Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EFECTO DEL Al SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS *in vitro*

Tesis que presenta

JESÚS EMANUEL DE ATOCHA BOJÓRQUEZ QUINTAL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2010

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EFECTO DEL AI SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS *in vitro*

Tesis que presenta

JESÚS EMANUEL DE ATOCHA BOJÓRQUEZ QUINTAL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2010

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*". fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez, dentro de la Opción Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México a 14 de Septiembre de 2010.

Q.B.B. Jesús Emanuel de Atocha Bojórquez Quintal

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, forma parte del proyecto (No. 50626) titulado "Análisis de la tolerancia a aluminio en plántulas transgénicas de cafeto cultivadas *in vitro* obtenidas con la integración del gen AVP1" y está bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez

AGRADECIMIENTOS

Brindo un reconocimiento especial:

- Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por la formación académica otorgada y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 224261, otorgada para mis estudios de maestría.

- Al Dr. Manuel Martínez Estévez por la formación profesional, la confianza que depositó en mí y por permitirme ser parte de su equipo.

- Al Dr. César de los Santos Briones por su aportación en mi formación profesional, la confianza y por motivarme para que continuara mis estudios.

- A la Dra. Ileana Echevarría Machado por su confianza, disponibilidad y sus aportaciones en mi formación profesional.

- Al Comité Tutoral integrado por la Dra. Ileana Echevarría Machado y la Dra. Nancy Santana Buzzy de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, al Dr. Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda del Instituto Tecnológico de Conkal por las críticas y comentarios objetivos que permitieron el enriquecimiento de este trabajo y por su tiempo para la revisión del mismo.

- A los Doctores Manuel Martínez Estévez, Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda, Ileana Echevarría Machado, Nancy Santana Buzzy y Teresa Hernández Sotomayor por sus sugerencias y revisión de este escrito.

- A la Dra. Laura Margarita Hernández Terrones de la Unidad de Ciencias del Agua-CICY por su apoyo profesional y técnico en el uso del ICP-AES.

- A la M.C. Lucila Sánchez Cach por todo su apoyo durante la realización de esta tesis, por su ayuda, por los conocimientos transmitidos, pero sobre todo por sus consejos y amistad brindada durante todo este tiempo.

- A la Q.F.B. Fátima Medina Lara por su apoyo durante la realización de esta tesis, por sus consejos y por su amistad durante todo este tiempo.

- Al M.C. José Rafael López Cetz por su apoyo técnico y profesional durante la realización de esta tesis, por sus consejos y amistad brindada.

- A mis amigos y compañeros de los laboratorios 7 y 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán por sus consejos, por su confianza, por su amistad y por los momentos divertidos que pase con ellos.

- A todos mis amigos y compañeros de la UBBMP por sus comentarios, apoyo y su amistad brindada durante el Posgrado y durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi mamá

Carmen, por la confianza y cariño que me has brindado toda mi vida y porque siempre tienes tiempo para escucharme. Siempre serás la principal razón para lograr mis metas.

A mis hermanos y hermanas

Zuli, Rosalba, Martín, Roció y Juan por su cariño, consejos y apoyo que me han brindado. Además, de estar siempre cuando los he necesitado.

A mis sobrinas y sobrino

A mis sobrinas, por su cariño y todos los momentos felices que he pasado con ustedes. Y a ti, Jorge, porque aparte de ser mi sobrino te considero mi amigo y porque tu llegada alegró mi vida y la de mi familia.

A mi familia

A todos aquellos que siempre han estado pendientes de mi y que han compartido mis triunfos.

A mis amigos

Tanto de Hunucmá, como de la carrera, con los que he compartido parte de mi vida y pasado momentos divertidos como tristes, les doy las gracias...

LISTADO DE CUADROS v
LISTADO DE FIGURAS vii

RESUMEN 1
ABSTRACT 3
INTRODUCCIÓN 5

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES 9

1.1 EL CAFETO 9
1.1.1 ORIGEN Y DATOS HISTÓRICOS DEL CAFETO 9
1.1.2 TAXONOMÍA 9
1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA 9
1.1.4 ESPECIES CULTIVADAS EN EL MUNDO 12
1.2 EL CAFÉ EN MÉXICO 12
1.3 SUELOS ÁCIDOS 13
1.3.1 ACIDIFICACIÓN DE LOS SUELOS 14
1.3.2 DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES EN SUELOS ÁCIDOS 15
1.4 ALUMINIO 15
1.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ALUMINIO 16
1.4.2 ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO 16
1.5 TOMA DE ALUMINIO EN PLANTAS 17
1.6 DISTRIBUCION DEL ALUMINIO EN LA RAÍZ 17
1.7 EFECTOS DE LA TOXICIDAD POR ALUMINIO 18
1.7.1 INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ 18
1.7.2 PARED CELULAR 18
1.7.3 MEMBRANA PLASMÁTICA 19
1.7.4 EFECTOS SOBRE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 20
1.7.5 EFECTO SOBRE EL CITOESQUELETO 21
1.7.6 EFECTO SOBRE EL ADN 22
1.7.7 EFECTO SOBRE LA NUTRICIÓN MINERAL 22
1.7.7.1 INTERACCIÓN ALUMINIO-CALCIO 23
1.7.7.2 INTERACCIÓN ALUMINIO-POTASIO 23

1.7.7.3 INTERACCIÓN ALUMINIO-HIERRO 23
1.7.7.4 INTERACCIÓN ALUMINIO-FÓSFORO 24
1.7.8 OTROS EFECTOS 24
1.8 EFECTO BENÉFICO DEL ALUMINIO 25
1.9 TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN CAFETO 31
1.10 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ALUMINIO 32
1.11 HIPÓTESIS 37
1.12 OBJETIVO GENERAL 37
1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37
1.14 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 38
1.15 REFERENCIAS 39

CAPÍTULO 2. EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS *in vitro* 53

2.1 INTRODUCCIÓN 53
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS 54
2.2.1 MATERIAL VEGETAL 54
2.2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS 54
2.2.3 EXTRACCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS 55
2.2.4 TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALUMINIO 55
2.2.5 DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DEL AUMINIO 55
2.2.6 ANÁLISIS MINERAL EN BROTES Y RAÍCES 56
2.2.7 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE UN CULTIVAR DE CAFETO 56
2.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 57
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 57
2.3.1 EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL 57
2.3.1.1 *Coffea arabica* L. 57
2.3.1.2 *Arabidopsis thaliana* L. 66
2.3.1.3 *Capsicum chinense* Jacq. 68
2.3.2 DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DEL ALUMINIO 70
2.3.3 ANÁLISIS MINERAL 74

2.4 REFERENCIAS **79**

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN GENERAL **85**

REFERENCIAS **89**

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES **93**

CAPÍTULO 5. PERSPECTIVAS **95**

ANEXOS **97**

LISTADO DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1. Taxonomía del cafeto **10**

Cuadro 1.2. Principales factores limitantes del crecimiento vegetal asociados con las condiciones ácidas del suelo **14**

Cuadro 1.3. Posibles blancos de la toxicidad del aluminio en plantas superiores **25**

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Características de muestreo **57**

Cuadro 2.2. Análisis agrologicos de suelo **58**

Cuadro 2.3. Concentración de nutrientes y Al en raíces y brotes de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. Chinense* **76**

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Descripción botánica del cafeto 11

Figura 1.2. Estructura de la semilla de café 11

Figura 1.3. Disponibilidad de nutrientes dependiendo del pH del suelo 15

Figura 1.4. Estrategia experimental 37

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Curso temporal del efecto de diferentes concentraciones de $AlCl_3$ sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. *Typica* 59

Figura 2.2. Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. Typica a diferentes concentraciones de aluminio al día 40 de cultivo en medio $B_5/2$ pH 4.3 60

Figura 2.3. Curso temporal del efecto del $AlCl_3$ sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. Typica en 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ 62

Figura 2.4. Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. Typica a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 30 de cultivo en medio $B_5/2$ pH 4.3 63

Figura 2.5. Crecimiento de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. Typica al día 15 y 30 de cultivo en medio $B_5/2$ en 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3 64

Figura 2.6. Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de *A. thaliana* a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 5 en medio $B_5/2$ segmentado pH 4.3 66

Figura 2.7. Crecimiento de la raíz de plántulas de *A. thaliana* al día 5 de cultivo en medio $B_5/2$ segmentado a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3 67

Figura 2.8. Efecto del $AlCl_3$ sobre el número de raíces laterales en *A. thaliana* 68

Figura 2.9. Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de *C. chinense* a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 7 en medio $B_5/2$ segmentado pH 4.3 69

Figura 2.10. Crecimiento de la raíz de plántulas de *A. thaliana* al día 5 de cultivo en medio $B_5/2$ segmentado a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3 70

Figura 2.11. Tinción con hematoxilina de raíces de *C. arabica* cv Typica al día 30 de cultivo 71

Figura 2.12. Tinción con hematoxilina de raíces de *A. thaliana* al día 5 de cultivo 72

Figura 2.13. Tinción con hematoxilina de raíces de *C. chinense* al día 7 de cultivo 73

Figura 2.14. Concentración de Al en plántulas de *C. arabica, A. thaliana* y *C. chinense* crecidas en medio $B_5/2$ a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3 al día 30, 5 y 7 de cultivo respectivamente 79

ANEXO

Anexo 1. Composición del medio Gamborg (B_5) **97**

RESUMEN

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y uno de los cultivos tropicales con mayor área cultivada en el mundo. Por sus requerimientos agronómicos, crece en suelos con elevada materia orgánica, los cuales son ácidos con valores de pH entre 4.5-5.5. En suelos ácidos, se ha visto que el Al puede ejercer un efecto sobre el crecimiento de la raíz y en general sobre el desarrollo de las plantas. Por tal motivo, para determinar el efecto del aluminio sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto, se evaluó el crecimiento de la raíz de plántulas de *C. arabica* cv. Typica expuestas a diferentes concentraciones de $AlCl_3$ (0, 100, 300 y 500 µM) en medio Gamborg (1968) a la mitad de su fuerza iónica ($B_5/2$) a pH 4.3 durante 30 días en condiciones *in vitro*. Los resultados mostraron un incremento en el crecimiento radical de *C. arabica* en 100 y 300 µM de $AlCl_3$; a la concentración de 500 µM de $AlCl_3$ se observó el efecto tóxico de este metal al día 30 de cultivo. Por otro lado, al comparar los resultados observados en *C. arabica* con las especies *A. thaliana* y *C. chinense* bajo las mismas condiciones de cultivo, se observaron respuestas diferentes a las mostradas en *C. arabica*; *C. chinense* mostró tolerancia y *A. thaliana* fue sensible al tratamiento con Al.

ABSTRACT

Coffee is one of the most important agricultural products in the international market and one of the largest tropical crops area cultivated in the world. For its agronomic requirements, coffee grows in soils with high content of organic matter, which are acidic with pH values between 4.5-5.5. In acid soils, it has been that shown Al may exert an effect on root growth and overall development of plants. Therefore, to determine the effect of aluminum on root growth of seedlings of coffee, we evaluated the root growth of seedlings of *C. arabica* cv. Typica exposed to different concentrations of $AlCl_3$ (0, 100, 300 and 500 µM) in the Gamborg media (1968) with the half-strength ($B_5/2$) at pH 4.3 during 30 days under conditions *in vitro*. The results showed an increase in root growth of *C. arabica* in 100 and 300 µM of $AlCl_3$. To a concentration of 500 µM of $AlCl_3$ toxic effect of lead on day 30 of culture were observed. On the other hand, in order to comparing the results observed in *C. arabica,* we used others species as *A. thaliana* and *C. chinense* under the same culture conditions. Different responses to the one observed in *C. arabica*, were obtained in *C. chinense* that showed tolerance and *A. thaliana* that was sensitive to treatment with Al.

INTRODUCCIÓN

El cafeto es una especie cultivable de gran importancia económica a nivel internacional. En la actualidad, se cultiva principalmente en la región comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, siendo Brasil, Colombia, Vietnam, Indonesia y México los principales productores a nivel mundial.

El cafeto es un miembro de la familia *Rubiaceae* y del género Coffea.[1] Este género incluye aproximadamente diez especies, y dentro de éstas, *C. arabica* y *C. canephora* son las principales especies cultivadas comercialmente. También, son cultivadas las especies *C. liberica* y *C. dewevrei*.[2,3]

En México se cultivan comercialmente dos especies de cafeto: *C. arabica* L., la cual es la de mayor importancia en extensión, difusión, calidad y valor en el mercado nacional e internacional, aportando el 95% de la producción y *C. canephora*, conocida como café Robusta. La producción de café en México de la especie *C. arabica* L. está representada por las variedades comerciales conocidas como cafés árabes, siendo la variedad Typica, conocida con los nombres de criollo, café arábico, corriente o nacional, la de mayor distribución.

Por sus condiciones agrológicas en México el cafeto es cultivado en suelos ácidos, donde el pH fluctúa entre 4.5 y 5.5.[4] Estos suelos están ampliamente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales, constituyendo aproximadamente el 30% del área total de la tierra del planeta, así como el 50% de los suelos arables del mundo.

Los suelos ácidos limitan la producción vegetal a nivel mundial[5] y constituyen una limitante para el cultivo de plantas comestibles, como son: el maíz, el arroz, el trigo y la soya.[6] La explicación del pobre crecimiento vegetal en estos suelos incluye la toxicidad por H^+, la deficiencia de minerales y la toxicidad por metales,[7] siendo la toxicidad por aluminio el principal problema en estos suelos.

El aluminio es el metal más abundante en la tierra y el tercer elemento en mayor abundancia en la corteza terrestre.[5] Por lo general en condiciones normales se encuentra en estado insoluble, en forma de aluminosilicatos y óxidos de aluminio, sin

embargo, cuando el pH disminuye el aluminio puede ser solubilizado, haciéndose disponible para las plantas, siendo el Al^{3+} la forma más tóxica a pH menores a 5.5.[8]

La toxicidad por aluminio provoca una gran cantidad de síntomas en las plantas, interfiriendo en un amplio rango de procesos fisiológicos, celulares y moleculares. El aluminio afecta especialmente la absorción de K^+ y Ca^{2+}, la estructura del citoesqueleto, la síntesis de callosa, la peroxidación de lípidos y los mecanismos de traducción de señales,[9,10,11] sin embargo, el principal efecto de la toxicidad del aluminio es la dramática inhibición del crecimiento de la raíz.[12]

Por otro lado, se ha reportado el papel benéfico de este elemento en algunas especies de plantas cuando está presente en bajas concentraciones. Este metal puede evitar los efectos de la toxicidad de H^+,[13,14] la toxicidad de Fe[15] y del P cuando se encuentran en exceso.[15,16] También, mejora la toma de P y aumenta el crecimiento de las raíces y los brotes de determinados taxas.[17]

El grado de toxicidad, así como el efecto benéfico de este metal varía dependiendo de la especie de la planta, las condiciones de crecimiento, la concentración de aluminio y la duración de la exposición al metal.[9,17] Por tal motivo, para determinar el efecto del aluminio sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto, se evaluó el crecimiento de la raíz de plántulas expuestas a diferentes concentraciones de $AlCl_3$.

REFERENCIAS

1. M.T.S. Eira; E.A. Amaral; R. De Castro; S. Dussert; C. Walters; J.D. Bewley; W.M. Hilhorts, Coffee seed physiology, *Braz J. Plant Physiol. 18,* 149-163, 2006.
2. J. León, Botánica de los cultivos tropicales, 3a Ed; San José, Costa Rica, 2000, 350-364.
3. M. Alvarado; G. Rojas, El cultivo y beneficiado del café, San José, Costa Rica, 1998, 184.
4. G. Castillo; A. Contreras; A. Zamarripa; I. Méndez; M. Vázquez; F. Holguín; A. Fernández, Tecnología para la producción de café en México, INIFAP, 1a Reimpresión; México, 1996, 1-11.
5. H. Marschner, Mineral nutrition of higher plants, 2a Ed; Academic Press, New York, 1995, 889.
6. L.V. Kochian; O.A. Hoekenga; M.A. Piñeros, How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency, *Annu. Rev. Plant Biol. 55,* 459–493, 2004.
7. P.S. Kidd; M. Llugany; Ch. Poschenrieder; B. Gunsé; J. Barceló, The role of root exudates in aluminium resistence and silicon-induced of amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.), *J. Exp. Bot. 52,* 1339-1352, 2001.
8. M. Pessarakli, Acid soil and aluminum tolerance in turfgrasses in: Handbook of turggrass management and physiology, University of Arizona Tucson, Arizona, U.S.A., 2008, 375-388.
9. L.V. Kochian; M.A. Piñeros; O.A. Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil 274,* 175–195, 2005.
10. F. Quintal-Tun; J.A. Muñoz-Sánchez; A. Ramos-Díaz; A. Escamilla-Bencomo; M. Martínez-Estévez; C. Exley; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid, *J. Inorg. Biochem. 101,* 362-369, 2006.
11. A. Ramos-Díaz; L. Brito-Argáez; T. Munnik; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway, *Planta 225,* 393–401, 2007.

12. P. Illes; M. Schlicht; J. Pavlovkin; I. Lichtscheidi; F. Baluska; M. Ovecka, Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production, *J. Exp. Bot. 57,* 4201-4213, 2006.
13. T.B. Kinraide; P.R Ryan; L.V. Kochian, Interactive effects of Al^{3+}, H^{+}, and cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential, *Plant Physiol. 99,* 1461-1468, 1992.
14. T.B. Kinraide, Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations, *Physiol. Plant. 88,* 619-625, 1993.
15. T. Watanabe; S. Jansen; M. Osaki, Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils, *Plant Cell Environ. 29,* 2124-2132, 2006.
16. R.B. Clark, Effect of aluminum on growth and mineral elements of Al-tolerant and Al-intolerant corn, *Plant Soil 47,* 653–662, 1977.
17. E.A.H. Pilon-Smits; C.F. Quinn; W. Tapken; M. Malagoli; M. Schiavon, Physiological functions of beneficial elements, *Curr Opin Plant Biol. 12,* 267–274, 2009.

ANTECEDENTES

1.1 EL CAFETO

1.1.1. ORIGEN Y DATOS HISTÓRICOS DEL CAFETO

El cafeto es originario de África Oriental, de las montañas (de más de 1 000 msnm) de Etiopía[1,2] y Sudán.[2] Se introdujo a Europa entre los siglos XV y XVI a través del puerto de Mokka, en Arabia. En 1720 se trajo a América y las primeras plantaciones se establecieron en las Guayanas Francesa y Holandesa.[3] El café se introdujo a México por tres regiones diferentes: en el año de 1796 proveniente de Cuba a la región de Córdoba, Veracruz; en 1823 proveniente de Mokka, Arabia, se introdujo a Uruapan, Michoacán; y en 1847 de Guatemala a Tuxtla Chico, Chiapas. De estos tres puntos se extendió a los 12 estados que actualmente cultivan esta planta.[3] En la actualidad, se cultiva principalmente en la región comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, siendo Brasil, Colombia, Vietnam, Indonesia y México los principales productores a nivel mundial.[4]

1.1.2. TAXONOMÍA

El café pertenece al género *Coffea,* el cual fue propuesto en 1735 por Linnaeus, quien también describió la especie *Coffea arabica* en 1753.[5] El café pertenece a la familia *Rubiaceae*, en la cual se han identificado 600 géneros, entre ellos *Coffea*. El género *Coffea* incluye aproximadamente 10 especies, no obstante, solo cuatro de éstas son cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras según el siguiente orden: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* y *C. dewevrei* (Cuadro 1.1.).[2,6]

1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La planta es un arbusto que puede medir hasta 7 m de altura, de forma cónica e irregular, que en condiciones normales se desarrolla con un solo eje central, el cual presenta en su extremo una parte meristemática en crecimiento permanente que da lugar a la formación de nudos y entrenudos. El sistema radical de la planta se constituye por una raíz principal o pivotante; a partir de este eje se desarrollan de cuatro a ocho raíces axilares y numerosas ramificaciones laterales.

Cuadro 1.1. *Taxonomía del cafeto según Chevalier, citado por Ramírez, (1971).*[7] *Alvarado y Rojas, (1998)*[6] *incluyen a las especies C. liberica y C. dewevrei en la clasificación.*

Reino	***Plantae***
División	***Antofita***
Subreino	***Angiospermae***
Clase	***Dicotiledoneae***
Subclase	***Sympetalae***
Orden	***Rubiales***
Familia	***Rubiaceae***
Tribu	***Cofeales***
Género	***Coffea***
Sección	***Eucoffea***
Subsección	***Erythrocoffea***
Especie	***C. arabica* L.,** ***C. canephora* P.,** ***C. liberica* Bull ex Hiern.,** ***C. dewevrei***

La planta de cafeto presenta dos tipos de crecimiento: vertical u ortotrópico, representado por un tallo central con pocas ramificaciones verticales;[9] y lateral o plagiotrópico, representado por ramas primarias, las cuales pueden originar ramas secundarias y terciarias. Éstas son el asiento de hojas y de la fructificación del cafeto. Las hojas se sitúan en un mismo plano y crecen opuestas, son elípticas, oblongas o lanceoladas, de color verde oscuro en el haz y un verde más pálido en el envés.

Las flores son blancas y se presentan en una inflorescencia llamada cima, conteniendo de dos a cuatro flores. Las flores individuales son completas, hermafroditas y autógamas. El fruto es una drupa conocida como cereza que mide de 10-17 mm de largo por 8-14 mm de ancho,[8] consta de varias partes como son: epicarpio o epidermis, mesocarpio o pulpa, endocarpio o pergamino, la piel plateada y el endospermo o semilla; son de color verde en estado inmaduro y rojo o amarillo cuando madura (Figura 1.1.).

La semilla de café es de forma elíptica, plano-convexa, posee un surco longitudinal en la superficie.[9] La cubierta exterior está formada por un endocarpo duro que se convierte en el pergamino después del secado. La semilla está constituida por el endospermo cuya coloración es verde oscuro a amarillento, mide de 10-18 mm de largo y 6.5 a 9.5 mm de ancho; en el caso de la especie *C. arabica*, con un embrión de 3 a 4 mm de largo, el cual tiene la forma de una planta que consta sólo de dos hojas cotiledonales, lo que dará origen al tallo hipocótilo, y la radícula que dará origen a la

raíz. Por otro lado, la semilla está cubierta por una película plateada (silver skin) o perisperma, el cual es un vestigio del tegumento del óvulo (Figura 1.2.).

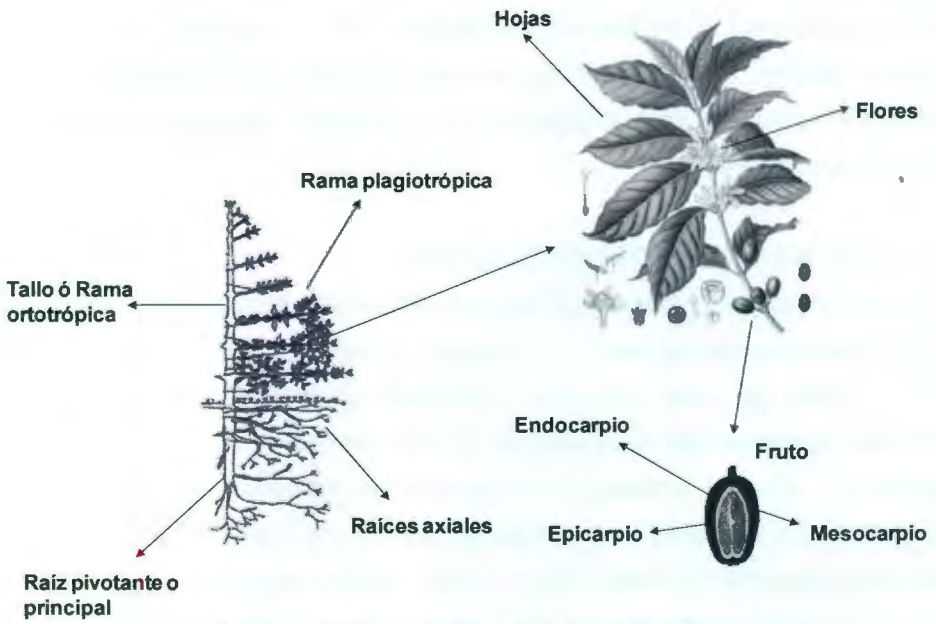

Figura 1.1. *Descripción botánica del cafeto. (Tomado de http://academmic.uprm.edu)*

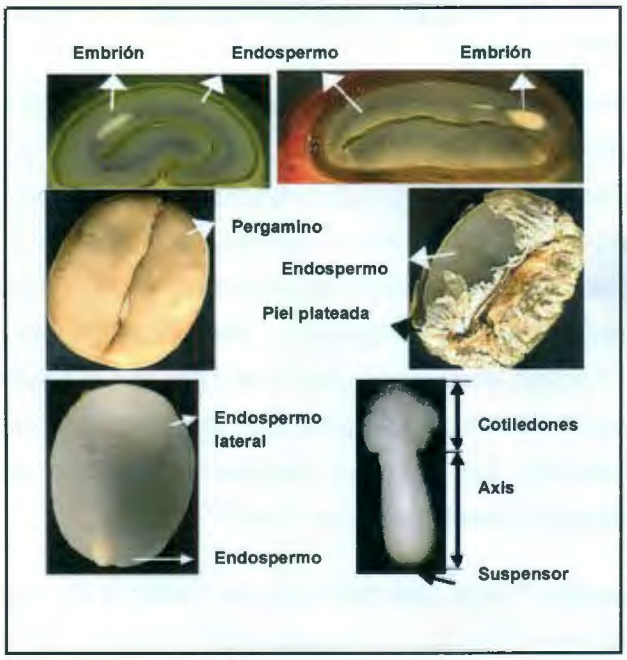

Figura 1.2. *Estructura de la semilla de café (Eira et al., 2006).*[10]

El endospermo es córneo y contiene una región externa dura y una interna suave, que rodea al embrión;[9,11,12] la parte del endospermo delante de la punta radicular del embrión es denominado endospermo tapa y todo el resto es conocido como endospermo lateral.[8] El tejido del endospermo está constituido de hemicelulosa, proteínas, cafeína, aceite, azúcares, dextrina, celulosa, ácido clorogénico, y otros compuestos necesarios para el crecimiento del embrión, hasta que éste se convierta en una planta autótrofa.[1]

1.1.4. ESPECIES CULTIVADAS EN EL MUNDO

Se cultivan globalmente cuatro especies de café: el 90% de los cultivos es *C. arabica*, 9% *C. canephora* y menos del 1% *C. liberica y C. excelsa* o *dewevrei*,[13] no obstante, desde el punto de vista comercial solamente *C. arabica y C. canephora* son importantes en el mercado internacional. El 75% del café consumido en el mundo se obtiene de *C. arabica*, cultivada en su mayoría en América Latina, debido a la alta productividad y a la calidad de la bebida que se obtiene. La especie *C. canephora* se cultiva principalmente en Brasil, África y Asia, debido a su resistencia a la roya del cafeto y a su mejor adaptación al clima cálido y húmedo, tiene cierta importancia en el ámbito mundial y hoy en día constituye el 25% del café exportado.[14,15]

1.2. EL CAFÉ EN MÉXICO

En el país se cultivan comercialmente dos especies de cafeto: *C. arabica* L., la cual es la de mayor importancia en extensión, difusión, calidad y valor en el mercado nacional e internacional, aportando el 95% de la producción y *C. canephora*, conocida como café Robusta. La producción de café en México de la especie *C. arabica* L. está representada por las variedades comerciales conocidas como cafés árabes, entre ellas se encuentran: Typica, Bourbón, Mundo Novo, Pluma Hidalgo, Maragogipe, Caturra, Garnica y Catuai.[16] Existen otras variedades de no muy amplia distribución y su cultivo se restringe a pocos finqueros que los producen para mercados muy selectos, estas variedades son: Pacamara, San Bernardo, San Ramón, Villalobos, Villa Carchi, Pacas, Blue Mountain, Colombia y Sarchimor, entre otras.[17]

Entre ellas, la variedad Typica, conocida con los nombres de criollo, café arábico, corriente o nacional, fue la primera en introducirse al Continente Americano y al país. En México, es la variedad con mayor distribución y la más frecuente en la zona central

de Veracruz. Es un arbusto que puede alcanzar 4-6 m de altura, de porte alto y de forma piramidal, los frutos y las semillas son de dimensiones grandes. Se considera una variedad de baja producción, maduración temprana y de alta calidad, aunque susceptible a ciertas plagas. Es una de las variedades mejor adaptadas a la producción de café orgánico.[16]

En México el cafeto es cultivado a una altura entre 900-1300 msnm, con una precipitación media anual de 1 800 a 2 000 mm, en un rango de temperatura de 19°C a 22°C con mínimos de 16°C y máximo de 25°C, en cuanto a luminosidad se requiere de 1 500 a 2 500 h efectivas, con una humedad de 70 a 80% y en suelos profundos, de texturas francas, permeables y friables, con valores de pH de 4.5 a 5.5,[3] los cuales son considerados ácidos.

1.3. SUELOS ÁCIDOS

Los suelos ácidos también llamados ultisoles u oxisoles,[18] son suelos con pH de 5.5 o más bajos, están ampliamente distribuidos en suelos tropicales y subtropicales.[19,20] Los suelos ácidos constituyen aproximadamente el 30% del área total de la tierra del planeta, así como el 50% de los suelos arables del mundo. Estos suelos se caracterizan por poseer una deficiencia de nutrientes, asimismo presentan toxicidad por metales.

Los suelos ácidos limitan la producción vegetal a nivel mundial,[21] en muchos países en desarrollo constituyen una limitante para el cultivo de plantas comestibles, como son el maíz y el arroz, ya que el 20% y 13% respectivamente de estos cultivos se desarrolla en estos suelos.[18]

La explicación del pobre crecimiento vegetal en los suelos ácidos incluyen la toxicidad por Al, toxicidad por Mn, baja provisión de N (principalmente en forma de NH_4^+), deficiencia de P, deficiencia de Mo y concentraciones tóxicas de ácidos fenólicos. Se ha considerado al propio ión H^+ como la principal causa del pobre crecimiento vegetal.[22] Por otro lado, Arnon y Johnson (1942) sugieren que el bajo suministro de Ca^{2+} a pH bajo como la principal causa de la disminución del crecimiento vegetal.[23] En el Cuadro 1.2. se observan los principales problemas para el crecimiento vegetal que presentan en los suelos ácidos.

Cuadro 1.2. *Principales factores limitantes del crecimiento vegetal asociados con las condiciones ácidas del suelo. (Pessarakli, 2008).*[20]

Factores limitantes de crecimiento	Síntoma vegetal
Toxicidad por Al	Raíces cortas y anormales. Pobre crecimiento de los brotes
Toxicidad por H^+	El exceso de H^+ compite con la toma de Ca^{2+} y Mg^{2+} causando deficiencia de Ca y Mg
Toxicidad por Mn	Clorosis y necrosis
Deficiencia de Mg, Ca y K	Clorosis, descoloración y poca eficiencia en el uso del agua
Deficiencia de P, Mo y B	Coloración amarilla o púrpura
Reducción de la toma de N	Reducción de la toma de nitrato: deficiencia de N con reducción de la actividad microbiana, clorosis
Reducción del crecimiento de la raíz	Raíces cortas, quebradizas, de color oscuro, reducción de pelos radiculares
Aumento del potencial de lixiviación de nutrientes	Menor concentración de nutrientes en los tejidos de las plantas y deficiencia de nutrientes
Pobre toma de agua y de nutrientes	Daño a la membrana plasmática y gran vulnerabilidad a la sequia: pobre retención de agua en las células de la raíz

1.3.1. ACIDIFICACIÓN DE LOS SUELOS

Existen zonas del planeta que presentan de forma natural un pH ácido, como las zonas tropicales y subtropicales.[24] Esta situación se puede agravar por la manipulación antropogénica, como el uso de fertilizantes[19] y acidificantes o la utilización de fuentes de energía fósil como el carbón y petróleo que liberan una gran cantidad de NO_2 y SO_2, los cuales, en presencia de agentes oxidantes, dan lugar a ácido nítrico y ácido sulfúrico, acidificando el agua y el suelo.[24] Asimismo, la contaminación ambiental es un problema crítico a nivel mundial, ya que aumenta la precipitación de la lluvia ácida, disminuyendo el pH de suelos y cuerpos de agua.

Por otro lado, la materia orgánica en descomposión aumenta la acidez de los suelos, tal como sucede en los cultivos de cafeto en donde los requerimientos agronómicos de sombra, aumentan la cantidad de materia orgánica de los mismos.[25] También, el desequilibrio de los ciclos de N, S y C, tienen influencia en la disminución del pH de los suelos,[26,27] así como un exceso en la captación de cationes sobre aniones y la fijación de nitrógeno por leguminosas.[27,28]

1.3.2. DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES EN SUELOS ÁCIDOS

La disponibilidad de muchos nutrientes se ve afectada directa o indirectamente por la acidificación de los suelos (Figura 1.3.), teniendo implicaciones en el crecimiento de las plantas. Esto se debe a que dependiendo del pH del suelo la planta puede captar diversos minerales. Por ejemplo, si el pH es inferior a 5, la disponibilidad de algunos nutrientes como P, Ca, Mg y Mo es muy baja y la absorción por parte de la planta es limitada. Por otro lado, la disponibilidad de elementos como el Al aumenta, siendo la toxicidad por este mineral la principal limitante para el cultivo de plantas con interés económico[29] y ecológico en los suelos ácidos a nivel mundial.

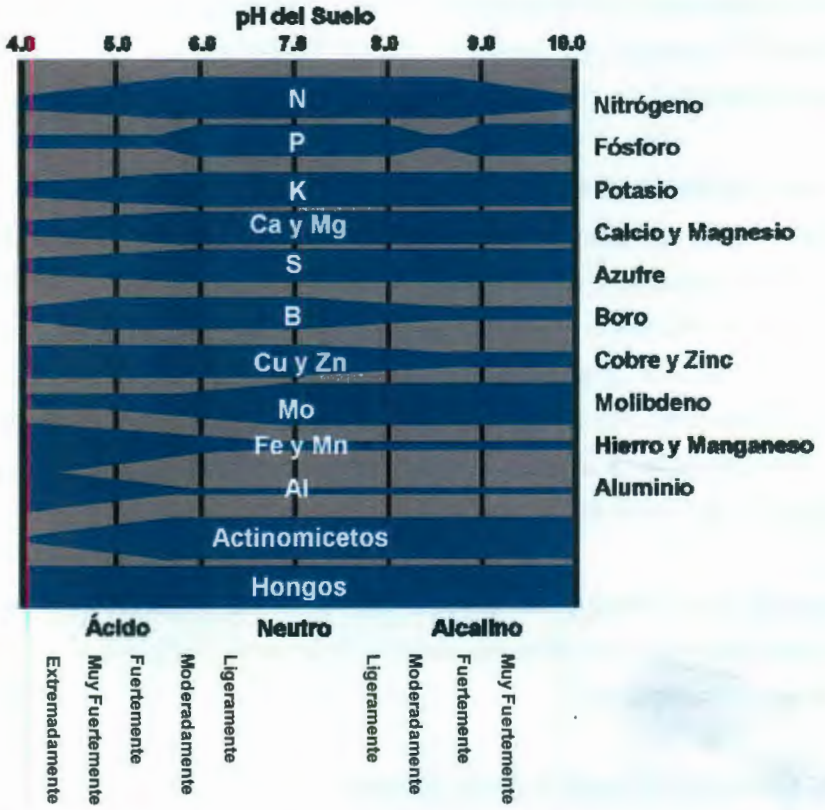

Figura 1.3. *Disponibilidad de nutrientes dependiendo del pH del suelo. (Tomado de http://www.terragis.bees.unsw.edu.au/terraGIS_soil)*

1.4. ALUMINIO

El Al es el metal más abundante en la tierra y el tercer elemento en abundancia en la corteza terrestre, donde compone aproximadamente el 8% en peso. En la naturaleza,

se encuentra solamente en forma oxidada. En cambio, en solución acuosa el ion hidroliza las moléculas de agua formando hidróxidos.

Este metal se ha relacionado con procesos patológicos importantes, tanto en el hombre, como en otros grupos de animales,[30] como agente neurotóxico, provocando la degeneración de fibrillas nerviosas, lo cual se ha observado en el cerebro. De igual forma se ha relacionado al Al con enfermedades como el Alzheimer y Parkinson.[31]

El estudio sobre la fitotoxicidad del Al empezó a principios de siglo XX y ha cobrado importancia ya que diversos metales, entre ellos el Al, se han descrito como importantes limitadores del crecimiento de las plantas provocando fuertes pérdidas económicas.[32,33] Además, los vegetales son la vía de entrada del Al a la cadena alimentaria del hombre directa e indirectamente.

1.4.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ALUMINIO

El aluminio (Al) es un elemento sólido en condiciones normales, de color blanco plateado, dúctil, maleable y cristaliza en forma cúbica. Lo podemos encontrar libre o combinado en la naturaleza. Pertenece al grupo III de la tabla periódica, es un metal trivalente (Al^{3+}), tiene un peso atómico de 25.98 $g.Mol^{-1}$, número atómico de 13 y una baja electronegatividad. Por su baja densidad no se le incluye en el grupo de metales pesados. Para aumentar la dureza del metal, normalmente se utiliza en aleaciones con Cu, Si, Mg y Zn, las cuales tienen aplicaciones industriales.

La química del Al es bastante compleja, debido a su alta carga iónica y su pequeño radio atómico, este metal es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble.[24]

1.4.2. ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO

Como mencionamos anteriormente, el Al es el tercer elemento más abundante en los suelos, junto al oxígeno y el silicio.[21] Dependiendo del pH del suelo, el Al molecular (cinco especies) existe en forma de hidroxialuminio: $Al(H_20)_6^{3+}$, $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^{+}$, $Al(OH)_3$ y $Al(OH)_4^{-}$. Cuando el pH es menor de 5 el Al^{3+} es la especie más tóxica para las plantas, sin embargo, cuando el pH del suelo es de 5 a 6, las especies dominantes son el $AlOH^{2+}$ y el $Al(OH)_2^{+}$, las cuales no son tan tóxicas para las plantas como Al^{3+}. Cuando el pH es neutro se forma el $Al(OH)_3$; sin embargo, no es tóxico y es

relativamente insoluble. El aluminato $Al(OH)_4^-$, es la especie dominante cuando el pH es alcalino (pH>7.0).[20] Pessarakli en su libro (2008)[20] menciona que la concentración de Al en suelos ácidos puede variar en un rango de varios micromoles (µM) a milimoles (mM), dependiendo de las condiciones del suelo.

1.5. TOMA DEL ALUMINIO EN PLANTAS

La toma del Al por el sistema radical es un proceso de intercambio que involucra los sitios de unión de Ca en la superficie de las células de la raíz. Este proceso empieza cuando las raíces son expuestas al metal, después de un periodo corto de tiempo, siendo el ápice de la raíz el principal sitio de toma del Al.[34]

La pared celular es el principal sitio de unión del Al, antes de entrar al citoplasma, debido a la carga negativa de sustancias como la pectina. Sin embargo, la membrana plasmática funciona como una barrera al movimiento pasivo del Al hacia el interior de la célula.[20] Por otro lado, en células de la raíz de plantas resistentes a este metal, se producen compuestos que se unen al Al para formar compuestos no tóxicos, como son los fosfatos, ácidos orgánicos (citrato, malato y oxalato) y algunas proteínas (fosfolipasa, glucanasa, NAD cinasa) al ser inducidas por el Al libre.[35-37]

Por otro lado, la toma de Al es significativamente reducida a bajas temperaturas (0°C) en comparación con la que ocurre a altas temperaturas (23°C).[37] Asimismo, altas concentraciones de los cationes NH_4^+ y H^+ facilitan la toma del Al en la rizosfera en los suelos que presentan un pH<5.0.[37]

1.6. DISTRIBUCIÓN DEL ALUMINIO EN LA RAÍZ

Garzón (2003) explica que debido a que la inhibición de la elongación de la raíz es el síntoma visible en la planta tras la aplicación externa del Al, éste ha sido uno de los órganos más estudiados.[24] Estudios realizados indican que la concentración de Al en la raíz depende de la sensibilidad de cada tipo de planta, ya que muchas plantas (tolerantes) poseen mecanismos de exclusión de este metal.[39]

Es conocido que el Al se acumula en los ápices de las raíces, incluyendo la caliptra y las zonas meristemáticas y de elongación.[40,41] A partir de los estudios por tinción de

raíces de trigo con hematoxilina, Delhaize *et al.* (1993) y Sasaki *et al.* (1997) demostraron que el Al se acumula en la epidermis y en las células de córtex.[40,41]

Asimismo, Lazoft *et al.* (1996) demostraron que el Al se acumula en las células de la capa externa de la raíz, durante los primeros 30 min y en las capas más internas después de las 18 h de tratamiento, pero en menor concentración.[42] La acumulación de Al en la raíz sigue una relación lineal con respecto al tiempo de exposición al metal.[38] Pessarakli (2008) menciona que el Al entra al cilindro central o estela de la raíz y se mueve ascendentemente hasta las hojas.[20]

1.7. EFECTOS DE LA TOXICIDAD POR ALUMINIO

La toxicidad por Al provoca una gran cantidad de síntomas en las plantas, interfiriendo en un amplio rango de procesos fisiológicos, celulares y moleculares. La toxicidad por Al resulta de su interacción con el apoplasto (pared celular), membrana celular y el simplasto (citosol). Mientras algunos síntomas y respuestas son detectables en segundos o minutos después de su exposición al metal, otros son solamente discernibles a exposiciones prolongadas ya sean horas o días.

1.7.1. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA RAÍZ

La inhibición del crecimiento de la raíz es el principal efecto de la toxicidad del Al, por lo cual es utilizado como una medida de la toxicidad por este metal. Este efecto fue observado en muchas especies, por ejemplo, Illes *et al.* (2006), encontraron que la elongación de la raíz de plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* era inhibida a 300 µM de $AlCl_3$.[43] Entre los efectos visibles se observan la inhibición de la elongación de la raíz, las raíces son pequeñas y quebradizas, los ápices de éstas así como los ápices de las raíces laterales se hinchan y se tornan de color café, además hay un pobre o nulo desarrollo de los pelos radicales.[44] Por lo que estos efectos provocan respuestas secundarias como lo son la inhibición de la toma de agua y de nutrientes.[45] El grado de toxicidad varía dependiendo de la especie de planta, las condiciones de crecimiento, la concentración de Al y la duración de la exposición al metal.

1.7.2. PARED CELULAR

Muchos estudios han descrito que la mayor parte del Al se encuentra en el apoplasto, indicando que más del 95% del Al asociado a las raíces de las plantas se encuentra en

la pared celular,[46] principalmente en células situadas en la periferia de la raíz.[47] La carga negativa neta de la pared celular determina su capacidad de intercambio catiónico (CEC, por sus siglas en inglés) y el grado en el cual el Al interactúa con la pared celular. Entre los muchos componentes de la pared celular, las pectinas han sido propuestas como el sitio crítico para la interacción Al-pared celular.

La interacción del Al conduce al desplazamiento de otros cationes (Ca^{2+}) fundamentales para estabilización de la pared celular. Consecuentemente, la fuerte y rápida unión del Al puede alterar la estructura y las propiedades mecánicas de la pared celular, haciéndola más rígida e impidiendo la expansión celular. Por otro lado existen evidencias de que la modificación de la carga iónica de la membrana afecta la absorción de otros cationes y aniones.[48,49]

También, es posible que el Al afecte la extrusión de microfibrillas de celulosa debido al aumento de la rigidez de la membrana plasmática evitando el movimiento de las proteínas relacionadas con este proceso de extrusión.[24]

1.7.3. MEMBRANA PLASMÁTICA

El Al no sólo afecta rápidamente a la pared celular, sino también a las características de la membrana plasmática. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, el Al puede interactuar fuertemente con la carga negativa de la superficie de la membrana plasmática. Como el Al tiene una mayor afinidad (500 veces) a las cargas negativas de las cabezas de fosfolípidos (componentes de la membrana) que otros cationes (como el Ca^{2+}), éste puede desplazar a los cationes que forman puentes entre los fosfolípidos de la bicapa lipídica, alterando la compactación de los fosfolípidos y la fluidez de la membrana. La interacción del Al con la membrana plasmática puede además, modificar la estructura de la membrana, así como el ambiente iónico cercano a la superficie de la célula, conduciendo a la perturbación de los procesos de transporte de iones y de la homeostasis celular.

Otro claro indicador de la interacción del Al con la membrana plasmática es la inducción de la síntesis de 1,3 β-glucano (callosa): la formación de callosa es una respuesta de la planta a cualquier tipo de estrés, incluyendo el mecánico, biofísico, químico y biológico. La acumulación de callosa en el apoplasto también ha sido usada como una medida de los primeros síntomas de la toxicidad por Al.[50,51] Ya que la

síntesis de callosa depende de la presencia de Ca^{2+}, se ha sugerido que el desplazamiento de Ca^{2+} de la superficie de la membrana inducido por el Al, puede incrementar la poza de Ca^{2+} requerida para estimular la síntesis de callosa.

Otra de las consecuencias de la toxicidad del Al, es la reducción de la absorción de calcio. El calcio actúa como segundo mensajero en la transducción de señales, desde el medio exterior hasta el metabolismo en el interior de la planta y se encuentra implicado en la expansión celular. Estudios han demostrado que el Al puede bloquear los canales de Ca^{2+} y K^+ en la membrana plasmática, evitando su entrada a la célula.[52] Por otro lado, se ha observado que plantas expuestas a tratamientos con Al el flujo de los cationes (Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+ y K^+) se reduce[44] y el flujo de los aniones (NO_3^- y PO_4^{-2}) aumenta.[24]

la casi instantánea depolarización de la membrana plasmática es una de las principales consecuencias de la exposición al Al.[53,54] Este cambio en el potencial electroquímico de la membrana plasmática puede deberse a las interacciones directas e indirectas del Al con las vías de transporte de iones.[55]

Por otro lado, el Al puede inhibir la actividad de la H^+-ATPasa de la membrana plasmática, lo que impide la formación y el mantenimiento del gradiente de H^+, esta alteración del gradiente de H^+ se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo*.[56-58] El gradiente de H^+ actúa como la principal fuerza impulsora de procesos de transporte secundario de iones, por lo que la interrupción del gradiente de H^+ por el efecto del Al, podría indirectamente modificar el estado iónico y la homeostasis de los iones en la célula de la raíz.

1.7.4. EFECTOS SOBRE LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Se ha visto que Al puede actuar sobre la ruta de transducción de señales, en particular interrumpiendo las vías de señalización de Ca^{2+}.[44,45] Asimismo, se ha indicado que uno de los mecanismos de toxicidad del Al podría derivarse de las interacciones entre este metal y los componentes de la vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos,[59] ruta en la cual la fosfolipasa C desempeña un papel importante. De igual forma, se menciona la inhibición de la actividad de la enzima fosfolipasa C por Al.[44,45,59] Parece que el Al posee una capacidad de unión a esta enzima muy superior al Ca^{2+}, afectando la funcionalidad de esta enzima por la unión del Al en los sitios de

unión a Ca^{2+}.[24] En estudios realizados por Piña-Chablé y Hernández-Sotomayor (2001), se observó que el Al tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PLC en raíces transformadas de *Catharantus roseus*.[60]

También, se ha observado un incremento en la fosforilación de proteínas en cultivos de células en suspensión de café (*C. arabica* L.) tratadas con $AlCl_3$.[61] Asimismo, Martínez-Estévez *et al.*, (2003) evaluaron el efecto de Al sobre fosfoinosítidos y la actividad de la fosfolipasa C, estos autores observaron que al tratar suspensiones celulares de *C. arabica* con $AlCl_3$ por períodos cortos (1 min) incrementaba dos veces la actividad de la PLC y la formación de IP_3 (inositol trifosfato) con respecto a las células en suspensión no tratadas con Al; sin embargo, en períodos largos de exposición al metal, la actividad de la PLC se inhibió en más del 50%.[62]

Este efecto del Al en periodos largos de tiempo (2 h) también fue observado por Quintal-Tun *et al.*, (2006) al adicionar este metal en forma de $AlCl_3$ y en forma de hidroxialuminosilicatos (HA), así como la inhibición de la formación de ácido fosfatídico (PA) cuando se adicionó Al en forma de $AlCl_3$ en células en suspensión por un periodo de 15 min.[63]

Por otro lado, se ha observado que la exposición a Al está asociada a la peroxidación de los lípidos de membrana debido a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (radicales libres). Sin embargo, parece que la peroxidación lipídica incrementa después de una exposición prolongada a Al (24 h o más). Por lo tanto, aunque el Al induce la peroxidación de los lípidos de membrana, ésta no se produce con la rapidez suficiente como para ser el primer síntoma de la toxicidad por el metal.[64,65] La generación de ROS y la disfunción mitocondrial inducida por Al podría jugar un papel más general en la inhibición del crecimiento de las raíces.[66]

1.7.5. EFECTO SOBRE EL CITOESQUELETO

Otro de los síntomas visibles de la toxicidad del Al sería la distorsión del patrón de extensión celular, debido a ello varios laboratorios han investigado el citoesqueleto como posible objetivo de la toxicidad del Al en el citosol, dada la importancia de sus componentes (microtúbulos y microfilamentos) en la división celular. El Al podría alterar la dinámica del citoesqueleto, ya sea a través de una interacción directa con los elementos del citoesqueleto, es decir, los microtúbulos o microfilamentos de actina o

indirectamente a través de la alteración de la cascada de señalización, debido a que el calcio citosólico participa en la estabilización del citoesqueleto. Frantzios *et al.*, (2000) sugieren que los daños producidos por este metal a nivel de citoesqueleto pudieran ser los siguientes: retraso en la despolimerización de los microtúbulos en todas las fases del ciclo celular, alteración en la capacidad de los microtúbulos para formar los sistemas bipolares durante la mitosis, así como la separación de los cromosomas durante la mitosis, también un trastorno en la polimerización de la tubulina ya que se ha observado una formación atípica de los microtúbulos en la exposición de las plantas a Al.[67]

1.7.6. EFECTO SOBRE EL ADN

Se ha demostrado que el Al inhibe la división celular y se asocia al ADN en diferentes plantas, posiblemente se une al ADN por los cargas negativas de los grupos fosfato que posee. El Al tiene la capacidad de unirse al ADN tanto *in vivo* como *in vitro*, algunos autores afirman que este metal se une a la cromatina disminuyendo su actividad. El Al puede unirse a otros ácidos nucleicos como el ARN ribosomal y de transferencia, aunque con menos afinidad. La unión del Al al ADN puede provocar cambios estructurales que dificultan la expresión celular.[24]

1.7.7. EFECTO SOBRE LA NUTRICIÓN MINERAL

La toxicidad por Al normalmente disminuye la concentración de ciertos elementos en las plantas. La disminución de la absorción de cationes como K^+ puede estar relacionada con la inhibición del crecimiento celular, ya que el K^+ contribuye a la expansión celular. Por otro lado, el efecto del Al sobre la absorción de nutrientes depende de la especie estudiada como del genotipo, ya que estudios con plantas hiperacumuladoras de Al revelan que la acumulación de Al en las hojas restringe la acumulación de otros elementos minerales, esto ha sugerido que las plantas que acumulan Al han desarrollado mecanismos eficientes para usar bajas concentraciones de otros elementos esenciales para crecer en suelos ácidos. Osaki *et al.*, (1997) observaron que en plantas acumuladoras de Al había un incremento en la acumulación de N, K y P y una disminución en el contenido de Ca y Mg.[68] Huang *et al.*, (1992) mencionan que no sólo la absorción de Ca parece ser alterada, sino también su translocación en el interior de la planta.[69]

1.7.7.1. INTERACCIÓN ALUMINIO-CALCIO

Uno de los primeros síntomas definidos en la toxicidad por Al es el bloqueo de la entrada de Ca. Existe una controversia entre si el Al aumenta o disminuye la concentración de Ca intracelular, ya que los resultados de diversos estudios, han indicado la disminución de éste a través del bloqueo de los canales y otros un aumento en la concentración citosólica.[24]

1.7.7.2. INTERACCIÓN ALUMINIO-POTASIO

En cuanto a la absorción de K, se observó que disminuía la absorción de este elemento en plantas de algodón[70] y arroz[32] cuando fueron expuestas a Al; sin embargo, se ha observado un efecto contrario. Por otro lado, en estudios realizados en *Zea mays*, parece que se encuentra más afectado el transporte de K que su absorción.[24,71] La inhibición de la absorción de K es parcialmente reversible cuando se retira el tratamiento con aluminio, lo que da motivo a especular sobre el bloqueo exterior por parte del aluminio de los canales de K.[24]

Por otro lado, otros estudios han indicado que la inhibición de los canales de potasio no es externa y éste es producido una vez que el Al ha penetrado al interior de la célula, sugiriendo que ciertos componentes, ya sea de la membrana plasmática o del citosol son requeridos en la inhibición de la absorción de K. La inhibición de la absorción de K es proporcional a la concentración de Al aplicada, ya que se ha observado que una concentración de 10 μM de Al inhibe aproximadamente en un 50% la absorción de K y una concentración de 50 μM la inhibe en 79%. Sin embargo, existen estudios en los que se produce una estimulación en la absorción de K en la raíces al utilizar 100 μM[67] y 200 μM[72] de Al.

1.7.7.3. INTERACCIÓN ALUMINIO-HIERRO

El hierro funciona como componente estructural y cofactor enzimático en las plantas (citrocromo oxidasa, catalasa peroxidasa y ferredoxina). Aproximadamente el 75% del Fe celular se encuentra en los cloroplastos y este metal es esencial para la síntesis de clorofila.[73] En tratamientos de raíces con Al se ha observado una reducción de la concentración de Fe y síntomas típicos de clorosis, por otro lado, también se reporta que al adicionar concentraciones altas de Fe a la solución utilizada en los tratamientos con Al pueden aliviarse los efectos tóxicos antes mencionados.[24]

1.7.7.4. INTERACCIÓN ALUMINIO-FÓSFORO

La forma en que el P se encuentra en el suelo depende del pH de éste; favoreciéndose la absorción de este elemento cuando las condiciones son ácidas. Este elemento forma parte de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), y otros componentes como AMP, ADP, ATP y NADP, por lo que participa en las reacciones energéticas, procesos anabólicos y transferencia de características hereditarias. Su deficiencia provoca alteraciones del metabolismo y desarrollo vegetal. Uno de los síntomas observado en plantas expuestas a aluminio es una pigmentación más oscura, un verde más intenso relacionado con una deficiencia de P.[24]

En variedades de plantas tolerantes al Al (trigo y tomate), se ha observado que su tolerancia coincide con la habilidad para tolerar bajos niveles de P. En plantas de *Trifolium repens* se observaron disminuciones significativas en el contenido de P en todos los órganos que se estudiaron.[74] En un rango de pH entre 4.5 y 7, se observa una fuerte interacción entre Al y P, incrementándo así la cantidad de P inmovilizado en la raíz y disminuyendo el P disponible en la parte aérea, donde se observan los síntomas de deficiencia por este metal. Cumming *et al.*, (1986) mencionan que el Al concentra la cantidad de P en la raíz y lo disminuye en la parte aérea.[71]

Por otro lado, al estudiar plantas acumuladores de Al, se han señalado ciertos efectos beneficiosos del Al sobre el aumento en el crecimiento de la raíz en la planta. Este aumento en el crecimiento de la raíz fue acompañada por un aumento de la concentración de P en los tejidos.[68]

1.7.8. OTROS EFECTOS

El Al provoca síntomas similares a la deficiencia de minerales, tales como el desarrollo de hojas pequeñas de color verde oscuro, maduración tardía, amarillamiento y muerte del meristemo apical de las hojas, efectos relacionados con la deficiencia de P. También provoca el enrollamiento de las hojas jóvenes y colapso de los meristemos, síntomas relacionados por la deficiencia o reducción del transporte de Ca.[25]

Un exceso de Al provoca la inhibición de la división celular en las raíces principalmente en los meristemos, inhibe la actividad respiratoria en la mitocondria. De igual forma, este metal interfiere con algunas de las enzimas que actúan en la deposición de los polisacáridos de la pared celular incrementando el contenido de pectina, hemicelulosa

y celulosa en la pared celular de las raíces, asimismo, aumenta la rigidez de la pared celular debido al mal entrecruzamiento de las pectinas. A nivel celular el daño causado por el contacto con Al está principalmente asociado a su unión a la calmodulina.[32] En el Cuadro 1.3, se observan los efectos de la toxicidad por Al.

Cuadro 1.3. *Posibles blancos de la toxicidad del aluminio en plantas superiores (Pessarakli, 2008).*[20]

Toxicidad del aluminio (Al) en plantas superiores	
A nivel de tejidos	**Evidencias (efectos)**
Ápice de la raíz	Inhibición de la división celular de la raíz y la elongación de la zona de transición
Cofia o Caliptra	Vacuolización de la cofia o caliptra
Pelos radicales	Reducción de los pelos radicales
A nivel celular	
Pared celular	Incremento del contenido de peptina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular
Membrana plasmática	Inhibición del transporte de cationes
Mitocondria	Inhibición de la actividad respiratoria
Citoesqueleto y microtúbulos	Reorganización del citoesqueleto
Simplasto	Acumulación del Al en el núcleo
Apoplasto	Acumulación del Al entre las células
A nivel molecular	
ADN ATP GTP Calmodulina Proteínas/enzimas	Disturbios en la replicación del ADN Reducción de la producción de ATP Reducción de las funciones del GTP Reducción de las funciones de la calmodulina Impacto sobre las proteínas de membrana, ATPasa y NAD-cinasa
Interacción con otros cationes y aniones inorgánicos	
Ca^{2+}	Interrupción de la ruta de señalización por Ca^{2+}
H^{+}	Cambios en el pH citosólico
ROS	Daño a los lípidos de membrana

1.8. EFECTO BENÉFICO DEL ALUMINIO

El Aluminio (Al), Cobalto (Co), Selenio (Se), Sodio (Na) y Silicio (Si) son considerados elementos benéficos para las plantas, ya que a pesar de que no son requeridos para todas, pueden promover el crecimiento y ser esenciales para determinados taxas dependiendo de las condiciones ambientales, la concentración del elemento y el tipo de especie de planta.[75] Entre los efectos benéficos de estos elementos, se ha reportado que mejoran o aumentan la resistencia a estrés biótico, como el ataque por patógenos y herbívoros, y a estrés abiótico como la salinidad, la sequía, la toxicidad y la deficiencia de nutrientes.

Muchos trabajos se han reportado sobre el papel tóxico del Al; sin embargo, algunos autores han reportado el papel benéfico de este elemento en algunas especies de plantas cuando es suministrado a bajas concentraciones. Yoshii (1937) y Osaki *et al.* (1997) han reportado que el Al aumenta el crecimiento, principalmente de plantas nativas o adaptadas a suelos ácidos como *Miscanthus sinensis* y *Melastoma malabathricum*.[76,68] En esta última especie se ha observado que el Al aumenta la toma de P, ya que se vio una mayor concentración de P en hojas de plantas de *M. malabathricum* expuestas a Al, así como en las raíces, aunque el incremento del P en las raíces pudiera deberse a la precipitación de Al-P sobre lá superficie de la raíz y/o en el espacio libre de Donnan. Osaki *et al.* (1997) también reportan que hay un aumento en la toma de K y N, así como un decremento en la toma de Ca y Mg por la aplicación de Al. En este mismo trabajo se observó un incremento en el crecimiento de la raíz de *M. malabathricum* a 100 µM de $Al_2(SO_4)_3$.[68]

En el transporte de azúcares, aminoácidos y varios iones a través de la membrana está involucrado un gradiente electroquímico producido por bombas de protones. En presencia de 100 µM de $AlCl_3$ se observó un incremento de la extrusión de H^+ y en la polaridad de la membrana en trigo, lo cual podría estar relacionado con una mayor toma de nutrientes y con el incremento en el crecimiento.[77,78] Matsumoto y Yamaya (1986) en chícharo (*Pisum sativum*) reportaron un aumento en la actividad de la ATPasa inducida por Al.[79] En un trabajo con raíces de *H. vulgare* se ha reportado que la absorción de P y K fue acelerada por el Al y este efecto sobre la absorción de P desapareció cuando se utilizó un inhibidor metabólico;[72] en contraste, Matsumoto *et* al. (1992) reportaron una inhibición de la actividad de ATPasa en *H. vulgare* en presencia de Al.[80]

En algunos informes se ha reportado un aumento de la biomasa de las raíces de especies arbóreas, después de ser tratadas con Al y en la mayoría de estos reportes el mecanismo propuesto para explicar este efecto es el alivio de la toxicidad por H^+, provocada por cationes polivalentes como el Al^{3+}.[81,82] Este mecanismo, en el cual el Al previene la toxicidad por H^+, fue demostrado en plantas como trigo, pepino, rábano japonés, guisante, etc.[83]

Carr (2001) en su tesis doctoral reporta el efecto de varias dosis de $AlCl_3$ (0, 0.25, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mM Al) sobre el crecimiento y contenido nutrimental de *C. sinensis*. En ausencia de Al el crecimiento de *C. sinensis* fue retardado y concentraciones cercanas a 1 mM fueron tóxicas para *C. sinensis*. A concentraciones de 0.25 y 0.5 mM, distintas respuestas rizoestimulatorias fueron observadas. En periodos cortos la biomasa de estas plántulas incrementó en 44 y 35% respectivamente, comparado con las plantulas testigo, creciendo en ausencia de $AlCl_3$. Asimismo, las concentraciones benéficas de $AlCl_3$ (0.25 y 0.5 mM) estimularon la toma de Ca, Mg, K y Mn, a diferencia de Fe, Cu y Zn.[84]

De igual forma, Ghanati *et al.* (2005) evaluaron una posible conexión entre el efecto del Al sobre el crecimiento de plantas de té y el sistema de barrido de especies reactivas de oxígeno (ROS) en raíces y suspensiones celulares de té. En este trabajo se observó que el crecimiento de la raíz fue marcadamente estimulado en presencia de 400 µM de $AlCl_3$ (en solución Hoagland), comparado con las raíces crecidas en ausencia de Al. Además, en los tratamientos sin Al se observó una abundancia de raíces con una coloración café, así como una mayor emergencia de raíces laterales (secundarias y terciarias). En las suspensiones celulares de té, también se apreció un aumento en el crecimiento neto después de un pretratamiento por 24 h con 50 y 500 µM de $AlCl_3$. Por otro lado, se evaluó la tasa de peroxidación de lípidos, la cual fue significativamente más baja en raíces y suspensiones celulares de té tratadas con Al en comparación con los cultivos en ausencia de este metal. También se observó una mayor actividad de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa en ambos cultivos en presencia de Al, así como una reducción en los contenidos de lignina y fenoles unidos a pared celular.[85] Con base a estos resultados, Ghanati *et al.* (2005) mencionan que el tratamiento con Al provocó la activación del sistema antioxidante, sugiriéndose que el papel fundamental del Al en la promoción del crecimiento de las plantas de té está conectada con el sistema de barrido de ROS, lo que resulta en una mayor integridad de la membrana y una menor lignificación de la pared celular.[85]

En el caso de *M. malabathricum* se ha sugerido que el Al es esencial para el crecimiento de esta planta.[86] Osaki *et al.* (1997) reportaron la estimulación del crecimiento de ésta planta en 100 µM de Al, así como una mayor toma de P.[68] En 2001 Watanabe y Osaki, mencionan que a pesar de que el Al aumenta la

concentración de P en las hojas y en la savia del xilema, posiblemente la estimulación de la toma P no es la causa primaria del aumento del crecimiento en *M. malabathricum* sino el Al en sí.[87]

M. malabathricum es una especie hiperacumuladora de Al que crece en suelos ácidos tropicales, acumula más de 10 g Kg^{-1} de Al en hojas maduras y más de 7 g Kg^{-1} en hojas jóvenes.[88] *C. sinensis* es igual una especie hiperacumuladora, Matsumoto *et al.* (1976) reportan 30 g Kg^{-1} en hojas maduras y 600 mg Kg^{-1} en hojas jóvenes en esta planta.[89] En *Melastoma* a través del análisis de ácidos orgánicos y Al, en la savia xilemática y en los tejidos de la planta, se vio que el Al era traslocado de las raíces a las hojas a través del complejo Al-citrato y posteriormente éste complejo es transformado a Al-oxalato para ser almacenado en las hojas. También, se demostró que en ausencia de Al hay una mayor concentración de malato en la savia del xilema, en presencia de Al hay una mayor concentración de citrato, lo cual indica que *Melastoma* cambia el metabolismo de los ácidos orgánicos en ausencia o presencia de Al, más específicamente aumenta la síntesis de citrato y disminuye la del malato.[87]

Por otro lado, se ha visto que en ausencia de nutrientes el Al no incrementa el crecimiento radical y la acumulación de Al en hojas de *M. malabathricum*, por lo que es posible que una interacción del Al con algunos nutrientes en el apoplasto (pared celular o membrana plasmática) de la raíz sea esencial para ejercer el efecto beneficioso de este metal sobre la raíz, así como para la síntesis de citrato que es necesario para el transporte de Al a las hojas.[90]

También, se ha observado que esta planta secreta mucílago para acumular Al en suelos con baja disponibilidad de este elemento y su acumulación incrementa el crecimiento de raíces y brotes de la planta. Posiblemente el Al acumulado en el mucílago de la raíz sea posteriormente absorbido en forma de un complejo con ácidos orgánicos.[90,91] Asimismo, se demostró que el mucílago secretado por las capas más externas de la raíz, presenta características físicas y químicas únicas que facilitan la toma de este metal en *M. malabathricum*.[92]

En suelos ácidos, al igual que el Al, la disponibilidad de Fe es elevada, por lo que las especies que crecen en este tipo de suelo pueden presentar toxicidad por Fe. Se ha observado que 100 µM de Fe aplicado en una solución de nutrientes indujo la

inhibición del crecimiento en *M. malabathricum*, debido al estrés oxidativo causado por este metal, pero la aplicación de 500 µM de Al previno la toxicidad por Fe. Este alivio también fue asociado con un decremento en la concentración de Fe en brotes y raíces.[86] Por tal motivo, Watanabe *et al.* (2009) han considerado como una de la principales razones del incremento en el crecimiento de *M. malabathricum* la reducción de la acumulación del Fe inducido por Al. También, se ha sugerido que el poco crecimiento en *M. malabathricum* en ausencia de Al puede ser por el efecto del oxalato sintetizado en altas cantidades, ocasionando la formación de complejos con metales alcalinos, como el Ca y el Mg en la planta, resultando posiblemente en deficiencia de esos nutrientes.[93]

Al igual que en *C. sinensis*, *M. malabathricum* y otras especies adaptadas a suelos ácidos, en *Quercus serrata* Thunb se observó incremento en el crecimiento de la raíz y este crecimiento se produjo a corto y largo plazo. Tomioka *et al.* (2005),[83] al evaluar el efecto de varias concentraciones (0 a 5 mM) de $AlCl_3$ en el crecimiento de *Q. serrata* observaron un aumento en el crecimiento de la raíz, así como en la biomasa de raíces y brotes en concentraciones mayores a 2.5 mM del metal. También se vio un aumento en el número de raíces secundarias y terciarias en presencia de Al; al analizar el contenido nutrimental se observó una mayor concentración de P en las raíces de plantas expuestas al metal. Con base a estos resultados, estos autores han sugerido que el aumento en la concentración de P puede deberse a la precipitación del P con Al sobre la superficie de la raíz o en el apoplasto de ésta y de alguna forma las especies en las que se ha observado un aumento en el crecimiento de la raíz tengan la habilidad de utilizar el P precipitado. Por otro lado, también se sugiere que el efecto benéfico sobre el crecimiento de la raíz, así como los cambios en la morfología de ésta posiblemente se deba a cambios en los niveles de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en las raíces, siendo el Al capaz de inducir directa o indirectamente la síntesis o el transporte de RCV, tales como el ácido indol acético (AIA), citocininas y giberelinas.[83]

En *Picea abies* se ha reportado el incremento de los niveles de AIA, citocininas y giberelinas en las raíces en presencia de 0.74 y 1.85 mM de $Al_2(SO_4)_3$, siendo estos cambios correlativos con los cambios morfológicos inducidos por este metal, como la inhibición de la elongación de la raíz primaria y la estimulación de raíces laterales cercanas al ápice de la raíz.[94] Oda (2003) reporta que la formación de nuevas raíces

fue acelerada por el tratamiento con Al en *Quercus acutissima* y *Cinnamomun camphora*, esos resultados correlacionaron con bajas concentraciones de AIA y un incremento en la concentración de citocininas en raíces tratadas con 2.7 mM de Al.[95]

También, se han reportado cambios morfológicos en la raiz en presencia de Al como engrosamiento, coloración blanca y una buena elongación en *C. sinensis*, *Q. acutissima*, *C. camphora*, *E. viminalis*, *Q. serrata* y *M. malabathricum*.[85,86,95] En esta última especie se han observado cambios en la morfología de las hojas en ausencia del metal, viéndose síntomas como clorosis y enrollamiento de las hojas.[86]

Por otro lado, Pilon-Smits *et al.* (2009) menciona que plantas hiperacumuladoras de aluminio (1 g Al kg^{-1} de peso seco) pueden utilizar este metal en sus tejidos para disuadir herbívoros,[75] como ha sido observado en estudios realizados al aplicar Al en *Festuca arundinacea*.[96]

En mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (*zrt1 Δ*) que difieren en el gene *ZRT1*, el cual codifica para un trasportador de Zn^{2+} de alta afinidad, se ha observado que esta mutante crece escasamente a bajo pH, bajo P y en condiciones de deficiencia de Zn; sin embargo, cuando fue aplicado Al en el medio de cultivo se restauró el crecimiento a nivel comparable a las cepas silvestres.[97]

El efecto benéfico también ha sido observado en microorganismos. Por ejemplo, en *Frankia* un actinomiceto fijador de N, el cual fija nitrógeno *in vitro* o asociado simbióticamente con raíces de numerosas plantas dicotiledóneas (actinorrizas), se ha demostrado un incremento en su crecimiento (*in vitro*) cuando se adiciona hasta 500 µM de Al, igualmente se vio que el Al previno el efecto inhibitorio del pH acido (pH 4.8).[98]

Asimismo, varios reportes indican que el Al está implicado en la formación ósea.[99,100] Se ha visto que la adición de Al aumentó la proliferación y la diferenciación de osteoblastos humanos y de pollo.[101] Por otra parte, se ha demostrado que el Al induce la síntesis de ADN en osteoblastos *in vitro*[102] y actúa como mitógeno en células epiteliales de ratón.[103]

1.9. TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN CAFETO

Según Pavan y Bingham (1982) al evaluar el efecto del Al en solución nutritiva utilizando diferentes concentraciones de $Al_2(SO_4)_3$ (0, 0.037 y 0.148 mM), observaron que el primer síntoma de la toxicidad del Al en plantas de cafeto como en otras especies de plantas es la inhibición del crecimiento de la raíz, también se observan raíces laterales más delgadas, más cortas y en menor número. Las raíces primarias se oscurecen después de estar expuestas al tratamiento con Al, ya que de poseer un color blanco pasan a ser de color café después de estar pocas semanas en presencia del metal, las hojas se observan más pequeñas, presentan clorosis en el borde seguido del enrollamiento de las mismas.[104] Estos efectos han sido asociados a la actividad del Al^{3+}, en comparación con las otras especies de aluminio presentes en el solución.

En trabajos realizados por Pavan y Bingham (1982) y Pavan (1983), en hojas de cafeto expuestas a Al, encontraron una reducción del contenido celular de Ca^{2+} y PO_4^{-3} intracelular y un aumento en el contenido intracelular de Al^{3+}.[104,105] Martínez y Monerat (1992) mencionan que en plantas de cafeto el Al es preferentemente acumulado en el sistema radical y sólo pequeñas cantidades son transportadas al tallo.[106] Por otro lado, se reportan variedades tolerantes a la toxicidad por Al e incluso un efecto benéfico de este metal.[107-111]

Tambien, se ha observado el efecto tóxico del Al en suspensiones celulares; por ejemplo, en estudios en suspensiones celulares de *C. arabica* realizados por Martínez–Estévez (2001), se demostró que la dosis letal media es 25 µM de Al y que este metal entra a las células después de 30 min de incubación.[25] Asimismo, Quintal-Tun *et al.* (2006), determinaron que el Al en forma de $AlCl_3$ y Al como hidroxialuminosilicatos (HAS) inhibían la actividad de la fosfolipasa C (PLC) en ≈50% cuando las células fueron incubadas por 2 h. Por otro lado, se observó una inhibición en la formación de ácido fosfatídico cuando estas células eran cultivadas durante 15 min en $AlCl_3$.[63] Ramos-Díaz *et al.* (2007) también, reportan la inhibición en la formación de acido fosfatídico cuando células en suspensión fueron tratadas con $AlCl_3$ por períodos cortos de tiempo.[112]

1.10. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ALUMINIO

La respuesta de las plantas frente a cualquier estrés se divide en mecanismos de resistencia, los cuales evitan la entrada de un factor de estrés al interior de una célula u organismo y mecanismos de tolerancia, que permiten la penetración de la sustancia estresante, pero que ello no afecta el correcto funcionamiento fisiológico de la planta. Ambos mecanimos han sido observados como respuesta al estrés por Al. Las respuestas de las plantas, frente a la toxicidad por Al, así como otros tipos de estrés varía considerablemente dependiendo de la especie e incluso dependiendo de la variedad que se está estudiando.

Entre los mecanismos de resistencia se mencionan: la exclusión de moléculas de bajo peso molecular (como ácidos orgánicos) para la quelación del Al apoplástico, la modificación del pH rizosférico, la unión del Al a la pared celular, disminución de la permeabilidad de la membrana a la penetración de Al, así como la unión del Al al mucílago asociado al ápice de la raíz o tal vez el eflujo del propio Al de las células de la raíz.[24,113] Entre los mecanismos de tolerancia, Garzón (2003) y otros autores mencionan la quelación del Al con moléculas orgánicas en el interior celular, su unión a proteínas en el citoplasma y su posterior compartamentalización en la vacuola u otros organelos.[24] También, se han reportado modificaciones del metabolismo que permiten la función celular normal en presencia de Al.[113]

Se ha visto que los ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato) son moléculas que se unen al Al y que permiten la exclusión de este metal al formar complejos estables y menos tóxicos que la forma iónica. Entre algunas de las plantas que secretan aniones orgánicos se encuentran *T. aestuvum*, *Z. mays*, *F. esculentum* M., *C. tora* L., *H. vulgare*, *L. bicolor*, *P. falcataria*, así como especies de eucalipto y abeto.[114,115]

En el 2004, Sasaki *et al.* aislaron en trigo (*T. aestivum*) un gen que controla el eflujo de malato dependiente de Al.[116] Este gen designado como *TaALMT1* codifica para una proteína hidrofóbica que se localiza en la membrana celular de células de la raíz y su expresión confiere resistencia a genotipos de trigo. Se ha demostrado que la expresión heteróloga de este gen en cultivos de *N. tabacum* y plantas de *H. vulgare* permitieron un eflujo de malato y un incremento en la tolerancia a Al,[116,117] Zhang *et al.* (2008) reportan que el TaATML1 funciona como un canal de malato activado por Al.[118]

El genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene al menos 14 homólogos con un 30 a 40 % de identidad con *TaALMT1*. *El AtALMT1* ha sido relacionado recientemente con el mecanismo de resistencia a Al a través de su papel en la liberación de malato.[119,120] Hoekenga *et al.* (2006) demostraron que una mutante deficiente en *AtAMLT1* en el cromosoma 1 de *A. thaliana* pierde su capacidad de flujo de malato inducido por Al, ocasionando una mayor sensibilidad a Al que las plantas silvestres. En *Brassica napus* se han identificado dos homólogos de *TaALMT1*, los cuales son designados como *BnALMT1* y *BnALMT2* y son expresados en raíces en presencia de Al; asimismo, se ha observado que otros cationes como lantano (La), iterbio (Yb) y erbio (Er) también incrementan la expresión de ambos homólogos en raíces.[120]

Se ha demostrado que en trigo existe un segundo mecanismo de resistencia a Al que involucra un eflujo de citrato.[121] El eflujo de citrato activado por Al también se ha observado en cebada (*H. vulgare*) y sorgo (*S. bicolor*), este eflujo no es activado por genes tipo *ALMT1*, pero si por miembros de la familia *MATE*. Por ejemplo, el eflujo de citrato en *S. bicolor* es codificado por *SbMATE*[122] y en *H. vulgare* por *HvAACT1*, el cual posteriormente fue denominado *HvMATE1*.[123,124] En trigo (*T. aestivum*) se ha reportado que el eflujo de citrato en respuesta a Al es probablemente codificado por genes de la familia *MATE*, el *TaMATE1*.[121] En *A. thaliana* es de importancia la exudación de malato y citrato para la resistencia a Al, recientemente se ha identificado un gen de la familia *MATE* (*AtMATE*) que codifica para un transportador de citrato, el cual es expresado en raíces e inducido por Al. Sin embargo, en *A. thaliana* el principal mecanismo de resistencia a Al es el eflujo de malato mediado por el *AtALMT1*, teniendo una contribución pequeña pero significante del *AtMATE*.[125]

Por otro lado, *E. camaldulensis* es una especie que presenta una alta resistencia a Al. Se ha considerado que no sólo la exclusión de ácidos orgánicos (como malato, citrato y oxalato) son claves en el mecanismo de resistencia de esta planta, ya que se ha reportado un compuesto (nuevo) unido a Al en raíces y éste podría tener un papel importante en la alta resistencia de la planta actuando como un mecanismo interno de de detoxificación.[126]

El mucílago de la raíz, también juega un importante papel como mecanismo de resistencia a metales. El mucílago es un material gelatinoso compuesto de polisacáridos de alto peso molecular que son exudados de las capas más externas del

ápice de la raíz.[127] Debido a que los azúcares en el mucílago contienen ácido urónico, los grupos carboxilo de este ácido pueden absorber cationes metálicos, evitando que estén disponibles.[91,128] En *V. unguiculata* se encontró que el 50% del Al en la raíz estaba unido al mucílago y la eliminación del mucílago de la raíz incrementó la fitotoxicidad del Al. En trigo (*T. aestivum*) y maíz (*Z. mays*) se ha reportado una fuerte unión entre el mucílago-Al y esta unión no es tóxica para la planta.[129,130] De igual forma, se ha demostrado que la pectina del mucílago (peso molecular elevado) juega un papel importante en la inmovilización del Al, reduciendo su toma en el ápice de la raíz.[131] Por otro lado, también se ha observado una estructura tipo Cap (cofia o caliptra) que protege a las células borde del ápice de la raíz de *A. mangium*; sin embargo, su papel como mecanismo de resistencia a Al todavía no se entiende.[132]

Otro de los mecanismos de resistencia y/o tolerancia al estrés por Al que ha cobrado importancia, es su interacción con otros elementos. En 1939, Pierre y Stuart demostraron que el P puede prevenir el efecto tóxico debido a la directa precipitación de Al-P en la zona de asimilación del P.[133] También se reporta que el incremento de P en las raíces evita los efectos tóxicos del Al.[134] En *Oryza sativa* no se inhibió en respuesta a Al el crecimiento de los brotes en plantas precultivadas con P.[135] También se ha reportado que un adecuado contenido de P puede aumentar la tolerancia a Al en maíz (*Z. mays*).[136] Recientemente se reportó que el P incrementa la tolerancia a Al en *L. bicolor*, posiblemente por un incremento en la acumulación y traslocación de P hacia los brotes, así como el aumento en la exclusión de Al en el ápice de la raíz.[137] En *Citrus grandis* el P previno la inhibición del crecimiento de raíces y brotes, también se reporta que disminuyó la inhibición de la fotosíntesis provocada por el efecto tóxico del Al.[138] En suspensiones celulares de *C. arabica* se demostró que los efectos tóxicos del Al sobre el crecimiento celular son restaurados por la adición de altas concentraciones de P en el medio de cultivo.[139]

Se ha demostrado que el Ca puede evitar los efectos tóxicos del Al sobre el crecimiento de la raíz, la formación de raíces laterales y el crecimiento de pelos radiculares en *Glycine max*.[140] Ribeiro da Silva *et al.* (2008) reportan que la inhibición del crecimiento de la raíz de *Glycine max* a 10 µM de Al se revirtió a nivel comparable a las plantas control por un efecto benéfico del Mg; asimismo, la reducción de la toxicidad del Al fue acompañado por una menor acumulación de Al en los tejidos de la planta, posiblemente por una absorción competitiva entre cationes o por la exclusión

de Al del tejido vegetal inducido por Mg. También se menciona que el Mg previene más eficazmente la toxicidad del Al que el Ca.[141] En *T. aestivum* también se ha reportado que el Ca y Mg confieren protección contra la toxicidad por Al.[142]

Por otro lado, se menciona que el B, un elemento esencial para las plantas superiores, también previene la toxicidad del Al. Este efecto benéfico del B se ha mencionado para *P. vulgaris*,[143] *C. sativus*, *Z. mays*[144] y *P.* sativum.[145] Se ha reportado que el mecanismo de acción del B está relacionado con la reducción de los sitios de unión del Al a la pectina de la pared celular, así evitando la acumulación del Al y algunas de las consecuencias de la toxicidad por este metal.[145] De igual forma, se menciona que el B puede prevenir el decremento de la actividad de la Rubisco y evitar la inhibición de la fotosíntesis.[138,146]

El Si también puede prevenir el estrés abiótico en plantas, este elemento puede evitar los síntomas de toxicidad de metales pesados. Varios mecanismos han sido propuestos, entre ellos se incluyen la reducción de la disponibilidad de metales en el medio de cultivo, la regulación de la toma y transporte raíz-brote, la modulación de la capacidad de carga catiónica de la pared celular, la estimulación de antioxidantes tanto enzimáticos (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa y glutatión reductasa) como no enzimáticos (ascorbato y glutatión). Además, este elemento puede formar complejos y precipitar en el citoplasma con Zn, Cd y Al en forma de silicatos y ser posteriormente compartamentalizados en la vacuola.[75,147-149]

En plantas de maíz (*Z. mays*) pretratadas con Si, se observó una menor inhibición del crecimiento de la raíz por Al en comparación con el control, se menciona en este trabajo que el efecto benéfico del Si es causado por una menor toma de Al y por su exclusión en el ápice de la raíz.[150] Se ha visto en *Faramea marginata* (*Rubiaceae*) la formación de complejos Al-Si en los tejidos de las hojas, lo cual podría sustancialmente contribuir como un mecanismo de detoxificación interna de Al.[151] También se menciona que muchas especies de Rubiáceas acumulan Al y Si.[152] En suspensiones celulares de *C. arabica* se ha reportado que el ácido silícico (como HAS) parece proteger contra la influencia del Al sobre la formación de PA.[63]

Sin embargo, hasta el momento estos mecanismos todavía no son completamente entendidos. Por otro lado, debido a que la inhibición del crecimiento radical es unos de los primeros efectos observados en la toxicidad por aluminio, este parámetro ha sido usado ampliamente como indicador de la tolerancia a este metal.

1.11. HIPÓTESIS

Si el aluminio modifica el crecimiento radical en otras especies de plantas, entonces se puede observar este efecto en plántulas de *C. arabica* L. cultivadas en condiciones *in vitro*.

1.12. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del aluminio en el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*

1.13. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto.
- Evaluar el efecto del Al en otras especies (*A. thaliana* y *C. chinense*) de plantas.
- Identificar la distribución del Al en raíces de plántulas de cafeto.
- Cuantificar el contenido de Al en brotes y raíces.

1.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto que pudiera tener el $AlCl_3$ sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*, se diseñó un esquema experimental (Figura 1.4.), en el cual se tomaron semillas de *C. arabica* L. cv Typica, que se desinfectaron y se les extrajeron los embriones. Estos embriones fueron germinados en medio Gamborg[153] a la mitad de su fuerza iónica ($B_5/2$) para la obtención de plántulas. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas en medio $B_5/2$ a diferentes concentraciones de $AlCl_3$ y se incubaron en fotoperiodo a 25 °C. Como testigo se usaron plántulas que crecieron en ausencia de Al. Durante todo el tratamiento se realizó la medición de la longitud de la raíz, al finalizar el tratamiento se cosechó el material vegetal (brotes y raíces) para la posterior cuantificación del Al, así como para los análisis de histología.

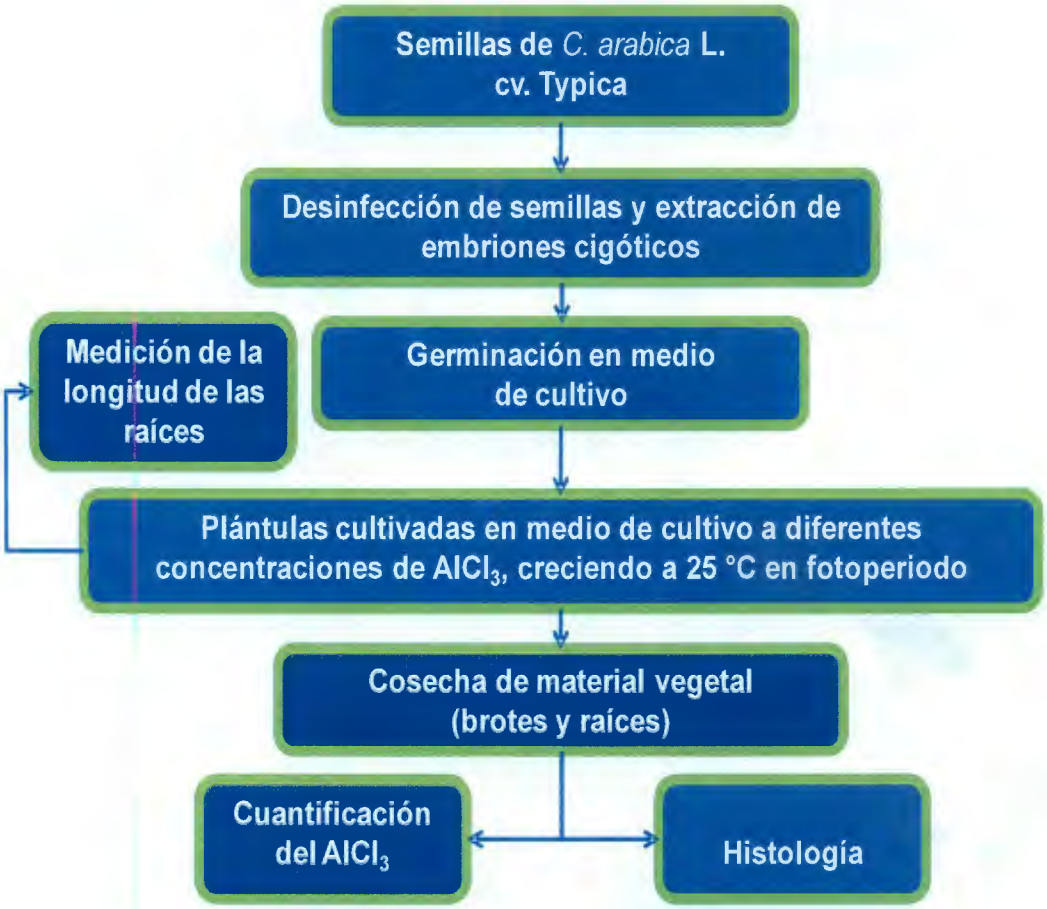

Figura 1.4. *Estrategia experimental.*

1.15. REFERENCIAS

1. R.V.M. Patiño, Plantas cultivadas y animales domésticos en América Equinoccial. Cali, Colombia, 1969; 573.
2. J. León, Botánica de los cultivos tropicales, 3a Ed; San José, Costa Rica, 2000, 350-364.
3. G. Castillo; A. Contreras; A. Zamarripa; I. Méndez; M. Vázquez; F. Holguín; A. Fernández, Tecnología para la producción de café en México, INIFAP, 1a Reimpresión; México, 1996, 1-11.
4. United States Departament of Agriculture,Tropical products: world markets and trade, Foreign Agricultural Service, http://www.fas.usda.gov/htp/tropical.asp, 2007.
5. W. Solano, Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática, Tesis Licenciatura en: Ingeniería en. Agronomía con énfasis en Fitotecnia, Universidad de Costa Rica, Turrialba, Costa Rica, 2001.
6. M. Alvarado; G. Rojas, El cultivo y beneficiado del café, San José, Costa Rica. 1998, 184.
7. B.J. Ramírez, Especies y variedades del cafeto, Asociación Nacional del Café (ANACAFE), Guatemala, Guatemala, 1971, 32.
8. E.A.A. Da Silva; P.E Toorop; A.C. van Aelst; H.W.M. Hilhorst, Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination, *Planta 220,* 251-261, 2004.
9. D.M. Dedecca, Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer, *Bragantia 16,* 315-355, 1957.
10. M.T.S. Eira; E.A. Amaral; R. De Castro; S. Dussert; C. Walters; J.D Bewley; W.M. Hilhorts, Coffee seed physiology, *Braz J. Plant Physiol. 18,* 149-163, 2006.
11. C.A. Krug; A. Carvalho, Genetical proof of the existence of coffee endosperm, *Nature 144,* 515, 1939.
12. A.J.T. Mendes, Cytological observations in *Coffea*. VI. Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L., *Am J. Bot. 28,* 784-789, 1941.
13. S.E. McGregor, Insect pollination of cultivated cropplants. Agriculture Handbook 496. Departament of Agriculture, Agricultural Research Service, Whasington DC, United States, 1976, 162.

14. M.F. Carneiro, Advances in coffee biotechnology, *AgBiotechNet. 1,* 1-7, 1999.
15. I. Girón, Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal, Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, 1998.
16. A. Zamarripa and E. Escamilla, Variedades de café en México: origen, características y perspectivas, Universidad Autónoma Chapingo, México, 2002, 39.
17. INMECAFE, El Cultivo del Cafeto en México, 1a Ed.; Instituto Mexicano del Café (INMECAFE); México, 1990, 35-40, 54.
18. J. Onthong; M. Osaki, Adaptations of tropical plants to acid soils, *Tropics 15,* 337-338, 2006.
19. L.V. Kochian; O.A. Hoekenga; M.A. Piñeros, How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency, *Annu. Rev. Plant Biol. 55,* 459–493, 2004.
20. M, Pessarakli, Acid soil and aluminum tolerance in turfgrasses, in: Handbook of turggrass management and physiology, University of Arizona Tucson, Arizona, USA., 2008, 375-388.
21. H. Marschner, Mineral nutrition of higher plants, 2a Ed, Academic Press, New York, 1995, 889.
22. P.S. Kidd; M. Llugany; Ch. Poschenrieder; B. Gunsé; J. Barceló, The role of root exudates in aluminium resistence and silicon-induced of amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.), *J. Exp. Bot. 52,* 1339-1352, 2001.
23. D.I. Arnon; C.M. Johnson, Influence of hydrogen ion concentration on the growth of higher plants under controlled conditions, *Plant Physiol. 17,* 525-539, 1942.
24. T. Garzón, Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España, 2003.
25. M. Martínez-Estévez, Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café, Tesis doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Mérida, México, 2001.

26. N.S. Bolan; M.J. Hedley, Role of carbon, nitrogen and sulfurcycles in soil acidification, In: Rengel Z. Ed. Handbook of Soil Acidity, Marcel Dekker, New York, 2003, 29–56.
27. C. Tang; Z. Rengel, Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. In: Rengel Z. Ed. Handbook of Soil Acidity, Marcel Dekker, New York, 2003, 57–81.
28. N.S. Bolan; M.J. Hedley; R.E. White, Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume basedpasture, *Plant Soil 134,* 53–63, 1991.
29. Z. Rengel; W. Zhang, Role of dynamics of intracelular calcium in aluminium-toxicity síndrome, *New Phytol. 159,* 295–314, 2003.
30. A. Haung, Molecular aspects of aluminium toxicity in plants, *Rev. Plant Sci. 1,* 345-373, 1984.
31. D.R. Crapper-McLachlan, Aluminium in Alzheimer´s disease, *Neurobiol Aging. 7,* 525-532, 1986.
32. C.D. Foy; R.L. Chaney; M.C. White, The physiology of metal toxicity in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. 29,* 511-566, 1978.
33. Ch. Poschenrieder; N. Massot; P. Guevara; J. Barceló, Aluminio: II. Mecanismos de toxicidad en hombre, animals y plantas, *Cir Far. 313,* 27-42, 1992.
34. A.K Roy; A. Sharma; G. Talukder, Some aspects of aluminum toxicity in plants, *Bot. Rev. 54,* 145–178, 1988.
35. L.V. Kochian; D.L. Jones, Aluminum and resistance in plants. In: Research issues in aluminum toxicity. R. A. Yokel and M. S. Golub, Ed.; Taylor & Francis Publishers, Washington, DC, USA, 1997, 69–89.
36. S.K. Mukherjee; S. Asanuma, Possible role of cellular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminum tolerance in *Pradyrhizobium japonicum*, *Soil Biol. Biochem. 30,* 1511–1516, 1998.
37. G.J. Taylor; S.M. Macfie, Modeling the potential for boron amelioration of aluminum toxicity using the Weibull function, *Can. J. Bot. 72,* 1187-1196, 1994.
38. G.C. Zhang; G.J. Taylor, Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. identity of the linear phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars, *Plant Physiol. 94,* 577–584, 1990.
39. Y. Yamamoto; S. Rikiishi; Y.C. Chang; K. Ono; M. Kasai; H. Matsumoto, Quantitative stimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: Correlation

between aluminium uptake and growth inhibition, *Plant Cell Physiol. 35,* 575-583, 1994.

40. E. Delhaize; S. Craig; C. D. Veaton; R.J. Bennet; V.C. Jagadish; P. Randall, Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Physiol. 103,* 685-693, 1993.
41. M. Sasaki; Y. Yamamoto; J.F. Ma; H. Matsumoto, Early events induced by aluminium stress in elongation cells of wheat root, *Soil Sci. Plant Nutr. 43,* 1009-1014, 1997.
42. D.B. Lazoft; J.G. Goldsmith; R.W. Linton, The *'in situ* analysis of intracellular aluminium in plants, *Prog. Botany 58,* 112-149, 1996.
43. P. Illes; M. Schlicht; J. Pavlovkin; I. Lichtscheidi; F. Baluska; M. Ovecka, Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production, *J. Exp. Bot. 57,* 4201-4213, 2006.
44. L.V. Kochian; M.A. Piñeros; O.A Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil 274,* 175–195, 2005.
45. L.V. Kochian, Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants, *Annu. Rev.Plant Physiol and Plant Mol. Biol. 46,* 237–260, 1995.
46. Z. Rengel, Uptake of aluminium by plants cells, *New Phytol. 134,* 389-406, 1996.
47. M.D, Vazquez; C. Poschenrieder; I. Corrales; J. Barcelo, Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety, *Plant Physiol. 119,* 435–444, 1999.
48. B.E. Nichol; A.D.M. Oliveira; M.Y. Glass, The effects of aluminium on the influx of calcium, potassium, ammonium nitrate and phosphate in an aluminium sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Physiol. 101,* 1262-1266, 1993.
49. Z. Rengel, Competitive aluminium inhibition of net magnesium uptake by intac Lolium multiflorum roots. II. Planta ge effects, *Plant Physiol. 93,* 1261-1267, 1990.
50. W.J. Horst; A.K. Puschel; N. Schmohl, Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminum sensitivity in maize, *Plant Soil 192,* 23–30, 1997.

51. N. Massot; M. Llugany; C. Poschenrieder; J. Barcelo, Callose production as indicator of aluminium toxicity in bean cultivars, *J. Plant Nutr. 22,* 1–10, 1999.
52. M. Piñeros; M. Testeer, Characterization of a voltage dependent calcium selective chanel from wheat roots, *Planta 195,* 478-488, 1995.
53. S. Lindberg; K. Szynkier; M. Greger, Aluminum effects on transmembrane potentials in cells of fibrous roots of sugar beet, *Physiol. Plant. 83,* 54–62, 1991.
54. L.A. Papernik; L.V. Kochian, Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat, *Plant Physiol. 115,* 657–667, 1997.
55. S. C. Miyasaka; L.V. Kochian; J.E. Shaff; C.D. Foy, Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of geno-typic differences in rhizosphere pH, K^+, and H^+ transport and root-cell membrane potentials, *Plant Physiol. 91,* 1188–1196, 1989.
56. P.R. Ryan; J.E. Shaff; L.V. Kochian, Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum tolerant wheat cultivars, *Plant Physiol. 99,* 1193–1200, 1992.
57. S.J. Ahn; M. Sivaguru; H. Osawa; G.G. Chung; H. Matsumoto, Aluminum inhibits the H^+-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots, *Plant Physiol. 126,*1381–1390, 2001.
58. S.J. Ahn; M. Sivaguru; G.C. Chung; Z. Rengel; H. Matsumoto, Aluminium-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H^+ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*), *J. Exp. Bot. 53,* 1959–1966, 2002.
59. D.L. Jones; L.V. Kochian, Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity, *Febs Lett. 400,* 51–57, 1997.
60. M.L Piña-Chable; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect, *Prostanglandins Other Lipid Mediat. 65,* 45-56, 2001.
61. M. Martínez-Estévez; V.M. Loyola-Vargas and S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium increases phosphorylation of particular proteins in celular suspensión cultures of coffee (*Coffea arabica*), *Plant Physiol. 158,* 1375-1379, 2001.
62. M. Martínez-Estévez; I. Echevarría-Machado; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium toxicity and plant signal transduction. Research Signpost, Kerala, India, *Recent Res. Devel. Plant Biol. 3,* 15-29. 2003.

63. F. Quintal-Tun; J.A. Muñoz-Sánchez; A. Ramos-Díaz; A. Escamilla-Bencomo; M. Martínez-Estévez; C. Exley and S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid, *J Inorg Biochem. 101,* 362-369, 2006.
64. W.J. Horst; J.C. Asher; P. Suzulkiewicz; A.H. Wissemeier, Short-term responses of soybeans roots to aluminium, *J. of Plant Physiol. 140,* 174-178, 1992.
65. Y. Yamamoto; Y. Kobayashi; H. Matsumoto, Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, *Plant Physiol. 125,* 199–208, 2001.
66. Y. Yamamoto; Y. Kobayashi; S. Devi; S. Rikiishi; H. Matsumoto, Aluminum toxicity is associated with mitocondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells, *Plant Physiol. 128,* 63–72, 2002.
67. G. Frantzios; B. Galatis; P. Apostolakos, Aluminium effects on microtube organization in dividing root tips cells of *Triticum turgidum* l. Mitotic cells, *New Phytol. 145,* 211-224, 2000.
68. M. Osaki; T. Watabane; T. Tadano, Beneficial effect of aluminium on growth of plants adadted to low pH, *Soils Sci. Plant Nutr. 43,* 551-563, 1997.
69. J.W. Huang; J. E. Shaff; D.L. Gruner; L.V. Kochian, Aluminium effects on calcium fluxes at the root apex of aluminium tolerant and aluminium sensitive wheat cultivars, *Plant Physiol. 98,* 230-237, 1992.
70. R. Lance; J.C. Pearson, Effects of low concentration of Al on growth and water and mineral uptake by cottons roots, Soil Sci. Am. Proc., 33, 95-98, 1969.
71. J.R. Cumming; R.T. Ecbert, Effect of Al on P uptake and translocation by red spruce seedling, *Can. J. Botn. 16,* 864-867, 1986.
72. D.R.R. Malkanthi; M. Moritsugu; K. Yokoyama, Effects of low pH and Al on absortion and translocation of some essential nutrients in excised barley roots, *Soil Sci. Plant Nutr. 41,* 253-262, 1995.
73. J. Barceló; G. Nicolas; B. Sabater; R. Sanchez, Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, S.A., Madrid, 2003.
74. J. Lee; M.V. Pritchard, Aluminium toxicity expression on nutrient uptake, growth and root morphology of *Trifolium repens* L., *Plant Soil 82,* 101-116, 1984.
75. E.A.H. Pilon-Smits; C.F. Quinn; W. Tapken; M. Malagoli; M. Schiavon, Physiological functions of beneficial elements, *Curr Opin Plant Biol. 12,* 267–274, 2009.

76. Y. Yoshii, Aluminium requirements of solfatara plants, *Bot Mag 51,* 262-270, 1937.
77. T.B. Kinraide; P.R Ryan; L.V. Kochian, Interactive effects of Al^{3+}, H^{+}, and cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential, *Plant Physiol. 99,* 1461-1468, 1992.
78. T.B. Kinraide, Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations, *Physiol. Plant. 88,* 619-625, 1993.
79. H. Matsumoto; T. Yamaya, Inhibition of potassium uptake and regulation of membrane-associated Mg^{2+} -ATPase activity of pea roots by aluminum, *Soil Sci. Plant Nutr. 32,* 179-188, 1986.
80. H. Matsumoto; Y. Yamamoto; M. Kasai, Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminium stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium, *Soil Sci. Plant Nutr. 38,* 411-419, 1992.
81. F.C. Thornton; M. Schaedle; D.J. Ryanal, Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution cultura, *Can J Forest Res. 16,* 892-896, 1986.
82. F.C. Thornton; M. Schaedle; D.J. Ryanal, Tolerance of red oak and American and European beech seedlings to aluminum, *J Environ Qual. 18,* 541-545, 1989.
83. R. Tomioka; A. Oda; C Takenaka, Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. seedlings, *J For Res. 10,* 319-324, 2005.
84. H.P. Carr, The accumulation of aluminium and it´s effect on the uptake and distribution of Ca, Mg, K, Mn, Fe, Cu and Zn in *Camellia sinensis* (L.), PhD Thesis, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, 2001.
85. F. Ghanati; A. Morita; H. Yokota, Effects of aluminium on the growth of tea plant and activation of antioxidant system, *Plant Soil 276,* 133-141, 2005.
86. T. Watanabe; S. Jansen; M. Osaki, Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils, *Plant Cell Environ. 29,* 2124-2132, 2006.
87. T. Watanabe; M. Osaki, Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L., *Plant Soil 237,* 63-70, 2001.

88. T. Watanabe; M. Osaki; T. Tadano, Aluminum-induced growth stimulation in relation to calcium, magnesium and silicate nutrition in *Melastoma malabathricum* L., *Soil Sci. Plant Nutr. 43,* 827-837, 1997.
89. H. Matsumoto; E. Hirasawa; S. Morimura; E. Takahashi, Localization of aluminium in tea leaves, *Plant Cell Physiol. 17,* 627-631, 1976.
90. T. Watanabe; S. Jansen; M. Osaki, The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*, *New Phytol. 165,* 773-780, 2005.
91. T. Watanabe; S. Misawa; S. Hiradate; M. Osaki, Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminium accumulation, *New Phytol. 178,* 581-589, 2008.
92. T. Watanabe; S. Misawa; S. Hiradate; M. Osaki, Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator, *Plant Signaling Behavior 3,* 603-605, 2008.
93. T. Watanabe; M. Osaki, Possible reasons why aluminum is a beneficial element for *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator, in the proceedings of the international plant nutrition colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis. http://escholarship.org/uc/item/187933t1, 2009.
94. R. Cizková, Phytohormonal levels in spruce roots under aluminium stress. In: Balus˘ka F, Ed.; Structure and function of roots, Kluwer, Netherlands, 1995, 335-339.
95. A. Oda, Physiological and ecological study about effect of acid rain on forest. Effect of aluminum concentration on growth and endogenous growth regulatory substances of woody plant seedlings (in Japanese), Doctoral dissertation, The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Tottori, Japón, 2003.
96. D.A. Potter; A.J. Powell; P.G. Spicer; D.W. Williams, Cultural practices affect root feeding white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) in turfgrass, *J Econ Entomol. 89*, 156-164, 1996.
97. S. Tamura; E. Yoshimura, Promotion of Zn^{2+} uptake by Al^{3+} in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant that lacks the *ZRT1* gene encoding a high-affinity Zn transporter, *Biol. Trace Elem Res. 124,* 262–268, 2008.
98. J.M. Igual; J.O. Dawson, Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*, *Can. J. Bot. 77,* 1321–1326, 1999.

99. L.D. Quaries; H.J. Gitelman; M.K. Drezner, Induction of de novo bone formation in the Beagle, *J Clin Invest 81,* 1056–1066, 1988.

100. L.D. Quaries; H.J. Gitelman; M.K. Drezner, Aluminum-induced de novo bone formation in the beagle. A parathyroid hormone-dependent event, *J Clin Invest 83,* 1644–1650, 1989.

101. K-H.W. Lau; A. Yoo; S.P. Wang, Aluminum stimulates the proliferation and differentiation of osteoblasts in vitro by a mechanism that is different from fluoride, *Mol Cell Biochem 105,* 93–105, 1991.

102. L.D. Quarles; J.E.I. Hartle; J.P. Middleton; J. Zhang; J.M. Arthur; J.R. Raymond, Aluminum-induced DNA synthesis in osteoblast: mediated by a G-protein coupled cation sensing mechanism, *J Cell Biochem. 56, 106–117,* 1994.

103. T.R. Jones; D.L. Antonetti; T.W. Reid, Aluminum ions stimulate mitosis in murine cells in tissue cultura, *J Cell Biochem. 30,* 31–39, 1986.

104. M.A. Pavan; F.T. Bingham, Toxicity of aluminium to coffe seedlings grow in nutrient solution, *Soil Sci. Soc. Ame. J. 46,* 993-997, 1982.

105. M.A. Pavan, Aluminio em solos ácidos do Parana: Relacao entre o aluminio nao-trocável e soluvel, como pH, CTC, porcentagem de saturacao de Al e materia organica, *R. Bras. Ci. Solo 7,* 39-46, 1983.

106. H.E.P. Martinez; P.H. Monnerat, Aluminum response of two coffee varieties in nutritive solution, Proceedings of the XVIII Brazilian Coffee Research Congress, 1, 105–106, 1992.

107. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; P.R.G. Pereira; N.F. Sampaio; E.A.M. Silva, Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, *R. Bras. Ci. Solo 22,* 435-442, 1998.

108. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini, Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução, *Bragantia Campinas 59,* 221-226, 2000.

109. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini; S.M. Mendonça, Avaliação do ph da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de aluminio no solo, *Bragantia Campinas 59,* 83-88, 2000.

110. E.M. Mattiello; M.G. Pereira; E. Zonta; J. Mauri; J.D. Matiello; P.G. Meireles; I. Ribeiro da Silva, Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arabica*

sob influencia da atividade do alumínio em solução, *R. Bras. Ci. Solo 32,* 425-434, 2008.

111. C.M.P. Macedo; J.C. Lopes, Qualidade fisiológica de semente de *café arábica* na presença de alumínio, *Rev Bras Sementes 30,* 66-73, 2008.

112. A. Ramos-Díaz; L. Brito-Argáez; T. Munnik; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway, *Planta 225,* 393–401, 2007.

113. A. Ligaba; M. Katsuhara; P.R. Ryan; M. Shibasaka; H. Matsumoto, The BnALMT1 and BnALMT2 genes from *Brassica napus* L. encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells, *Plant Physiol. 142,* 1294–1303, 2006.

114. X.Y. Dong; R.F. Shen; R.F. Chen; Z.L. Zhu; J.F. Ma, Secretion of malate and citrate from roots is related to high Al-resistance in *Lespedeza bicolor*, *Plant Soil 306,* 139–147, 2008.

115. B. Klug; W.J. Horst, Connection between aluminium exclusion and accumulation in the aluminium accumulator buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), in The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis., http://escholarship.org/uc/item/3pr446sh, 2009.

116. T. Sasaki; Y. Yamamoto; B. Ezaki; M. Katsuhara; S.J. Ahn; P.R. Ryan; E. Delhaize; H. Matsumoto, A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter, *Planta 37,* 645–653, 2004.

117. E. Delhaize; P.R. Ryan; D.M. Hebb; Y. Yamamoto; T. Sasaki; H. Matsumoto, Engineering high-level aluminium tolerance in barley with the ALMT1 gene, *Proc. Natl Acad. Sci. USA 101,* 15249–15252, 2004.

118. W-H. Zhang; P.R. Ryan; T. Sasaki; Y. Yamamoto; W. Sullivan; S.D. Tyerman, Characterization of the TaALMT1 protein as an Al3þ-activated anion channel in transformed tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) cells, *Plant Cell Physiol. 49,* 1316–1330, 2008.

119. O.A. Hoekenga; T.J. Vision; J.E. Shaff; A.J. Monforte; G.P. Lee; S.H. Howell; L.V. Kochian; Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg *erecta* Columbia) by quantitative trait locus mapping. a physiologically simple but genetically complex trait, *Plant Physiol. 132,* 936–948, 2003.

120. O.A. Hoekenga; L.G. Maron; M.A. Piñeros; G.M.A. Cancádo; J. Shaff; Y. Kobayashi; P.R. Ryan; B. Dong; E. Delhaize; T. Sasaki; H. Matsumoto; Y. Yamamoto; H. Koyama; L.V. Kochian, AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA 103,* 9738-9743, 2006.

121. P.R. Ryan; H. Raman; S. Gupta; W.J. Horst; E. Delhaize, A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots, *Plant Physiol. 149,* 340–351, 2009.

122. J.V. Magalhaes; J. Liu; C.T. Guimaraes; U.G.P. Łana; V.M.C. Alves; Y. H. Wang; R.E. Schaffert; O.A. Hoekenga; M.A. Piñeros; J.E. Shaff; *et al.*, A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum, *Nat Genet 39,* 1156–1161, 2007.

123. J. Furukawa; N. Yamaji; H. Wang; N. Mitani; Y. Murata; K. Sato; M. Katsuhara; K. Takeda and J.F. Ma, An aluminum-activated citrate transporter in barley, *Plant Cell Physiol. 48,* 1081-1091, 2007.

124. J. Wang; H. Raman; M. Zhou; P.R. Ryan; E. Delhaize; D.M. Hebb; N. Coombes and N. Mendham, High-resolution mapping of Alp, the aluminium tolerance locus in barley (*Hordeum vulgare* L.), identifies a candidate gene controlling tolerance, *Theor Appl Genet 115,* 265-276, 2007.

125. J. Liu; J.V. Magalhaes; J. Shaff and L.V. Kochian, Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance, *Planta 57,* 389–399, 2009.

126. K. Tahara; K. Hashida; S. Ohara; K. Kojima; K. Shinohara, Aluminum-detoxifying compounds in roots of *Eucalyptus camaldulensis*, in The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis. http://escholarship.org/uc/item/9k7244qb, 2009.

127. A. Sievers; M. Braun and G.B. Monshausen, The root cap: structure and function. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U, Eds. *Plant roots*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, 2002, 33-47.

128. J.L. Morel; M. Mench; A. Guckert, Measurement of Pb^{2+}, Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots, *Biol Fertil Soils 2,* 29-34, 1986.

129. D.J. Archambault; G. Zhang; G.J. Taylor, Accumulation of Al in root mucilage of an Al-resistant and an Al-sensitive cultivar of wheat, *Plant Physiol. 112,* 1471-1478, 1996.

130. X.F. Li; J.F. Ma; S. Hiradate; H. Matsumoto, Mucilage strongly binds aluminum but does not prevent roots from aluminum injury in *Zea mays*, *Physiol. Plant.* 108, 152-160, 2000.

131. M.M. Xu; M. Yu; C.Q. Wang; Y.H. Zhang; H.Z. Wang;v H.D. Xiao, The binding of Al in different polysaccharides alleviates Al toxicity to root apices, in The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis. http://escholarship.org/uc/item/2s7331t5, 2009.

132. I. Endo; T. Tange; H. Osawa, The Protective Role of a Unique Tissue Detachment on Root Cap Cells in a Strong Aluminum- Resistant Tree *Acacia mangium*, in The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis. http://escholarship.org/uc/item/3028n08z, 2009.

133. W.H. Pierre; A.D. Stuart, Soluble aluminum studies. IV. The effects of phosphorus in reducing the detrimental effects of soil acidity on plant growth, *Soil Sci 36,* 211-227, 1933.

134. A. Gaume; F. Machler; E. Frossard, Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: root exudation organic acids and influence of phosphorus nutrition, *Plant Soil 234,* 73-81, 2001.

135. T.O. Nakagawa; S. Mori; E. Yoshimura, Amelioration of aluminum toxicity by pretreatment with phosphate in aluminum-tolerant rice cultivar, *J Plant Nutr 26,* 619–628, 2003.

136. G. Salinas; P.A. Sanchez, Tolerance to Al-toxicity and low available P. Agronomic Economic Research in the Tropics, Annual Report for 1976–1977, Northern Carolina State University, Raleigh NC, USA, 1977, 115–137.

137. Q.B. Sun; R.F. Shen; X.Q. Zhao; R.F Chen; X.Y. Dong, Phosphorus enhances Al resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata* under relatively high Al stress, *Ann. Bot. 102,* 795–804. 2008.

138. H-X. Jiang; N. Tang; J-G. Zheng; Y. Li; L-S. Chen, Phosphorus alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings, *Physiol. Plant. 137,* 298-311, 2009.

139. L.R. Che-Gonzalez, Efecto de la adición de fósforo sobre la toxicidad por aluminio en células en suspensión de *Coffea arabica* L, Tesis de Maestría, Centro de Investigación Cientifica de Yucatán, Mexico, 2009.

140. D.J. Brady; D.G. Edwards; C.J. Asher and F.P.C. Blamey, Calcium amelioration of aluminium toxicity effects on root hair development in soybean (*Glycine max* L. Merr), *New Phytol.123,* 531-538, 1993.

141. I. Ribeiro da Silva; T.F. Côrtes-Corrêa; R. Ferreira-Novais; F. de Oliveira-Gebrim; F. Novais-Nunes; E. Francisco da Silva and T. Jot-Smyth, Protective effect of divalent cations against aluminum toxicity in soybean, *R. Bras. Ci. Solo 32,* 2061-2071, 2008.

142. T.B. Kinraide, Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities, *Plant Physiol. 118,* 513-520, 1998.

143. A. Stass; Z. Kotur; W.J. Horst, Effect of boron on the expression of aluminium toxicity in *Phaseolus vulgaris*, *Physiol. Plant. 131,* 283-290, 2007.

144. I. Corrales; C. Poschenrieder; J. Barcelo, Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species, *Plant Physiol. 165,* 504-513, 2008.

145. M. Yu; R. Shen; H. Xiao; M. Xu; H. Wang; H. Wang; Q. Zeng; J. Bian, Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*), *Plant Soil 314,* 87-98, 2009.

146. H-X. Jiang; N. Tang; J-G. Zheng; L-S. Chen, Antagonistic actions of boron against inhibitory effects of aluminum toxicity on growth, CO_2 assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of *Citrus grandis* seedlings, *BMC Plant Biol. 9,* 102, 2009.

147. H.A. Currie; C.C. Perry, Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies, *Ann Bot. 100,* 1383-1389, 2007.

148. Y. Liang; W. Sun; Y.G. Zhu; P. Christie, Mechanisms of silicon mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review, *Environ Poll. 147,* 422-428, 2007.

149. K.P.V. Cunha; C.W.A. do Nascimento, Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil, *Water Air Soil Poll. 197,* 323-330, 2009.

150. I. Corrales; C. Poschenrieder; J. Barceló, Influence of silicon pretreatment on aluminium toxicity in maize roots, *Plant Soil 190,* 203-209, 1997.

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

152. F.B. Golley; J. Yantko; T. Richardson; H. Klinge, Biogeochemistry of tropical forests: 1. The frequency distribution and mean concentration of selected elements in a forest near Manaus, Brazil, *Tropical Ecology 21,* 59–70, 1980.

153. O.L. Gamborg; R.A. Miller; K. Ojima, Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res. 50,* 151-158, 1968.

EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL DE PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS *in vitro*

2.1. INTRODUCCIÓN

La toxicidad por aluminio es considerada el principal factor limitante de la producción agrícola en suelos ácidos, que presentan valores de pH de 5 o menores, donde las formas tóxicas del Al se hallan disueltas en la solución del suelo, inhibiendo el crecimiento de la raíz y su función. Se estima que cerca del 50% de los suelos arables en el mundo son ácidos y cerca del 60% de éstos ocurren en países en desarrollo, donde la producción de alimentos es fundamental. Se ha demostrado que el Al afecta numerosos procesos celulares, especialmente la absorción de K^+ y Ca^{2+},[1,2] la destrucción de la estructura del citoesqueleto,[3,4] la síntesis de callosa,[5] peroxidación de lípidos[4,6] y los mecanismos de traducción de señales.[7-11]

Sin embargo, el principal efecto de la toxicidad del Al es la dramática inhibición del crecimiento de la raíz, por lo cual este efecto se considera una medida de la toxicidad que provoca este metal. Este comportamiento se observa en muchas especies; por ejemplo, Illes *et al.* (2006), encontraron que la elongación de la raíz de plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* era inhibida con 300 µM de $AlCl_3$.[12] Por otro lado, se sabe que en determinados taxas el Al puede ejercer un efecto benéfico, principalmente en especies adaptadas a suelos ácidos, como *M. malabathricum*, *M. sinensis*, *C. sinensis*, entre otras.[13] Se ha visto que el Al puede prevenir el efecto tóxico del H^+, Fe y P cuando este último elemento se encuentra en exceso. También, se ha reportado que el Al puede mejorar la toma de nutrientes, inducir un sistema antioxidante, así como mejorar el crecimiento de raíces y brotes de determinadas especies; asimismo se le ha atribuido un papel insecticida.[13-15] El efecto del Al, así como de otros minerales, varía dependiendo de la especie, las condiciones de crecimiento, la concentración de Al y la duración de la exposición de la planta al metal.

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y con mayor área cultivada en el mundo, la planta de cafeto por sus requerimientos agronómicos, se cultiva en suelos con una concentración elevada de materia orgánica, y que por lo tanto, poseen una acidez importante. Por tal motivo, para determinar el efecto del aluminio sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto, se evaluó el

crecimiento de la raíz de plántulas expuestas a diferentes concentraciones de Al y se cuantificó el contenido de este metal en diferentes órganos (brotes y raíces). Asimismo, se comparó el efecto de este metal en *A. thaliana* y *C. chinense*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se utilizaron plántulas de cafeto que se obtuvieron de semillas de *C. arabica* cv Typica provenientes de una plantación del estado de Veracruz, las cuales fueron donadas por el Sr. José Roberto Martínez Villegas. Para la obtención de plántulas de *A. thaliana* y *C. chinense* se utilizaron semillas de la variedad Col-0 (*A. thaliana*) y la variedad naranja (*C. chinense*) que comercializa la empresa de semillas Seminis, respectivamente.

2.2.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Para la semilla de cafeto, se eliminó el pergamino o endocarpio y la piel plateada de la semilla, para facilitar el tratamiento de desinfección de las semillas. Éstas se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 2 h, posteriormente se decantó la solución de hipoclorito de sodio y se realizaron enjuagues con agua estéril (destilada y desionizada); se adicionó etanol al 70% y se incubaron las semillas durante 5 min con agitación constante, se realizó un nuevo lavado con agua estéril (dos veces); se adicionó de nuevo una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 10 min y de nueva cuenta se realizaron enjuagues con agua estéril (d.d.) hasta eliminar el hipoclorito de la solución. Por último, se dejaron embebiendo las semillas en agua estéril (d.d.) durante 48-72 h, hasta la extracción de los embriones.[16] Por otro lado, también se desinfectaron semillas de *A. thaliana* con hipoclorito de sodio al 25% y 5 µL de Triton X-100, posteriormente las semillas fueron estratificadas incubándolas por 3 días a 4°C en agar suave (0.15%). Para la desinfección de semillas de *C. chínense* se siguió el protocolo establecido por el grupo de la Dra. Ileana Echevarría, el cual consiste en remojar semillas de *C. chinense* en etanol al 80% por 5 min y enjuagar de 3 a 6 veces con agua estéril (d.d.), posteriormente las semillas se incubaron con hipoclorito de sodio al 30% y Tween (1 gota) por 15 min, se enjuagaron de 4 a 5 veces con agua estéril (d.d.) y se dejaron embebiendo durante 48 h a 4°C y en condiciones de oscuridad.

2.2.3. EXTRACCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS

Después de 72 h de imbibición, se extrajeron los embriones de *C. arabica* y se colocaron en cajas Petri con medio B_5 a la mitad de su fuerza iónica ($B_5/2$) a pH 5.8, para la obtención de plántulas.[16] Para el medio B_5, se prepararon soluciones concentradas con las sales que componen dicho medio (Anexo 1). Una vez sembrados los embriones en las cajas Petri, se mantuvieron en oscuridad por ocho días a 25°C en posición vertical para facilitar e inducir el crecimiento de la raíz, posteriormente se incubaron en fotoperiodo a 25°C, con iluminación 16/8 h luz/oscuridad. En el caso de *A. thaliana* posterior a la estratificación, las semillas fueron germinadas en medio $B_5/2$ bajo las mismas condiciones en las que se germinaron los embriones de *C. arabica*. En *C. chinense*, después de las 48 h de estratificación, las semillas fueron incubadas (oscuridad) en cajas Petri con papel filtro humedecido con agua estéril (d.d.) hasta la aparición de la radícula, posteriormente se transfirieron a medio $B_5/2$ bajo las mismas condiciones de germinación de *C. arabica* y *A. thaliana*.

2.2.4. TRATAMIENTO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALUMINIO

Para evaluar el efecto del Al, plántulas de *C. arabica* cuya raíz primaria media 1.6-1.8 cm de longitud fueron transferidas a cajas Petri con medio $B_5/2$ a un pH de 4.3, conteniendo diferentes concentraciones de aluminio en forma de $AlCl_3.6H_2O$ (100, 300, 500 µM). Se utilizó un tratamiento testigo, al cual no se le adicionó el Al. El medio de cultivo se segmentó conteniendo en la parte superior medio sin $AlCl_3$ y en la parte inferior $AlCl_3$. La longitud de la raíz se midió desde el inicio y a intervalos de cinco días hasta el día 30 del tratamiento. Los tratamientos se incubaron en fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 25°C. Para evaluar el efecto del aluminio en *A. thaliana* se utilizaron plántulas con 1.9-2.4 cm de raíz, el crecimiento radical se midió en el día 0 (inicio del cultivo) y en el día 5 de cultivo. Para *C. chinense* se transfirieron plántulas cuya raíz primaria media 1.6-1.8 cm, el crecimiento radical se midió en el día 0 o día de inicio del cultivo y en el día 7 cuando la raíz de las plántulas llegaron al final del borde de la caja Petri.

2.2.5. DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DEL ALUMINIO

Al final del tratamiento con Al se cosecharon las raíces y se realizó la tinción con hematoxilina de las mismas. Para la tinción, las plántulas control y tratadas con $AlCl_3$ fueron transferidas a tubos de ensaye de 10 mL de 13/100, posteriormente se adicionó

agua destilada y se agitaron a 50 rpm durante 20 min, al finalizar el tiempo se decantó el agua destilada. Después se adicionó la solución de hematoxilina (0.2% de hematoxilina en 0.02% de yoduro de potasio) y se mantuvo en agitación constante por 12 h, se decantó el colorante y se realizaron varios lavados con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.[17,18] Por último, se cortaron los ápices de la raíz (3 mm), así como varios segmentos de ella y se observaron en el estereoscopio. También, se realizó la tinción de las raíces de plántulas de *A. thaliana* y *C. chinense* tratadas sin y con Al.

2.2.6. ANÁLISIS MINERAL EN BROTES Y RAÍCES

Para el análisis mineral, las plántulas se cosecharon al final de los tratamientos. Las plántulas fueron lavadas con agua destilada y desionizada, posteriormente fueron separadas en brotes y raíces. Cada tipo de muestra se secó en una estufa eléctrica a 60 °C durante 72 h, éstas se pesaron y fueron almacenadas para su posterior análisis. Para la preparación de la muestra utilizando digestión por microondas, se empleó un peso conocido y se agregó HNO_3:H_2O_2 en una proporción 5:1; el programa de digestión que se utilizó fue el siguiente: una corrida a 1 200 W, en una rampa de 15 min a 200°C, 10 min a 200°C, 5 min a 170°C, según el método establecido para material vegetal por la Dra. Laura Hernández en UCIA-CICY, Unidad Cancún, México. Una vez realizada la digestión, las muestras se aforaron con agua (Milli Q) a un volumen de 25 mL y se midieron en un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma, acoplado inductivamente (ICP-AES, por sus siglas en inglés). Se determinó el contenido de Al, P, K y Ca en brotes y raíces de las especies *C. arabica* y *C. chinense*; en el caso de *A. thaliana*, en toda la plántula.

2.2.7. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO DE UN CULTIVAR DE CAFETO

Se caracterizaron cuatro muestras de suelo, las cuales fueron recolectadas el 28 de octubre de 2009 en la parcela No. 494Z-1P1/1 propiedad del Sr. José Roberto Martínez Villegas, en la localidad de Ejido de Lomas, Coatepec, Veracruz, México. En el Cuadro 2.1 se especifican las características del muestreo. Las muestras de suelo fueron pesadas, colocadas en bandejas y secadas al aire libre; una vez secas éstas fueron tamizadas (tamiz malla No. 10). Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas y finalmente se almacenaron en bolsas de plástico para su posterior análisis. Para la caracterización de las muestras de suelos se determinó el pH y la conductividad eléctrica utilizando la técnica de pasta saturada, el contenido de sodio y

potasio fue determinado por flamometría utilizando acetato de amonio como solución extractora, los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} se cuantificaron por complejometría con EDTA, el nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl, el contenido de materia orgánica se determinó utilizando el método de Walkley & Black, el fósforo fue determinado por fotocolorimetría utilizando el método de Olsen y finalmente el aluminio se cuantificó por absorción atómica.

Cuadro 2.1. *Características de muestreo*

No. de muestra	Horizonte
1*	Profundidad 0-0.05 cm
2*	Profundidad 0-0.20 cm
3*	Profundidad 20-40 cm
4*	Mezcla 0-20 cm + Tepecil

*Cada muestra consistió de 5 muestra individuales, las cuales fueron tomadas al azar.

2.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados con un análisis de varianza de dos vías (Sigma Stat Versión 3.1). Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey ($P<0.05$).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 EFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL CRECIMIENTO RADICAL

2.3.1.1 *Coffea arabica* L.

C. arabica L., es la principal especie cultivada para la producción de café. Se estima que cerca del 75% del café cultivado a nivel mundial pertenece a la especie *arabica*, así como el 95% de la producción de café en México corresponde a esta especie.[19,20] *C. arabica* es originaria de África y comprende un gran número de variedades, las cuales se diferencian por su mayor producción, rendimiento, calidad, resistencia a enfermedades o por las condiciones en las que se lleva a cabo su cultivo. Sin embargo, independientemente de la especie o la variedad por sus requerimientos agronómicos en el campo son cultivadas normalmente en suelos con valores de pH menores a 5.5. En estas condiciones de acidez se ha observado que la disponibilidad del aluminio incrementa, ocasionando un efecto tóxico o benéfico en determinados taxas. Por otro lado, el efecto positivo o negativo de este metal dependerá de la concentración del elemento, las condiciones de cultivo, la especie de planta y el tiempo de exposición al metal.

En el Cuadro 2.2 se presentan los resultados que se obtuvieron al realizar un análisis agrológico al suelo de la plantación de cafeto, propiedad del Sr. José Roberto Martínez Villegas. De acuerdo al análisis, las plantas de donde se cosecharon las semillas que fueron el origen del material vegetal, crecen en suelos ácidos y esta acidez se presenta en los primeros 20 cm del suelo (pH 5.14-5.54). Por otro lado, el contenido de Al total es elevado en todas las muestras (Cuadro 2.2) y aumenta dependiendo de la profundidad del suelo. Estos valores de acidez y contenido de aluminio nos sugieren que en las primeras etapas de crecimiento y desarrollo de la raíz de plantas de café, el Al se encuentra disponible para este órgano vegetal y ya está demostrado que este elemento ejerce un efecto sobre la raíz y en general sobre el crecimiento de las plantas. Por tal motivo, para determinar si el aluminio tiene algún efecto sobre el crecimiento de la raíz, se evaluaron diferentes concentraciones de este elemento en plántulas de cafeto.

Cuadro 2.2. *Análisis agrológico del suelo*

Análisis	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
pH	5.14	5.54	6.59	5.13
Conductividad	266 µS	95.5 µS	79.5 µS	214 µS
Na^+	1.63 meq100g^{-1}	0.44 meq100g^{-1}	0.53 meq100g^{-1}	0.57 meq100g^{-1}
K^+	0.67 meq100g^{-1}	0.79 meq100g^{-1}	0.54 meq100g^{-1}	0.8 meq100g^{-1}
Ca^{2+}	23.81 meq100g^{-1}	9.56 meq100g^{-1}	11.43 meq100g^{-1}	24.95 meq100g^{-1}
Mg^{2+}	2.77 meq100g^{-1}	4.78 meq100g^{-1}	7.88 meq100g^{-1}	3.56 meq100g^{-1}
N Total	1.48 %	0.9 %	1.08 %	1.04 %
M.O.	12.18 %	9.54 %	16.03%	16.01 %
C.O.	7.08 %	5.55 %	9.31 %	9.3 %
P	1836.7 ppm	1878.6 ppm	1970 ppm	1855.02 ppm
Al total	37954.2 ppm	49612.7 ppm	39371.5 ppm	29423.35 ppm

M.O. Materia orgánica; C.O. Carbono orgánico

En un primer experimento se transfirieron plántulas de cafeto de la variedad Typica en cajas Petri con medio $B_5/2$ (sin segmentar) a pH 4.3 adicionado con 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 600 µM de $AlCl_3$. En este experimento (Experimento 1) se determinó el efecto del Al sobre el crecimiento de la raíz, midiendo la longitud de ésta cada 48 h, desde el inicio del cultivo (día 0) hasta el día 40.

En la Figura 2.1 se muestra el comportamiento del crecimiento de la raíz principal en las diferentes concentraciones de aluminio, durante 40 días de cultivo y se indica por medio de la longitud de la raíz. Se puede apreciar una curva ascendente, en la cual se observa un mayor crecimiento de la raíz a partir del día 30 de cultivo en los tratamientos con 100, 200, 300, 400 y 600 µM de $AlCl_3$. Este aumento en el crecimiento de la raíz fue estadísticamente significativo en comparación con las concentraciones de 12.5 y 50 µM de $AlCl_3$. El testigo, creciendo en ausencia de Al no presentó diferencias significativas con las concentraciones en las que se observó un mayor crecimiento de la raíz. En la concentración de 25 µM de Al, el crecimiento de la raíz fue similar al observado en las concentraciones de 100 µM de Al en adelante.

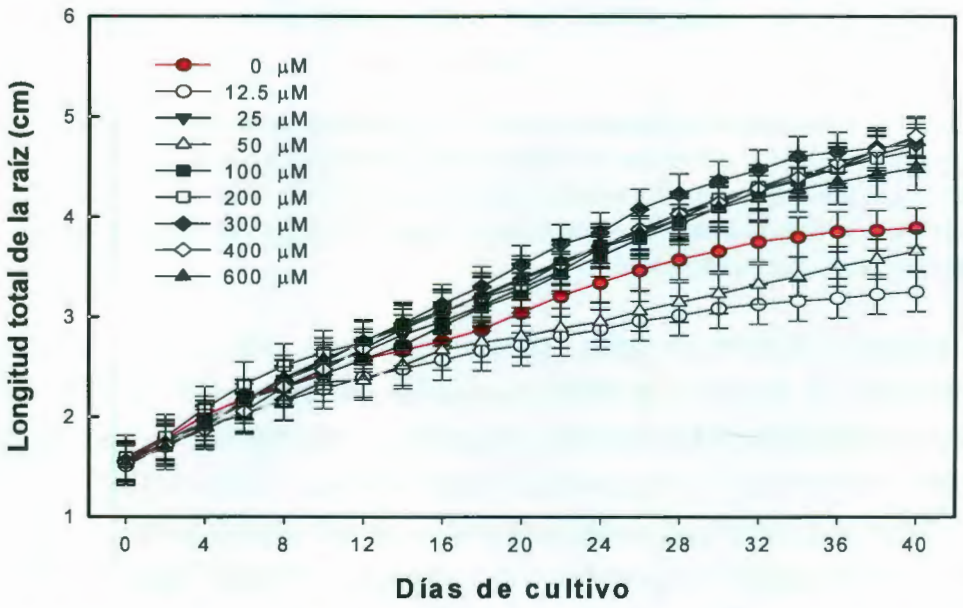

Figura 2.1. *Curso temporal del efecto de diferentes concentraciones de $AlCl_3$ sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de C. arabica cv. Typica (n= 15 plántulas). Tukey ($P< 0.05$). La línea de color rojo indica el tratamiento testigo (0 µM de $AlCl_3.6H_2O$ a pH 4.3).*

En la Figura 2.2 se muestra el crecimiento radical acumulado al final del tratamiento, en donde se indica que no existen diferencias significativas entre el testigo (0 µM) y las concentraciones iguales o mayores a 100 µM de $AlCl_3$. Resultados similares se observaron en las variedades Bourbon y Mundo Novo, en las cuales no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con $AlCl_3$ (datos no mostrados).

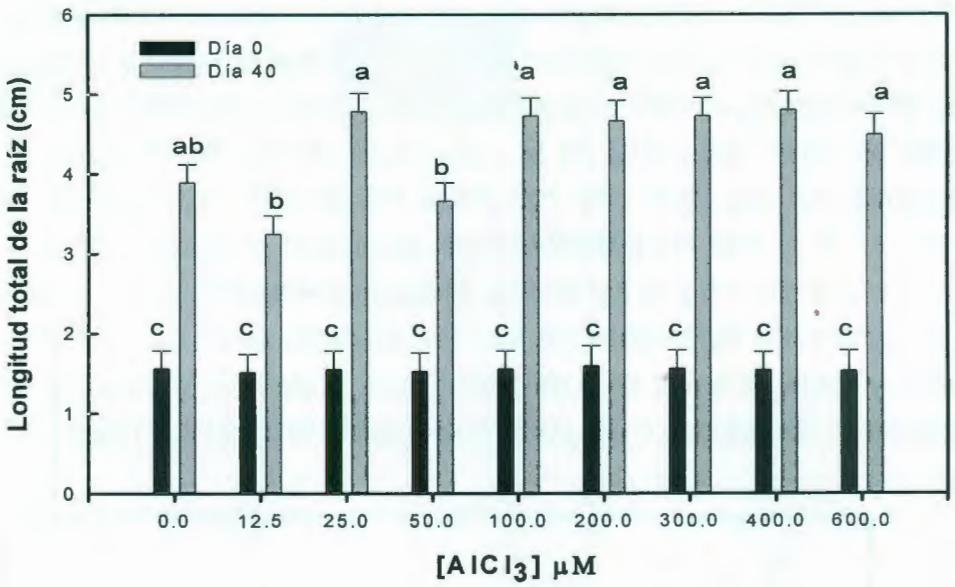

Figura 2.2. Crecimiento radical acumulado. *Longitud total de la raíz de plántulas de* C. arabica *cv. Typica a diferentes concentraciones de aluminio al día 40 de cultivo en medio* $B_5/2$ *pH 4.3. Las barras representan las medias de la longitud total de la raíz en los diferentes tratamientos (n= 12 plántulas). Tukey (P< 0.05). Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos.*

En estudios realizados en cafeto, se han demostrado variedades tolerantes a la toxicidad por Al. Braccini *et al.* (1998) encontraron diferencias en el crecimiento de la raíz al evaluar el efecto del Al sobre el crecimiento y desarrollo de nueve genotipos de cafeto, clasificando los nueve genotipos como tolerantes, moderadamente tolerantes, moderadamente sensibles y sensibles, donde los genotipos tolerantes pertenecieron a las variedades Catimor y Mundo Novo de la especie *C. arabica*.[21] Esta tolerancia fue relacionada al uso eficiente de los nutrientes P y Ca.[22] En otro trabajo realizado por Braccini *et al.* (2000), se reporta que de 26 líneas de cafeto evaluadas, la mayoría fueron clasificadas como tolerantes a Al. Por otro lado, también se encontró que cuatro líneas presentaron un ligero aumento en el crecimiento de la raíz con la adición de Al.[23] Asimismo, se ha reportado tolerancia a Al en la variedad Icatu y en híbridos como Catuaí.[23-27] Por tal motivo, con base a los resultado observados en las Figura 2.1 y 2.2 y lo reportado en la literatura, es posible que la variedad Typica presente tolerancia a Al.

Recientemente, Houman *et al.* (2009) al evaluar el efecto del Al en *Melaleuca cajuputi*, árbol que crece en regiones tropicales debido a su resistencia a pH ácido y resistencia

a Al, observaron que a concentraciones de 0.1 a 2 mM de $AlCl_3$ (pH 4.5) no se inhibió el crecimiento de la raíz, este efecto fue atribuido a que esta especie tiene la capacidad para evitar la entrada de este metal.[28] Por otro lado, se ha reportado un efecto benéfico del Al en especies de plantas que crecen en suelos ácidos.[14] En *M. malabathricum* y en otras especies se ha reportado que el Al puede aumentan la toma de elementos esenciales para el crecimiento vegetal como N, K y principalmente P. Posiblemente un mecanismo similar este ocurriendo en las raíces de cafeto tratadas con aluminio y este aumento en la toma de nutrientes favorezca el crecimiento de la raíz y así se evite el efecto tóxico de este elemento. Chee-González (2009), recientemente observó que el P revierte los efectos tóxicos del $AlCl_3$ en células en suspensión de *C. arabica* al adicionar concentraciones altas de P en el medio de cultivo;[29] sin embargo, a pesar de que en el medio $B_5/2$ no se adicionó una concentración mayor de P, es posible que haya una interacción entre Al y P que mejore el crecimiento de la raíz, como es reportado por Tomioka *et al.* (2005).[30]

También, una posibilidad que pudiera ocurrir es que al preparar el medio $B_5/2$, en la etapa de esterilización el P y el Al se hayan asociado y precipitado, por lo que el aluminio éste menos disponible y no tenga un efecto tóxico sobre la raíz. Para evitar la precipitación del Al con el P, se han reportado modificaciones en el modo de preparar el medio de cultivo para prevenir este fenómeno. Para ello, varios autores han sugerido adicionar las soluciones de P y Al después de la esterilización del medio o de la solución nutritiva, ya sea agregando ambas soluciones o sólo una de ellas.[31,32]

Por tal motivo, para evitar la posible precipitación de los fosfatos con los diferentes componentes del medio (Fe^{2+}, Ca^{2+} y Al^{3+}), el medio $B_5/2$ para los tratamientos con $AlCl_3$ se preparó como se describe en la sección 2.2.4 de Materiales y Métodos, y en el anexo: Composición del medio de cultivo B_5, adicionando la solución de fosfatos después de la esterilización del medio $B_5/2$; por lo que se realizó un nuevo experimento (Experimento 2) con plántulas de *C. arabica* cv Typica.

Por otro lado, también debido a la posibilidad de que el pH del medio de cultivo no se haya mantenido ácido y esté ejerciendo un efecto sobre el crecimiento de la raíz, se evaluó el pH del medio al inicio y al final del cultivo del Experimento 2. Después de la esterilización del medio y de la adición de la solución de PO_4^{-2}, el medio de cultivo al inicio del tratamiento mantuvo un pH ácido, siendo éste de 4.48, 4.41, 4.3 y 4.18 en 0,

100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$, respectivamente. Al final del tratamiento (día 30) el pH del medio se midió utilizando tiras reactivas de pH y se encontró que se mantenía en el rango de pH 4-5. Al evaluarse el pH con un potenciómetro en las concentraciones de 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ se observaron los valores 4.15, 4.14, 4.05 y 4.14, respectivamente, confirmando que el pH del medio se mantiene ácido durante el tiempo de cultivo.

En la Figura 2.3 se muestra el efecto del Al sobre el crecimiento de la raíz bajo las condiciones que se mencionan en la sección 2.2.4. A partir del día 10 de cultivo se presentan diferencias entre los tratamientos, observándose un menor crecimiento de la raíz en la concentración de 500 µM de Al; asimismo se muestra que al día 20 de cultivo la longitud de la raíz fue mayor en 100 y 300 µM con respecto al concentración de 0 µM y este incremento en el crecimiento de la raíz fue estadísticamente significativo según la prueba de Tukey ($P<0.05$). Estas diferencias se mantuvieron hasta el final del tratamiento.

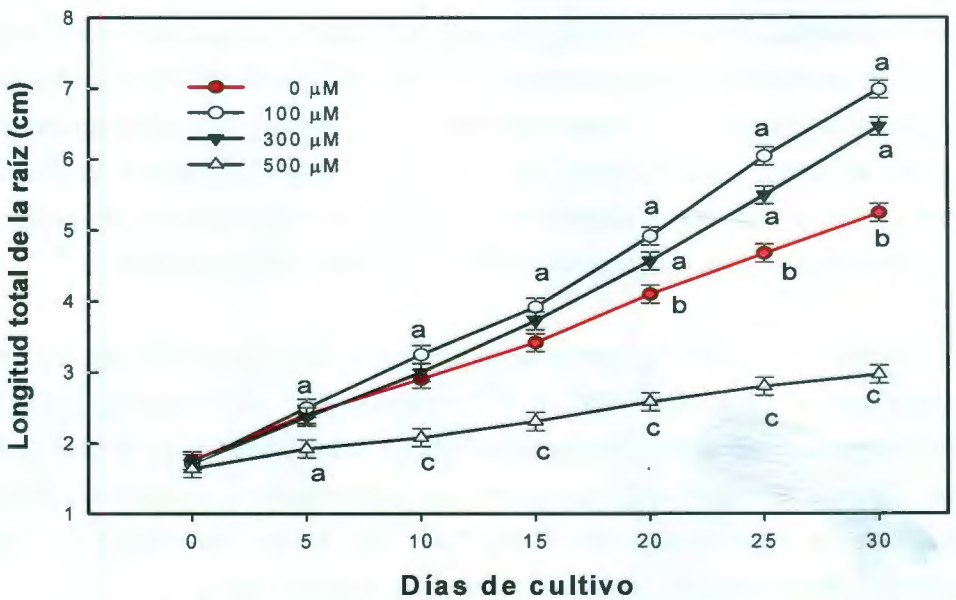

Figura 2.3. *Curso temporal del efecto del $AlCl_3$ sobre el crecimiento de la raíz de plántulas de C. arabica cv. Typica en 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ (n= 15 plántulas). Tukey ($P< 0.05$). La línea de color rojo indica el tratamiento testigo (0 µM de $AlCl_3.6H_2O$ a pH 4.3).*

En el crecimiento radical acumulado al día 30 de cultivo se observa más claramente el incremento en el crecimiento de la raíz a las concentraciones de 100 y 300 µM de Al

con respecto al testigo (0 µM), así como el menor crecimiento en la concentración de 500 µM de $AlCl_3$ (Figura 2.4.).

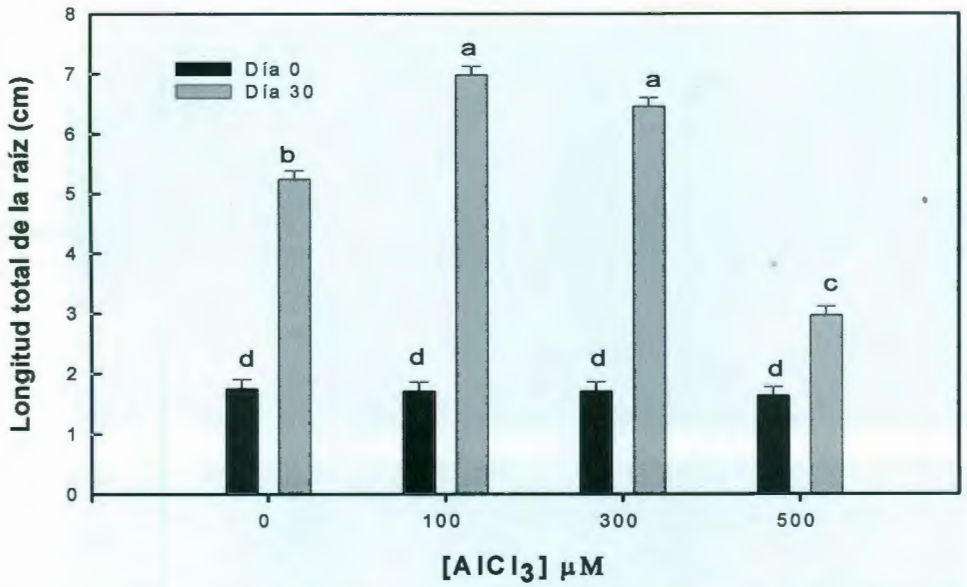

Figura 2.4. Crecimiento radical acumulado. *Longitud total de la raíz de plántulas de C. arabica cv. Typica a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 30 de cultivo en medio $B_5/2$ pH 4.3. Las barras representan las medias de la longitud total de la raíz en los diferentes tratamientos (n= 12 plántulas). Tukey (P< 0.05). Letras diferentes indican diferencia entre los tratamientos.*

La modificación realizada en el medio de cultivo presentó una respuesta diferente a la observada en el Experimento 1, ya que se observó un aumento en el crecimiento de la raíz en presencia de aluminio (100 y 300 µM). Sin embargo, en la concentración de 500 µM de $AlCl_3$ se observó la inhibición de la longitud de la raíz (Figura 2.4 y 2.5), posiblemente esta inhibición se deba a una mayor disponibilidad del Al, debido a que el P no está interviniendo en la disponibilidad de este metal.

Por otro lado, nuestros resultado concuerdan con lo reportado por otros autores, ya que en cafeto, Braccini *et al.* (2000) observaron un incremento en la biomasa de brotes y raíces, así como la estimulación del crecimiento de la raíz en genotipos de las variedades Icatu y Catimor, cuando plantas de estas variedades fueron cultivadas en invernadero en presencia de Al.[24] En otro trabajo, en el cual se germinaron semillas de varios genotipos de cafeto en papel humedecido con una solución con Al, al evaluar el crecimiento de la raíz de las plántulas, se observó una ligera estimulación del

crecimiento de raíz en 4 de los 25 genotipos estudiados. En este trabajo el genotipo que presentó el mayor crecimiento de la raíz fue considerado como tolerante a Al.[23]

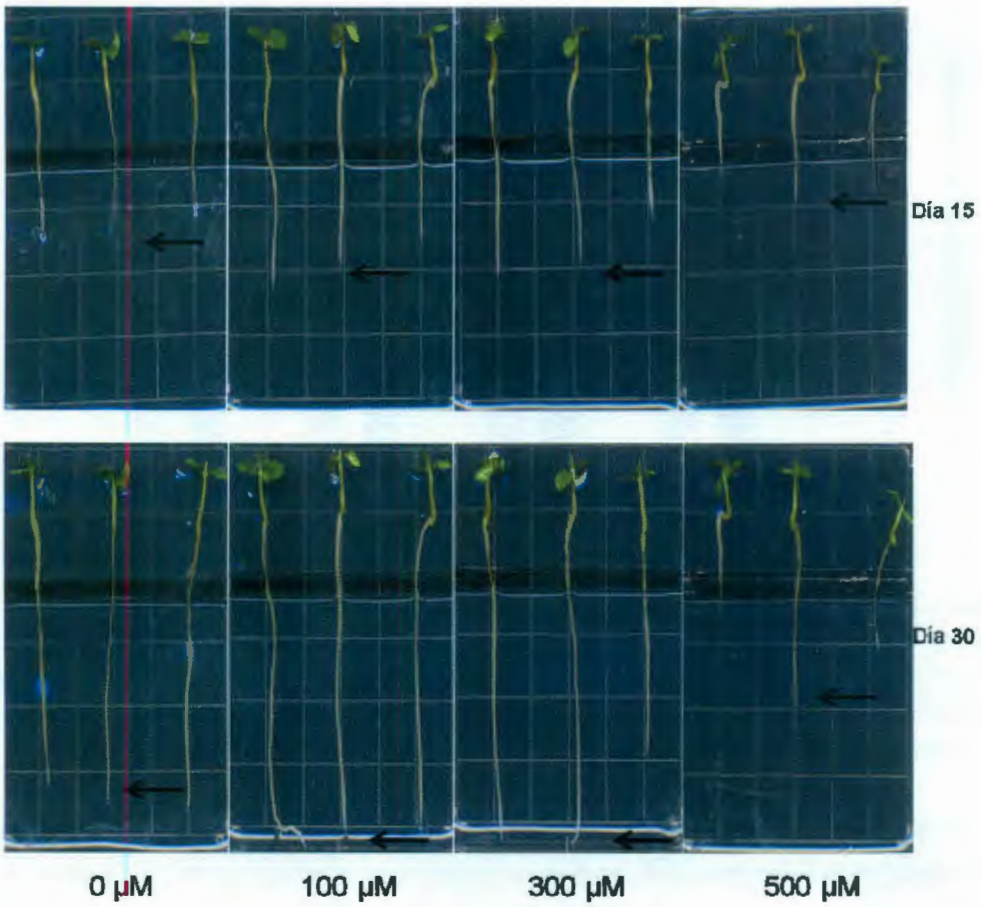

Figura 2.5. *Crecimiento de la raíz de plántulas de* C. arabica *cv. Typica al día 15 y 30 de cultivo en medio $B_5/2$ en 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3.*

Recientemente, se observó en la variedad Catuaí amarillo un aumento en el crecimiento de la raíz a bajas concentraciones de Al en solución nutritiva.[27] También, Macedo *et al.* (2008) al evaluar el efecto del Al sobre la germinación y vigor de semillas de café en variedades de las especies *C. arabica* y *C. canephora*, observaron que el Al tuvo un efecto benéfico sobre el crecimiento de la raíz en ambas especies.[33] En otro trabajo, Macedo y Lopes (2008) reportan la estimulación del crecimiento de la raíz cuando semillas de cuatro variedades de *C. arabica* fueron germinadas en papel humedecido con un solución de nutrientes adicionada con Al.[34] En estos trabajos, se menciona que el Al a bajas concentraciones puede estimular el desarrollo temprano de

las plantas, sin causar efectos tóxicos, actuando directamente sobre el alargamiento de la raíces.[33,34]

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la estimulación de la toma de nutrientes es uno de los mecanismos que podrían estar implicados en el aumento del crecimiento de la raíz.[14,30] Algunos trabajos mencionan que el Al se asocia con P precipitando en la superficie de la raíz y en la pared celular de las células de este órgano y de alguna forma se estimula el crecimiento radical, así como un aumento en la biomasa de los brotes. También, se reporta un aumento en la toma de K, el cual es un elemento indispensable para mantener la integridad de la membrana plasmática.

Por otro lado, se ha mencionado que el aluminio puede prevenir el efecto tóxico por H^+; en este trabajo a 0 µM de $AlCl_3$ se observó un menor crecimiento de la raíz que en presencia del metal (100 y 300 µM) a pH 4.3 (Figura 2.5.), por lo que es posible que un mecanismo similar de alivio de la toxicidad por H^+ esté participando en cafeto.[35-38]

En el Experimento 2 la concentración de 500 µM de $AlCl_3$ redujo el crecimiento de la raíz (Figura 2.5.). Este efecto tóxico del Al sobre el crecimiento radical en cafeto ya había sido demostrado por Pavan y Bingham (1982) bajo condiciones de hidroponía.[39] Martínez-Estévez *et al.* (2003) reportan la inhibición del crecimiento celular a 100 µM de Al en suspensiones celulares de *C. arabica*.[40] Sin embargo, las diferencias en la concentración tóxica del aluminio entre nuestros datos y los reportados por otros autores nos indican que el efecto negativo del Al depende de las condiciones utilizadas en el estudio, así como el nivel de complejidad del material vegetal donde se realice el estudio. A nivel celular o a nivel de planta completa puede haber diferencias en los mecanismos de respuesta al efecto del aluminio. En este caso se puede comentar que en suspensiones celulares a la concentración de 100 µM de Al se observe la inhibición del crecimiento celular,[40] y en raíces de plántulas de *C. arabica* bajo las condiciones en las que se llevó a cabo este estudio, a la concentración de 500 µM de Al se observe la inhibición del crecimiento de la raíz.

Asimismo, para corroborar los resultados en los que se observó un aumento en el crecimiento radical en presencia de Al, se sugirió utilizar como controles plántulas de las especies *A. thaliana* y *C. chinense* cultivadas bajo las mismas condiciones. Los datos que se obtuvieron al analizar estas especies se presentan a continuación.

2.3.1.2. *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una especie sensible a la toxicidad por aluminio; en plántulas cultivadas en placas de agar a diferentes concentraciones de $AlCl_3$ se ha visto que la inhibición del crecimiento de la raíz es dependiente de la concentración del metal. Por otro lado, también se han observado cambios en la arquitectura de la raíz. La sensibilidad que presenta *A. thaliana* al Al nos podría ayudar a corroborar el efecto observado en *C.arabica*, por tal motivo se evaluó el efecto de este metal en plántulas baja las condiciones que se especifican en la sección 2.2.4.

En la Figura 2.6 se muestra el efecto del $AlCl_3$ sobre el crecimiento de la raíz en plántulas de *A. thaliana* a los cinco días de tratamiento, en donde se observa que la inhibición del crecimiento de la raíz fue dependiente de la concentración del metal. El crecimiento de la raíz fue ligeramente reducido a 100 µM de Al, sin embargo no fue estadísticamente significativo con respecto al testigo, de acuerdo a la prueba de Tukey ($P<0.05$). La inhibición fue más aparente y estadísticamente significativa a 300 µM de Al, mientras que a 500 µM el crecimiento de la raíz fue claramente inhibida (2.84 cm) con respecto al testigo (6.74 cm) como se puede observar en la Figura 2.6 y 2.7.

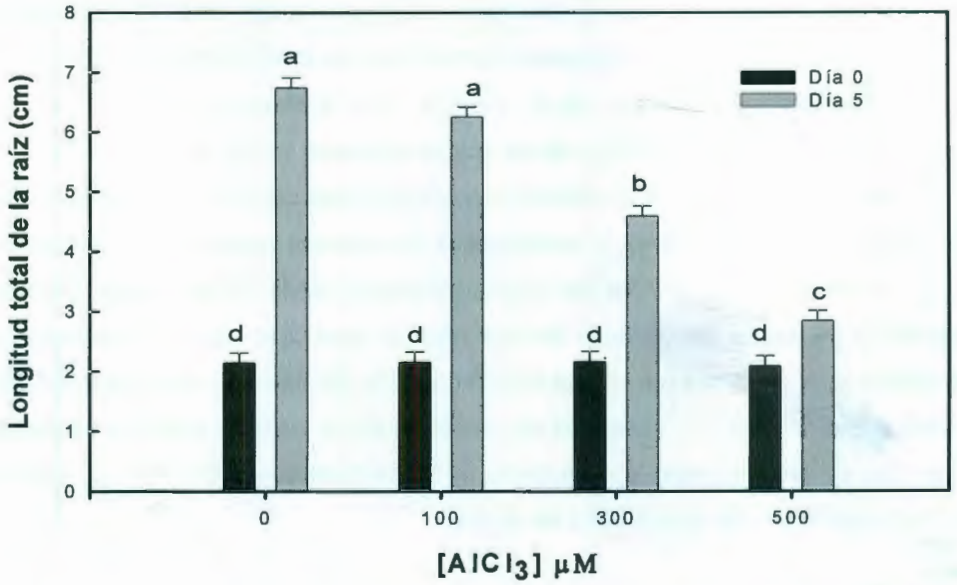

Figura 2.6. *Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de* A. thaliana *a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 5 en medio $B_5/2$ segmentado pH 4.3. Las barras representan las medias de la longitud total de la raíz en los diferentes tratamientos (n= 14 plántulas). Tukey (P< 0.05). Letras diferentes indican diferencias en los tratamientos.*

Los resultado observados en *A. thaliana* en las Figuras 2.6 y 2.7 fueron similares a los reportados por Illes *et al.* (2006) en donde se observó la inhibición del crecimiento de la raíz dependiente de la concentración de Al. Por otro lado, estos autores reportan la completa inhibición del crecimiento de la raíz a 300 µM del metal,[12] en cambio en las Figuras 2.6 y 2.7 se muestra que el menor crecimiento fue en 500 µM de $AlCl_3$. Sin embargo, esta diferencia puede deberse a las condiciones en las que se llevo a cabo el tratamiento.

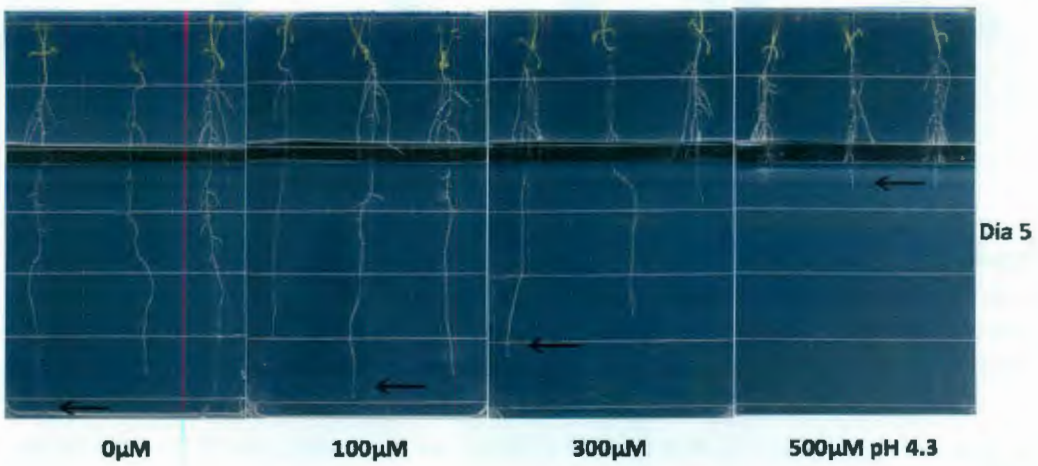

Figura 2.7. *Crecimiento de la raíz de plántulas de A. thaliana al día 5 de cultivo en medio B_5/2 segmentado a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3.*

También, se observaron cambios en la arquitectura de la raíz, en las concentraciones de 300 y 500 µM de $AlCl_3$. Se observó una mayor formación de raíces laterales en el segmento superior de la placa de agar siendo estadísticamente significativo con las concentraciones de 0 y 100 µM de Al, como se muestra en la Figura 2.8. Los cambios en la arquitectura de la raíz ya habían sido reportados anteriormente por Illes *et al.* (2006).[12] Por otro lado, en la Figura 2.8 se muestra que el número de raíces laterales en el segmento inferior disminuyó conforme aumentó la concentración de $AlCl_3$; sin embargo, este efecto correlacionó con la inhibición de la longitud de la raíz primaria.

Una las razones que pudieran explicar el aumento en el número de raíces laterales en el segmento superior (Figura 2.8) está fuertemente correlacionada con la reducción de la longitud de la raíz primaria, por lo que el aumento del área radical con la formación de las raíces laterales sería una forma de compensar la inhibición del crecimiento de la raíz para mantener la absorción de nutrientes.

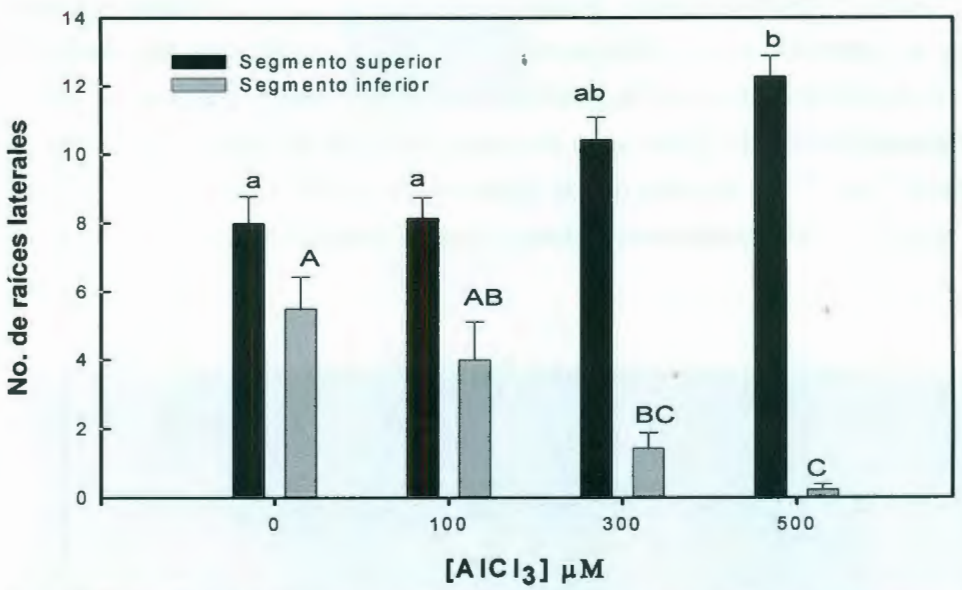

Figura 2.8. *Efecto del $AlCl_3$ sobre el número de raíces laterales en A. thaliana. Las barras indican las medias del número de raíces laterales en A. thaliana al día 5 de cultivo en medio $B_5/2$ segmentado pH 4.3 (n= 14 plántulas). Tukey (P< 0.05). Letras diferentes indican diferencias entre los tratamientos.*

También, es posible que el Al produzca cambios en los niveles de RCV en las raíces, induciendo directa o indirectamente la síntesis y el trasporte de estos metabolitos, y estos cambios estén involucrados con la inhibición de la raíz y la formación de las raíces laterales, como ya ha sido demostrado en otras especies.[41]

2.3.1.3. *Capsicum chinense* Jacq.

C. chinense es una especie cultivada en suelos alcalinos y aunque no hay reportes que indiquen que esta planta es afectada por la toxicidad por aluminio, se menciona que especies que crecen en suelos con un pH básico son más sensibles al efecto de este metal. Por tal motivo, para ver si existen diferencias y comparar con el efecto que se observa en *C. arabica* bajo las condiciones que se detallan en la sección 2.2.4., se evaluó el efecto del $AlCl_3$ sobre el crecimiento radical de chile habanero (*C. chinense* Jacq.).

En la Figura 2.9 se muestran los resultados que se obtuvieron al día siete de tratamiento al utilizar *C. chinense*. Se puede apreciar que no existe diferencias significativas entre los tratamientos a pH 4.3 tanto en ausencia, como en presencia de Al, tal como lo indica la prueba de Tukey (P< 0.05). En la figura 2.10 se muestra el

crecimiento radical de *C. chinense*, el cual fue igual en todos los tratamientos. También se observa la ausencia de raíces laterales.

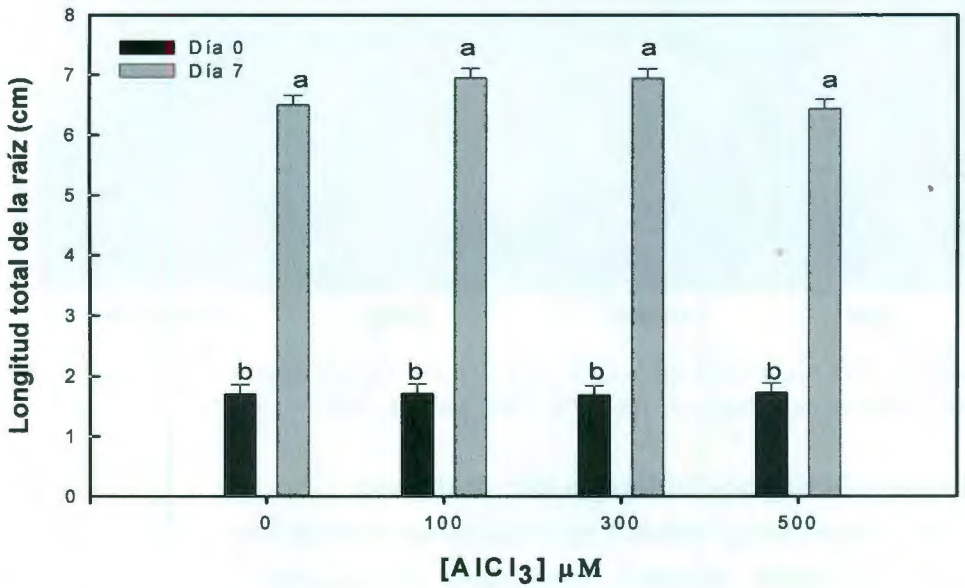

Figura 2.9. *Crecimiento radical acumulado. Longitud total de la raíz de plántulas de C. chinense a 0, 100, 300 y 500 µM de aluminio al día 7 en medio $B_5/2$ segmentado pH 4.3. Las barras representan las medias de la longitud total de la raíz en los diferentes tratamientos (n= 14 plántulas). Tukey (P< 0.05). Letras diferentes indican diferencias en los tratamientos.*

A pesar de que no existen reportes del efecto del aluminio en *C. chinense*, hay estudios realizados en Solanáceas en los que se describe la disminución del rendimiento de la parte aérea en *Lycopersicon esculentum* y un aumento en el rendimiento de los brotes y raíces en *Capsicum annum* a medida que aumenta la tasa de Al. Por otro lado, esta última especie fue más sensible al pH del medio.[42]

Las diferentes respuestas observadas sobre el crecimiento de la raíz en *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense* por efecto del Al, nos sugieren que poseen diferentes mecanismos para responder a la presencia de este metal. Asimismo, el efecto del Al sobre el crecimiento vegetal puede depender de la dosis, la especie, así como el tipo de tejido, entre otros factores.

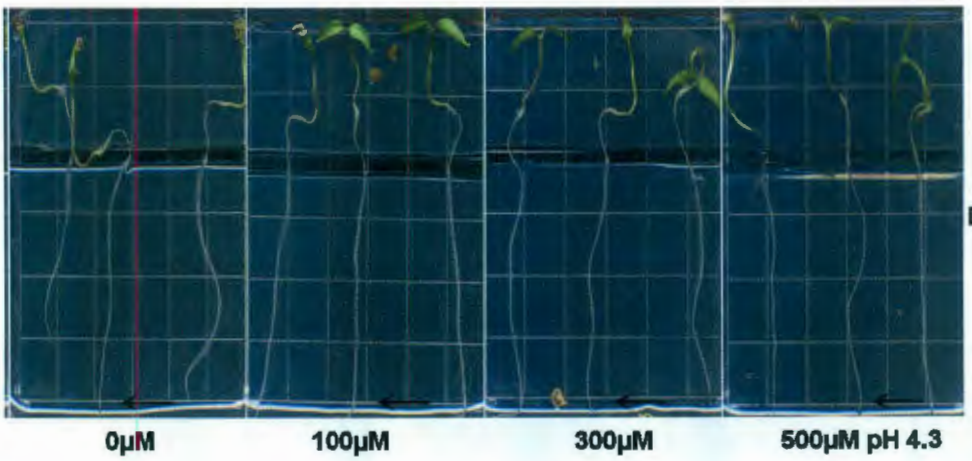

Figura 2.10. *Crecimiento de la raíz de plántulas de* A. thaliana *al día 5 de cultivo en medio* $B_5/2$ *segmentado a 0, 100, 300 y 500 µM de* $AlCl_3$ *a pH 4.3.*

2.3.2. DETECCION HISTOQUÍMICA DEL ALUMINIO

Se han utilizado varios métodos para determinar la localización y la acumulación de aluminio en tejidos vegetales, entre estos se encuentra el uso de colorantes específicos para Al. Las técnicas de tinción son relativamente simples y constituyen herramientas rápidas que han sido utilizadas para examinar la presencia del Al en la raíz.[43]

La hematoxilina es un colorante ampliamente utilizado en estudios citogenéticos, también ha sido utilizado como un método rápido y no destructivo para el estudio de especies de plantas sensibles al aluminio. Por ejemplo, Concado *et al.* (1999) usaron la tinción con hematoxilina como un indicador fenotípico de selección para líneas de maíz resistentes a aluminio.[18] Por otro lado, debido a que la hematoxilina tiene la propiedad de tornarse de color azul oscuro cuando ésta forma un complejo con el metal, y que la reacción hematoxilina y Al es específica, se decidió utilizar esta tinción para evaluar la presencia de este elemento en raíces de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense*.

Para llevar a cabo la tinción con hematoxilina, se cosecharon plántulas de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense* al día 30, 5 y 7 de tratamiento, respectivamente, las cuales previamente habían sido tratadas con Al, como se indica en la sección 2.2.4. Las plántulas fueron teñidas con el colorante hematoxilina como se describe en la sección 2.2.5 y posteriormente se observaron las raíces de los diferentes tratamientos en el

estereoscopio. En la Figura 2.11 se muestra que en el testigo no se detectó la presencia del Al en la raíz por tinción con hematoxilina. En las concentraciones de 100, 300 y 500 µM se observó la tinción con hematoxilina en la raíces, lo cual nos indicó la presencia del metal en la superficie de la raíz, asimismo, no se observa la presencia del Al en el ápice de la raíz. La mayor tinción se detectó en la zona de diferenciación de la raíz.

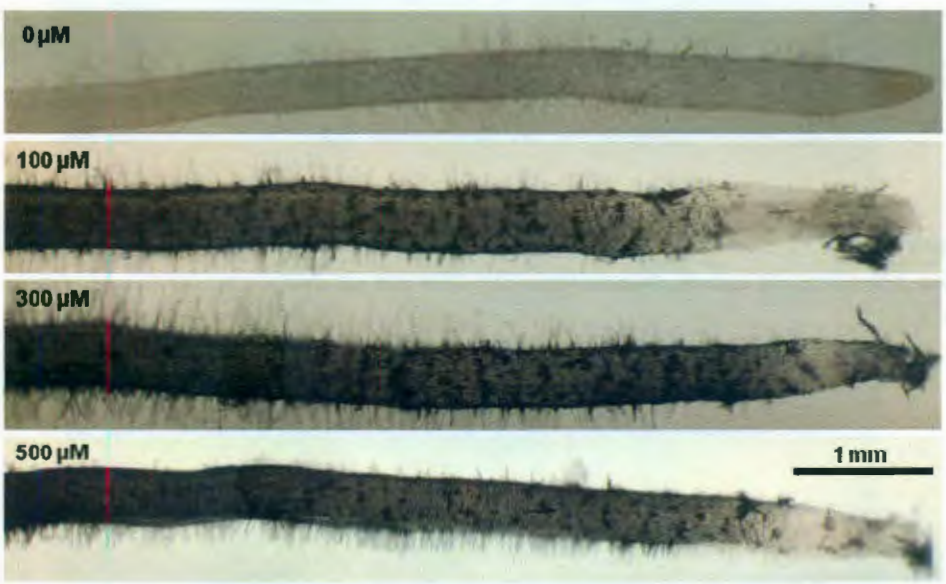

Figura 2.11. *Tinción con hematoxilina de raíces de C. arabica cv Typica al día 30 de cultivo .Las raíces previamente fueron expuestas a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$.*

En raíces de *A. thaliana* no se observó la tinción con hematoxilina en el testigo (Figura 2.12.1). En raíces que fueron tratadas previamente con 100 µM de $AlCl_3$ no se apreció la tinción con hematoxilina en el ápice de la raíz; sin embargo, en pequeños segmentos distantes al ápice se observó la coloración azul característica del complejo Al-hematoxilina (Figura 2.12.1.). En la concentración de 300 µM se aprecia una ligera tinción en el ápice de la raíz y al igual que en 100 µM de Al, se observaron varios segmentos distantes al ápice teñidos con hematoxilina los cuales son indicados por la flechas en la Figura 2.12.2. En 500 µM la tinción en el ápice, el cilindro central y en gran parte de la raíz fue observada y ésta fue abundante.

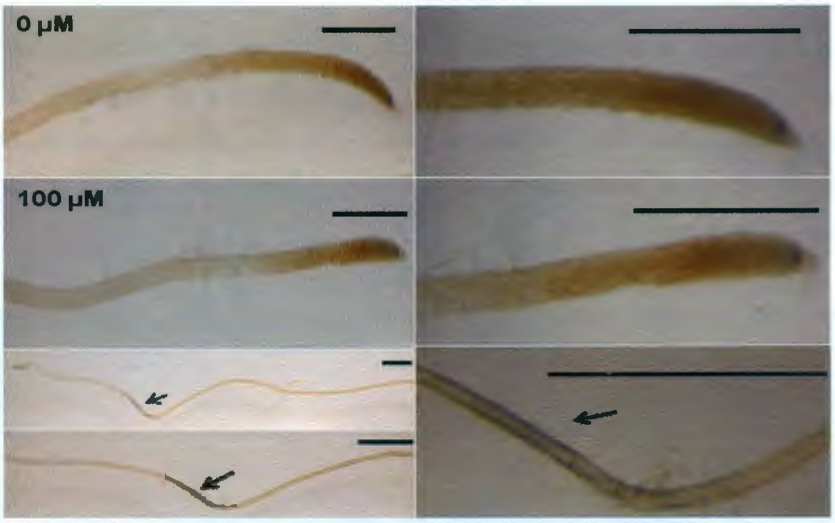

Figura 2.12.1 *Tinción con hematoxilina de raíces de A. thaliana al día 5 de cultivo. Las raíces previamente fueron expuestas a 0 y 100 µM de $AlCl_3$. Las barras representan 1 mm.*

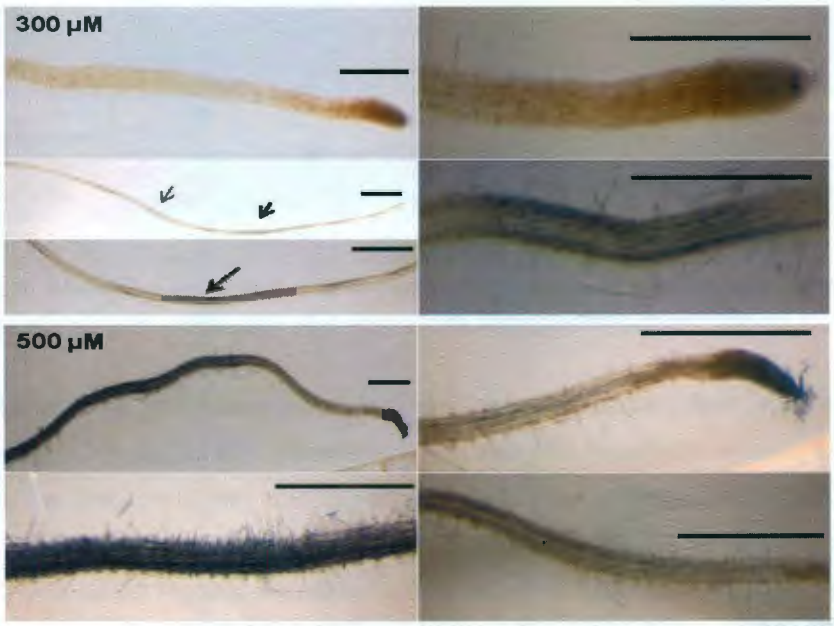

Figura 2.12.2 *Tinción con hematoxilina de raíces de A. thaliana al día 5 de cultivo. Las raíces previamente fueron expuestas a 300 y 500 µM de $AlCl_3$. Las barras representan 1 mm.*

Del mismo modo que en *C. arabica* y *A. thaliana*, en *C. chinense* no se dectectó la presencia del Al al teñir con el colorante en 0 µM. En 100 µM se aprecia una ligera acumulación del metal en el ápice (flecha) y en pequeños sementos de raíz (Figura 2.13.1). En las raíces expuestas a 300 y 500 µM de Al se observa la acumulación de

este metal en el ápice, en el cilindro central y en segmentos amplios de la raíz (Figura 2.13.2).

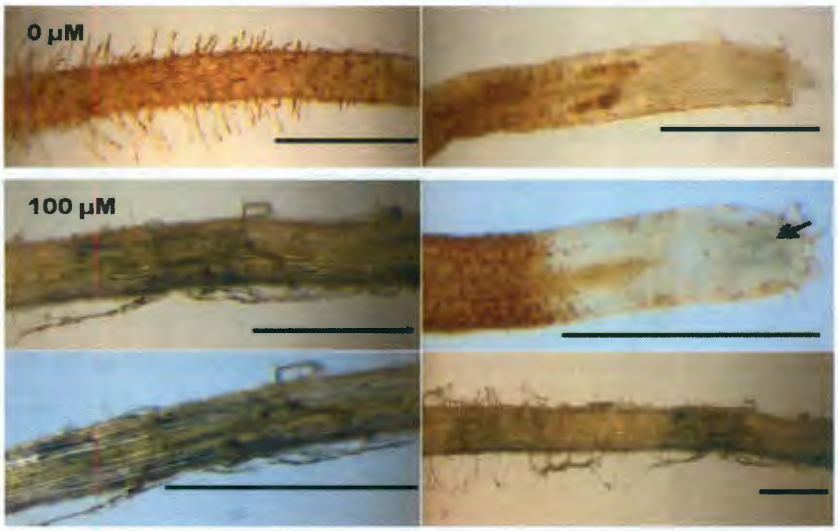

Figura 2.13.1 *Tinción con hematoxilina de raíces de C. chinense al día 7 de cultivo. Las raíces previamente fueron expuestas a 0 y 100 µM de $AlCl_3$. Las barras representan 1 mm.*

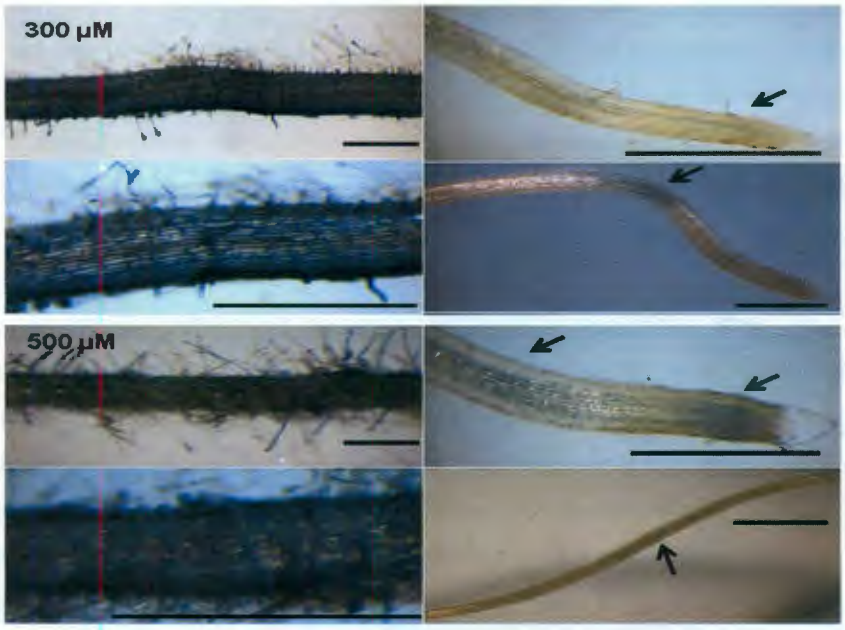

Figura 2.13.2 *Tinción con hematoxilina de raíces de C. chinense al día 5 de cultivo. Las raíces previamente fueron expuestas a 300 y 500 µM de $AlCl_3$. Las barras representan 1 mm.*

En estos ensayos de tinción se observó que la acumulación del Al fue más evidente en el ápice y en el cilindro central en las raíces expuestas a la mayor concentración de Al en el caso de *A. thaliana*; y en 300 y 500 µM en *C. chinense*. En *C. arabica* se observa que el Al se asocia a la superficie de la raíz y no se acumula en el ápice ni en el cilindro central. Bracini *et al.* (2000) reportan que genotipos de cafeto con tolerancia intermedia a Al mostraron una mayor intensidad de la tinción con hematoxilina y el Al se encontró en células epidérmicas y en varias capas de células del cortex; también mencionan que en la mayoría de los genotipos tolerantes, el Al sólo se localizó en las células epidérmicas, por lo que se sugirió la existencia de un mecanismo de exclusión.[25] Por otra parte, en *A. thaliana*, Illes *et al.* (2006) observaron la acumulación del Al en el ápice en concentraciones iguales y mayores a 100 µM de Al, en plántulas expuestas a 300 µM se menciona que el Al no solamente fue abundante en el ápice de la raíz sino que también invadió el cilindro central de la raíz.[12]

2.3.3. ANÁLISIS MINERAL

La nutrición o estatus nutricional juega un importante papel en la planta para hacer frente a cualquier tipo de estrés. Se ha visto que el Al al interaccionar con la membrana plasmática, puede modificar la estructura de ésta, así como el medio iónico cercano a la superficie de las células; asimismo, la interaccion del Al con las pectinas de la pared celular puede alterar la extensibilidad y la permealidad de la misma, afectando de manera significativa la absorción y traslocasión de nutrientes.[44,45] Por tal motivo, Hirano *et al.* (2007) consideran que el estado nutricional de las plantas es uno de los mejores indicadores de estrés por Al.[45]

Por otro lado, se ha observado que muchas especies de plantas que crecen en suelos con altos niveles de Al soluble han desarrollado una amplia gama de mecanismos de resistencia o tolerancia para evitar los efectos toxicos del Al.[46-48] Esas plantas pueden ser agrupadas en dos categorias: acumuladoras y excluidoras de Al, dependiendo de si el Al es o no absorbido por las raíces en grandes cantidades y posteriormente transportado de la raíz hasta las hojas.[49] Por tal motivo, era de importancia determinar el papel que juega el Al en el estatus nutricional y el contenido de Al que es asociado a las raíces y brotes de *C. arabica* y de las especies *A. thaliana* y *C. chinenese*.

Para realizar el análisis mineral, se cosecharon plántulas de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense* al día 30, 5 y 7 de cultivo respectivamente. El material vegetal fue secado y almacenado como se describe en la sección 2.2.6 de Materiales y Métodos. En el caso de *C. arabica* y *C. chinense* las muestras fueron separadas en raíces y brotes, mientras que para *A. thaliana* se utilizó la plántula completa. Posteriormente, un peso conocido de cada muestra fue digerido en microondas en una proporcion 5:1 de HNO_3:H_2O_2. Una vez digeridas las muestras, se determinó el contenido de Al, P, K, y Ca mediante ICP-AES.

Cabe señalar, que debido a la poca cantidad de material vegetal con la que se contaba, las muestras tuvieron que ser reunidas en una sola para representar cada tratamiento (0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$) de las tres especies evaluadas. Por tal motivo, a los resultados obtenidos por ICP-AES no se les realizó un análisis estadístico.

En el Cuadro 2.3 se muestran los resultados que se obtuvieron en el ICP-AES. En el Cuadro se observa que el contenido de K en las raíces de *C. arabica* es mayor en aquellas muestras que provienen de los tratamientos con 100 y 300 µM de $AlCl_3$ en comparación con los tratamientos testigo y 500 µM de $AlCl_3$. En cambio, en *A. thaliana* no se observaron grandes cambios en el contenido de K, a excepción de la concentración de 100 µM de $AlCl_3$, donde se observó un aumento de este elemento. En cuanto a las muestras de *C. chinense,* el contenido de K fue mayor en las raíces y brotes de las plántulas de los tratamientos en presencia de $AlCl_3$.

Por otro lado, el contenido de Ca en las raíces y los brotes de *C. arabica* y *C. chinense* disminuyó por el tratamiento por Al (Cuadro 2.3), y esta reducción en el contenido de Ca fue dependiente de la concentración de $AlCl_3$, a excepción de la concentración de 100 µM de $AlCl_3$ en donde se vio una mayor cantidad de Ca en las raíces y brotes de *C. arabica*. También, se observó una mayor cantidad de Ca en los brotes de *C. arabica* que en las raíces de los tratamientos con y sin $AlCl_3$. En el caso de *A. thaliana* no se pudo determinar el contenido de Ca en las muestras estudiadas.

Del igual forma, cuando se evaluó el contenido de P (Cuadro 2.3), se observó que la concentración de este elemento ligeramente incremento en *A. thaliana* (plántulas) y *C. chinense* (raíces y brotes) por el tratamiento con Al. Asimismo, en *A. thaliana* a la

concentración de 500 µM de $AlCl_3$, el contenido de P fue menor comparado con el testigo. Por otro lado, en *C. arabica* el contenido de P no pudo ser determinado, ya que las muestras analizadas por ICP-AES presentaron interferencias con Cu.

Cuadro 2.3. Concentración de nutrientes y Al en raíces y brotes de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense*

Especie	Tratamiento Al (µM)	Al (µmoles g^{-1} de PS)	K (µmoles g^{-1} de PS)	Ca (µmoles g^{-1} de PS)	P (µmoles g^{-1} de PS)
C. arabica					
Raíz	0	0	1246.28	36.47	-----
	100	8.95	1587	49.4	-----
	300	4.06	1445.45	31.97	-----
	500	17.02	1171.11	26.43	-----
Brote	0	0	1457.73	59.76	-----
	100	1.68	1414.78	70.74	-----
	300	0.68	1291.33	54.28	-----
	500	4.88	1268.7	41.58	-----
A. thaliana					
Plántula	0	0	1370.55	-----	1144.57
	100	44.95	1771.09	-----	1397.54
	300	50.94	1373.37	-----	1286
	500	53.9	1209.94	-----	979.46
C. chinense					
Raíz	0	0	1217.09	1367.57	467.57
	100	13.16	1483.43	732.98	568.31
	300	25.27	1546.98	561.7	651.15
	500	43.45	1819.08	227.39	538.85
Brote	0	0	1230.79	725.2	892.81
	100	5.7	1428.01	313.98	975.84
	300	14.42	1833.12	302.78	1063.61
	500	14.09	1537.37	257.5	963.6

-----No pudo ser determinado

Anteriormente, se mencionó que el Al interfiere con la nutrición mineral de plantas expuestas a este elemento, ya sea disminuyendo u aumentando la absorción de nutrientes como K, N, P, Ca, Mg, entre otros. En plantas de algodón y arroz expuestas a Al se ha visto una disminución en la absorcion de K;[50,51] por otro lado, otros estudios han reportado una estimulación en la absorción de K en raíces de trigo y cebada a 100 y 200 µM de Al.[50,52] Asimismo, se ha observado que uno de los sintomas de la toxicidad por Al es el bloqueo de la entrada de Ca; sin embargo, así como hay estudios que indican una disminución en el contenido de Ca, otros reportan un aumento en la concentración citosólica. De igual forma, se han observado cambios en la absorcion de P en respuesta al Al.[3]

En trabajos donde se ha visto el efecto benéfico del Al, se menciona un aumento en la absorción de otros nutrientes. En plantas adaptadas a suelos ácidos, se ha observado un aumento en el crecimiento de raíz, este aumento ha sido relacionado con un incremento en el contenido de N, P y K en sus tejidos.[14] En raíces de *H. vulgare* se obtuvo una mayor absorción de P y K por Al.[50] Carr (2001), también reporta la estimulación de la toma de K en *C. sinensis*.[53]

En estudios sobre el efecto del Al en cafeto, se observó una reducción en la absorción de Ca, Mg y P en plantas de café cultivadas en solución nutritiva en presencia de Al.[39] Asimismo, Mattiello *et al.* (2008) reportan una disminución del contenido de P y Ca en hojas y raíces de cafeto a medida que aumentaba la actividad del Al.[27] Por otro lado, Bracini *et al.* (1998) al estudiar genotipos tolerantes de cafeto en solución de nutrientes en presencia de Al, mencionan que a pesar de la disminución en el contenido de P y Ca, las plantas de café pueden tolerar el efecto tóxico del Al debido a un aumento en el uso eficiente de P y Ca.[22]

También, se ha reportado un aumento en la toma de K en plantas de café cultivadas en hidroponía en presencia de Al.[39] En nuestros resultados (Cuadro 2.3) se observa un aumento en el contenido de K en raíces de *C. arabica* en 100 y 300 de $AlCl_3$, concentraciones en las que se observó un aumento en el crecimiento de la raíz. Por tal motivo, es posible que este incremento en el contenido de K contribuya a evitar el efecto tóxico del Al en *C. arabica*, así como estimular el crecimiento de la raíz, como anteriormente ha sido reportado por Osaki *et al.* (1997) para especies nativas de suelos ácidos.[14] En este trabajo, también se observó un aumento en el contenido de K en raíces y brotes de *C. chinense*, en donde no se observó un efecto tóxico por Al.

Por otro lado, en todos los tratamientos con Al, el contenido de este elemento aumentó en las raíces y brotes de las tres especies evaluadas conforme aumentó la concentración de Al en el medio, en el caso de *A. thaliana* en toda la plántula (Cuadro 2.3). En *C. arabica* y *C. chinense* se observó una mayor asociación del Al en las raíces en comparación con los brotes; anteriormente Martínez y Monerat (1992) habían reportado que el Al es acumulado en el sistema radical de plantas de cafeto y sólo pequeñas cantidades son traslocadas al tallo.[54] Asimismo, Braccini *et al.* (1998) mencionan que grandes cantidades de Al son acumuladas en las raíces cuando se evaluó el efecto del Al en nueve genotipos de cafeto.[22] Mattiello *et al.* (2008), también

reportan una mayor cantidad del Al en raíces que en los brotes de las variedades de *C. canephora* y *C. arabica* estudiadas.[27]

Se ha mencionado, que una mayor asociación del Al en la raíz impide su translocación hacia las hojas, pudiendo ser esto un factor importante para la tolerancia de las plantas a Al, ya que la permanencia del Al en el sistema radical puede prevenir los efectos nocivos de este elemento en otros órganos.[27] También, Bracini *et al.* (1998) discuten que la tolerancia de cafeto a Al puede estar asociado a un incremento en la compartamentalización de este elemento en las raíces, ya que en un genotipo tolerante la mayor parte de este metal fue asociado a las raíces. Por tal motivo, estos autores consideran que existe un mecanismo interno de tolerancia en este genotipo, que permite la quelación del Al con proteínas o ácidos orgánicos, para su posterior compartamentalización.[22]

Por otro lado, se comparó el contenido total de Al en plántulas de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense* (Figura 2.14) y se observa que el contenido de Al depende de la concentración de Al a la cual fue expuesta la plántula, así como de la especie evaluada. En *C. arabica* se obtuvo un menor contenido de Al, en comparación con las plántulas de *A. thaliana* y *C. chinense*. En *A. thaliana* un mayor contenido de Al en la plántula puede estar relacionado con su sensibilidad a este metal. Por otro lado, son interesantes los resultados observados en *C. chinense*, ya que en el tratamiento con 500 µM de Al, en el cual se vio la inhibición del crecimiento de la raíz en *C. arabica* y *A. thaliana*, en *C. chinense* no se observaron diferencias significativas con respecto al testigo (Sección 2.3.1.3). Sin embargo, el contenido de Al en *C. chinense* a la concentración de 500 µM de Al fue mayor al observado en *C. arabica* y *A. thaliana* a la misma concentración de Al.

Recientemente, Houman *et al.* (2009) al evaluar el efecto del Al en una especie tolerante (*M. cajaputi*) y una sensible (*M. bracteata*), observaron que en *M. Cajaputi* no se inhibió el crecimiento de la raíz, en cambio en *M. bracteata* se observó una remarcada inhibición de su crecimiento. Por otro lado, al evaluar la acumulación de Al en ambas especies se vio un mayor contenido de Al en la especie sensible, lo que sugiere que en *M. cajaputi* funciona un mecanismo que evita la entrada de Al y que permite el crecimiento de la raíz a las concentraciones de Al evaluadas.[28]

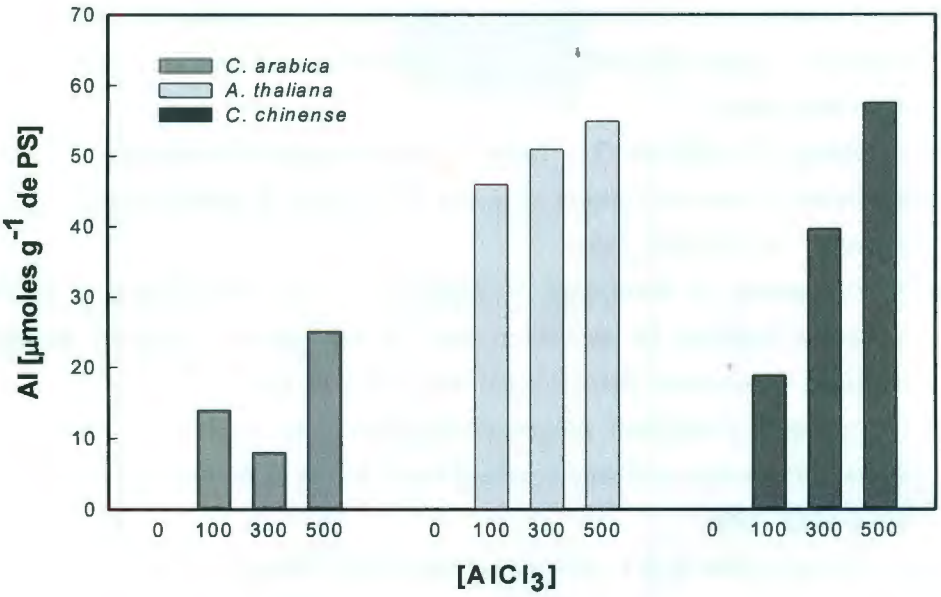

Figura 2.14. Concentración de Al en plántulas de *C. arabica, A. thaliana* y *C. chinense* crecidas en medio $B_5/2$ a 0, 100, 300 y 500 µM de $AlCl_3$ a pH 4.3 al día 30, 5 y 7 de cultivo respectivamente.

Los diferentes resultados observados al evaluar el crecimiento de la raíz, la distribución del Al por medio de tinción con hematoxilina, la cuantificación de Al y otros elementos en *C. arabica*, así como en *A. thaliana* y *C. chinense*, nos indican que el efecto del Al es diferencial con respecto a la especie de planta, de ahí que sean más sensibles o tolerantes a este metal y en el caso de cafeto se observe un efecto benéfico del Al al estimularse el crecimiento de la raíz.

2.4. REFERENCIAS

1. J.D. Huango; L. Grunes; L.V. Kochian, Aluminum effects on kinetics of calcium uptake into cells on the wheat root ápex, *Planta 188,* 414-421, 1992.
2. K. Liu; S. Luan, Internal aluminum block of plant inward K^+ channels, *Plant Cell 13,* 1453-1465, 2001.
3. T. Garzón, Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España, 2003, 1-101.

4. L.V. Kochian; M.A. Piñeros; O.A. Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil 274,* 175–195, 2005.
5. G. Zhang; J. Hoddinot; G.J. Taylor, Characterization of 1-3-β-glucan (callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminum toxicity, *Plant Physiol. 144,* 229-234, 1994.
6. Y. Yamamoto; Y. Kobayashi; H. Matsumoto, Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots, *Plant Physiol. 125,* 199-208, 2001.
7. D.L. Jones; L.V. Kochian, Aluminium inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in Al toxicity?, *Plant Cell 7,* 1913-1922, 1995.
8. M.L Piña-Chable; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect, *Prostanglandins Other Lipid Mediat 65,* 45-56, 2001.
9. M. Martínez-Estévez; G. Racagni-Di Palma; A. Muñoz-Sánchez; L. Brito-Argáez; V.M. Loyola-Vargas; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells, *Plant Physiol. 160,* 1297-1303, 2003.
10. F. Quintal-Tun; J.A. Muñoz-Sánchez; A. Ramos-Díaz; A. Escamilla-Bencomo; M. Martínez-Estévez; C. Exley; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid, *J. Inorg. Biochem 101,* 362-369, 2006.
11. A. Ramos-Díaz; L. Brito-Argáez; T. Munnik; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway, *Planta 225,* 393–401, 2007.
12. P. Illes; M. Schlicht; J. Pavlovkin; I. Lichtscheidi; F. Baluska; M. Ovecka, Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production, *J. Exp. Bot. 57,* 4201-4213, 2006.
13. E.A.H. Pilon-Smits; C.F. Quinn; W. Tapken; M. Malagoli; M. Schiavon, Physiological functions of beneficial elements, *Curr Opin Plant Biol. 12,* 267–274, 2009.

14. M. Osaki; T. Watabane; T. Tadano, Beneficial effect of aluminium on growth of plants adadted to low pH, *Soils Sci. Plant nutr. 43,* 551-563, 1997.
15. F. Ghanati; A. Morita; H. Yokota, Effects of aluminium on the growth of tea plant and activation of antioxidant system, *Plant Soil 276,* 133-141, 1995.
16. J.E.A. Bojórquez-Quintal, Establecimiento de las condiciones optimas de germinación de embriones cigóticos de plantas de cafeto (*Coffea arabica* L.), Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, 2009.
17. E. Polle; C.F. Konzak; J.A. Littrik, Visual detection of aluminium tolerance levels in wheat by haematoxylin staining of seedling roots, *Crop Sci. 18,* 823-827, 1978.
18. G.M.A. Cancado, L.L. Loguercio, P.R. Martins, S.N. Parentony, E. Paiva, A. Borem; M.A. Lopes, Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.), *Appl Genet Theor. 99,* 747–754, 1999.
19. M.F. Carneiro, Advances in coffee biotechnology, *AgBiotechNet 1,* 1-7, 1999.
20. I. Girón, Desarrollo y maduración de embriones somáticos de híbridos F1 de *Coffea arabica* para una producción masal, Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, 1998.
21. M.C.L. Braccini, H.E.P. Martínez, P.R.G. Pereira, N.F. Sampaio; E.A.M. Silva, Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular, *R. Bras. Ci. Solo 22,* 435-442, 1998.
22. M.C.L. Braccini, H.E.P. Martínez, P.R.G. Pereira, N.F. Sampaio; A.A. Pereira, Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. II. Teores de P, Ca e Al e eficiência ao P e Ca, *R. Bras. Ci. Solo 22,* 443-450, 1998.
23. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini, Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução, *Bragantia Campinas 59,* 221-226, 2000.
24. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini; S.M. Mendonça, Avaliação do ph da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de aluminio no solo, *Bragantia Campinas 59,* 83-88, 2000.
25. M.C.L. Braccini, H.E.P. Martínez, E.A.M. Silva, A.L. Braccini; C.A. Scapim, Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios

de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de aluminio, *R. Bras. Ci. Solo 24,* 59-68, 2000.

26. L.A. Rodrigues, H.E.P. Martínez, J.C.L. Neves, R.F. Novais; S.M. Mendonça, Growth response of coffee tree shoots and roots to subsurface liming, *Plant Soil 234,* 207-214, 2001.
27. E.M. Mattiello, M.G. Pereira, E. Zonta, J. Mauri, J.D. Matiello, P.G. Meireles; I. Ribeiro da Silva, Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arabica* sob influencia da atividade do alumínio em solução, *R. Bras. Ci. Solo 32,* 425-434, 2008.
28. Y. Houman; K. Tahara; F. Shinmachi; A. Noguchi; S. Satohiko; I. Hasegawa, Differences of growth response to aluminum excess of two Melaleuca trees differing in aluminum resistance, in The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis, UC Davis., http://escholarship.org/uc/item/28f4d547, 2009.
29. L.R. Che-Gonzalez, Efecto de la adición de fósforo sobre la toxicidad por aluminio en células en suspensión de *Coffea arabica* L, Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México, 2009.
30. R. Tomioka; A. Oda; C Takenaka, Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. seedlings, *J For Res. 10,* 319-324, 2005.
31. J.M. Igual; J.O. Dawson, Stimulatory effects of aluminum on in vitro growth of *Frankia*, *Can. J. Bot. 77,* 1321–1326, 1999.
32. O.A. Hoekenga; L.G. Maron; M.A. Piñeros; G.M.A. Cancádo; J. Shaff; Y. Kobayashi; P.R. Ryan; B. Dong; E. Delhaize; T. Sasaki; H. Matsumoto; Y. Yamamoto; H. Koyama; L.V. Kochian, AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA 103,* 9738-9743, 2006.
33. C.M.P. Macedo; J.C. Lopes; J.A.T. Amaral; A.F.A. Fonseca, Germinação e vigor de sementes de café submetidas ao estresse com aluminio, *Sci. Agrar. Curitiba 9;* 235-239, 2008.
34. C.M.P. Macedo; J.C. Lopes, Qualidade fisiológica de semente de *café arábica* na presença de alumínio, *Rev. Bras. Sementes 30,* 66-73, 2008.

35. T.B. Kinraide; P.R Ryan; L.V. Kochian, Interactive effects of Al^{3+}, H^{+}, and cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential, *Plant Physiol. 99,* 1461-1468, 1992.
36. T.B. Kinraide, Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations, *Physiol. Plant. 88,* 619-625, 1993.
37. F.C. Thornton; M. Schaedle; D.J. Ryanal, Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution cultura, *Can J Forest Res. 16,* 892-896. 1986.
38. F.C. Thornton; M. Schaedle; D.J. Ryanal, Tolerance of red oak and American and European beech seedlings to aluminum, *J Environ Qual. 18,* 541-545, 1989.
39. M.A. Pavan; F.T. Bingham, Toxicity of aluminium to coffe seedlings grow in nutrient solution, *Soil Sci. Soc. Ame. J. 46,* 993-997, 1982.
40. M. Martínez-Estévez; I. Echevarría-Machado; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium toxicity and plant signal transduction. Research Signpost, Kerala, India. *Recent Res. Devel. Plant Biol. 3,* 15-29. 2003.
41. R. Cizková, Phytohormonal levels in spruce roots under aluminium stress. In: Balus˘ka F Ed; Kluwer, Structure and function of roots, Netherlands, 1995, 335-339.
42. D.M. Wheeler; D.C. Edmeades; R. A. Chritie; J. Putterill; R. Gardner, Effect of aluminum and pH on relative yield and plant chemical concentrations of 7 dicotyledonous species grown in solution culture at low ionic strength, *J. Plant Nutr. (USA) 15,* 419-433, 1992.
43. D. Eticha; A. Stass; W.J. Horst, Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium?, *J. Exp. Bot. 56,* 1351–1357, 2005.
44. L.V. Kochian; M.A. Piñeros; O.A. Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil 274,* 175–195, 2005.
45. Y. Hirano; T. Mizoguchi; I. Brunner, Root parameters of forest trees as sensitive indicators of acidifying pollutants: a review of research of Japanese forest tres, *J For Res 12,* 134–142, 2007.
46. C.D. Foy; R.L. Chaney; M.C. White, The physiology of metal toxicity in plants, *Annu Rev Plant Physiol. 29,* 511-566, 1978.

47. L.V. Kochian, Celular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 46,* 237-260, 1995.
48. T. Watanabe; M. Osaki, Mechanisms of adaptation to high aluminium condition in native plant species growing in acid soils: a review, *Comm Soil Sci Plant Anal 33,* 1247-1260, 2002.
49. S. Jansen; T. Watanabe; S. Dessein; E. Smets; E. Robbrecht, A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae, *Ann Bot. 91,* 657-663, 2003.
50. D.R.R. Malkanthi; M. Moritsugu; K. Yokoyama, Effects of low pH and Al on absortion and translocation of some essential nutrients in excised barley roots, *Soil Sci. Plant Nutr. 41,* 253-262, 1995.
51. C.D. Foy; R.L. Chaney; M.C. White, The physiology of metal toxicity in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. 29,* 511-566, 1978.
52. G. Frantzios; B. Galatis; P. Apostolakos, Aluminium effects on microtube organization in dividing root tips cells of *Triticum turgidum* I. Mitotic cells, *New Phytol. 145,* 211-224, 2000.
53. H.P. Carr, The accumulation of aluminium and it´s effect on the uptake and distribution of Ca, Mg, K, Mn, Fe, Cu and Zn in *Camellia sinensis* (L.), PhD Thesis, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, 2001.
54. H.E.P. Martinez; P.H. Monnerat, Aluminum response of two coffee varieties in nutritive solution, Proceedings of the XVIII Brazilian Coffee Research Congress, 1, 105–106, 1992.

DISCUSIÓN GENERAL

Suelos con pH bajo constituyen uno de los limitantes de la producción de cultivos a nivel mundial, principalmente debido a que el metal Al se encuentra soluble. Se ha descrito que el Al restringe el crecimiento de algunas especies de plantas, incluidas algunas de importancia económica, como el trigo, el maíz y la soja.[1,2] Debido a que la raíz es el principal órgano en contacto con este metal, se ha reportado que el Al inhibe el crecimiento de la raíz y provoca trastornos en sus funciones tales como la permeabilidad de la membrana plasmática, la peroxidación lipídica y rigidez de la pared celular, estos efectos directamente afectan el vigor de la planta reduciendo su rendimiento y aumentando la sensibilidad a otros factores de estrés como la sequía, la deficiencia de nutrientes y la herbivoría.[3]

Por otro lado, se tiene especial interés en estudiar cómo algunas plantas son capaces de tolerar o resistir la presencia de Al, mediante mecanismos de exclusión de moléculas de bajo peso molecular, como los ácidos orgánicos, así como mecanismos de detoxificación interna del Al. Recientemente se han identificado genes que codifican transportadores de malato y citrato los cuales son inducidos por Al, con la consecuente exudación de estos ácidos orgánicos para la quelación del Al apoplástico.[4-6] En los últimos años, se han reportado trabajos en donde se menciona el efecto benéfico del Al. Se ha visto que en especies adaptadas a suelos con pH ácido, el Al puede mejorar el crecimiento de la raíz a bajas concentraciones de este metal en determinados taxas.[7] Entre los mecanismos que se han descrito en los cuales el Al puede intervenir directa o indirectamente, se menciona el aumento en la toma de nutrientes, principalmente N, K y P.[8]

En este trabajo se evaluó el efecto del aluminio sobre el crecimiento radical de *C. arabica*, debido a que es una especie que crece o es cultivada en suelos con características ácidas, en los cuales el aluminio podría afectar el desarrollo, así como el rendimiento de este tipo de cultivo.

En el Experimento 1, se aplicaron diferentes concentraciones de $AlCl_3$ (0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 600 µM pH 4.3) a plántulas de *C. arabica*, en las cuales se observó un incremento en el crecimiento de la raíz en las concentraciones mayores a 100 µM del metal; sin embargo, el crecimiento de la raíz no fue estadísticamente significativo según la prueba de Tukey ($P<0.05$) con el crecimiento de la raíz en 0 µM

de Al. Esta respuesta resultó contradictoria a lo reportado por Pavan y Binghan (1982), ya que según estos autores el Al inhibe el crecimiento de la raíz en plantas de cafeto, así como la formación de raíces laterales.[9] Otros trabajos han reportado que algunos genotipos y variedades de la especie *C. arabica* presentan tolerancia a Al,[10-14] debido a ello, los resultados observados en el Experimento 1 nos sugieren que la variedad Typica utilizada en este estudio es tolerante a Al.

En el Experimento 2 (*C. arabica*) bajo las condiciones que se especifican en la sección 2.2.4, los resultados mostraron un mayor crecimiento de la raíz en las plántulas en presencia de 100 y 300 µM de Al, esta diferencia fue estadísticamente significativa (Tukey, $P<0.05$) con respecto a los otros tratamientos. Por otro lado, los resultados aquí mostraron un menor crecimiento de las raíces de *C. arabica* en la concentración de 0 µM de Al en comparación con los otros tratamientos con excepción de la concentración mayor de Al (500 µM), en la cual se observó la mayor inhibición del crecimiento de la raíz. En estudios sobre la germinación y vigor de semillas de cafeto sometidas a estrés por Al, se ha visto la estimulación del crecimiento de la raíz, principalmente en variedades de la especie *C. arabica*, lo que nos hace suponer que el Al en concentraciones bajas, en las primeras etapas de desarrollo de la raíz puede tener un efecto positivo sobre el crecimiento de ésta.[10,14-16] Tomioka *et al.* (2005) mencionan que la presencia del Al en la raíz puede desencadenar una señal que acelere el crecimiento de la raíz, sin embargo esta deducción sólo es especulativa.[17] También, se ha mencionado que la toxicidad por H^+ en suelos con pH bajo puede causar la inhibición del crecimiento de la raíz y la aplicación de Al puede evitar este efecto, tal como fue observado en las concentraciones de 100 y 300 µM.[18,19]

La concentración de 500 µM de Al (Experimento 2) inhibió el crecimiento de la raíz, anteriormente en condiciones de hidroponía se reporta la inhibición del crecimiento de la raíz en concentraciones mayores a 0.74 mM de Al.[9] En trabajos en suspensiones celulares de cafeto se ha reportado que la dosis letal media es de 25 µM de Al,[20] también se ha observado que el Al inhibe completamente el crecimiento celular de las suspensiones celulares de *C. arabica* cuando éstas son tratadas con 100 µM de Al.[21] Asimismo varios trabajos en *C. arabica* han reportado efectos negativos del Al sobre las enzimas de la ruta de transducción de señales, tales como la fosfolipasa C.[22-25] Sin embargo, cabe mencionar que el modelo de suspensiones celulares puede presentar respuestas diferentes a la que se observarían al utilizar un organismo completo, ya

que estas células se encuentran desdiferenciadas y pueden presentar una mayor sensibilidad, en este caso a la toxicidad por Al. Además, en este tipo de modelo se carece de componentes sistémicos de regulación.

Por otro lado, al comparar los resultados que se obtuvieron en *C. arabica* con otras especies de plantas se observaron diferentes respuestas al efecto del Al. En *A. thaliana* se observó un efecto dependiente de la concentración de aluminio, ya que la inhibición del crecimiento de la raíz fue aumentando conforme aumentó la concentración del metal (Tukey, $P<0.05$). Este resultado fue similar al reportado por Illes *et al.* (2006) en el cual la inhibición del crecimiento de la raíz es dependiente de la concentración de aluminio a los siete días de cultivo, siendo en la concentración de 300 µM de $AlCl_3$ donde se observó la mayor inhibición del crecimiento de la raíz.[26] En este trabajo, a 500 µM de $AlCl_3$ se observó la mayor inhibición del crecimiento de la raíz en *A. thaliana* al día 5 de cultivo.

Asimismo, en *A. thaliana* se observó un mayor número de raíces laterales en el segmento superior de la placa de cultivo en los tratamientos con 300 y 500 µM de Al y este aumento en el número de raíces laterales fue estadísticamente significativo con las concentraciones de 0 y 100 µM de Al (Tukey, $P<0.05$). Esta respuesta en *A. thaliana* probablemente se deba a cambios en la síntesis y transporte de RCV que induzcan la formación de raíces laterales, también es posible que el aumento de la formación de raíces laterales sea un mecanismo de respuesta para compensar la inhibición del crecimiento de la raíz primaria.[26,27]

En *C. chinense* el crecimiento radical no se afectó por Al, ya que el crecimiento de la raíz fue normal, además de que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar de que no existen reportes del efecto del aluminio en *C. chinense*, en *Capsicum annum* se ha observado un aumento en el rendimiento de los brotes y raíces a medida que aumentaba la tasa de Al.[28] Las diferentes respuestas observadas sobre el crecimiento radical en presencia de Al en plántulas de *C. arabica*, *A. thaliana* y *C. chinense*, nos hacen suponer que entre estas especies mecanismos diferentes están involucrados en dichas respuestas.

Por otro lado, la tinción con hematoxilina nos permitió determinar de una forma rápida y sencilla la presencia y la acumulación del Al en la superficie de la raíz de las tres especies evaluadas en este trabajo. En las tres especies a las concentraciones de 100, 300 y 500 µM de Al se observó la presencia del metal en superficie de la raíz y esta aumentó en las concentraciones mayores de Al. En el caso de *A. thaliana* y *C. chinense* se observó la acumulación del aluminio en el ápice y en el cilindro central de la raíz, lo cual nos indica que estas especies acumulan una mayor cantidad de Al.

Mediante el análisis mineral por ICPAES, se pudo observar que en *C. arabica* y *C. chinense* el Al se acumula principalmente en las raíces y pequeñas cantidades son transportadas a los brotes; estos resultados nos hacen suponer que en estas dos especies, una mayor asociación de Al en la raíz puede prevenir los efectos nocivos de este elemento en otros órganos de la planta. Al comparar el contenido de Al en plántulas de las tres especies, se observó que *A. thaliana y C. chinense* acumulan una mayor cantidad de este elemento. En el caso de *A. thaliana* un mayor contenido de Al en la plántula puede estar relacionado con su sensibilidad. Por otro lado, en *C. arabica* a las concentraciones de 100 y 300 µM de Al se observó un mayor contenido de K, es posible que este elemento contribuya a prevenir el efecto tóxico del Al, así como estimular el crecimiento de la raíz. Anteriormente se ha relacionado al K con el aumento en el crecimiento de la raíz en presencia de Al.[8] En *C. chinense*, especie que no mostró efectos tóxicos por Al, se observó un incremento en el contenido de K en raíces y brotes.

En este trabajo, al comparar el efecto de Al sobre el crecimiento radical de *C. arabica* con otras especies y observarse diferentes respuestas, se demostró que en *C. arabica* a ciertas concentraciones de Al (100 y 300 µM), este metal puede ejercer un efecto benéfico sobre la raíz aumentando su crecimiento. También mediante tinción con hematoxilina se demostró que el Al se une a la superficie de la raíz y que este elemento es acumulado en las raíces y solo pequeñas cantidades son transportadas a los brotes; por otro lado, a las concentraciones en donde se observó la estimulación del crecimiento de la raíz hubo un mayor contenido de K, elemento que podría contribuir a evitar el efecto tóxico del Al, así como estimular el crecimiento de la raíz. Por otro lado, en este trabajo se demostró la inhibición del crecimiento de la raíz a la concentración de 500 µM de Al en *C. arabica*.

REFERENCIAS

1. L.V. Kochian, O.A. Hoekenga; M.A. Piñeros, How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency, *Annu. Rev. Plant Biol. 55,* 459–93, 2004.
2. L.V. Kochian; M.A. Piñeros; O. A. Hoekenga, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil, 274,* 175–195, 2005.
3. O.A. Hoekenga; L.G. Maron; M.A. Piñeros; G.M.A. Cancado; J. Shaff; Y. Kobayashi; P.R. Ryan; B. Dong; E. Delhaize; T. Sasaki; H. Matsumoto; Y. Yamamoto; H. Koyama; L.V. Kochian, AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA 103,* 9738-9743, 2006.
4. T. Garzón, Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España, 2003.
5. T. Sasaki; Y. Yamamoto; B. Ezaki; M. Katsuhara; S.J. Ahn; P.R. Ryan; E. Delhaize; H. Matsumoto, A wheat gene encoding an aluminium-activated malate transporter, *Planta 37,* 645–653, 2004.
6. P.R. Ryan; H. Raman; S. Gupta; W.J. Horst; E. Delhaize, A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots, *Plant Physiol. 149,* 340–351, 2009.
7. E.A.H. Pilon-Smits; C.F. Quinn; W. Tapken; M. Malagoli; M. Schiavon, Physiological functions of beneficial elements, *Curr Opin Plant Biol. 12,* 267–274, 2009.
8. M. Osaki; T. Watabane; T. Tadano, Beneficial effect of aluminium on growth of plants adadted to low pH, Soils *Sci. Plant Nutr. 43,* 551-563, 1997.
9. M.A. Pavan; F.T. Bingham, Toxicity of aluminium to coffe seedlings grow in nutrient solution, *Soil Sci. Soc. Ame. J. 46,* 993-997, 1982.
10. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini, Avaliação de linhagens de cafeeiros quanto à tolerância ao alumínio pelo método do papel-solução, *Bragantia Campinas 59,* 221-226, 2000.
11. M.C.L. Braccini; H.E.P. Martínez; A.L. Braccini; S.M. Mendonça, Avaliação do ph da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de aluminio no solo, *Bragantia Campinas 59,* 83-88, 2000.

12. M.C.L. Braccini, H.E.P. Martínez, E.A.M. Silva, A.L. Braccini; C.A. Scapim, Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de aluminio, *R. Bras. Ci. Solo. 24,* 59-68, 2000.
13. L.A. Rodrigues, H.E.P. Martínez, J.C.L. Neves, R.F. Novais; S.M. Mendonça, Growth response of coffee tree shoots and roots to subsurface liming, *Plant Soil 234*, 207-214, 2001.
14. E.M. Mattiello, M.G. Pereira, E. Zonta, J. Mauri, J.D. Matiello, P.G. Meireles; I. Ribeiro da Silva, Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arabica* sob influencia da atividade do alumínio em solução, *R. Bras. Ci. Solo. 32,* 425-434, 2008.
15. C.M.P. Macedo; J.C. Lopes, Qualidade fisiológica de semente de *café arábica* na presença de alumínio, *Rev. Bras. Sementes 30,* 66-73, 2008.
16. C.M.P. Macedo; J.C. Lopes; J.A.T. Amaral; A.F.A. Fonseca, Germinação e vigor de sementes de café submetidas ao estresse com aluminio, *Sci. Agrar. Curitiba 9;* 235-239, 2008.
17. R. Tomioka; A. Oda; C Takenaka, Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. seedlings, *J For Res. 10,* 319-324, 2005.
18. T.B. Kinraide; P.R Ryan; L.V. Kochian, Interactive effects of Al^{3+}, H^{+}, and cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential, *Plant Physiol. 99,* 1461-1468, 1992.
19. T.B. Kinraide, Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations, *Physiol. Plant. 88,* 619-625, 1993.
20. M. Martínez-Estévez, Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café, Tesis doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, México, 2001.
21. M. Martínez-Estévez; I. Echevarría-Machado; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium toxicity and plant signal transduction. Research Signpost, Kerala, India, *Recent Res. Devel. Plant Biol. 3,* 15-29. 2003.
22. M.L. Piña-Chable; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect, *Prostanglandins Other Lipid Mediat. 65,* 45-56, 2001.

23. M. Martínez-Estévez; G. Racagni-Di Palma; A. Muñoz-Sánchez; L. Brito-Argáez; V.M. Loyola-Vargas; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells, *Plant Physiol. 160,* 1297-1303 2003.
24. F. Quintal-Tun; J.A. Muñoz-Sánchez; A. Ramos-Díaz; A. Escamilla-Bencomo; M. Martínez-Estévez; C. Exley; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminium-induced phospholipid signal transduction pathway in *Coffea arabica* suspension cells and its amelioration by silicic acid, *J. Inorg. Biochem. 101,* 362-369, 2006.
25. A. Ramos-Díaz; L. Brito-Argáez; T. Munnik; S.M.T. Hernández-Sotomayor, Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway, *Planta 225,* 393–401, 2007.
26. P. Illes; M. Schlicht; J. Pavlovkin; I. Lichtscheidi; F. Baluska; M. Ovecka, Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production, *J. Exp. Bot. 57,* 4201-4213, 2006.
27. R. Cizková, Phytohormonal levels in spruce roots under aluminium stress. In: Balus˘ka F Ed; Kluwer, Structure and function of roots, Netherlands, 1995, 335-339.
28. D.M. Wheeler; D.C. Edmeades; R. A. Chritie; J. Putterill; R. Gardner, Effect of aluminum and pH on relative yield and plant chemical concentrations of 7 dicotyledonous species grown in solution culture at low ionic strength, *J. Plant Nutr. (USA) 15,* 419-433, 1992.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden señalar las siguientes conclusiones:

- El efecto del Al sobre el crecimiento radical de *C. arabica* depende de la concentración a la cual está expuesta: dosis de 100 y 300 µM tienen un efecto estimulatorio, mientras que una dosis de 500 µM inhibe el crecimiento radical.

- Al evaluar el efecto del Al en *C. chinense* y *A. thaliana*, se observaron respuestas diferentes a las mostradas en *C. arabica*: *C. chinense* mostró tolerancia y *A. thaliana* fue sensible al tratamiento con Al.

- En las tres especies a las concentraciones de 100, 300 y 500 µM de Al se observó la presencia del metal en la superficie de la raíz.

- En *A. thaliana* y *C. chinense* se observó la acumulación de Al en el ápice y en el cilindro central de la raíz, lo cual nos indica que estas especies acumulan una mayor cantidad de Al.

- Al evaluar el contenido de Al en raíces y brotes de *C. arabica*, se observó una mayor asociación del metal en la raíz y pequeñas cantidades en los brotes. En *A. thaliana* y *C. chinense* se observó una mayor acumulación de Al.

- En *C. arabica* a 100 y 300 µM de Al se observó un mayor contenido de K en las raíces. En *C. chinense* la adición de Al incrementó el contenido de K en brotes y raíces. Por tal motivo, es posible que el incremento en el contenido de K evite el efecto tóxico y estimule el crecimiento de la raíz en *C. arabica* y *C. chinense*.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el efecto del Al sobre el crecimiento vegetal puede depender de la dosis, la especie, así como del tipo de tejido, entre otros factores.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se observó que el Al a bajas concentraciones puede estimular el crecimiento de la raíz de plántulas de *C. arabica*, por lo que resulta interesante determinar los mecanismos que posiblemente estén implicados en el incremento del crecimiento de la raíz. Por otro lado, los resultados mostraron que en *C. arabica* el Al se asocia más a las raíces y solo pequeñas cantidades son traslocadas a los brotes. Asimismo, se vio un mayor contenido de K en los tratamientos que estimularon el crecimiento de la raíz. En general, los resultados que se presentan en este trabajo nos han permitido realizar nuevos cuestionamientos, por lo que se han planteado las siguientes perspectivas.

- Determinar si el Al desencadena un sistema antioxidante que evite los efectos tóxicos y estimule el crecimiento de la raíz en *C. arabica*, como ha sido observado en otros taxas. Para ello se sugiere evaluar el índice de peroxidación de lípidos, mediante la medición del contenido de malondialdehido (MDA) como producto final de la peroxidación de lípidos, al igual que el contenido de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las raíces. Asimismo, determinar la actividad de las enzimas ascorbato peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa.

- Evaluar el contenido de pectina, lignina y compuestos fenólicos en raíces de cafeto en presencia de Al y determinar la relación de estos compuestos con la asociación de este metal a la raíz.

- Evaluar si existen cambios en el contenido de ácidos orgánicos en las raíces y los brotes de cafeto que permitan determinar el mayor contenido de Al en las raíces y su menor translocación hacia los brotes.

- Determinar si el K juega un papel particular en el aumento del crecimiento radical de *C. arabica* bajo condiciones de estrés por Al, así como determinar si el K puede aliviar los efectos tóxicos de este metal. Por tal motivo se plantea evaluar el efecto del Al en plántulas de *C. arabica* en condiciones de deficiencia de K, también se sugiere evaluar el efecto de diferentes concentraciones de K

sobre el efecto de este metal. Ambas estrategias nos permitirían determinar el papel del K frente a este tipo de estrés abiótico.

- Evaluar el efecto de otras formas químicas del Al sobre el crecimiento radical de *C. arabica*, así como el efecto de este metal en otras variedades y especies de cafeto.

- Debido a que no se pudo evaluar el contenido de P por medio de ICP-AES en las muestras de cafeto, se pretende evaluar el efecto del Al sobre el contenido de P en las raíces y los brotes de plántulas de *C. arabica* por métodos fotocolorimétricos.

Por otra parte, en este trabajo se presentan resultados en donde se observaron cambios en el número de raíces laterales de plántulas de *A. thaliana* en respuesta a Al, por lo que sería interesante evaluar el perfil de RCV en respuesta a estrés por Al. Para ello se ha propuesto:

- Evaluar el contenido de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), en particular el de auxinas en raíces tratadas y no tratadas con Al.

Asimismo, se presentan datos interesantes sobre el efecto del Al en *C. chinense*; ya que en esta especie, el crecimiento de la raíz no se vio afectada por este metal. También se observó una mayor asociación y acumulación del Al en la raíz, así como un mayor contenido de K en las raíces y los brotes en plántulas de *C. chinense* en presencia de Al. Estos resultados nos sugieren una investigación futura que nos ayudaría a entender los mecanismos que están participando en *C. chinense* en respuesta a Al. A continuación se mencionan algunas perspectivas relacionadas con este tema:

- Evaluar e identificar el contenido de ácidos orgánicos y otros ligandos que puedan quelar al aluminio en la raíz, así como conocer si este elemento es traslocado hacia los brotes.

- Evaluar la interacción del Al con otros nutrientes importantes para el crecimiento de las plantas.

ANEXO 1

Composición del medio Gamborg (B5). Gamborg et al. *(1968)*

Composición del medio Gamborg (B5). Gamborg *et al.* (1968)				
	Componente	mg L-1	g 500ml-1 (20X)	Vol L-1
Stock A.1	KNO_3	2500	25	50 mL
	$CaCl_2.H_2O$	150	1.5	
	$MgSO_4.7H_2O$	250	2.5	
	$(NH_4)_2SO_4$	134	1.34	
Stock A.2	$NaH_2PO_4.2H_2O$	150	1.5	50 mL
Stock B	KI	0.75	0.0075	50 mL
	H_3BO_3	3	0.03	
	$MnSO_4.H_2O$	10	0.1	
	$ZnSO_4.7H_2O$	2	0.02	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.0025	
Stock C	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.0125	1 mL
	$CoCl.6H_2O$	0.025	0.0125	
Stock D	$FeSO_4.7H_2O$	37.3	0.373	50 mL
	$Na_2EDTA.2H_2O$	27.8	0.278	
Stock E	Piridoxina	1	0.05	10 mL
	Ac. Nicotínico	1	0.05	
	Tiamina HCl	10	0.5	
	Mio-inositol	100	5	
Sacarosa			30 gL-1	
Agar			1%	