elevadas de Pi.

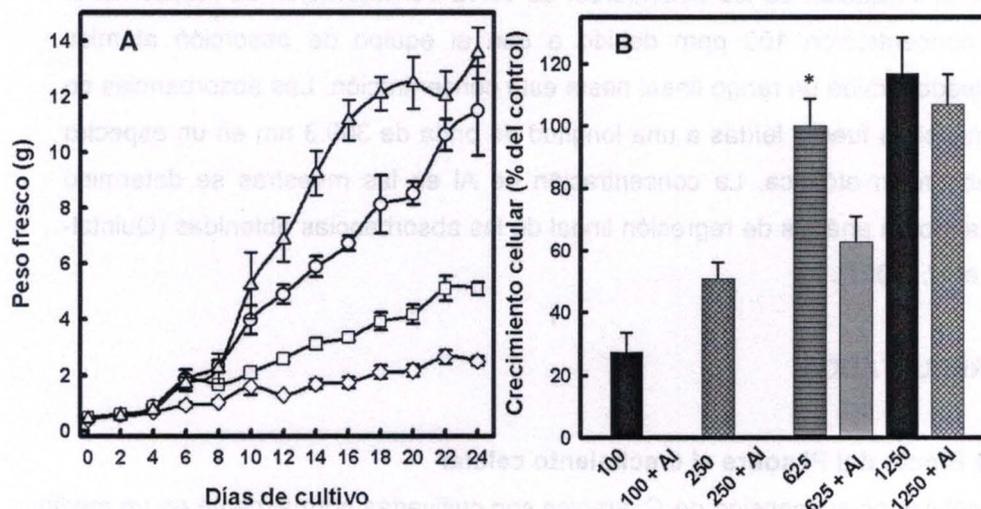


Figura 2.1 Efecto del Pi y Al sobre el crecimiento celular. (A) Las células de café fueron cultivadas con 100 (◇), 250 (□), 625 (○) y 1250 (△)  $\mu\text{M}$  de Pi durante un ciclo de cultivo de 24 días y se evaluó el peso fresco cada dos días. B) Las células del día 14 cultivadas con las cuatro concentraciones de Pi fueron resembradas en un medio de cultivo con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  y se dejaron crecer durante 14 días, tiempo en el cual se evaluó el crecimiento celular. El asterisco indica el tratamiento control (625  $\mu\text{M}$  de Pi sin Al) el cual alcanzó un peso de 6.11 g

En la figura 2.1A se muestra el comportamiento de las células con las diferentes concentraciones de Pi y se indica por medio del peso fresco el crecimiento celular. Se puede observar que el crecimiento de las células es dependiente de la concentración de Pi, ya que si se aumenta la concentración de este nutriente las células crecen de una manera mas eficiente alcanzando un máximo de crecimiento de 14 g con 1250  $\mu\text{M}$  (Figura 2.1A).

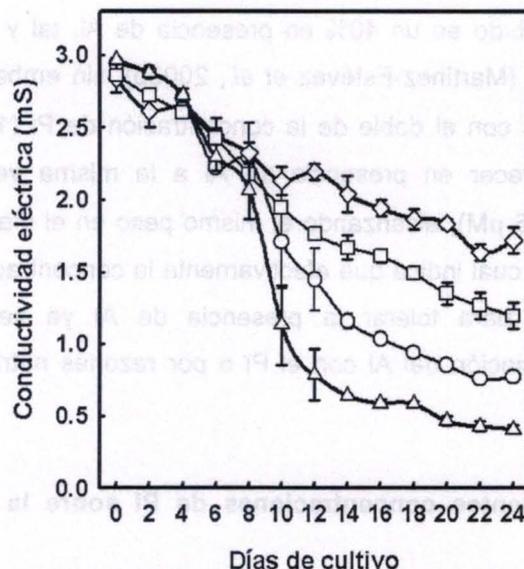
Cuando las células se trataron con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  se observaron diferentes respuestas para los cuatro tratamientos (figura 2.1B), por una parte las células que se encontraban en condiciones de baja concentración de Pi (100 y 250  $\mu\text{M}$ ) y que tenían poco crecimiento, mostraron una inhibición total en el crecimiento celular cuando fueron tratadas con Al. Una de las razones para este comportamiento pudiera estar relacionado con la alta asociación del Al a la poca cantidad de Pi

disponible en el medio de cultivo, por lo que las células al ser privadas de este Pi detenían su crecimiento y se morían. En el tratamiento con 625  $\mu\text{M}$  de Pi el crecimiento se vio inhibido en un 40% en presencia de Al, tal y como se había reportado previamente (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b), sin embargo cuando las células fueron tratadas con el doble de la concentración de Pi (1250  $\mu\text{M}$ ), estas fueron capaces de crecer en presencia de Al a la misma velocidad que el tratamiento testigo (625  $\mu\text{M}$ ), alcanzando el mismo peso en el día 14 del ciclo de cultivo (figura 2.1B), lo cual indica que efectivamente la concentración de Pi es un parámetro importante para tolerar la presencia de Al ya sea por razones fisicoquímicas de asociación del Al con el Pi o por razones nutricionales de las células.

### **2.3.2 Efecto de diferentes concentraciones de Pi sobre la conductividad eléctrica**

La conductividad eléctrica (CE) del medio de cultivo es un parámetro que indica la cantidad de iones o electrolitos disueltos y muestra como las células van agotando sus nutrientes del medio a través de una disminución de la fuerza iónica total, por lo cual es un factor que nos indica como el Pi en el medio de cultivo puede influenciar la toma de los nutrientes por las células.

En la figura 2.2 se muestra el comportamiento de las células con los diferentes tratamientos de Pi. Se puede observar que a bajas concentraciones existe una menor toma de los nutrientes del medio de cultivo lo cual también se refleja en el crecimiento pobre de las células (figura 2.1A), sin embargo al aumentar la concentración de Pi la toma de nutrientes se hace más eficiente hasta agotarlos casi por completo en el día 24 con el tratamiento de 1250  $\mu\text{M}$  de Pi, donde se observó el mayor crecimiento de las células (figura 2.1A). Estos resultados indican que el Pi es un nutriente esencial para el crecimiento celular y que influencia de alguna forma la capacidad de las células de tomar el resto de los nutrientes del medio de cultivo.

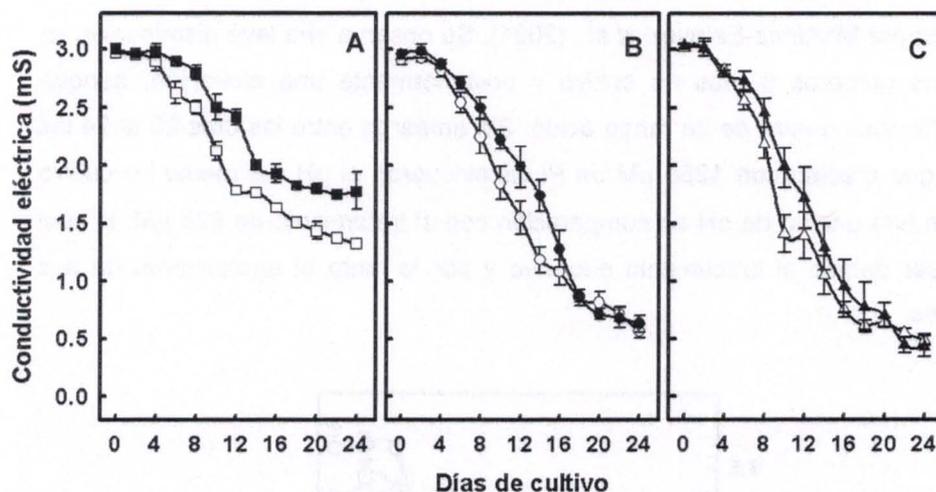


**Figura 2.2.** Efecto de la concentración de Pi sobre la conductividad eléctrica del medio de cultivo. Las células en suspensión fueron cultivadas con 100 (◇), 250 (□), 625 (○) y 1250 μM de Pi (△) durante 24 días y se evaluó la conductividad eléctrica del medio de cultivo cada 2 días.

Posteriormente también se evaluó la CE del medio de cultivo de las células tratadas con 100 μM de  $AlCl_3$  (Figura 2.3) para los cuatro tratamientos de Pi. Debido a que las células que fueron cultivadas con 100 μM de Pi no fueron capaces de crecer en presencia de Al desde los primeros dos días de tratamiento, no fue posible evaluar la CE para esta concentración de Pi. En cuanto al tratamiento con 250 μM de Pi se observó que la CE era mas alta para el tratamiento con Al, mostrando un patrón muy similar al tratamiento con 100 μM de Pi sin Al (figura 2.2).

Estos resultados indicaban que la presencia de Al en el medio de cultivo provocaba una disminución de la concentración de Pi disponible para las células y por eso al agregar 100 μM de Al en el medio de cultivo en el tratamiento de 250

$\mu\text{M}$  la CE era igual al tratamiento de  $100 \mu\text{M}$  de Pi sin Al. Para los tratamientos con  $625$  y  $1250 \mu\text{M}$  de Pi se observó una leve diferencia en la CE del medio de cultivo en presencia de Al, estos resultados indican que el efecto del Al sobre el crecimiento celular puede ser debido a una disminución de la cantidad de Pi disponible para las células, por lo que al aumentar la concentración de Pi en el medio de cultivo también disminuyen los efectos del Al sobre el crecimiento celular.

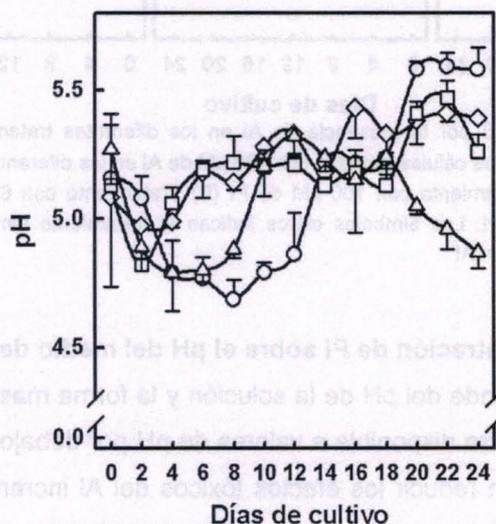


**Figura 2.3.** Cambios en la CE por la presencia de Al en los diferentes tratamientos con Pi. Se recolecto el medio de cultivo de las células tratadas con  $100 \mu\text{M}$  de Al en las diferentes concentraciones de Pi durante 24 días. (A) Tratamiento con  $100 \mu\text{M}$  de Pi (B) Tratamiento con  $625 \mu\text{M}$  de Pi y (C) Tratamiento con  $1250 \mu\text{M}$  de Pi. Los símbolos claros indican el tratamiento sin Al y los símbolos oscuros indican el tratamiento con Al

### 2.3.3 Efecto de la concentración de Pi sobre el pH del medio de cultivo

La solubilidad del Al depende del pH de la solución y la forma más tóxica para las plantas el  $\text{Al}^{3+}$  se encuentra disponible a valores de pH por debajo de 4.5. Debido a esto las plantas pueden reducir los efectos tóxicos del Al incrementando el pH de la solución. Se ha observado que la mutante de *Arabidopsis alr-104*, la cual es tolerante a Al es capaz de alcalinizar la rizósfera en presencia de Al a diferencia de la planta tipo silvestre que no muestra esta respuesta cuando es tratada con Al

(Degenhardt *et al.*, 1998). Debido a esto era necesario evaluar si las modificaciones en la concentración de Pi del medio de cultivo tenían algún efecto sobre las células que provocara algún cambio en el pH del medio de cultivo. Para esto se recolectó el medio de cultivo de los diferentes tratamientos cada dos días durante un ciclo de cultivo de 24 días. Como se puede observar en la figura 2.4, no hubo diferencia en el pH entre los cuatro tratamientos con Pi para los primeros 14 días de cultivo mostrando un comportamiento muy similar para todos los tratamientos alcanzando valores de 5.5 a 4.8, un rango normal muy similar a lo reportado por Martínez-Estévez *et al.*, (2001). Se observa una leve disminución en el pH los primeros 6 días de cultivo y posteriormente una elevación, aunque manteniéndose dentro de un rango ácido. Sin embargo entre los días 20 al 24 las células que crecían con 1250  $\mu\text{M}$  de Pi disminuyeron el pH del medio de cultivo hasta en una unidad de pH en comparación con el tratamiento de 625  $\mu\text{M}$ , lo cual podría ser debido al crecimiento excesivo y por lo tanto al agotamiento de sus nutrientes.



**Figura 2.4.** Efecto de la concentración de Pi sobre el pH del medio de cultivo. Las células en suspensión fueron cultivadas con 100 ( $\diamond$ ), 250 ( $\square$ ), 625 ( $\circ$ ) y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi ( $\triangle$ ) durante 24 días y se evaluó el pH del medio de cultivo cada dos días.

Cuando se evaluó el pH del medio de cultivo de las células tratadas con Al se observó en todos los tratamientos que la presencia de Al provocaba una disminución del pH del medio de cultivo, la respuesta mas evidente se observa en la figura 2.5A en donde se observa una disminución de hasta una unidad de pH en el tratamiento con 250  $\mu\text{M}$  de Pi en presencia de Al en comparación al tratamiento sin Al. En los tratamientos de 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi la diferencia fue mas baja aunque se sigue observando el patrón de disminución del pH en presencia de Al. De igual forma a la CE no fue posible evaluar el pH del tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  de Pi debido a la muerte de las células en los primeros días de tratamiento con Al. No se sabe cual es la razón de la disminución del pH del medio de cultivo en presencia de Al pero es posible que la inhibición del crecimiento celular en los tratamientos con Al provoquen una respuesta de acidificación por medio de la liberación de protones.

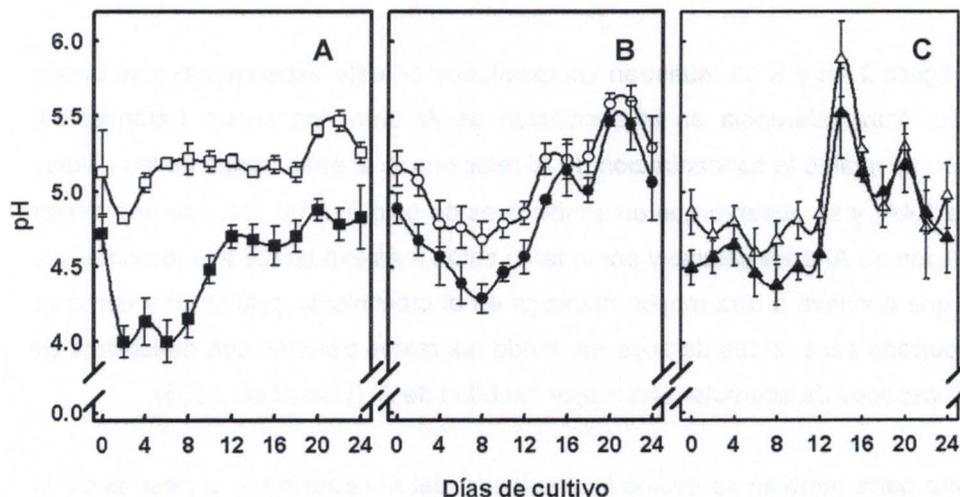


Figura 2.5. Efecto del Al sobre el pH del medio de cultivo en los diferentes tratamientos con Pi. Las células en suspensión fueron cultivadas en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  en los diferentes medios de cultivo con 100  $\mu\text{M}$  (A), 625  $\mu\text{M}$  (B) y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi (C) durante un ciclo de cultivo de 24 días. Los símbolos claros indican el tratamiento sin Al y los símbolos oscuros el tratamiento con Al.

### 2.3.4 Cuantificación del contenido de Al en las células en suspensión

En un trabajo realizado en suspensiones celulares de tabaco se vió que el grado de acumulación de Al en las células dependía de los componentes del medio de cultivo. En un medio simple que únicamente contenía  $\text{CaCl}_2$  y sacarosa la acumulación de Al en las células iniciaba inmediatamente después de la exposición a Al e incrementaba progresivamente hasta que la mayor parte del Al del medio de cultivo se unía a las células (Ikegawa *et al.*, 2000). En este era importante evaluar como la concentración de Pi en el medio de cultivo afectaba la disponibilidad y la asociación de Al a las células de café. Para esto las células de 14 días cultivadas en los medios de cultivo modificados en la concentración de Pi fueron tratadas con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 1 hora; posteriormente se filtraron a vacío y se tomó un gramo de células, las cuales fueron calcinadas y tratadas con una hidrólisis ácida para evaluar la concentración de Al total en las células por absorción atómica (Quintal-Tun *et al.*, 2007).

En la figura 2.4A y B se muestran los resultados de este experimento y se puede ver una clara diferencia en la asociación de Al entre los cuatro tratamientos. Primero se evaluó la concentración de Al relacionado al peso fresco de las células (figura 2.4A) y se observó que en condiciones de bajo Pi ( $100 \mu\text{M}$ ) hay una mayor asociación de Al a las células y por lo tanto están más expuestas a la toxicidad por Al, lo que conlleva a una mayor inhibición en el crecimiento celular tal y como se ha reportado para raíces de soya en donde las raíces tratadas con deficiencia de Pi son capaces de acumular una mayor cantidad de Al (Liao *et al.*, 2006).

Por otra parte también se evaluó la asociación del Al relacionado al peso seco de las células (figura 2.4B) y se observa un patrón más claro de asociación que es proporcional a la concentración de Pi en el medio de cultivo. Se puede ver que a menor concentración de Pi existe una mayor asociación de Al a las células misma que disminuye si las células crecen a concentraciones elevadas de Pi, por lo que

estos resultados nos indican que la asimilación del Al podría estar siendo afectada por la concentración de Pi en el medio de cultivo a través de una asociación de los iones Pi con el  $Al^{3+}$ . Estos resultados junto con los de la CE y el crecimiento celular nos indican que posiblemente los efectos del Al sobre el crecimiento celular se deben a que el Al estaría formando fuertes complejos con el Pi, disminuyendo de esta forma la concentración de Pi disponible para las células en el medio de cultivo, por lo tanto si se agrega una mayor cantidad de Pi los efectos del Al son revertidos porque existe una menor cantidad de Al libre para las células y una mayor cantidad de Pi disponible.

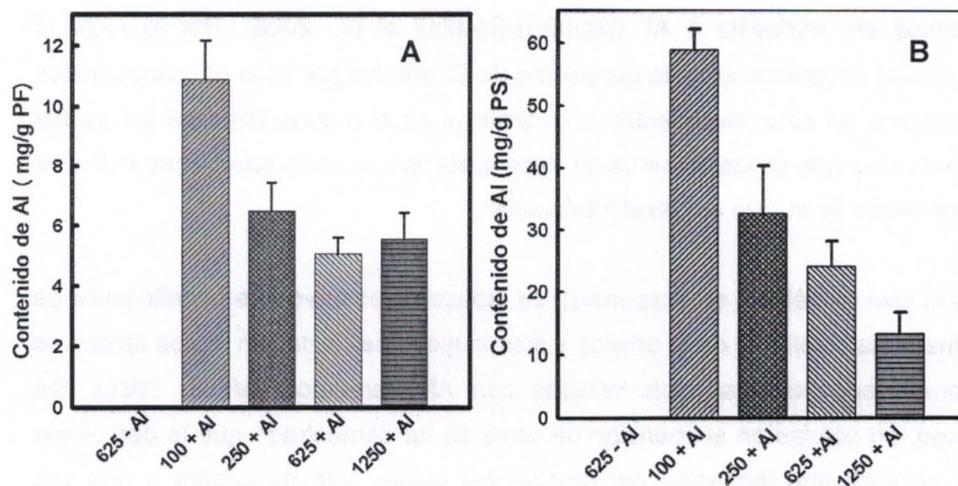


Figura 2.6 Determinación del contenido de Al total en las células de café tratadas con  $100 \mu M$  de  $AlCl_3$  durante 1 hora y a diferentes concentraciones de P. A) Evaluación relacionado al peso fresco y B) determinación de Al relacionado al peso seco de las células.

## 2.4 DISCUSIÓN

Varios estudios en plantas han demostrado que la presencia de altas concentraciones Pi disminuyen los efectos tóxicos ocasionados por el Al a través de modificaciones en el patrón de exudación de ácidos orgánicos (Liao *et al.*,

2006; Ligaba *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004). Se ha demostrado que tanto la deficiencia de Pi como la toxicidad por Al inducen la exudación de ácidos orgánicos hacia la rizósfera (Hinsinger, 2001; Ryan *et al.*, 2001), sin embargo también se ha visto que las plantas responden de manera diferencial a ambos tipos de estrés. En un estudio con raíces de *Lupinus albus* se observó que la exudación de citrato inducido por Al es diferente a la exudación provocada por deficiencia de Pi y que esta respuesta depende de la zona de la raíz que se evalúe, de la etapa de desarrollo de la planta, del estado nutricional de fósforo de la planta y del tipo de estrés (Wang *et al.*, 2007). Además en células en suspensión de *C. arabica* se ha observado que el único ácido orgánico que exudan las células es malato y que el patrón de exudación de este ácido orgánico no cambia en respuesta a Al. (Ramírez-Benitez *et al.*, 2008). Por lo tanto la restauración del crecimiento de las células de *C. arabica* por altas concentraciones de Pi parece no estar relacionado con cambios en el metabolismo de los ácidos orgánicos sino que probablemente se debe a efectos de asociación entre el Pi y el Al en el medio de cultivo o a nivel intracelular.

En un cultivo de células en suspensión de tabaco se observó que la deficiencia de Pi aumenta la viabilidad de la células y disminuye la peroxidación de los lípidos de membrana cuando estas son tratadas con Al (Yamamoto *et al.*, 1996). Sin embargo, en células en suspensión de arroz se ha demostrado que la deficiencia de Pi provoca una inhibición del crecimiento celular que es debida a una alta acumulación de putrecina (Chiung-Yuen y Ching-Huei, 1996) e induce la expresión de enzimas fosfatasas (Lefebvre *et al.*, 1990; Duff *et al.*, 1991). En nuestro modelo de estudio se observó que la deficiencia de Pi provoca que las células sean más susceptibles a la presencia de Al, ya que al ser tratadas con Al el crecimiento de las células es inhibido. Este efecto puede estar relacionado con la formación de especies reactivas de oxígeno y con la muerte celular programada como se ha visto para raíces de *Zea mays* y para células en suspensión de *Hordeum vulgare* que son tratadas con Al (Boscolo *et al.*, 2003; Jian-wei *et al.*, 2002), sin embargo

para este modelo de estudio aún no se tienen datos acerca de estas respuestas. Se ha reportado que la inhibición del crecimiento celular causado por la toxicidad por Al en células en suspensión de *Hordeum vulgare* es debido a una muerte celular programada causada por la disminución de la viabilidad de las células (Jian-Wei *et al.*, 2002). Otra posibilidad es que la inhibición del crecimiento de las células pueda ser debido a que el Al afecta diversos procesos de transporte de Pi inhibiendo la toma de este nutriente por las células. En un estudio con raíces de maíz se demostró que los complejos de  $AlF_x$  son capaces de unirse a los sitios de unión de Pi de varias proteínas funcionando como análogos del fosfato inorgánico e impidiendo la toma de  $^{32}Pi$  por las células de las raíces (Rocha Façanha y Okorokova-Façanha, 2002). Aunque no se tienen datos acerca de estas respuestas, la inhibición del crecimiento de las células de *C. arabica* por el Al si esta relacionado con la cantidad de Pi disponible para las células.

Existen reportes que indican que la adición de Pi al medio de cultivo compensa el efecto causado por el Al sobre el crecimiento celular de *Arthrobacter*, una bacteria típica de suelos ácidos (Illmer *et al.*, 2005). En plantas también se ha demostrado que el Pi le permite a los genotipos de soya acumular una menor cantidad de Al en las raíces, lo que conlleva a una disminución de los efectos tóxicos del Al; además les permite tener un mejor crecimiento cuando las raíces se encuentran sometidas a estrés por Al (Liao *et al.*, 2006). En plantas de *Fygopyrum esculentum* Moench se observó que la adición de Pi inmoviliza al Al presente en el tejido de las raíces, lo que indica que la alta resistencia de estas plantas a Al era debido a su eficiencia en la toma de Pi y a su capacidad de inmovilizar al Al en las raíces y evitar su entrada a los tejidos superiores (Zheng *et al.*, 2005). Estas respuestas también se pudieron observar en nuestro modelo de estudio ya que a mayor concentración de Pi las células presentaron una menor asociación de Al y también una mejora en el crecimiento celular.

Por otra parte la presencia de las diferentes concentraciones de Pi no afectaron el pH del medio de cultivo, indicando que las células no alcalinizan el medio de cultivo en presencia de Al como se ha visto para raíces (Degenhardt *et al.*, 1998). Sin embargo la concentración de Pi si afecta la toma de nutrientes la cual es mas lenta a bajas concentraciones de Pi y mas rápida con altas concentraciones de Pi lo cual también se refleja en el crecimiento celular.

En otros trabajos se ha observado que el Pi puede ayudar a las plantas a tolerar la presencia de Al por medio de la precipitación del Al con el Pi. En *Fygotyrum esculentum* Moench se ha observado que el principal mecanismo de detoxificación de Al esta relacionado con la inmovilización de este metal por el Pi (Zheng *et al.*, 2005). Además este mecanismo podría estar relacionado con la salida o movimiento de Pi de los tallos hacia las raíces para evitar la entrada de Al e impedir su transporte hacia las plantas por medio de la precipitación del Al con el Pi apical (Pellet *et al.*, 1996).

## 2.5 BIBLIOGRAFÍA

Balliger CV y Ahlrichs JL (1998) Nature and distribution of acid soils in the world. En: Schaffert (Ed.) Proceedings of the workshop to develop a strategy for collaborative research and dissemination of technology in sustainable crop production in acid savannas and other problems soils of the world. Purdue University, pp. 1-11.

Bolan NS y Hedley MJ (2003) Role of carbon, nitrogen and sulfur cycles in soil acidification. En: Rengel Z (Ed.) Handbook of soil acidity. Marcel Decker, New York, pp. 29-56.

Boscolo P, Menossi M y Jorge R (2003) Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochem.* 62: 181-189.

Chiung-Yuen S y Ching-Huei K (1996) Growth inhibition in suspension-cultured rice cells under phosphate deprivation is mediated through putrescine accumulation. *Plant Physiol.* 111: 721-724.

Cogliatti DH y Santa Maria GE (1990) Influx and efflux of phosphorus in roots of wheat plants in non-growth limiting concentration of phosphorus. J. Exp. Bot. 41: 601-607.

Degenhardt J, Larsen PB, Howell S y Kochian LV (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 ES y Ryan PR (1995) Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol. 107: 315-321.

Delhaize E, Gruber BD y Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. FEBS Lett. 12: 2255-2262.

Dong D, Peng X y Yan X (2004) Organic exudation induced by phosphorus and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. Physiol. Plant. 122: 190-199.

Duff SMG, Plaxton WC y Lefebvre D (1991) Phosphate-starvation response in plant cells: De novo synthesis and degradation of acid phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9538-9542.

Foy CD (1992) Soil chemical factors limiting plant root growth. En: Hatfield JL, Stewart BA (Eds.) Advances in soil sciences: Limitations to plant root growth. Springer Verlag, New York pp. 97-149.

Herman F, Smidt S, Huber S, Englisch M y Knowflacher M (2001) Evaluation of pollution-related stress factors for forest ecosystems in central Europe. Env. Sci. Poll. Res. Intern. 8: 231-242.

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. Plan Soil 273: 173-195.

Ikegawa H, Yamamoto Y y Matsumoto H (2000) Responses to aluminum of suspension cultured tobacco cells in a simple calcium solution. Soil Sci. Plant Nutr. 46: 503-514.

Illmer P y Erlebach C (2005) Phosphorus compensates Aluminium-induced effects on *Arthrobacter* cells. Microbiology 74: 741-743.

Jian-Wei P, Mu-Yuan Z, Hong C y Ning H (2002) Inhibition of cell growth caused by aluminum toxicity results from aluminum-induced cell death in barley suspension cells. J. Plant Nutr. 25: 1063-1073.

Kinraide TB (1991) Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant Soil* 134: 167-178.

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

Kochian LV, Hoekenga OA y Piñeros MA (2005) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanism of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459-493.

Lefebvre D, Duff SMG, Fife CA, Julien-Inalsingh C y Plaxton WC (1990) Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells. Enhancement of intracellular, cell surface, and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate. *Plant Physiol.* 93: 504-511.

Ligaba A, Yamaguchi M, Shen H, Sasaki T, Yamamoto Y y Matsumoto H (2004) Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and citrate exudation in grater purple lupin (*Lupinus piluosus*). *Funct. Plant Bio.* 31: 1075-1083.

Liao H, Wan H, Shaff J, Wang X, Yan X y Kochian L (2006) Phosphorus and aluminium interaction in Soybean in relation to aluminium tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant Physiol.* 141: 674-684.

Lüttge U y Clarkson DT (1992) B. Physiology I. Mineral nutrition: aluminium. En: Behnke HD, EsserK, Kubitzki K, Runge M, Ziegler H (Eds.) *Progress in botany*. Springer Verlag, Berlin, New York, pp. 53: 63-67.

Martínez-Estévez M, Muñoz-Sánchez JA, Loyola-Vargas VM y Hernández-Sotomayor SMT (2001) Modification of the culture medium to produce aluminium toxicity in cell suspension of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Rep.* 20: 469-474.

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

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

Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for tapad growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-495.

Pellet DM, Papernik LA y Kochian LV (1996) Multiple aluminum-resistance mechanism in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiol.* 112: 591-597.

Quintal-Tun F, Muñoz-Sánchez JA, Ramos-Díaz A, Escamilla-Bencomo A, Martínez-Estévez M, Exley C y Hernández-Sotomayor SMT (2007) Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid. *J. Inorg. Biochem.* 101: 362-369.

Ramírez-Benítez JE, Chee-González L y SMT Hernández-Sotomayor (2008) Aluminium induces changes in organic acids metabolism in *Coffea arabica* suspension cells with differential Al-tolerance. *J. Inorg. Biochem.* 102: 1631-1637.

Ryan PR, Delhaize E y Jones DL (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52: 527-560.

Rocha-Façanha A y Okorokova-Façanha AL (2002) Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. *Plant Physiol.* 129: 1736-1772.

Stass A y Horst WJ (1995) Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Plant Soil* 171: 113-118.

Wang BL, Shen JB, Zhang WH, Zhang FS y Neumann G (2007) Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminum. *New Phytol.* 176: 581-589.

Yamamoto Y, Masamoto K, Rikiishi S, Hachiya A, Yamaguchi Y y Matsumoto H (1996) Aluminum tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 112: 217-227.

Yakimova E, Kapchina-Toteva VM y Woltering EJ (2007) Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiol.* 164: 702-708.

Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF y Matsumoto H (2005) Inmovilization of aluminium with phosphorus in roots is associates with high aluminum resistance in Buckwheat. *Plant Physiol.* 138: 297-303.



## CAPÍTULO 3

### **La vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos responde diferencialmente a la deficiencia de Pi y a la toxicidad por Al**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

Todos los organismos perciben señales ambientales y químicas mediante diferentes mecanismos o receptores específicos. Una vez estimulados los receptores inducen una cascada intracelular de eventos que conducen a la regulación de genes específicos o a la modificación de la actividad celular, produciendo una respuesta biológica. Los agentes señalizadores mas comunes para muchas vías diferentes son el  $\text{Ca}^{2+}$ , los fosfolípidos de inositol, las proteínas G, los nucleótidos cíclicos, las proteínas cinasas, las proteínas fosfatasa y las fosfolipasas (Clarck *et al.*, 2001). Los fosfolípidos son componentes de las membranas localizados normalmente con los receptores de membrana, por lo que la activación de un receptor es a menudo traducido directa o indirectamente en la activación de una enzima efectora que usa lípidos como sustrato para convertirlos en moléculas señalizadoras. Los fosfolípidos como el ácido fosfatídico (PA) y los fosfolípidos de inositol son rápidamente formados en respuesta a una variedad de estímulos vía lípido cinasas o fosfolipasas y se ha visto que participan como segundos mensajeros ante diversos tipos de estímulos en plantas (Munnik, 2001).

En células eucariotas las lípido cinasas específicas involucradas en la síntesis de las moléculas fosforiladas están localizadas en varios compartimentos celulares como la membrana plasmática, las endomembranas, el citoesqueleto o el núcleo y las proteínas representativas de esta familia de enzimas son: la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) y la fosfatidilinositol fosfato 5-cinasa (PIP-4K) y la diacilglicerol cinasa (DGK) entre otras (Heilmann *et al.*, 2000). Estas enzimas utilizan como sustratos a los lípidos de membrana, los cuales son

un importante grupo complejo de señales o precursores de señales involucrados en numerosas vías independientes.

Una de las principales vías de señalización lipídica es la que involucra a la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) y produce dos moléculas señal el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG), que inducen la liberación de Ca<sup>2+</sup> citosólico y la activación de proteínas cinasas respectivamente. Otra enzima importante que participa en esta vía es la DGK, que fosforila el DAG producido por la PLC para producir PA. A diferencia del DAG, el PA ha llegado a ser aceptado como una molécula señal (Munnik, 2001) y por lo tanto la DGK podría ser una importante enzima señalizadora dado que en plantas esta enzima convierte rápidamente el DAG producido por la PLC en PA (Munnik *et al.*, 1998; Van der Luit *et al.*, 2000; Munnik *et al.*, 2000; Den Harteg *et al.*, 2003; Meijer *et al.*, 2001).

Estas vías de señalización son activadas o inhibidas por diferentes tipos de condiciones ambientales extremas; por ejemplo se ha reportado que la deficiencia de fosfato (Pi) activa esta vía de señalización (Nakamura *et al.*, 2005; Cruz-Ramírez *et al.*, 2006), mientras que la toxicidad por aluminio (Al) la inhibe (Jones y Kochian, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2003a). Estos dos factores de estrés son muy importantes debido a que coexisten en los suelos ácidos y porque afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ciamporová, 2002).

Cuando existe deficiencia de Pi, todo el contenido de fosfolípidos el cual corresponde al 30% del total de Pi almacenado, disminuye e inversamente el contenido de galactolípidos no fosforados como el mono y el digalactosildiacilglicerol (MGDG y DGDG) incrementan significativamente (Härtel *et al.*, 2000). Estos galactolípidos son ubicuos en las plantas, pero únicamente son encontrados en los plástidos, especialmente en membranas fotosintéticas (Joyard *et al.*, 1998). Estos galactolípidos son sintetizados por la galactosilación del diacilglicerol (DAG) por una MGDG sintasa y una DGDG sintasa en las

membranas que envuelven a los plástidos. Sin embargo, durante la deficiencia de Pi, se ha reportado una acumulación de DGDG en membranas extraplastídicas (Lynch, 1995), reemplazando muchos de los fosfolípidos constitutivos de la membrana plasmática de la raíz (Andersson *et al.*, 2003). En este contexto la hidrólisis de fosfolípidos para la producción de DAG se considera como el principal paso para proveer una fuente disponible de Pi y el sustrato primario para la síntesis de galactolípidos.

Se han propuesto dos vías alternativas para la producción de DAG a partir de fosfolípidos: una por la hidrólisis directa a través de la PLC y la otra por una reacción indirecta en dos pasos que involucra a la fosfolipasa D (PLD) que produce PA y posteriormente una ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) que produce DAG y Pi. El involucramiento de estas dos vías sugiere la existencia de fosfolipasas inducidas transcripcionalmente que podrían degradar fosfolípidos. Se ha reportado la activación de una PLC que hidroliza fosfatidilcolina (PC), la cual únicamente incrementa su transcripción durante deficiencia de Pi (Nakamura *et al.*, 2005), además Cruz-Ramírez *et al.*, (2006) reportaron que en *Arabidopsis* hay un gen de la familia de la PLD (PLDZ2) que es inducida gradualmente bajo deficiencia de Pi.

Por otra parte, la presencia de AI interrumpe el metabolismo de los fosfolípidos de membrana incrementando la actividad de las lípido cinasas en células en suspensión de *C. arabica* y por lo tanto incrementando la formación de diversos fosfolípidos de membrana importantes en la señalización celular como es el PA, el PIP<sub>2</sub>, el PIP, el LPA y el DGPP. Sin embargo, el AI también inhibe a la fosfolipasa C (Jones y Kochian, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2003) y la formación de el PA exclusivamente por la vía de la PLC (Ramos-Díaz *et al.*, 2007). Por lo que se ha especulado que el AI no únicamente interfiere con enzimas fosfolipasas sino también interfiere con enzimas del metabolismo de los fosfolípidos.

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de P sobre la toxicidad del Al en la vía de señalización mediada por fosfoinosítidos, con el fin de demostrar si el Pi es capaz de revertir el efecto del Al sobre la actividad de las enzimas lípidos cinasas y sobre las enzimas fosfolipasas en células de café tratadas con  $\text{AlCl}_3$ .

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Tratamientos con $\text{AlCl}_3$

Las células en suspensión de *C. arabica* fueron cultivadas en medios de cultivo MS a la mitad de la concentración de sus sales, preparadas con concentraciones de Pi de 100, 250, 625 y 1250  $\mu\text{M}$ . Al día 14 del ciclo de cultivo las células fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 1 hora y posteriormente se filtraron al vacío pesando 1 gramo de células de cada tratamiento para obtener el extracto total que se utilizó para la cuantificación de las actividades enzimáticas y la inmunodetección de la PLC y la PLD y el extracto membranal que se utilizó para la medición de la actividad de las lípidos cinasas.

### 3.2.2 Obtención del extracto proteico

La extracción de proteínas totales se realizó macerando 1 g de células con nitrógeno líquido en un mortero y se homogenizó con un politrón en una solución amortiguadora. Por cada gramo de células se utilizó 2.5 mL de solución amortiguadora [NaCl 50 mM, etilen glicol amino tetracético (EGTA) 1 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4, sacarosa 250 mM, glicerol 10 %, fenilmetil sulfonil fluoruro 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM y ortovanadato de sodio 0.2 mM]. Una vez homogenizado el extracto se centrifugó a 22 000 x g durante 30 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante. Las proteínas totales se cuantificaron a través del método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

### 3.2.3 Medición de la actividad de la PLC

Para medir la actividad de la PLC se utilizó el extracto total de las células sometidas a los diferentes tratamientos. La actividad enzimática se evaluó en el día 14 del ciclo de cultivo evaluando la hidrólisis del [ $^3\text{H}$ ]-PIP<sub>2</sub> por acción de la PLC en una mezcla de reacción (50  $\mu\text{L}$ ) que contenía NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35 mM (pH 6.8), KCl 70 mM, EGTA 0.8 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.8 mM (una concentración final de Ca<sup>2+</sup> 25  $\mu\text{M}$ ), PIP<sub>2</sub> 200  $\mu\text{M}$  (74 000 Bq) y deoxicolato de sodio al 0.08 %. La reacción se llevó a cabo durante 10 min a 30 °C y se detuvo agregando 100  $\mu\text{L}$  de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (P/V) y 250  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (P/V). El precipitado se removió por centrifugación a 16 000 x g por 10 min y se utilizó el sobrenadante para la cuantificación del [ $^3\text{H}$ ]-IP<sub>3</sub> liberado, utilizando 5 mL de líquido de centelleo (AMERSHAM) y un equipo contador de centelleo BECKMAN (Hernández-Sotomayor *et al.*, 1999).

### 3.2.4 Medición de la actividad de la fosfolipasa D

Para medir la actividad de la PLD se utilizó el extracto total obtenido de las células del día 14 sometidas a los diferentes tratamientos. La hidrólisis de la [metil- $^3\text{H}$ ]-fosfatidilcolina ( $^3\text{H}$ -PC; 3.11 TBq/mmol) por acción de la PLD se midió en una mezcla de reacción (100  $\mu\text{L}$ ) que contenía NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM (pH 5), KCl 32 mM, EGTA 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y PC/ $^3\text{H}$ -PC 414  $\mu\text{M}$  (436.8 Bq) como sustrato, el cual fue preparado en presencia de deoxicolato de sodio al 0.02 %. La reacción se llevó a cabo durante 10 minutos a una temperatura de 37°C y se terminó agregando 100  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% (P/V) y 250  $\mu\text{L}$  de TCA al 10% (P/V). El precipitado se removió por centrifugación a 16 000 x g por 10 min y la fase acuosa se utilizó para la cuantificación de la [ $^3\text{H}$ ]-colina generada, utilizando 5 mL de líquido de centelleo (AMERSHAM) y un equipo contador de centelleo BECKMAN (Ramos-Díaz, 2005).

### 3.2.5 Electroforesis

Los extractos proteicos (50 µg de proteína) se separaron mediante electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 % y se separaron a 100 V. Después de la electroforesis los geles fueron teñidos con azul de Coomassie en una solución de metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) en agua.

### 3.2.6 Inmunodetección de la PLC y la PLD

El extracto proteico fue separado en un gel de poliacrilamida y electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa durante 1.5 h a 100 V. Posteriormente se bloqueó la membrana con leche descremada al 5 % en amortiguador Tris salino con Tween 20 (TBS-T) durante toda la noche a 4 °C. La membrana se lavó 3 veces con amortiguador TBS-T cada 10 min por lavado. Para la detección de la proteína PLC la membrana se incubó con un anticuerpo primario en una dilución 1:1000 (anticuerpo monoclonal de la PLC-δ1 de ratón, Upstate Biotechnology) por 2 h a temperatura ambiente. Después se lavó 3 veces con TBS-T y se incubó con un anticuerpo secundario en una dilución 1:1500 (anti IgG de ratón conjugada a una peroxidasa) durante 2 h a temperatura ambiente, y se lavo con TBS-T con las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para la detección de la proteína PLD se utilizó un procedimiento similar al de la PLC, pero usando un anticuerpo primario policlonal de PLD purificado de *Brassica oleracea* (Nordic Inmunolog Y) a una dilución 1:3000 durante 1 h a temperatura ambiente. Y posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugada a una peroxidasa) en una dilución 1:5000 durante 1 h a temperatura ambiente.

### 3.2.7 Obtención del extracto membranal

Para la obtención del extracto membranal las células en suspensión (1g) fueron congeladas con nitrógeno líquido, maceradas y homogenizadas en una solución

amortiguadora [HEPES 50 mM, pH 7.2; sacarosa 0.25 M; KCl 5 mM; EDTA 1 mM] con inhibidores de proteasas (Leupeptina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , aprotinina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , PMSF 1 mM), utilizando 2 mL/g de células. El extracto se centrifugó a 100 x g durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 100 000 x g durante 60 minutos. El precipitado (fracción membranal) fue resuspendido con una solución de HEPES 50 mM (pH 7.4) y la concentración de proteína se cuantificó por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985)

### 3.2.8 Determinación de las lípidos cinasas

La actividad de las diferentes lípidos cinasas se midió a través de la incorporación de fósforo desde el [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP utilizando lípidos endógenos como sustrato. La fosforilación se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 100  $\mu\text{L}$ , que contenía la fracción membranal (60  $\mu\text{g}$ ), una mezcla de inhibidores (leupeptina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; PMSF 1 mM; aprotinina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en una solución que contenía HEPES 50 mM (pH 7.4); EDTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM; Mg-ATP 1mM, ortovanadato de sodio 0.2 mM, ditiotretitol (DTT) 0.5 mM, y [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (350 000 Bq). La mezcla se incubó 4 minutos a 30 °C y la reacción se detuvo añadiendo 1.5 mL de cloroformo/metanol 1:2 (V/V).

### 3.2.9 Extracción y separación de los fosfolípidos

La extracción de los fosfolípidos se inició con la adición de 500  $\mu\text{L}$  de HCl 2.4 N y 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$ , la solución se agitó durante 1 minuto y posteriormente se dejó reposar 5 minutos para propiciar la separación de las fases. La fase inferior se transfirió a un tubo de ensayo nuevo, mientras que a la fase superior se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se separaron nuevamente las fases y se lavaron las dos fases clorofórmicas con HCl 1N/metanol (1:1 V/V). Después de separar las dos fases, la fase inferior se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL, donde los lípidos se concentraron en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ .

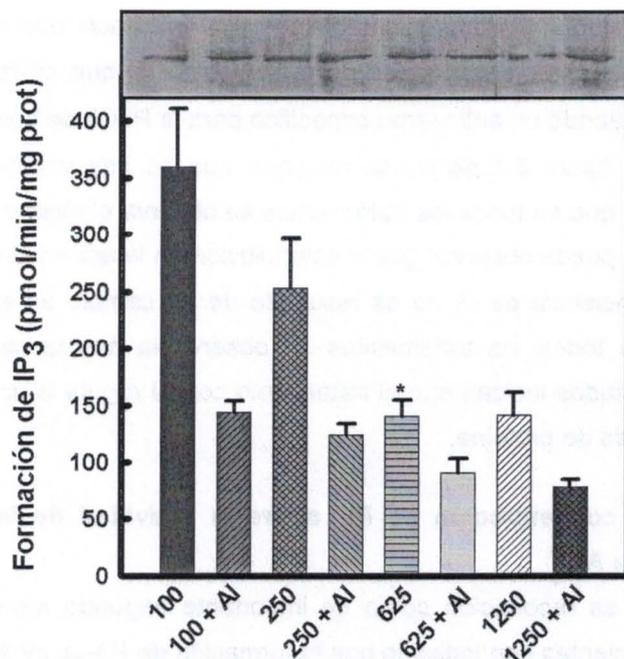
Los fosfolípidos se separaron por medio de cromatografía de capa fina (TLC) usando placas de sílica gel que son activadas con una solución que contiene EDTA 1 mM y oxalato de potasio al 1 % (P/V, metanol) y antes de usarlas fueron calentadas durante 60 min a 110 °C. Las placas fueron desarrolladas en un sistema de disolventes compuesta de cloroformo/metanol/ácido acético/agua (40:15:14:12:7 V/V) y posteriormente fueron expuestas a películas para rayos X por 96 horas. Las películas se sobrepusieron a las placas de TLC para raspar las bandas separadas, las cuales posteriormente se contaron por medio de un equipo contador de centelleo para la cuantificación del  $^{32}\text{P}$  de los fosfolípidos formados (Racagni *et al.*, 1992).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efecto combinado del Al y el Pi sobre la actividad de la PLC

Se había demostrado previamente que en un medio MS con 625  $\mu\text{M}$  de Pi el Al inhibe la actividad de la PLC hasta en un 60 % cuando las células de *C. arabica* son incubadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Martínez-Estévez *et al.*, 2003b). Sin embargo, no se había evaluado como la concentración de Pi puede afectar esta inhibición. En este trabajo se quería demostrar si altas concentraciones de Pi podían restablecer la actividad de la PLC, dado que el crecimiento celular inhibido por Al si es restablecido cuando las células crecen en presencia de 1250  $\mu\text{M}$  de Pi (Capítulo 2). Para esto las células fueron cultivadas en un medio MS con 100, 250, 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi y en el día 14 del ciclo de cultivo fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 1 h. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 3.1 y se puede ver que la actividad de la PLC cambia dependiendo de la concentración de Pi. Los tratamientos con una baja concentración de Pi, especialmente el tratamiento con 100  $\mu\text{M}$  incrementa la actividad de esta enzima hasta 2 veces cuando se compara con el testigo (625  $\mu\text{M}$ ). De igual forma se puede ver claramente que cuando las células fueron tratadas con el doble de la concentración de Pi (1250  $\mu\text{M}$ ) no hubo un cambio en la actividad con respecto al

testigo. Como se había mencionado en los antecedentes, la deficiencia de Pi provoca una activación de la PLC en raíces de *Arabidopsis* (Nakamura *et al.*, 2005) lo cual es muy similar a lo observado en estos resultados, una estimulación de la actividad enzimática a bajas concentraciones de Pi y una reducción de la misma a altas concentraciones.



**Figura 3.1.** Actividad de la PLC en células del día 14 tratadas con Al. Las células fueron cultivadas con 100, 250, 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi y en el día 14 fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 1 hora. Se evaluó la actividad de la PLC usando  $^3\text{H}$ -PIP<sub>2</sub> como sustrato y se cuantificó la formación de IP<sub>3</sub>. El control (625  $\mu\text{M}$ ) indicado con el asterisco mostró una actividad de 140 pmol/min/mg de proteína. En la parte superior de la gráfica se muestra el análisis del inmunoblot de la PLC, usando un anticuerpo monoclonal anti-PLC $\delta$ 1 de bovino para todos los tratamientos descritos.

Cuando las células fueron tratadas con Al (Figura 3.1) la actividad de la PLC disminuyó drásticamente para todos los tratamientos aún en el tratamiento de 100  $\mu\text{M}$  de Pi donde se había observado una estimulación en la actividad de esta enzima. Estos resultados nos indican que la inhibición de la actividad de la PLC cuando las células son tratadas con Al es independiente de la concentración de Pi,

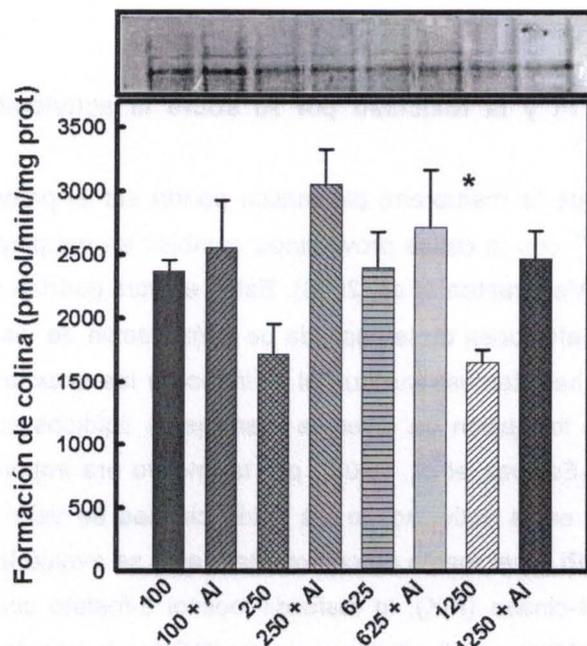
ya a que aún a altas concentraciones se observa una inhibición de la actividad ocasionado por el tratamiento con Al, muy similar a lo observado en el tratamiento con 625  $\mu\text{M}$  de Pi y que aún cuando haya una estimulación de la actividad por la concentración de Pi en el medio, esta es inhibida por la presencia de Al en el medio de cultivo.

Por otra parte se evaluó si las diferencias observadas en la actividad de la PLC eran debidas a un cambio en los niveles de proteína, por lo que se realizó una inmunodetección utilizando un anticuerpo específico para la PLC $\delta$  de bovino. En la parte superior de la figura 3.1 se puede observar que no hay cambios en los niveles de proteína y que en todos los tratamientos se observa el mismo patrón de proteína. Además se puede observar que la estimulación en la actividad de la PLC producida por la deficiencia de Pi no es resultado de un cambio en el nivel de proteína, ya que en todos los tratamientos se observa la misma cantidad de proteína. Estos resultados indican que el tratamiento con Al regula la actividad de la PLC y no los niveles de proteína.

### **3.3.2 Efecto de la concentración de Pi sobre la actividad de la PLD en células tratadas con Al**

El ácido fosfatídico es reconocido como un importante segundo mensajero en plantas. Reportes recientes han indicado que la formación de PA es inhibido por la presencia de Al en el medio de cultivo de 625  $\mu\text{M}$  de Pi, sin embargo esta inhibición es consecuencia de la inhibición de la actividad de la PLC y no al PA formado por la actividad de la PLD (Ramos-Díaz *et al.*, 2007). Los antecedentes para células de *C. arabica* han indicado que la actividad de la PLD no es afectada por la presencia de Al en el medio de cultivo, sin embargo esto aún no se ha establecido (Ramos-Díaz *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha visto que el gen de la PLDZ2 de *Arabidopsis* es inducido exclusivamente por condiciones deficientes de Pi. Para evaluar el efecto del Pi juntamente con la toxicidad por Al se realizó un experimento similar al descrito en la sección 3.3.1. En la figura 3.2 se muestra que

la actividad de la PLD varía de acuerdo a la concentración de Pi y se puede observar que la actividad de esta enzima tiene un comportamiento bifásico ya que a concentraciones de 100 y 625  $\mu\text{M}$  de Pi la actividad es elevada, mientras que con 250 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi la actividad es mas baja.



**Figura 3.2.** Actividad de la PLD en células del día 14 tratadas con Al en los diferentes medios con Pi. Las células fueron cultivadas con 100, 250, 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y en el día 14 fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante una hora. Se evaluó la actividad de la PLD usando  $^3\text{H}$ -PC como sustrato y se cuantificó la formación de colina. El control (625  $\mu\text{M}$ ) indicado con el asterisco mostró una actividad de 2398 pmol/min/mg de proteína. En la parte superior de la gráfica se muestra el análisis del inmunoblot de la PLD con el anticuerpo policlonal anti-PLD de *Brasica oleracea* para todos los tratamientos.

Cuando las células de café fueron tratadas con Al hubo una estimulación de la actividad de la PLD para todos los tratamientos, a diferencia de lo observado para la actividad de la PLC. Estos resultados indican que la presencia de Al activa a la vía de la PLD para la formación de PA e inactiva a la PLC así como a la formación de sus segundos mensajeros de manera semejante a lo observado por Ramos-

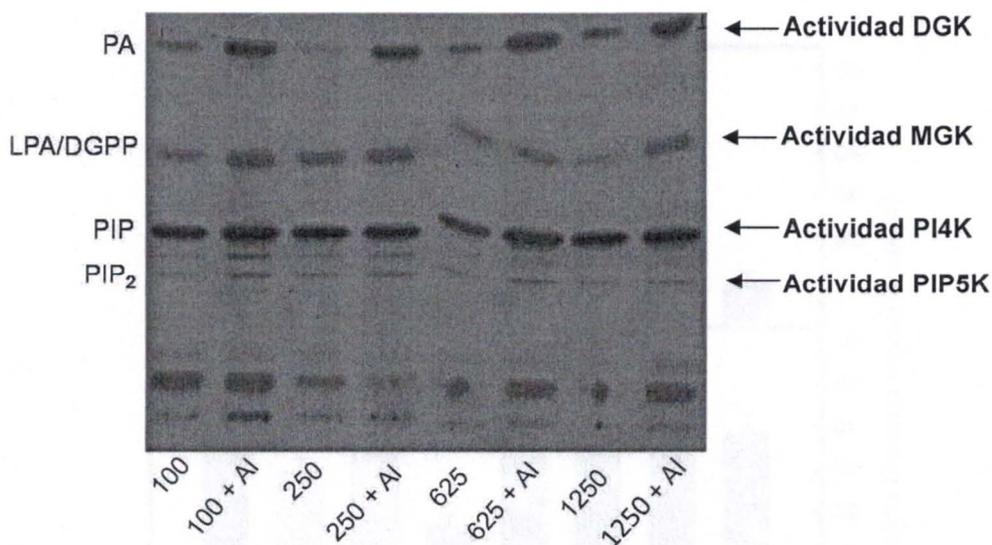
Díaz *et al.*, (2007). También se evaluaron los niveles de proteína de la PLD para todos los tratamientos utilizando un anticuerpo policlonal contra la PLD de *Brassica oleracea* y tampoco se pudieron observar cambios en los niveles de proteína ocasionados por los diferentes tratamientos. Indicando que los cambios observados en la actividad enzimática son debidos a otros mecanismos de regulación.

### **3.3.3 Efecto del Pi y la toxicidad por Al sobre la actividad de las lípido cinasas**

Se ha sugerido que la membrana plasmática podría ser el primer blanco de la interacción del  $Al^{3+}$  con la célula provocando cambios en las propiedades físicas de la membrana (Verstraeten *et al.*, 2003). Estos efectos podrían estar asociados con una función defectuosa de la cascada de señalización de los fosfoinosítidos. Reportes previos han demostrado que el Al induce a las enzimas lípido cinasas encargadas de la formación de diversos mensajeros lipídicos en células de *C. arabica* (Martínez-Estévez *et al.*, 2003), por tal motivo era importante evaluar si esta estimulación en la actividad de las lípido cinasas se veía afectada por la concentración de Pi en el medio de cultivo. Para esto se evaluó la actividad de la fosfatidil inositol 4-cinasa (PIK), la fosfatidil inositol 5-fosfato cinasa (PIP5K), la monoacilglicerol (MGK) y la diacilglicerol cinasa (DGK) a través de la formación de sus productos lipídicos, los cuales ya habían sido caracterizados previamente en células en suspensión de *C. arabica* (Racagni di Palma *et al.*, 2002).

Los extractos membranales de las células de 14 días sometidas a los cuatro tratamientos con Pi y luego tratadas con 100  $\mu M$  de Al durante 1 h fueron utilizados para medir la actividad de las lípido cinasas como se describe en materiales y métodos, utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}P]$  ATP y lípidos endógenos como sustratos en una mezcla de fosforilación (Sección 3.2.8). Bajo estas condiciones se pudo detectar la actividad de las cuatro enzimas lípido cinasas para todos los tratamientos tal y como se muestra en la película autorradiográfica en la figura 3.3.

Sin embargo solo fue posible analizar a la DGK, a la PI4K y a la PIP5K debido a que el producto de la actividad de la MGK el DGPP coincide con otro producto fosforilado, el ácido lisofosfatídico y por lo tanto no fue posible demostrar a que producto se debían los cambios observados.



**Figura 3.3** Autoradiografía representativa de la actividad de las lípido cinasas. Las células en suspensión fueron cultivadas con concentraciones 100, 250, 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por 14 días, tiempo en el cual fueron tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 1 hora, posteriormente se obtuvo el extracto membranal y se evaluó la actividad de las lípido cinasas usando  $^{32}\text{P}$ -ATP como sustrato. En la imagen se indican los lípidos formados por la acción de las lípido cinasas mostradas a la derecha.

Los resultados de las actividades enzimáticas se grafican en la figura 3.4 y como se puede observar, la actividad de la DGK varía dependiendo de la concentración de Pi en el medio de cultivo. La actividad de la DGK es baja en los tratamientos con 100 y 625  $\mu\text{M}$  de Pi y alta en los tratamientos de 250 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi, sin embargo en presencia de Al se ve claramente el efecto de una estimulación en la formación de PA para todos los tratamientos con Pi. El mismo efecto se observa en la actividad de la PI4K, una estimulación de la formación de PIP en presencia de Al para los tratamientos de 625 y 1250  $\mu\text{M}$  de Pi, para el tratamiento con bajas

concentraciones de Pi (100 y 250  $\mu\text{M}$ ) este comportamiento no es claro debido a que en ambos tratamientos la actividad de la PI4K no varia significativamente, aunque se ve un efecto muy similar para la DGK una menor actividad de la PI4K con el tratamiento de 625  $\mu\text{M}$  que es estimulado en presencia de Al.

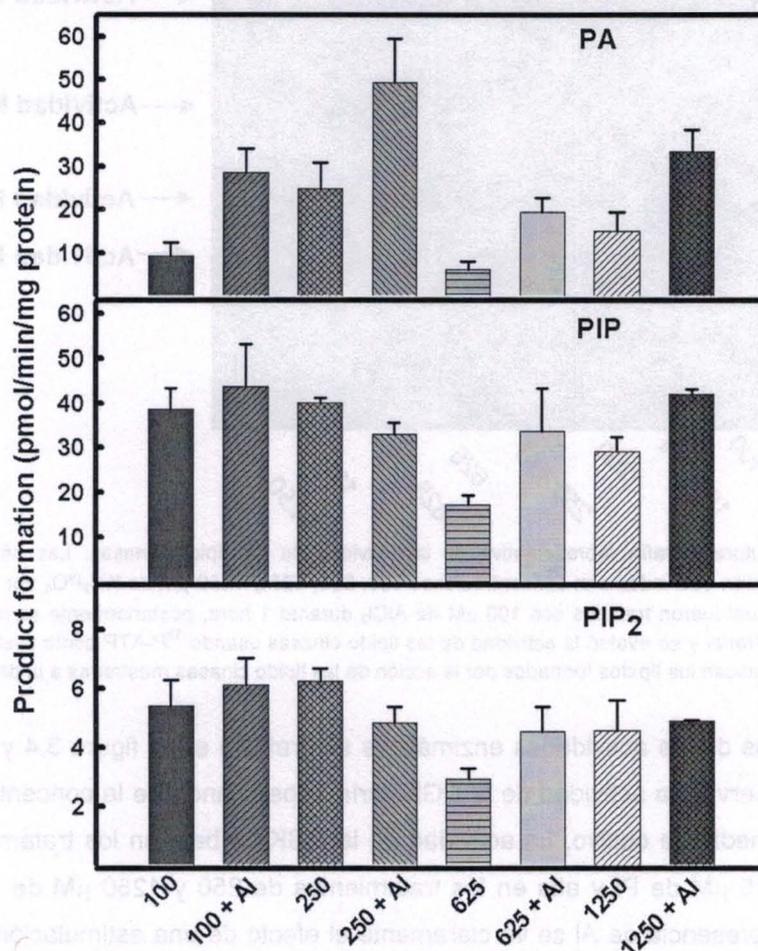


Figura 3.4 Actividad de la DGK, PI4K y la PIP5K de arriba hacia abajo en los diferentes tratamientos con Pi y Al. Los resultados fueron tomados de los productos formados en las placas cromatográficas y se cuantificaron en un contador de centelleo. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes

En cuanto a los resultados con la PIP5K se observa una estimulación de la actividad enzimática en presencia de Al únicamente para el tratamiento de 625  $\mu\text{M}$  de Pi, y una disminución de la actividad para el tratamiento con 250  $\mu\text{M}$  de Pi mas Al. Para el tratamiento con 100 y 1250  $\mu\text{M}$  no se observaron variaciones en la formación de PIP<sub>2</sub> para los tratamientos con Al. Como se puede observar en la figura 3.4 la actividad de las lípido cinasas son modificadas por la concentración de Pi y la presencia de Al, aunque el mayor efecto para las tres enzimas se observa con el tratamiento de 625  $\mu\text{M}$  de Pi en presencia y ausencia de Al, donde la actividad de estas enzimas es estimulada grandemente por el Al.

### 3.4 DISCUSIÓN

El Al interrumpe números procesos celulares dentro de la célula. Se ha reportado que altera las propiedades físicas de la membrana plasmática, la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, cambia la composición de los lípidos de membrana, bloquea canales iónicos y procesos de transducción de señales interfiriendo con el metabolismo de la PLC (Kinraide *et al.*, 1994; Ryan *et al.*, 1994; Jones y Kochian, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2003; Stival da Silva *et al.*, 2006; Verstraeten *et al.*, 2003), sin embargo aún no está claro cual de todos estos factores son la causas primarias de la toxicidad por Al en plantas. Diversos trabajos han tratado de demostrar que la inhibición de la actividad de la PLC era una de las causas principales de la inhibición del crecimiento de la raíz debido a que la PLC produce segundos mensajeros importantes en la célula como es el IP<sub>3</sub> que activa la liberación intracelular de Ca<sup>2+</sup> actuando sobre números blancos en respuesta a diversos tipos de estrés (Jones y Kochian, 1995; Martínez-Estévez *et al.*, 2003; Verstraeten *et al.*, 2003). Sin embargo todavía no hay una respuesta clara a esta pregunta. Los resultados de este trabajo mostraron que efectivamente la PLC es inhibida por la presencia de Al pero que esta inhibición no esta relacionada con el efecto del Al sobre el crecimiento celular, ya que cuando las células tratadas con Al crecieron con una concentración elevada de Pi el crecimiento celular si fue restaurado pero la

actividad enzimática de la PLC permaneció inhibida de forma similar a las células que fueron tratadas con 625  $\mu\text{M}$  de Pi. Estos resultados también indican que aún cuando el Pi mejore el crecimiento celular el efecto del Al sobre la PLC sigue siendo el blanco principal del Al aún a bajas concentraciones de este metal.

Por otra parte el PA puede ser sintetizado por diferentes enzimas; es formado por medio de la PLD que actúa hidrolíticamente sobre los fosfolípidos de membrana, por medio de la DGK que fosforila al DAG, por medio de una aciltransferasa que adiciona un ácido graso a una molécula de lisoPA y por medio de enzimas de la vía de formación de novo del gliceraldehído. Posiblemente las actividades de la PLD y la DGK son las dos principales rutas para producir PA y estas son abundantes en plantas. Resultados recientes indican que el PA y la PLD juegan múltiples papeles regulatorios en diversos procesos, incluyendo señalización por ABA, muerte celular programada, formación de pelos radiculares, crecimiento de la raíz, tolerancia al frío y otras respuestas a estrés (Wang, 2005; Wang *et al.*, 2006). En este trabajo se observó una respuesta muy interesante en cuanto al efecto del Al sobre la formación de PA. Reportes anteriores habían demostrado que el Al inhibe la formación de PA inhibiendo la actividad de la PLC, pero no tenía un efecto claro sobre la actividad de la PLD (Ramos-Díaz *et al.*, 2007). Al evaluar la actividad de la PLD en las células tratadas con Al se observó que no hay una inhibición de esta enzima sino por el contrario se puede ver un aumento de la actividad de la PLD en todas las concentraciones de Pi empleadas, esta respuesta posiblemente es para compensar el efecto de la inhibición de la formación de PA vía PLC, lo cual fue también confirmado al evaluar la actividad de la DGK debido a que esta enzima también muestra una activación en respuesta a Al, lo que conlleva a una elevada formación de PA. Este resultado también se había visto en este mismo modelo de estudio en un medio de cultivo con 625  $\mu\text{M}$  de Pi (Martínez-Estévez *et al.*, 2003).

También es importante mencionar que los efectos del Al y la deficiencia de Pi no modifican los niveles proteicos de la PLC y la PLD, lo cual indica que los efectos del Pi y el Al son exclusivamente debidos a un efecto sobre la enzima o sobre sus sustratos, lo cual modifica su actividad enzimática.

En este trabajo se evaluó la actividad de 4 enzimas lípido cinasas entre ellas estuvieron la DGK y la PI4K. Las lípido cinasas son estimuladas por Al en un medio con 625  $\mu\text{M}$  de Pi (Martínez-Estévez *et al.*, 2003). Los resultados de este trabajo muestran que si hay una estimulación de la actividad de la DGK y la PI4K y en menor medida de la PIP5K que únicamente es estimulada en el tratamiento con 625  $\mu\text{M}$  de Pi. La regulación de estas enzimas lípido cinasas por la presencia de Al en el medio de cultivo indican que existe una relación entre la inhibición de la actividad de la PLC que es compensada por la activación de la PLD y las lípido cinasas.

Finalmente se puede concluir que la concentración de Pi no tiene ninguna relación con la toxicidad del Al en la vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos, dado que el efecto del Al sobre los componentes de esta vía son similares para todas las concentraciones de Pi empleadas, aunque la deficiencia de Pi provoca una estimulación de la actividad PLC.

### 3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C y Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537: 128-132.
- Ciamporová M (2002) Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. *Biol. Plant.* 45: 161-171.
- Clark GB, Thompson G y Roux SJ (2001) Signal transduction mechanisms in plants: an overview. *Curr. Sci.* 80: 170-177.
- Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E y Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 6765–6770.
- Den Hartog M, Verhoef N y Munnik T (2003) Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiol.* 132: 311-317.
- Härtel H, Dormann P, Benning C (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10649-10654.
- Heilmann I, Stevenson-Paulik J y Perera IY (2000) Plant PtdIns 3-kinase goes nuclear. *Plant Cell* 12: 1511-1512.
- Hernández-Sotomayor SMT, De Los Santos-Briones C, Muñoz-Sánchez JA y Loyola Vargas VM (1999) Kinetics analysis of phospholipase C from *Catharanthus roseus* transformed roots using different assay. *Plant Physiol.* 120: 1075-1081.
- Jones DL y Kochian LV (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.
- Joyard J, Maréchal E, Miège C, Block MA, Dorne AJ y Douce R (1998) Lipids in photosynthesis: structure, function, and genetics. Kluwer Academic publisher (Ed.) Dordrecht, The Netherlands, pp. 21-52.
- Kinraide TB, Ryan PR, Kochian LV (1994)  $Al^{3+}$ - $Ca^{2+}$  interaction in rhizotoxicity. II. Evaluating the  $Ca^{2+}$  displacement hypothesis. *Planta* 192: 104-109.

Lynch JP (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109: 7-13.

Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

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

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

Meijer HJ, Berrie CP, Iurisci C, Divecha N, Musgrave A y Munnik T (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *Biochem. J.* 360: 491-498.

Munnik T, Irvine RF y Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochem. Biophys. Acta* 1389: 222-272.

Munnik T, Meijer HJ, Ter RB, Hirt H, Frank W, Bartels D y Musgrave A (2000) Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J.* 22: 147-154.

Munnik T (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.* 6: 227-233.

Munnik T y Musgrave A (2001) Phospholipid signaling in plants: holding on to phospholipase D. *Sci. STKE* 2001: pE42.

Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K y Ohta H (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 280: 7469-7476.

Racagni-Di Palma G, Garcia de Lema M, Domenech CE y Machado de Domenech EE (1992) Phospholipids in *Trypanosoma cruzi*: phosphoinositide composition and turnover. *Lipids* 27: 275-278.

Racagni-Di Palma G, Brito-Argáez L y Hernández-Sotomayor SMT (2002) Phosphorylation of signaling phospholipids in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiol. and Biochem.* 40: 899-906.

Ramos-Díaz A. (2005) Efecto de la adición del cloruro de aluminio sobre la transducción de señales fosfolipídicas en células en suspensión de *Coffea arabica* L. Tesis de doctorado en Ciencias y Biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 1-96.

Ramos-Díaz A, Brito-Argaez L, Munnik T y Hernández-Sotomayor SMT (2007) Aluminium inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 225: 393-401.

Ryan PR, Kinraide TB y Kochian LV (1994)  $Al^{3+}$ - $Ca^{2+}$  interaction in rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* 192: 98-103.

Stival da Silva AL, Sperling P, Horst WJ, Franke S, Ott C, Becker D, Stab A, Lörz H y Heinz E (1998) A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize. *J. Plant Physiol.* 163: 26-38.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, y Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Van der Luit AH, Piatti T, Van DA, Musgrave A, Felix G, Boller T y Munnik T (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol.* 123: 1507-1516.

Verstraeten SV, Villaverde MS, Oteiza PI (2003)  $Al^{3+}$ -mediated changes on membrane fluidity affects the activity of PI-PLC but not PLC. *Chem. Phys. Lipids* 122: 159-163.

Wang XM (2005) Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses. *Plant Physiol.* 139: 566-573.

Wang XM, Devalah SP, Zhang WH y Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45: 250-278.

## CAPÍTULO 4

### Discusiones generales

Reportes previos han mostrado que el Al afecta el crecimiento de las raíces de las plantas y la productividad de cultivos importantes en la agricultura (Delhaize y Ryan, 1995; Foy, 1988). En cultivos *in vitro* también se ha visto que afecta diversos procesos como la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , la formación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular programada (Rengel y Zhang, 2003; Yamamoto *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003). Se ha tratado de estudiar como algunas plantas son capaces de tolerar la presencia de Al y se han realizado estudios acerca de la resistencia interna a Al por medio de la exudación de ácidos orgánicos o la compartimentalización de los complejos de Al con los ácidos orgánicos (Kochian *et al.*, 2005). A la fecha ya se han determinado diversos genes que responden a Al y que activan la exudación de ácidos orgánicos (Delhaize *et al.*, 2007). Uno de los mecanismos que se ha visto que ayudan a tolerar la presencia de Al es la formación de complejos de  $\text{Al-PO}_4$ , los cuales impiden la entrada del Al hacia las raíces de las plantas. Diversos estudios han demostrado que los tratamientos con altas concentraciones de Pi mejoran los efectos tóxicos del Al y ayudan a que las raíces continúen su crecimiento de forma normal (Liao *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2005; Miranda y Rowell, 1989). También se ha visto que la adición de Pi disminuye la exudación de ácidos orgánicos inducidos por la presencia de Al (Ligaba *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2004).

En el capítulo 2 de este trabajo se observó que altas concentraciones de Pi en el medio de cultivo mejoran el crecimiento celular de las suspensiones de café disminuyendo la cantidad de Al que se asocia a las células. Estos resultados contrastan con lo observado en células en suspensión de tabaco donde la deficiencia de Pi es la que provoca una tolerancia a la presencia de Al (Yamamoto *et al.*, 1996). Los resultados en cultivos *in vitro* son muy diferentes a lo observado

en raíces de *Glycine max*, *Triticum aestivum* y *Fygopyrum esculentum* donde la resistencia a Al de estos genotipos se debe a la capacidad que tienen de tolerar bajas concentraciones de Pi, cuando estas plantas crecen en presencia de Al también aumenta la concentración de Pi en el ápice de la raíz (Liao *et al.*, 2006; Pellet *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2005).

En el capítulo 3 se estudió el papel del Pi sobre la actividad de diversas enzimas de la vía de señalización de los fosfoinosítidos en células de café tratadas con Al. Esta vía de señalización es afectada por la presencia de Al a través de la inhibición de la actividad de la PLC (Martínez-Estévez *et al.*, 2003) y la disminución de la formación del PA (Ramos-Díaz *et al.*, 2007). Se pensaba que el efecto del Al sobre esta vía de señalización podía ser una de los principales causas de la inhibición del crecimiento celular debido a que también se inhibe la formación de segundos mensajeros importantes para la célula. En este trabajo se demostró que los efectos del Al sobre las enzimas de esta vía de señalización no están relacionados con la inhibición del crecimiento celular ya que cuando las células crecen con altas concentraciones de Pi el crecimiento es restaurado pero la actividad de la PLC sigue siendo inhibida por la presencia de Al. Además se demostró que el Al únicamente regula la actividad enzimática de la PLC y la PLD y no los niveles de proteína. En base a estos resultados se puede concluir que el Al primeramente afecta la actividad de la PLC, lo cual conlleva a una inhibición en la formación de  $IP_3$  y PA, que es compensado por la activación de la PLD y la DGK, las cuales son otras enzimas encargadas de sintetizar PA (Figura 4.1).

Por otra parte también se demostró que las enzimas de la vía de señalización fosfolipídica responden de manera diferente a la toxicidad por Al y a la deficiencia de Pi. La actividad de la PLC es estimulada por bajas concentraciones de Pi de una manera muy significativa, lo cual muestra una clara relación con el incremento de la expresión de los genes de la PLC y la PLDZ en raíces de *Arabidopsis* (Nakamura *et al.*, 2005; Cruz-Ramírez *et al.*, 2006). Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar PC y acumular DAG para la producción de Pi a partir de

los fosfolípidos de membrana en condiciones deficientes de Pi (Li *et al.*, 2006a). Estudios realizados en raíces de *Arabidopsis* han demostrado que las mutantes que no expresan a la PLD $\zeta$ 1 y la PLD $\zeta$ 2 tienen un crecimiento mas lento de la raíz primaria (Li *et al.*, 2006b). Aunque en nuestro modelo de estudio la actividad de la PLD no es estimulada por deficiencia de Pi, la actividad de la PLC si lo es hasta un 200 % mas alto que el testigo.

En la figura 4.1 se describen de manera conjunta el efecto de la toxicidad por Al y la deficiencia de Pi sobre la actividad de las enzimas fosfolipasas y las lípido cinasas. Se muestra que la PLC es inhibida por la presencia de Al en todas las concentraciones de Pi disminuyendo la formación de segundos mensajeros muy importantes como el IP<sub>3</sub> y el PA. Por otra parte la presencia de Al en el medio de cultivo provoca una estimulación de la PLD y las enzimas lípido cinasas PI4K y DGK, esta respuesta es muy importante dado que la inhibición de la formación de PA por la PLC es compensado por el PA formado por la PLD y la DGK.

En cuanto a la respuesta por deficiencia de Pi se puede ver que la PLC es estimulada de manera significativa y que en este modelo de estudio la acumulación de DAG para la formación de lípidos galactosilados únicamente es formado por la actividad de la PLC y no por la PLD como se ha observado para raíces de *Arabidopsis*.



## Bibliografía

Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernández F, Ramírez-Chávez E y Herrera-Estrella L (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 6765-6770.

Delhaize E, Ryan PR (1995) Aluminium toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol. 107: 315-321.

Delhaize E, Gruber BD y Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. FEBS Lett. 12: 2255-2262.

Dong D, Peng X y Yan X (2004) Organic exudation induced by phosphorus and/or aluminium toxicity in two contrasting soybean genotypes. Physiol. Plant. 122: 190-199.

Foy CD (1988) Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 19: 959-987.

Kochian LV, Piñeros MA y Hoekenga OA (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. Plant Soil 274: 175-195.

Li M, Welti R y Wang X (2006a) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D $\zeta$ 1 and D $\zeta$ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. Plant Physiol. 142: 750-761.

Li M, Qin C, Welti R y Wang X (2006b) Double knockouts of phospholipases D $\zeta$ 1 and D $\zeta$ 2 in *Arabidopsis* affect root elongation during phosphate-limited growth but not affect root hair patterning. Plant Physiol. 140: 761-770.

Liao H, Wan H, Shaff J, Wang X, Yan X y Kochian L (2006) Phosphorus and aluminium interaction in soybean in relation to aluminium tolerance. Exudation of specific organic acids from different regions of the intact root system. Plant Physiol. 141: 674-684.

Ligaba A, Yamaguchi M, Shen H, Sasaki T, Yamamoto Y y Matsumoto H (2004) Phosphorus deficiency enhances plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and citrate exudation in greater purple lupin (*Lupinus piluosus*). Funct. Plant Bio. 31: 1075-1083.

Martínez-Estévez M, Racagni-Di Palma G, Muñoz-Sánchez JA, Brito-Argáez L, Loyola-Vargas VM y Hernández-Sotomayor SMT (2003) Aluminium differentially

modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. J. Plant Physiol. 160: 1297-1303.

Miranda LM y Rowell DL (1989) Aluminium-phosphate interactions in wheat. New phytol. 113: 7-12.

Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K y Ohta H (2005) A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 280: 7469-7476.

Ramos-Díaz A, Brito-Argaez L, Munnik T y Hernández-Sotomayor SMT (2007) Aluminium inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. Planta 225: 393-401.

Rengel Z y Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. New Phytol. 159: 295-314.

Yamamoto Y, Masamoto K, Rikiishi S, Hachiya A, Yamaguchi Y y Matsumoto H (1996) Aluminium tolerance acquired during phosphate starvation in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 112: 217-227.

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

Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF y Matsumoto H (2005) Immobilization of aluminium with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in Buckwheat. Plant Physiol. 138: 297-303.

## CAPÍTULO 5

### Perspectivas

En este trabajo se determinó que la presencia de altas concentraciones de Pi en el medio de cultivo restauran el crecimiento celular inhibido por Al, sin embargo quedan muchas preguntas importantes por responder. En los siguientes párrafos se describen varios experimentos que a futuro ayudarían entender como el Pi puede restaurar el crecimiento celular en presencia de Al.

- ❖ Determinar como la concentración de Pi afecta la disponibilidad de Al en el medio de cultivo. Para esto se sugiere evaluar la cantidad de  $Al^{3+}$  en los diferentes medios de cultivo por medio de fluorometría usando el reactivo morin, el cual se une de manera específica con el  $Al^{3+}$ . Este resultado ayudaría a entender si la concentración de Pi en el medio de cultivo afecta la disponibilidad de Al.
- ❖ Evaluar el efecto de la toxicidad por Al sobre la incorporación de Pi inorgánico, por lo cual se sugiere emplear ortofosfato radiactivo ( $^{32}PO_4$ ) para evaluar la incorporación de este compuesto en presencia de Al.
- ❖ Evaluar si la deficiencia de Pi tiene algún efecto sobre el patrón de exudación de ácidos orgánicos en las células en suspensión de *C. arabica*.
- ❖ Evaluar si la actividad de la MGDGS y la DGDGS están involucradas en la respuesta a deficiencia de Pi y determinar si existen cambios en la composición de los lípidos de membrana con el fin de poder integrar los resultados obtenidos en la vía de señalización de los fosfoinosítidos.

❖ Evaluar el efecto de la concentración de Pi y la toxicidad por Al sobre la expresión de los transportadores Pi de alta afinidad.

❖ Evaluar el efecto del Pi y el Al sobre la concentración de otros nutrientes importantes para el crecimiento de las plantas como el K y el Ca.