



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Efecto de la fuente nitrogenada en la
toxicidad por aluminio en suspensiones
celulares de *Coffea arabica* L.**

Tesis que presenta

Jacqueline Cerdas Solano

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “**Efecto de la fuente nitrogenada en la toxicidad por aluminio en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.**” 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 de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estevez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, **11 de octubre del 2017.**

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 a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

Ing. Agr. Jacqueline Cerdas Solano

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Papel de los mensajeros secundarios del sistema de transducción de señales fosfolipídico” (CONACYT, proyecto 219893) bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor.

AGRADECIMIENTOS

Al Señor de la Misericordia y a la Virgen de los Ángeles por protegerme, en este periodo de estudio, por ayudarme a superar obstáculos y dificultades durante este proyecto personal y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N°589292 otorgada para realizar mis estudios de maestría y por otorgarme la beca mixta para realizar la estancia académica en Keele University, resultados reportados en los anexos de este documento.

A la Universidad de Costa Rica por permitirme realizar este posgrado en el exterior.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), por el uso de las instalaciones para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, por su apoyo, dedicación y por compartir sus sabios conocimientos conmigo y haberme dado la oportunidad de realizar esta investigación en su grupo de trabajo.

De manera especial al comité tutorial conformado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, la Dra. Ileana Echevarría Machado y el Dr. Marco Villanueva, por las aportaciones y comentarios para realizar y llevar a buen fin este trabajo de investigación.

Al jurado evaluador conformado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, la Dra. Ileana Echevarría Machado, la Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco, al Dr. Enrique Castaño de la Serna y la Dra. Nancy Santana Buzzy.

Al Dr. Christopher Exley por recibirme en su laboratorio en The Birchall Centre en Keele University y por permitir el uso de las instalaciones durante la estancia académica.

De manera muy especial al M. en C. José Armando Muñoz Sánchez y a la IBQ. Yahaira Cab Guillén por el apoyo técnico durante mi estancia en el grupo de la Dra. Hernández.

A la M. en C. Lizbeth Castro Concha por el apoyo en el uso del fluorómetro, a la M. en C. María de Fátima Medina Lara por la ayuda en el uso del espectro de absorción atómica y a la M. en C. Ángela Kú González por el apoyo técnico en el uso del microscopio confocal.

A los profesores tanto del CICY como externos, que impartieron lecciones en las diferentes materias que cursé durante la maestría, a ellos mi agradecimiento por el conocimiento que me brindaron.

A Doña Marlen Vargas, quien me motivó a cruzar fronteras, y a los profes de la UCR de la Sede de Guanacaste: Raziel Acevedo, Vidal Vega, Roberto Cerdas, Eithel Vallejos, Greta Núñez, Luis Gómez, Alejandra Rodríguez, Lang Ying Hernández, Edgar Solano, Helga Blanco y a Gretel Torres, de quienes tuve el apoyo y la motivación antes y durante el curso de esta maestría.

A mis compañeros del laboratorio número 10 de la UBBMP: Roberto, Ibis, Yahaira, Laura, Julieta, Carmita, Normig, Cristina, Thalia, y a los posdoc: la Dra. Maru y al Dr. Víctor. A todos ellos por sus observaciones y críticas durante mi investigación y por su amistad y compañía en mi estancia en México. Se ganaron un espacio muy especial en mi corazón.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por regalarme su amistad, ratos de tertulias y compañía: Cynthia, Raúl, Sergio, Javier, Lili, Laurita, Martita, Angélica.

Así mismo, mi más sincera gratitud a todos los miembros del CICY, que de una u otra manera hicieron posible la realización de mis estudios de posgrado.

A mi familia y amigos, por el apoyo y la paciencia brindada a la distancia, la mejor motivación que se puede tener.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a la Divina Misericordia y a la Virgen Santísima, por permitirme vivir esta experiencia y lograr un éxito mas en mi vida personal y profesional.

A mi familia: a mi mamá Irene, a mi papá Oscar y a mis hermanas Verónica y Ericka. A mi abuelita Brígida. A todos ellos les dedico este trabajo, el cual ha sido posible gracias a sus oraciones y sus palabras de aliento.

A Javier, quien me acompañó en todo este arduo proceso y fue un pilar importante en el logro de esta maestría.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 ALUMINIO.....	3
1.1.1 GENERALIDADES.....	3
1.1.2 ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO.....	3
1.1.3 ABSORCIÓN DEL AI POR LAS PLANTAS.....	5
1.1.4 SÍNTOMAS DE LA TOXICIDAD POR AI EN LAS PLANTAS.....	5
1.1.5 EFECTOS DE LA TOXICIDAD POR AI EN LAS PLANTAS.....	6
1.1.6 EFECTO DEL AI A NIVEL CELULAR.....	7
1.2 EL NITRÓGENO.....	9
1.2.1 GENERALIDADES.....	9
1.2.2 FORMAS DEL N EN EL SUELO.....	9
1.2.3 EFECTOS DEL N EN LAS PLANTAS.....	12
1.2.4 ABSORCIÓN DEL N POR LAS PLANTAS.....	13
1.2.5 NITRÓGENO A NIVEL CELULAR.....	14
1.2.5.1 ENZIMA NITRATO REDUCTASA.....	16
1.2.6 LA ACIDEZ DEL SUELO Y LAS FUENTES NITROGENADAS.....	19
1.3 INTERACCIÓN ALUMINIO – FUENTE DE NITRÓGENO.....	20

1.4 EL CULTIVO DE CAFETO.....	21
1.4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	21
1.4.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	22
1.4.3 PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE CAFETO EN MÉXICO.....	24
1.5 MODELO EXPERIMENTAL.....	26
1.6 JUSTIFICACIÓN.....	27
1.7 HIPÓTESIS.....	27
1.8 OBJETIVO GENERAL.....	27
1.8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
CAPÍTULO II.....	31
2.1. INTRODUCCIÓN.....	31
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	32
2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE LA LÍNEA L2.....	33
2.2.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR, PH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA.....	34
2.2.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE K EN EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO CELULAR.....	34
2.2.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS FUENTES NITROGENADAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR EN SUSPENSIONES CELULARES.....	35
2.3 RESULTADOS.....	37

2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR	37
2.3.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE K EN EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO CELULAR	39
2.3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS FUENTES NITROGENADAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR	39
2.4 DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO III	49
3.1 INTRODUCCIÓN	49
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.2.1 TRATAMIENTOS CON $AlCl_3$	50
3.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE Al	51
3.2.2.1 NIVELES DE Al TOTAL EN CÉLULAS	52
3.2.2.2 DETERMINACIÓN DE Al LIBRE	53
3.4 RESULTADOS	57
3.4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON $AlCl_3$ EN EL CRECIMIENTO CELULAR	57
3.4.2 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE Al	64
3.4.2.1 Al TOTAL	64
3.4.2.2 CONTENIDO DE Al^{3+} EN MEDIOS DE CULTIVO	65
3.6 DISCUSIÓN	69
CAPÍTULO IV	73
4.1 INTRODUCCIÓN	73
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	74
4.2.1 TRATAMIENTOS	74

4.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	74
4.2.3 PERFIL PROTEICO.....	76
4.2.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRATO.....	76
4.3 RESULTADOS.....	77
4.3.1 CONTENIDO DE NO_3^-	77
4.3.2 EFECTO DEL AlCl_3 EN EL PERFIL PROTEICO.....	77
4.4 DISCUSIÓN.....	81
CAPÍTULO V.....	85
DISCUSIÓN GENERAL.....	85
CAPÍTULO VI.....	91
CONCLUSIONES Y PRESPECTIVAS.....	91
6.1 CONCLUSIONES GENERALES.....	91
6.2 PERSPECTIVAS.....	92
ANEXOS.....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Modelo de los posibles mecanismos de respuesta ante la toxicidad o la tolerancia al Al en plantas.....	8
Figura 1.2 El ciclo del N en la atmósfera.....	10
Figura 1.3 Sistema de transporte del N a nivel celular.....	14
Figura 1.4 Estructura de la enzima nitrato reductasa.....	18
Figura 1.5 Morfología de la parte aérea de la planta de cafeto.....	24
Figura 1.6 Estrategia experimental.....	29
Figura 2.1 Caracterización de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L.....	38
Figura 2.2 Evaluación del contenido de K en el medio de cultivo.....	40
Figura 2.3 Valor de pH en el medio de cultivo modificado en la fuente de N total.....	41
Figura 2.4 Conductividad eléctrica en el medio de cultivo modificado en la fuente de N total.....	42
Figura 2.5 Crecimiento del paquete celular de las suspensiones celulares cultivadas en medios modificados en la fuente de N total.....	43
Figura 3.1 Curva estándar de la concentración de Al total.....	53
Figura 3.2 Estructura química de morin.....	53
Figura 3.3 Complejo formado por Al-morin.....	54
Figura 3.4 Curva estándar de la concentración de Al ³⁺	55
Figura 3.5 Visualización con morin, fluorocromo selectivo para Al ³⁺	55
Figura 3.6 Estructura química y visualización de DAPI.....	56

Figura 3.7 Estructura química y visualización de CFW.....	56
Figura 3.8 Efecto del $AlCl_3$ en el valor de pH en el medio de cultivo de las suspensiones de <i>C. arabica</i> L.....	58
Figura 3.9 Efecto del $AlCl_3$ en la conductividad eléctrica en el medio de cultivo de las suspensiones de <i>C. arabica</i> L.....	60
Figura 3.10 Efecto del $AlCl_3$ en el peso fresco de las suspensiones de <i>C. arabica</i> L.....	61
Figura 3.11 Efecto del $AlCl_3$ en el peso seco de las suspensiones de <i>C. arabica</i> L.....	63
Figura 3.12 Determinación de la concentración de Al total.....	65
Figura 3.13 Determinación de la concentración de Al libre.....	65
Figura 3.14 Localización intracelular de Al^{3+}	67
Figura 4.1 Estructura química del azul de Coomassie G 250.....	75
Figura 4.2 Curva estándar de la concentración de proteínas.....	75
Figura 4.3 Curva estándar de la concentración de NO_3^-	77
Figura 4.4 Perfil proteico en SDS-PAGE al 15%.....	78
Figura 4.5 Determinación del contenido de nitrato en células con siete y 14 días de cultivo.....	80
Figura 4.6 Determinación del contenido de nitrato en el día 14 de cultivo.....	81

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Distribución de especies mononucleares de Al en base al pH de la solución del suelo.....	4
Cuadro 1.2 Principales procesos del ciclo del nitrógeno.....	11
Cuadro 1.3 Taxonomía del cultivo del café.....	23
Cuadro 1.4 Producción agrícola de café cereza por estado.....	25
Cuadro 2.1 Componentes y concentración del medio MS a la mitad de su fuerza iónica.....	33
Cuadro 2.2 Componentes y concentración del medio Murashige y Skoog elaborado con soluciones madres a la mitad de la fuerza iónica.....	35
Cuadro 2.3 Modificación del medio Murashige y Skoog en la fuente de N total.....	37

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético
6-BAP	6-amonopurina
AOs	Ácidos orgánicos
Asn	Asparagina
ATP	Adenosín trifosfato
ATPasa	Adenosíntrifosfatasa
BSA	Albúmina de suero bovino
cHAST	Transporte de alta afinidad constitutivo
DAG	Diacilglicerol
FAD	Flavina adenina dinucleótido
Fdox	Ferredoxina oxidado
Fdxred	Ferredoxina reducido
Gln	Glutamina
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HAST	Sistema de transporte de alta afinidad
IP ₃	Inositol (1,4,5-trifosfato)
LAST	Sistema de transporte de baja afinidad
iHAST	Sistema de transporte de alta afinidad inducido

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
PEPC	Fosfoenol piruvato carboxilasa
PLC	Fosfolipasa C
PPDK	Piruvato fosfatodicinaasa
rpm	Revoluciones por minuto
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico

RESUMEN

Los suelos agrícolas con condición ácida y que favorecen la toxicidad por Al, son un problema que se presenta en el cultivo de café, ya que estas condiciones afectan la calidad y la productividad del café. Además, la disponibilidad de nutrientes, como es el N, también se ve afectada por el grado de acidez y las condiciones del medio en el que se encuentre. Es por esto, que en el presente trabajo se estudió el efecto de la fuente nitrogenada y la toxicidad por Al en el modelo de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L., en el cual se evaluaron parámetros como: el crecimiento celular, el contenido de Al total y libre, la localización intracelular de este metal, el perfil proteico y el contenido de nitrato (NO_3^-).

Los resultados obtenidos indicaron que la fuente de NO_3^- afecta la toxicidad por Al en suspensiones de *C. arabica* L., dependiendo de la etapa de crecimiento en la que se encuentre, ya que las células cultivadas en el medio modificado con NO_3^- , evaluadas en la etapa estacionaria del cultivo, no mostraron disminución en el crecimiento cuando las células fueron tratadas con AlCl_3 . Además, el contenido de Al libre, en las suspensiones cultivadas en el medio modificado con NO_3^- disminuyó, sugiriendo que, el NO_3^- como única fuente de N en el medio de cultivo disminuye la disponibilidad del Al.

Por otro lado, las células de 14 días cultivadas en el medio modificado con NO_3^- presentaron un incremento en el contenido de NO_3^- , en comparación con las células control. Sin embargo, en células tratadas bajo las mismas condiciones con $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 , no se observaron cambios en el contenido de esta fuente nitrogenada.

ABSTRACT

Agricultural soils with an acidic condition and Al toxicity are a problem that occurs in coffee crops, and these conditions affect coffee quality and productivity. In addition, the availability of nutrients, such as N, is also affected by the degree of acidity and the conditions of the environment in which it is found. Therefore, in the present work, the effect of nitrogen source and Al toxicity in the model *Coffea arabica* L. suspensions cells, in which parameters such as cell growth, total and free Al content, intracellular localization, protein profile and nitrate content were evaluated.

The obtained results indicated that the NO_3^- source affects Al toxicity in suspensions of *C. arabica* L., depending on the stage of growth in which it is found, since the cells cultured in the medium modified with NO_3^- , evaluated on the stationary culture stage, showed no decrease in growth when the cells were treated with AlCl_3 . In addition, the free Al content in the suspensions cultured in the modified medium with NO_3^- decreased, suggesting that NO_3^- as the only source of N in the culture medium decreases the availability of Al.

On the other hand, the cells of 14 days cultured in the medium modified with NO_3^- presented an increase in the content of NO_3^- , compared to the control cells. However, in cells treated with AlCl_3 500 μM , under the same conditions, no presented changes in the content of this nitrogen source.

INTRODUCCIÓN

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre (Zhao *et al.*, 2013; Yaroshevsky, 2006) y a pesar de su alto contenido en los suelos, actualmente no existe evidencia de que este metal sea esencial para el crecimiento de las plantas (Zhao *et al.*, 2013; Kochian *et al.*, 2005)

La toxicidad por Al es el mayor problema agronómico que limita la producción de cultivos en aquellas partes donde la solución del suelo es fuertemente ácida. Se ha estimado que más del 50% de las tierras cultivables en el mundo presentan pH ácido, limitando la producción agrícola de muchos cultivos de importancia tanto alimenticia como económica alrededor del mundo (Liu *et al.*, 2014).

Delhaize y colaboradores (1993) afirman que uno de los efectos por la presencia del Al en la solución del suelo es el pobre desarrollo radical. Bajo esta condición existen diferentes formas fitotóxicas del Al, dependiendo del grado de acidez del medio en el que se encuentren. Por ejemplo, a pH neutro o básico, el Al se encuentra en estado insoluble formando aluminosilicatos u óxidos de aluminio; cuando el pH del suelo se encuentra a 5.5 o valores inferiores, el Al se solubiliza y puede ser tomado por las plantas, siendo el Al^{3+} la forma más tóxica (Liu *et al.*, 2014).

El grado de acidez de la solución del suelo y la disponibilidad de Al también determinan la disponibilidad de nutrientes indispensables para el desarrollo óptimo de la mayoría de cultivos, tal es el caso de los macronutrientes, que como su nombre lo indica, son requeridos en mayor cantidad por las plantas, como lo es el N, el P y el K.

El N es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, pero a pesar de esto, este elemento se encuentra en concentraciones bajas en el suelo (Zhao *et al.*, 2013; Yaroshevsky, 2006). El N es el cuarto elemento en abundancia en organismos vivos, mientras que en la corteza terrestre constituye menos del 0.1% y en la atmósfera se encuentra por arriba del 80% en forma de N molecular (Buchanan *et al.*, 2015).

El ciclo del N es un proceso biogeoquímico donde se presentan las diferentes formas químicas de este elemento, entre ellas: el N atmosférico, el amoníaco, el ion amonio, el

ion nitrito, y el ion nitrato. Cada forma de N se relaciona con la manera en la que es utilizada por la planta (Rosas et al., 2015). La asimilación del nitrato dentro de las células se lleva a cabo inicialmente por la acción de la enzima nitrato reductasa (NR) (Cazetta y Vasques, 2004; Lea, 1997; Srivastava, 1990).

El cultivo de cafeto, por lo general, se desarrolla en suelos con altos contenidos de materia orgánica, lo cual puede hacer que el Al se vuelva disponible (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), y que de esta manera, se vea afectado por la toxicidad por Al.

El cultivo *in vitro* de células es un adecuado modelo de estudio de la toxicidad por Al (Martínez-Estevez *et al.*, 2001; Ojima *et al.*, 1984; Ojima y Ohira, 1983), ya que este metal es capaz de afectar también el crecimiento de células en suspensión de *Coffea arabica* L. (*C. arabica* L.) principalmente en la línea sensible a Al (línea L2) (Chee-González, 2009; Martínez-Estevez *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se evaluó la adición de diferentes fuentes nitrogenadas al medio de cultivo y su efecto sobre la toxicidad por Al en el crecimiento celular, a través de mediciones fisiológicas y bioquímicas en las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 ALUMINIO

1.1.1 GENERALIDADES

Hans Christian Oersted, químico danés, quien aisló por primera vez al Al en 1825, demostró que este metal en condiciones normales se encuentra en forma sólida, es de color blanco plateado, es dúctil, maleable y su forma cristalizada es cúbica. Se puede encontrar en forma libre en la naturaleza o combinado con otros elementos (Martínez-Estevez *et al.*, 2003). Es un metal trivalente (Al^{3+}) con un peso atómico de 25.98 g mol^{-1} , número atómico de 13 y con electronegatividad baja. No se incluye dentro de la clasificación de metales pesados y normalmente se utiliza en aleaciones con otros metales como el cobre, el silicio, el magnesio y el zinc para su aplicación en la industria metalúrgica (Bojórquez, 2010).

A pesar de que es un elemento que no es esencial para las plantas ni para los animales, la solubilización de este elemento en la solución del suelo a pH ácido lo hace disponible, requiriendo concentraciones micromolares para llegar a afectar diferentes organismos (Escalante, 2012; Delhaize y Ryan, 1995).

1.1.2 ESPECIES DE ALUMINIO EN EL SUELO

El Al molecular puede cambiar su forma dependiendo del pH del suelo, ya que este factor es el que determina la solubilidad de sus especies. En un suelo de condición ácida el Al es liberado en sus formas iónicas, tales como: $\text{Al}((\text{H}_2\text{O})_6)^{3+}$, AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Al}(\text{OH})_4$, permitiendo la solubilización y la liberación de iones Al^{3+} en la rizosfera, provocando de esta forma el efecto tóxico en los cultivos sensibles (Simões *et al.*, 2012; Delhaize y Ryan, 1995).

En el Cuadro 1.1 se presentan las posibles especies mononucleares del aluminio con base al pH de la solución en el suelo.

Cuadro 1. 1 Distribución de especies mononucleares de Al con base al pH de la solución en el suelo (Chee-González, 2009; Baes y Mesmer, 1976).

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

El grado de toxicidad por Al es determinado por la disponibilidad de las diferentes especies químicas de este metal que se encuentran en el suelo. Por ejemplo, el ion aluminato $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ y el $\text{Al}(\text{OH})_3$ no se consideran tóxicos para las plantas (Chee-González, 2009; Kinraide, 1990); así como las especies monoméricas como el $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y el $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ (Chee-González, 2009), pero los complejos polinucleares de hidróxido de Al con carga positiva alta, como el $\text{Al}_{13}[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}]$ se consideran aún más tóxicas para las plantas que las especies monoméricas (Comin *et al.*, 1999; Parker y Bertch, 1992).

La mayor limitante para la producción agrícola de los cultivos a nivel mundial se debe a la disponibilidad del Al para las plantas y su fitotoxicidad (Zhao *et al.*, 2008; Kochian *et al.*, 2004). Los suelos con condición ácida, donde los valores de pH presentes son de 5.5

o inferiores, pueden contener concentraciones desde 37 μM de Al^{3+} , aumentando dicha concentración si el pH de la solución del suelo disminuye (Marschener, 2012). Este complejo hexahidratado octaédrico $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ puede inhibir tanto el crecimiento como la integridad radical de las plantas, reduciendo también el rendimiento productivo de los cultivos hasta en un 50% (Zhao *et al.*, 2008; Kochian *et al.*, 2005).

1.1.3 ABSORCIÓN DEL AI POR LAS PLANTAS

La disponibilidad del Al^{3+} en el suelo depende de la condición de pH de la solución en la que se encuentre, pero aún no se ha dilucidado cómo o qué tan rápido responden los cultivos que se desarrollan bajo estas condiciones tóxicas, cómo sus raíces responden ante esta señal, o si existe un receptor específico para este elemento en las plantas (Matsumoto *et al.*, 2015, Kinraide y Yemiyahu, 2007). A nivel celular se ha reportado tanto en *Oryza sativa* como en levaduras que existe un transportador específico para el Al^{3+} en la membrana plasmática de células del ápice radicular, identificado como Nramp1 (Nramp aluminum transporter 1) y que su expresión está regulada por el gen *ART1* como factor transcripcional (Escalante, 2012; Xia *et al.*, 2010).

Además, existen diversos reportes de otras vías de transporte de este elemento, como la permeabilidad a través de la membrana plasmática en forma de compuestos neutros por estructuras lipídicas, que se forman precisamente por la presencia de este metal en el medio y que facilitan su entrada en forma de partículas cargadas, por medio de un transportador unido a fosfolípidos de la membrana. Este es un mecanismo poco descrito hasta ahora, que sugiere la modificación en la composición de carbohidratos de la pared celular que reduce la unión del Al^{3+} (Liu *et al.*, 2014).

1.1.4 SÍNTOMAS DE LA TOXICIDAD POR AI EN LAS PLANTAS

El efecto adverso de los suelos ácidos en el crecimiento de las plantas está fuertemente relacionado con la toxicidad por Al^{3+} . Se ha reportado que las plantas pueden responder a la señal por Al ya sea de manera rápida o lenta, dependiendo de las condiciones de crecimiento en las que se encuentre, incluyendo el estado fisiológico de la planta, tejido y células, así como el evento que induce a la señal de Al a ser absorbida en órganos o células específicas (Matsumoto *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2006).

La inhibición del crecimiento de la raíz es uno de los primeros síntomas asociados a la toxicidad por Al^{3+} (Yang y Horst, 2015). El estrés que manifiesta este tejido vegetal por el Al se logra observar desde los primeros minutos de exposición a concentraciones micromolares en la solución en la que se encuentre el cultivo (Chee-González, 2009; Ma *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2001; Vázquez *et al.*, 1999; Blancaflor *et al.*, 1998; Sivaguro y Horst, 1998; Ryan *et al.*, 1993). La parte distal de la zona de elongación del ápice de la raíz expuesta a Al es el sitio de percepción a la toxicidad y el efecto de inhibición del crecimiento de este tejido (Chee-González, 2009; Kollmeier *et al.*, 2000; Sivaguro y Host, 1998; Ryan *et al.*, 1993). Algunos síntomas visibles de toxicidad por este metal en raíces es la coloración café y su hinchazón, que limita la toma de agua y nutrimentos, donde presentan más susceptibilidad las plantas jóvenes. La germinación de semillas no se ve afectadas por la presencia de Al, pero llega a afectar el crecimiento radical una vez que germinan (Mossor-Pietraszewska, 2001; Rengel, 2002).

La presencia de Al provoca una disminución en la actividad mitótica en un gran número de plantas, reduciendo la proliferación de células en la región de la división celular en las raíces expuestas a este metal, donde se ha evidenciado que este efecto involucra la interacción de factores hormonales (Kumar-Panda y Matsumoto, 2007; Massot *et al.*, 2002; Blamey, 2001).

En la parte aérea de las plantas también es posible encontrar síntomas de la toxicidad por Al, donde son la clorosis y la necrosis los más comunes, provocados por los cambios celulares y ultraestructurales de las hojas, así como la afectación en la funcionalidad de los estomas, que deriva en la disminución en la actividad fotosintética (Liang-Cuiyue *et al.*, 2013).

También, se ha reportado en diversos modelos de estudio que el Al evidencia efectos importantes, tal es el caso del modelo de suspensiones celulares de *C arabica* L., que provoca la disminución en la capacidad de crecimiento de una línea que es sensible al Al (Chee-González, 2009; Martínez-Estevez *et al.*, 2003).

1.1.5 EFECTOS DE LA TOXICIDAD POR Al EN LAS PLANTAS

Según Sivaguru y Horst (1998), el Al se acumula en los ápices, el tejido meristemático y la zona de elongación, siendo la zona distal de elongación la zona más sensible.

Como lo indican Kinraide y Yemiyahu (2007), no se cuenta con la información para conocer cómo las plantas responden a la señal del Al en las raíces, como tampoco se conoce si la señal es el mismo Al³⁺ o si son otras moléculas de señalización provocadas por la toxicidad de este elemento que se unen a las moléculas u órganos de las células expuestas, lo que resulta en una alteración en su función.

1.1.6 EFECTO DEL Al A NIVEL CELULAR

Aún no es posible comprender cómo la señal del Al afecta a órganos específicos (Figura 1.1), así como su mecanismo en las células, y no se conoce por completo cómo se lleva a cabo la formación de callosa en el plasmodesmo como respuesta a la señal de Al en células vegetales, como consecuencia a la toxicidad (Matsumoto *et al.*, 2015).

Existen evidencias de que en plantas sensibles al Al, como es el caso de las plantas de maíz, la elongación celular en la raíz se afecta en los primeros 30 minutos por la señal provocada al exponerse a este metal (Matsumoto *et al.*, 2015; Llugany *et al.*, 1995).

En el caso de las plantas de trigo, las cuales también son sensibles al Al, se ha propuesto que el efecto en la elongación de raíces se debe al bloqueo del tráfico entre células, debido a la producción de callosa en esta zona, y que por ende este bloqueo limita la transmisión de varias señales independientes o dependientes de la señal por Al. Esta señalización a través de callosa aún no se comprende completamente (Matsumoto *et al.*, 2015; Sivaguru *et al.*, 2000).

Además, se ha visto que la interacción del Al con la membrana plasmática puede modificar la estructura y el ambiente iónico cercano a la superficie, la cual provoca desórdenes en el proceso de transporte de iones, desbalances nutricionales y altera la homeostasis celular (Bose *et al.*, 2011; Sade *et al.*, 2016).

La toxicidad por Al está relacionada con severos cambios en el sistema radical de las plantas, entre ellos está la interferencia con la división celular en los ápices de las raíces, el incremento de la rigidez de la pared celular, la disminución de los polisacáridos de la pared celular, la disminución de la respiración celular, la producción y el transporte de citoquininas y afectación en la estructura y función de la membrana plasmática. A largo plazo, la exposición del Al causa daños severos al sistema radical, que en consecuencia

reduce la toma de agua y de nutrientes minerales, limitando en gran manera los rendimientos agrícolas (Kochian *et al.*, 2004; Sade *et al.*, 2016).

La absorción de Al en la pared celular de plantas reduce el movimiento de agua y de solutos en el apoplasto, el cual, limita la toma de nutrientes por parte del sistema radical (Eticha *et al.*, 2005; Sade *et al.*, 2016). Los cationes de la pared celular son reemplazados por Al, lo cual resulta en cambios drásticos en la estructura de la misma, así como sus propiedades mecánicas (Zhang *et al.*, 2007; Sade *et al.*, 2016).

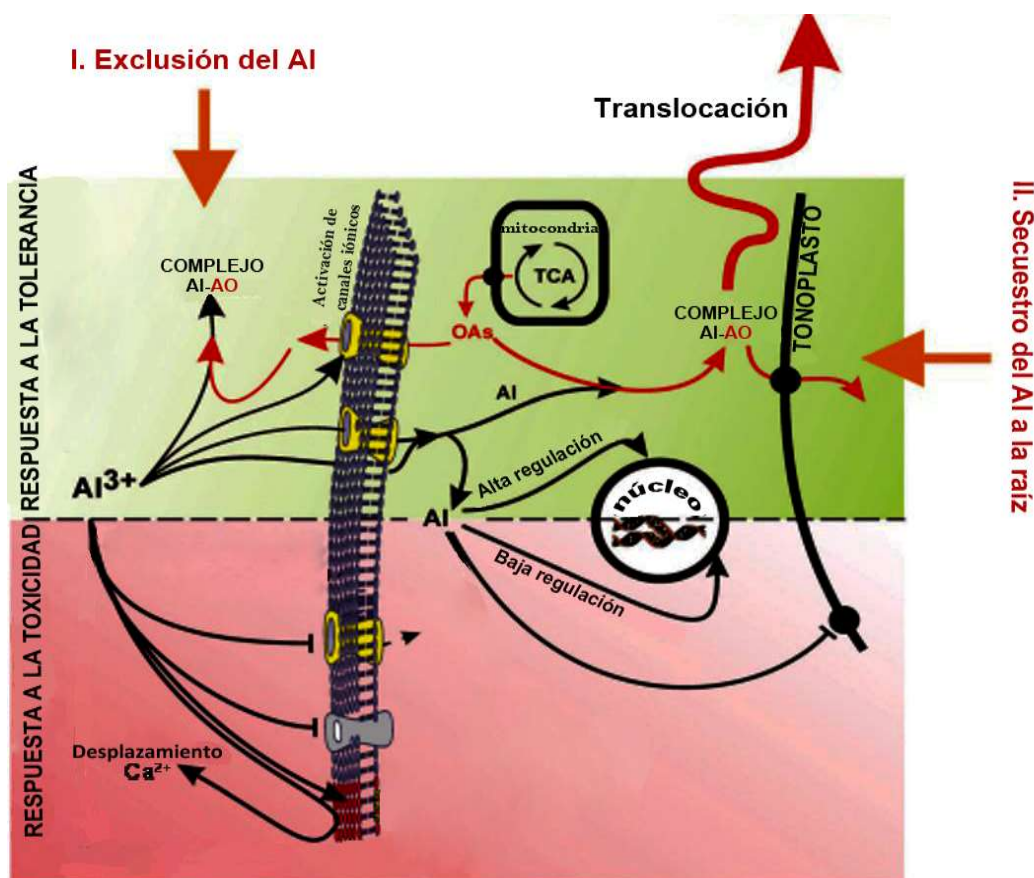


Figura 1.1 Modelo de los posibles mecanismos de respuesta ante la toxicidad o la tolerancia al Al en plantas. El modelo de toxicidad por Al se ilustra en el panel inferior del diagrama, mientras que en el panel superior se muestran los mecanismos de resistencia al Al. En el panel superior los mecanismos de tolerancia al Al (exclusión del Al y desintoxicación interna del Al) se basan en la formación de complejos de Al con aniones de ácidos orgánicos (Al-AO) y la activación del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) dentro de la mitocondria. El mecanismo de exclusión del Al implica la liberación de ácidos orgánicos (AOs) a través de canales aniónicos activados por el Al. El mecanismo interno de desintoxicación de Al involucra el flujo de Al^{3+} a través de las células de la raíz o secuestro en la vacuola mediado por transportadores (modificado de Liu *et al.*, 2014).

1.2 EL NITRÓGENO

La asimilación del N por las plantas se ve afectado por la presencia de Al, ya que provoca la disminución de la concentración de nitrato, donde se ha demostrado que altas concentraciones de este metal causan alteraciones en el proceso bioquímico de asimilación del N, el cual es considerado de suma importancia como precursor en la producción de proteínas (Castro de Souza *et al.*, 2016). Sin embargo, los estudios que involucran la fuente nitrogenada y la toxicidad por aluminio en modelos de plantas son escasos.

1.2.1 GENERALIDADES

El primer aislamiento del N se atribuye a Daniel Rutherford, físico escocés, quien lo realizó a partir del aire, separando el CO₂, consiguiendo las primeras separaciones de N impuro en el año 1772 (Johnson, 1970). El N se caracteriza por ser un gas incoloro, inerte e insípido, presente en forma molecular (N₂), constituyendo más del 78% de la atmósfera y encontrándose en gran cantidad en rocas ígneas en la corteza terrestre; sin embargo, este N no se encuentra disponible para las plantas en el mediano plazo (Perdomo *et al.*, 2006).

El número atómico del N es 7, su masa atómica es de 14.0067 g mol⁻¹ y entre sus principales usos destaca el industrial como refrigerante, en el área agrícola como fertilizante y en la investigación como criogénico (Chag y Goldsby, 2013).

Para las plantas son imprescindibles 17 elementos minerales, de estos elementos esenciales seis se requieren en mayor cantidad; y entre estos últimos se encuentra el N, el cual ocupa una posición única entre los elementos minerales, ya que forma parte de diferentes compuestos orgánicos y estructuras en las células vegetales (Rehman *et al.*, 2014).

1.2.2 FORMAS DEL N EN EL SUELO

En el suelo, el N se encuentra disponible en cantidades reducidas para ser utilizado por las plantas (Zhao *et al.*, 2013; Yaroshevsky, 2006). Esto es debido a su forma molecular N≡N, que tiene gran estabilidad dada por el triple enlace y bajo esta forma las plantas son incapaces de asimilarlo directamente (Perdomo *et al.*, 2006). Este elemento es, por

lo tanto, el que más limita la productividad de los cultivos agrícolas y se puede encontrar en la solución del suelo como N orgánico y como N inorgánico (Cuxim, 2012; Owen y Jones, 2001). Es en el ciclo del N (Figura 1.2) donde se representan todas las transformaciones que sufre este elemento.

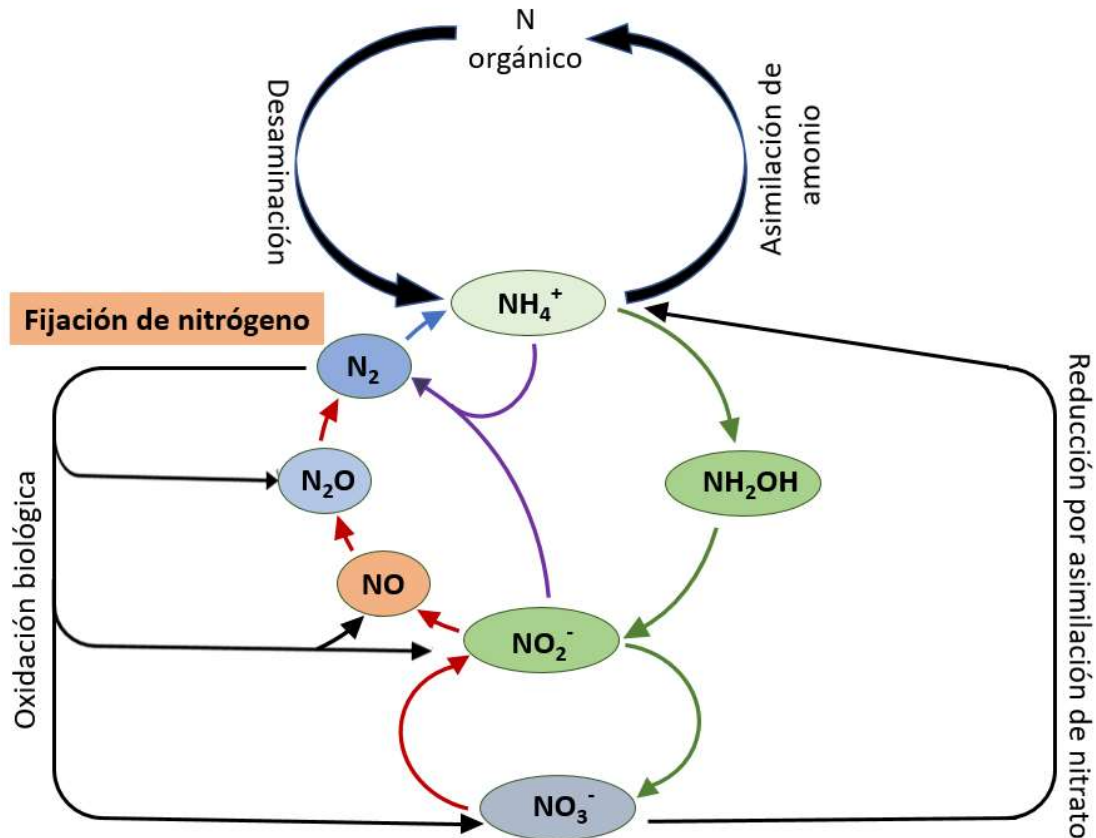


Figura 1.2 El ciclo del N en la atmósfera. Los compuestos orgánicos de N, que constituyen a todos los organismos vivos, son liberados al medio ambiente por la muerte y la descomposición o son excretados como desechos por algunos animales. Los microorganismos desaminan el N orgánico, utilizando el carbono como fuente de alimento y liberando amonio en el proceso. Las plantas y microorganismos pueden absorber al nitrato y reducirlo a amonio para su posterior asimilación en compuestos orgánicos que contienen N. Muchos procesos biológicos que cambian el estado de oxidación del N son catalizados exclusivamente por procariontas. Estos incluyen la nitrificación (flechas verdes; NH_4^+ o NO_2^- , son oxidados y la energía liberada es utilizada para fijar carbono inorgánico), la denitrificación (flechas rojas; el N sirve como aceptor de electrones y se reduce durante la respiración anaeróbica), la oxidación anaeróbica del ión amonio (flecha púrpura; la producción anaeróbica de N molecular a partir de NH_4^+ y NO_2^-) y la fijación de N [flecha azul; gas N (N_2) se reduce a NH_4^+] (modificado de Buchanan *et al.*, 2015).

A través de procesos tanto físicos como químicos en el ambiente, es donde la integración de una serie de interacciones de factores bióticos y abióticos, hace que la fuente de N tenga la transformación necesaria para ser utilizado por los diferentes organismos (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Principales procesos del ciclo del nitrógeno (Perdomo *et al.*, 2006).

Proceso	Definición
Fijación atmosférica	Conversión fotoquímica de nitrógeno molecular a amonio
Fijación biológica	Conversión procariótica de nitrógeno molecular a nitrato
Inmovilización	Absorción microbiana y asimilación del amonio o nitrato
Amonificación	Catabolismo de la materia orgánica del suelo a amonio (por bacterias y hongos)
Nitrificación	Oxidación del amonio a nitrato (<i>Nitrosomas sp.</i>) y oxidación de nitrito a nitrato (<i>Nitrobacter sp.</i>)
Fijación de amonio	Fijación física de amonio en las partículas del suelo
Mineralización	Catabolismo de la materia orgánica del suelo a nitrógeno mineral a través de la amonificación o nitrificación (acción por bacterias y hongos)
Volatilización	Pérdida física de amoniaco gaseoso a la atmósfera
Denitrificación	Conversión del nitrato a nitrógeno molecular (por bacterias)
Lixiviación del nitrato	Flujo físico de nitrato disuelto en el agua del suelo
Absorción por plantas	Absorción y asimilación del nitrato o del amonio por las plantas

La materia orgánica, en forma de N orgánico, es una de las reservas más grandes de N en el suelo, ya que puede alcanzar hasta un 98% de compuestos orgánicos, como lo son

las proteínas, los aminoácidos y los azúcares aminados (Cuxim, 2012; Stevenson, 1982).

El N presente en el suelo bajo formas orgánicas, tampoco está disponible como tal para las plantas, sino que para poder ser absorbido, tiene que convertirse a formas inorgánicas (Perdomo *et al.*, 2006). Estas formas inorgánicas como lo son el nitrato, el amonio y el nitrito son transitorias en el suelo, formando parte entre 2 y 3% del N total (Marschner, 2002). Generalmente, los cultivos requieren de la toma de ambas fuentes inorgánicas de N, donde se ha evidenciado que las concentraciones en el suelo varían entre sí (Hakeem *et al.*, 2014), pudiendo existir desde unos pocos gramos hasta más de 100 kg ha⁻¹ de N total. Por lo general, en los suelos agrícolas las concentraciones de nitrato se encuentran en un rango entre 1 y 5 mM, mientras que las concentraciones de amonio se pueden encontrar en un rango entre 20 y 200 µM. Debido a que ésta es la forma en que el N es absorbido por las plantas, el N inorgánico es muy importante para la nutrición vegetal (Perdomo *et al.*, 2006).

El N es un componente importante de diferentes compuestos orgánicos y estructuras en las células, ya que tiene un papel relevante en la transferencia de energía, al ser parte de compuestos como el adenosín trifosfato (ATP) que es responsable de la conservación y el uso de la energía durante el metabolismo de las células (Hakeem *et al.*, 2014). También, constituye compuestos vitales como aminoácidos, proteínas, enzimas, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, hormonas, alcaloides, algunos metabolitos secundarios, pigmentos, antibióticos, así como también forma parte de las paredes celulares y de la clorofila en los cultivos vegetales (Perdomo *et al.*, 2006).

1.2.3 EFECTOS DEL N EN LAS PLANTAS

La deficiencia de N causa efectos significativos en las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), la piruvato fosfato dicinasa (PPDK) y la ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo), que provocan la disminución en el nivel de sus respectivos mRNAs en los tejidos fotosintéticos (Hakeem *et al.*, 2014; Khamis *et al.*, 1990).

En la productividad agrícola, el N influye tanto en el rendimiento como en la calidad de los cultivos, ya que la deficiencia de este importante elemento produce clorosis y por ende, baja tasa fotosintética que provoca bajos rendimientos productivos (Hakeem *et al.*,

2014; Khamis *et al.*, 1990). De igual forma, el N debe cumplir con dos condiciones para que pueda ser utilizado por las plantas: 1) debe estar en una forma disponible en la solución del suelo y 2) debe encontrarse en una forma que pueda ser asimilable para la planta. Es de ésta última forma en la que se encuentra en menor proporción (Molina, 2001). De manera natural el N del aire puede llegar a estar disponible para las plantas a través de dos mecanismos principales: ya sea por fijación simbiótica o asimbiótica, en donde ambos procesos son llevados a cabo por las bacterias del suelo, ó disuelto en el agua de lluvia, siendo el proceso de fijación simbiótica el que más N disponible aporta para las plantas (Perdomo *et al.*, 2006).

1.2.4 ABSORCIÓN DEL N POR LAS PLANTAS

Son el nitrato y el amonio las dos principales fuentes de N inorgánico que la planta absorbe del suelo, donde la disposición de una o de otra depende del pH de la solución. Por ejemplo, el amonio predomina en suelos con pH entre 4.0 y 6.0 y la fuente de nitrato predomina en suelos con pH entre 6.0 y 8 (Zhao *et al.*, 2013; McGrath y Rorison, 1982). La manera en que las plantas sensan el N varía dependiendo de la disponibilidad y la localización de este elemento en la solución (Hakeem *et al.*, 2014).

La primera fuente de N preferida por la mayoría de los cultivos es el nitrato, el cual es transportado desde el suelo a través de la membrana plasmática por medio de las células epidérmicas y corticales de la raíz (Hakeem *et al.*, 2014; Miller y Cramer 2004).

La toma de ambas fuentes nitrogenadas ya sea nitrato ó amonio se encuentran bajo estricto control genético, ya que es por medio de transportadores de baja o alta afinidad que los iones de ambas fuentes nitrogenadas son acarreados a través de la membrana plasmática de las células de la raíz de las plantas. La activación de dichos transportadores depende de la concentración de la fuente nitrogenada (Figura 1.3), donde se activan los transportadores de alta afinidad cuando dicha concentración se encuentra a niveles bajos en el medio de crecimiento o los de baja afinidad cuando la concentración es alta (Mitra, 2015b).

1.2.5 TRANSPORTE DEL N A NIVEL CELULAR

Para la toma tanto de nitrato como de amonio las células de las plantas usan sistemas de transportes específicos. Por ejemplo, para la asimilación de amonio existen dos sistemas: de baja y de alta afinidad. Para el caso del sistema de alta afinidad involucra transportadores de la familia AMT/Rh, que para el caso de *Arabidopsis* existen seis genes *AMT*, que van de *AMT1;1-5* y *AMT2;1*, todos ubicados en el área radicular (Buchanan *et al.*, 2015; Mitra, 2015a). Los transportadores AMT para NH_4^+ funcionan como uniporte (en un solo sentido) (Buchanan *et al.*, 2015). Las proteínas involucradas en el sistema de baja afinidad aún no han sido dilucidadas, pero algunos estudios señalan que los canales de potasio, canales catiónicos no selectivos o aquaporinas podrían dirigir este tipo de transporte para la fuente de amonio a nivel celular (Mitra, 2015b).

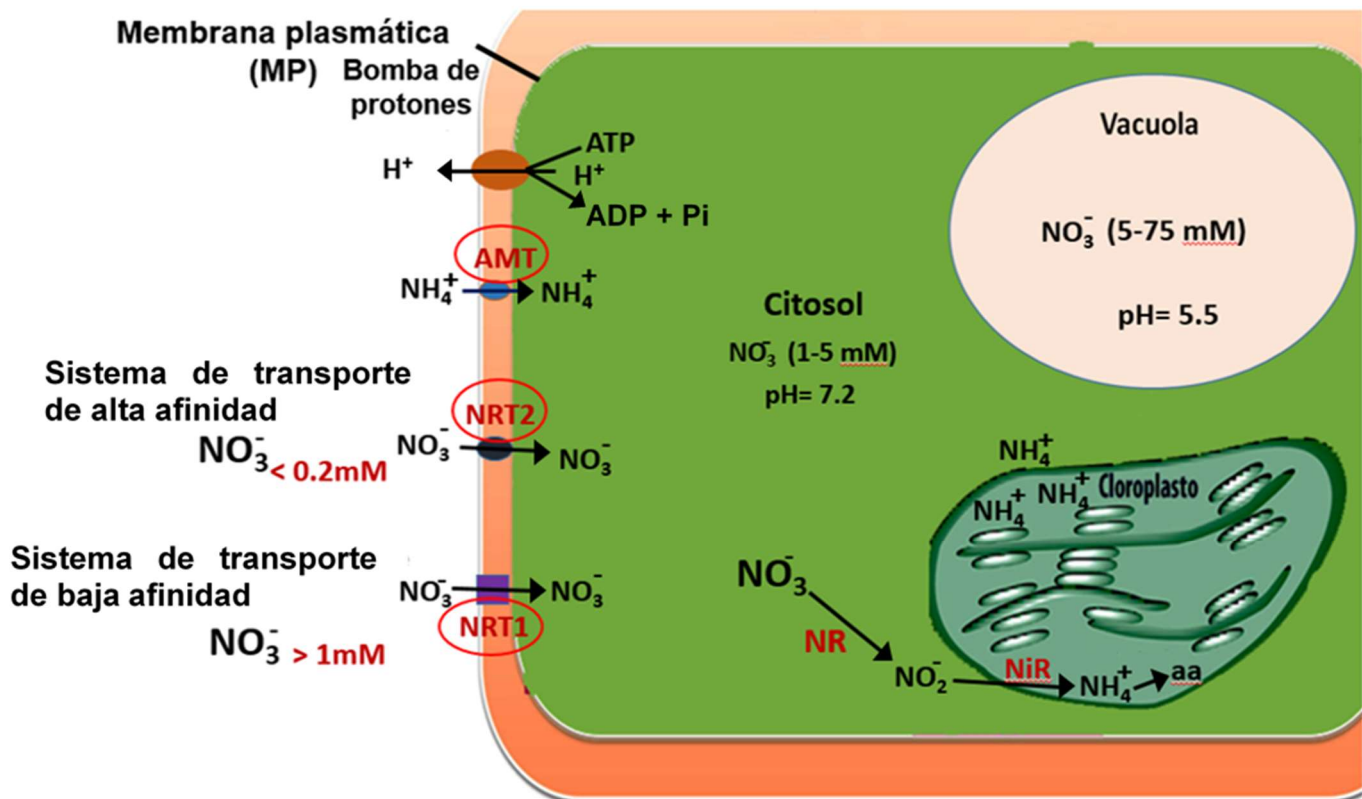


Figura 1.3 Sistema de transporte del N a nivel celular. El sistema de transporte de alta afinidad (HAST) y de baja afinidad (LAST) de NO_3^- y NH_4^+ a través de la membrana plasmática (MP) y reducción del NO_3^- a NO_2^- en el citosol y de NO_2^- a NH_4^+ en el cloroplasto de la célula vegetal. La concentración de NO_3^- en el citosol es de 1 a 5 mM y en la vacuola de 5 a 75 mM. El pH del citosol es de 7.2 y de la vacuola de 5.5 (modificado de Mitra, 2015b).

Los transportadores AMT en plantas son regulados a nivel transcripcional y postraducciona, donde los niveles de transcritos para *AMT1;1-3* y *1;5* son regulados positivamente en condiciones deficientes de N, y las proteínas AMT1.1 y AMT1.2 son reguladas por transactivación alostérica. Además, el potencial de membrana es una fuerza que impulsa la absorción de amonio por alta afinidad a través de la membrana plasmática mediada por los transportadores AMT, mientras que la acidificación de la vacuola podría ser el principal factor de acumulación de amonio en este organelo (Buchanan *et al.*, 2015).

Por otro lado, se sabe que el nitrato es la fuente de N que se encuentra en mayor cantidad en el suelo, pero el proceso de toma y asimilación por parte de las plantas tiene un costo energético. El nitrato puede ser tomado tanto por la parte radical como por la parte foliar de las plantas, este último siendo importante durante las aplicaciones foliares de fertilizantes a los cultivos agrícolas (Buchanan *et al.*, 2015; Maldonado, 2005).

El transporte de nitrato en plantas funciona como simporte o antiporte; donde existen dos tipos de simporte, mediado por los transportadores NRT1 y NRT2, y un tipo de antiporte, mediado por CLC, este último actúa en el tonoplasto (Buchanan *et al.*, 2015).

Las plantas utilizan dos sistemas de toma de nitrato: el de baja afinidad con una K_m de 5 mM y el de alta afinidad con una K_m de 50 μ M. Ambos casos están mediados por el gradiente generado por H^+ -ATPasa como una fuerza motriz de importación de nitrato al interior de la célula (Buchanan *et al.*, 2015; Mitra, 2015a).

En *Arabidopsis* se ha evidenciado que para la familia de transportadores NRT1 existen el AtNRT1.1 y el AtNRT1.2 y de manera similar la familia de NRT2 se presentan cuatro transportadores diferentes (AtNRT2.1, AtNRT2.2, AtNRT2.4 y AtNRT2.5), los cuales son asistidos por la proteína NAR2 (AtNAR2.1) todos para la toma de nitrato y que están localizados en la membrana plasmática (Buchanan *et al.*, 2015; Chopin *et al.*, 2007; Okamoto *et al.*, 2006). Estos son los transportadores que se sugieren median la toma de nitrato desde la solución del suelo hacia las raíces; sin embargo, existe un mayor número de transportadores pertenecientes a ambas familias, los cuales se conoce que llevan a cabo esta función en otras partes de la planta, e incluso para los NRT1, la gran mayoría de sus miembros no han sido caracterizados.

De manera más específica, los transportadores AtNRT1.2 y AtNRT2.1 son inducibles por nitrato. Para el caso de AtNRT1.1 es un transportador que se involucra en la toma de nitrato tanto para baja como alta afinidad (Li *et al.*, 2007), el cual es regulado por la fosforilación y la desfosforilación del residuo 101 de treonina, de modo que funciona como transportador de alta afinidad cuando la T101 es fosfoforilada, mientras que la forma desfosforilada es un transportador de baja afinidad para nitrato. Este cambio de fosforilación es dirigido por cambios por la disponibilidad externa de nitrato; esto permite que la función de los transportadores se adapte a los niveles disponibles en el entorno de la raíz (Buchanan *et al.*, 2015).

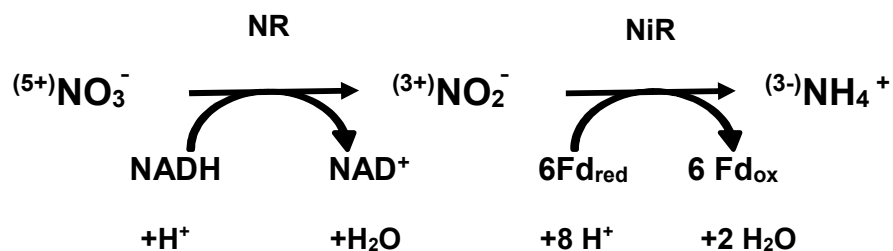
Como se muestra en la Figura 1.3 el sistema de transporte de baja afinidad (LATS, por sus siglas en inglés) se activa cuando la concentración externa de nitrato se encuentra entre 1-50 mM. Caso contrario, cuando la concentración externa de nitrato no supera la concentración de 0.2 mM se activa el sistema de transporte de alta afinidad (HATS por sus siglas en inglés), donde puede operar de forma constitutiva (cHATS) o de forma inducida (iHATS), por el nitrato presente (Mitra, 2015a). Por medio de todo este sistema mencionado anteriormente es que las plantas pueden absorber este mineral imprescindible, involucrado en diversos procesos para su óptimo desarrollo. Se ha evidenciado que las plantas contienen entre 1 y 6% de N en su peso total. En condiciones de disponibilidad de suficiente nitrato en el suelo, la concentración de este en las raíces y los brotes es de aproximadamente 100 mM, donde la mayoría se almacenan en la vacuola (Figura 1.3) (Mitra, 2015a; Crawford y Glass 1998).

1.2.5.1 ENZIMA NITRATO REDUCTASA

La enzima nitrato reductasa (NR) dependiente de NADH/NADPH (EC 1.7.1.1/2/3) cataliza la reducción de nitrato a nitrito utilizando a NADH/NADPH como donadores de electrones y es el primer paso en la vía de asimilación desde nitrógeno hasta compuestos orgánicos (Nemie-Feyissa *et al.*, 2013). Ya que el nitrato por sí mismo no puede ser incorporado a la célula, éste debe ser reducido a amonio en un proceso que involucra dos pasos. El nitrato es primero reducido a nitrito por la acción de la enzima NR, el cual es reducido a amonio por la enzima nitrito reductasa (NiR). Esta reacción involucra a la enzima ferredoxina reducida (Fdx_{red}), donde el resultado final es la asimilación de amonio como aminoácidos que también consume carbono orgánico. Las

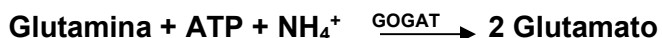
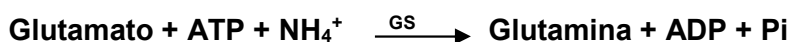
plantas reducen nitrato y nitrito tanto en raíces como en su parte aérea (Buchanan *et al.*, 2015).

A continuación, se presenta la reacción que describe la reducción de nitrato a amonio por la acción de las enzimas NR y NiR.



La ferredoxina reducida (Fd_{red}) o ferredoxina oxidada (Fd_{ox}) deriva del transporte de electrones de la fotosíntesis en los cloroplastos y el NADPH generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfatos en los tejidos no fotosintéticos (Pereyra-Cardoso, 2001).

Por lo general, el NH_4^+ en las plantas es formado después de la reducción del NO_3^- que es tomado del suelo, donde el NH_4^+ se requiere para ser asimilado para la síntesis de aminoácidos y se involucran dos enzimas más: la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT), donde la GS cataliza el primer paso de la asimilación de glutamato para la síntesis de glutamina; y la GOGAT cataliza la síntesis de dos moléculas de glutamato (Hakeem *et al.*, 2014; Suzuki y Knaff, 2005).



La enzima NR es un homodímero compuesto de dos subunidades idénticas de aproximadamente 100 kDa, cada subunidad contenida en tres grupos prostéticos, los cuales son: un equivalente de flavina adenina dinucleótido (FAD), hemo-Fe y un complejo de molibdeno (Mo). El Mo está unido a la enzima por un complejo orgánico llamado pterina formando el Mo-molibdoterina (Mo-MPT). En consecuencia, como se

muestra en la Figura 1.4, la enzima contiene tres cofactores internos: FAD, heme y dos iones metálicos: Fe y Mo en cada subunidad (Buchanan *et al.*, 2015).

La NR es una enzima soluble, que en plantas se puede encontrar en el citosol de las células de la epidermis de la raíz, en células corticales y en células de mesófilo de brotes (Hakeem *et al.*, 2014), y la cantidad total de esta enzima depende simultáneamente de su síntesis y su degradación (Buchanan, 2015).

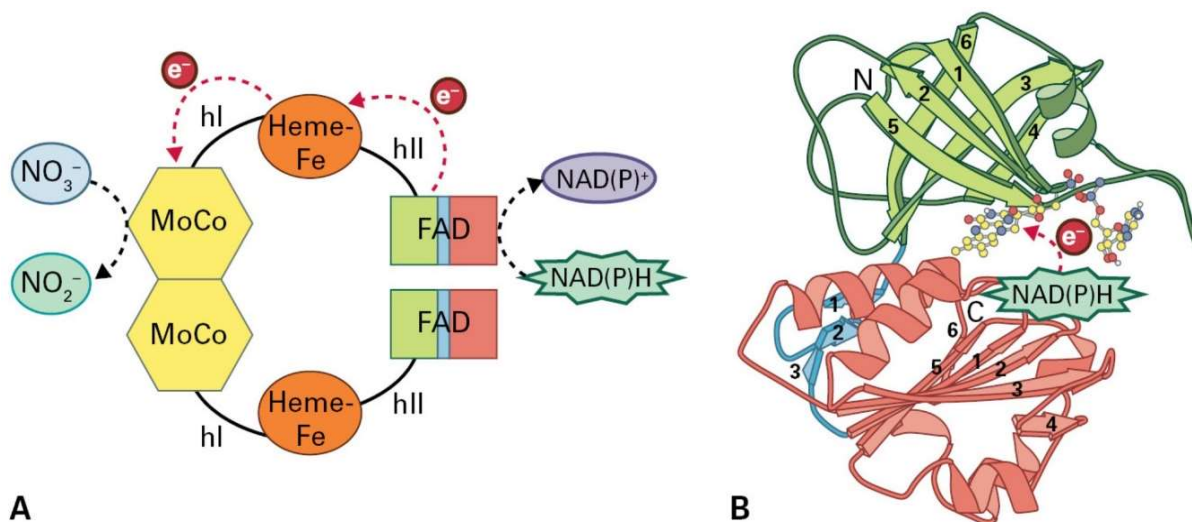


Figura 1.4 Estructura de la enzima nitrato reductasa. **(A)** Un monómero de NR tiene tres dominios principales que se unen al cofactor molibdeno (MoCo), heme y FAD, respectivamente. La región de unión a FAD recibe electrones de NAD(P)H, y la región de unión a MoCo recibe los electrones de lanzadera de dominio heme, que transfiere electrones a nitrato. Hinge 1 y 2 (hl y hll) separan los dominios funcionales. Estructura cristalina del dominio de unión a FAD de NR. **(B)** El lóbulo C-terminal está unido a FAD, mientras que el lóbulo N-terminal se une a NAD(P)H (tomado de Buchanan *et al.*, 2015).

En las células vegetales la reducción de nitrato ocurre en el citosol, donde se ha evidenciado su presencia tanto en raíces como en la parte aérea de las plantas y su distribución depende de las condiciones ambientales (Buchanan *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el proceso fotosintético es necesario para la activación de esta enzima, ya que se ha reportado que la disponibilidad del oxígeno y el nivel de luz son factores externos de rápida y reversible modulación de la NR, y el consumo de azúcares en la parte foliar de las plantas en la oscuridad la activa. Por otra parte, existen evidencias que en las raíces que sufren una súbita anoxia la enzima es modulada rápidamente mediante mecanismos que implican la fosforilación de la proteína NR o la

unión de Mg^{2+} u otro catión divalente, obteniéndose una respuesta de su actividad en minutos (Hakeem *et al.*, 2014).

Como estrategia alternativa, cuando las plantas presentan deficiencias de N, al ser un elemento móvil, puede tomarse de hojas viejas y translocarse a hojas jóvenes para así poder sostener su desarrollo y crecimiento, y este proceso no sólo puede darse en la etapa vegetativa del cultivo, sino también en la etapa reproductiva, donde el N puede pasar desde las hojas hacia el sumidero (Fan *et al.*, 2009; Schiltz *et al.*, 2005; Rossato *et al.*, 2001; Wendler *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 1983). Diversos estudios sobre la removilización del N demuestran que está asociado con la proteólisis y la senescencia del órgano fuente y esa fuente de N desde otros sitios está conformado de aminoácidos que fueron sintetizados en la fase vegetativa de la misma planta (Fan *et al.*, 2009; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008; Jukanti y Fischer, 2008; Good *et al.*, 2004; Hortensteiner y Feller, 2002).

Por lo general, en plantas superiores son los aminoácidos asparagina (Asn) y glutamina (Gln) los compuestos nitrogenados exportados por los tejidos senescentes. Además, el nitrato como N inorgánico también puede ser traslocado hacia diferentes órganos de la planta (Fan *et al.*, 2009; Caputo y Barneix, 1997; Rochat y Boutin, 1991).

1.2.6 LA ACIDEZ DEL SUELO Y LAS FUENTES NITROGENADAS

Los iones ácidos que se liberan de la descomposición de la materia orgánica favorecen la condición ácida de los suelos. Residuos vegetales y de animales depositados en el suelo llegan a formar compuestos ácidos, condición comúnmente encontrada en suelos cafetaleros, donde existen altos volúmenes de materia orgánica en constante descomposición. Además, el cultivo intensivo de los suelos causa remoción de nutrimentos importantes para el mantenimiento del equilibrio y de las buenas condiciones del mismo, tal es el caso del calcio, magnesio y potasio, a través de la cosecha constante. Las plantas por sí mismas también contribuyen a incrementar la acidez de los suelos, ya que al absorber cationes liberan iones hidrógeno para mantener el equilibrio en su interior, lo que favorece a la reducción de pH en el suelo (Molina, 2001).

En el suelo, por ejemplo, el amonio y el nitrato son las formas más comúnmente tomadas por las raíces de las plantas, donde el amonio es convertido a nitrito y nitrato por las bacterias nitrificadoras del suelo, conocidas como *Nitrosomas* sp y *Nitrobacter* sp respectivamente, donde las plantas son las más beneficiadas en este tipo de transformación (Rosas et al., 2015). Debido a esta condición de suelo, las plantas han debido ajustar sus mecanismos para regular el flujo de nitrato y amonio como fuente nitrogenada (Glass et al., 2002).

En condiciones ácidas la supervivencia de las plantas se convierte en un factor crítico por la presencia de amonio, el cual es la fuente de N predominante, de donde se da el proceso de nitrificación (Zhao et al., 2008; Watanabe et al., 1998). La oxidación microbiológica de amonio a nitrato no se lleva a cabo en suelos ácidos, lo que hace que las concentraciones de nitrato sean bajas y por lo tanto sea necesario realizar enmiendas agrícolas para mejorar tanto la disponibilidad de esta fuente nitrogenada como la condición de pH (Zhao et al., 2008; Do Boer y Kowalchuk, 2001).

Por lo tanto, en los suelos ácidos no predomina únicamente el Al, sino también el amonio, y en suelos neutros y calcáreos, aunque no se presentan concentraciones tóxicas de Al, se presentan concentraciones considerables de nitrato (Zhao et al., 2008; Rorison 1985).

1.3 INTERACCIÓN ALUMINIO – FUENTE DE NITRÓGENO

Existe poca información acerca de la interacción Al-N en suelos ácidos, ya que se ha asumido que la solución nutritiva en el suelo está formada mayoritariamente por nitrato y no por amonio como fuente nitrogenada cuando se ha estudiado la toxicidad por el Al en las plantas. Por lo tanto, el papel que juega el Al en el desarrollo de las plantas no ha sido evaluado de forma directa con las condiciones reales de las fuentes nitrogenadas inorgánicas en suelos ácidos (Zhao et al., 2008).

Se han realizado estudios en varios cultivos para analizar el efecto del Al en el crecimiento, utilizando tanto NH_4^+ como NO_3^- como fuente de N total, pero las respuestas han sido variadas. El estudio presentado por Taylor y Foy (1985) citado por Zhao (et al., 2008), demostraron que a pesar de que el cultivo de trigo es tolerante al Al existe un cultivar que no demostró tener esta tolerancia, ya que su interacción con el NH_4^+ fue

negativa, pero demostró ser tolerante en presencia de NO_3^- . Los mismos autores sugieren que la preferencia por la fuente nitrogenada es la que determina las diferencias del pH y por lo tanto la solubilidad del Al en la solución del suelo.

También, Zhao *et al.*, (2013) reportaron que, para el caso del cultivo del arroz anegado, la fuente de N por preferencia es el amonio, evidenciando una respuesta positiva del cultivo bajo condiciones ácidas de sustrato y, bajo condiciones tóxicas de Al^{3+} , la fuente nitrogenada que favorece la tolerancia es el amonio, ya que se genera un efecto sinérgico en el desarrollo del cultivo, no así cuando la fuente nitrogenada fue el nitrato, donde más bien su respuesta es antagónica.

Existen estudios sobre la respuesta de las plantas a las diferentes fuentes nitrogenadas disponibles en el suelo, pero la utilidad del N y las condiciones que provocan la toxicidad por Al^{3+} son estudiadas por separado (Zhao *et al.*, 2013). Ya que se ha comprobado la asociación en paralelo del Al y las formas inorgánicas de N con el pH es necesario estudiar este mecanismo, donde las plantas han tenido que desarrollarlo bajo estas condiciones, probablemente como resultado a la adaptación ecológica y a la selección natural, como sucede en el cultivo de cafeto.

1.4 EL CULTIVO DE CAFETO

El cafeto es, de los productos agrícolas, el más importante tanto en el mercado nacional como internacional, ya que representa una fuente de ingresos para millones de personas productoras de Asia, África y Latinoamérica (Escalante, 2012).

Este cultivo es originario de África Oriental, de la parte alta (superior a 1000 msnm) (León, 2000). Actualmente se conocen más de 70 especies de cafeto, siendo las de más importancia económica las variedades *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre, de las cuales *C. arabica* se produce en alrededor del 70% y de *C. canephora* (conocida también como robusta) el restante 30%. Existen otras especies como *C. congensis*, *C. dewevrei* y *C. recemosa*, ya que por su resistencia a pesticidas y enfermedades están cobrando interés para su uso en programas de mejoramiento genético (Eira *et al.*, 2006).

1.4.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Como se indica en el cuadro 1.3, el cafeto pertenece al género *Coffea*, donde varios autores han determinado diversas especies. Se han incluido entre 60 a 100 especies

que los agrupan en cuatro secciones o sub-secciones: *Eucoffea*, *Mascoffea*, *Paracoffea* y *Argoffea*.

Como lo indican Alvarado-Soto y Rojas-Cubero (2011) el subgénero más utilizado es el *Eucaffea*, donde se encuentran las dos especies más cultivadas comercialmente: *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre (Escalante, 2012).

1.4.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La planta de cafeto es un arbusto que puede llegar a medir hasta siete metros de altura, de forma cónica e irregular, que bajo condiciones normales se desarrolla con un solo eje central, con una parte meristemática en su extremo de crecimiento permanente que forma nudos y entrenudos. Su sistema radical cuenta con una raíz principal o pivotante, que a partir de ésta se desarrollan de cuatro a ocho raíces axilares y numerosas ramificaciones laterales (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 2011).

En su parte aérea presenta dos tipos de crecimiento, puede ser vertical u ortotrópico, donde lo caracteriza su tallo central con pocas ramificaciones laterales; ó lateral o plagiotrópico, donde posee sus ramas primarias, que pueden originar ramas secundarias y terciarias. Estas son de suma importancia, ya que contienen el fructificación del cafeto. La morfología de las hojas es elíptica, oblongas o lanceoladas, situadas en el mismo plano, de crecimiento opuesto, de color verde oscuro en el haz y un verde más pálido en el envés (Escalante, 2012; Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 2011).

Las flores brotan de los entrenudos de las ramas. Son individuales, completas, hermafroditas y autógamas, de color blanco, con inflorescencia conocida como cima (Ramírez, 2009). Su fruto es una baya conocida como “cereza”, ligeramente aplanada, de forma elíptica, cuyos tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, y de 8 a 14 mm de ancho y con un espesor de aproximadamente 10 mm (Serrano, 2013). Es de superficie lisa y brillante, de pulpa delgada, con tres partes: el epicarpio o epidermis, el mesocarpio o pulpa y el endospermo o semilla. Cuando ésta llega a su maduración puede ser de color rojo o amarillo, dependiendo del cultivar (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 2011).

Cuadro 1.3 Taxonomía del cultivo del café según Calderón y Guambi (2014).

Taxonomía del cafeto	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Súper división	<i>Spermatophita</i>
División	<i>Magnoliophita</i>
Clase	<i>Magnoliophita</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie	<i>Coffea arabica</i>
Nombre científico	<i>Coffea arabica</i> L

En la Figura 1.5 se presenta la morfología de la parte aérea y el desarrollo óptimo de la planta de cafeto (*Coffea arabica*).

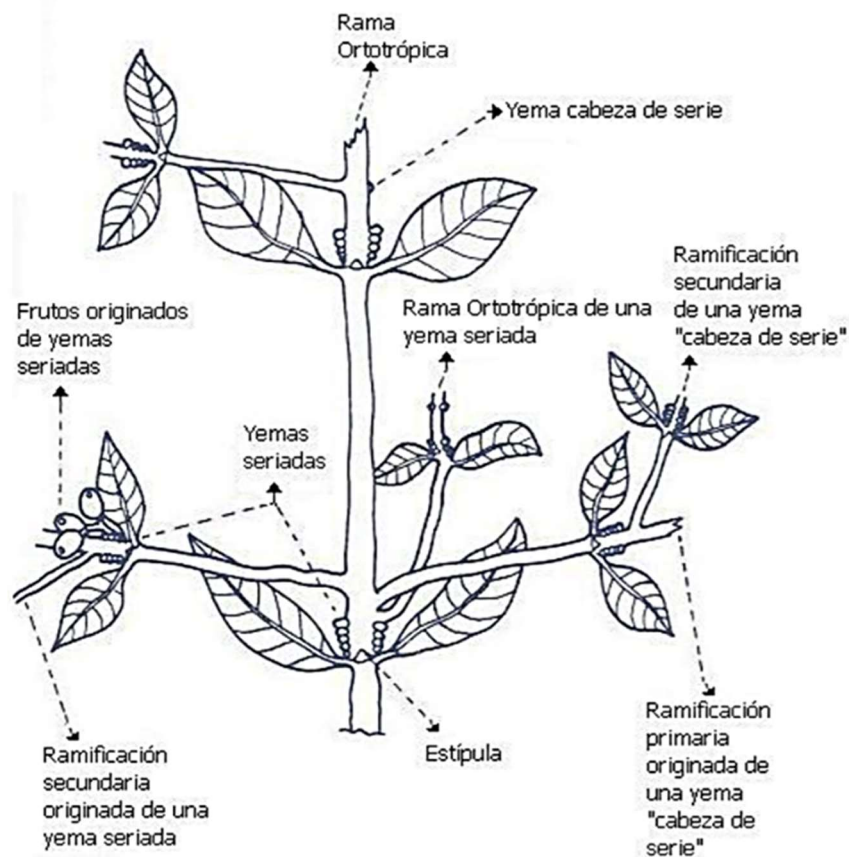


Figura 1.5 Representación esquemática del desarrollo del cafeto (*Coffea arabica*). (Cleves, 2008).

1.4.3 PRODUCCIÓN DEL CULTIVO DE CAFETO EN MÉXICO

El cafeto se introdujo al país en el año 1796 en la región de Córdoba, Veracruz, y hoy en día se ha extendido a todo el territorio nacional, siendo 11 estados los de mayor producción. Estos estados se agrupan en cuatro grandes regiones como son:

- a. Vertiente del Golfo: comprendido por San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, México y Veracruz.
- b. Vertiente del Océano Pacífico: comprendido por Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit y parte de Oaxaca.
- c. Región Soconusco: conformada por gran parte de Chiapas. Aquí es donde se produce la mayor cantidad de café orgánico de exportación.
- d. Región Centro Norte de Chiapas.

Para el caso de la producción mexicana de cafeto, este cultivo se desarrolla principalmente en suelos ácidos, por sus requerimientos de condiciones agroecológicas, donde el pH del suelo fluctúa entre 4.5 y 5.5 (Bojórquez, 2010; Castillo *et al.*, 1996).

En el Cuadro 1.4 se especifica la producción de café cereza en toneladas, por su rendimiento por hectárea, así como su valor en moneda local al año 2014.

Cuadro 1.4 Producción agrícola de café cereza por estado. Anuario estadístico de la producción agrícola-SIAP, 2014.

Entidad	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor de producción (miles de pesos)
Chiapas	532,582.79	2.09	3,481,899,684.22
Veracruz	369,455.21	2.65	2,584,749,838.42
Puebla	202,947.48	3.43	1,564,469,924.11
Oaxaca	117,439.81	0.94	440,579,491.44
Resto del país	114,500.00	0.88	578,053,177.54
Total Nacional	1,336,882.11	1.92	8,647,580,349.05

El café por lo general se desarrolla en suelos con altos contenidos de materia orgánica, bajo éstas condiciones el Al se vuelve tóxico por la acidez presente (Martínez-Estevez *et al.*, 2001). Al ser uno de los cultivos con mayor impacto económico en el mundo, es relevante conocer los factores que afectan su desarrollo y productividad. Las plantaciones de café por lo general se desarrollan en suelos de condiciones ácidas, donde altos contenidos de Al tóxico como el $Al(OH)_3$ están presentes. El Al disponible en la solución del suelo, y por ende tóxico, es un grave problema para los países productores de café (Martínez-Estévez *et al.*, 2001; Pavan *et al.*, 1982).

Con base a lo mencionado es pertinente realizar más estudios acerca de la fuente nitrogenada presente en el suelo y la interacción que existe con el Al a pH menores a 5.5, así como la repercusión en el desarrollo del cultivo del café que se produce bajo estas condiciones.

1.5 MODELO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este proyecto de investigación se utilizó como modelo experimental suspensiones celulares de *C. arabica* L. var. Catuaí de la línea L2, provenientes de callos disgregados que fueron obtenidos de hojas cotiledonares de plántulas de *C. arabica* L. germinadas *in vitro* (Martínez-Estévez *et al.*, 2003), los cuales son transferidos a medio líquido para su disgregación y de esta forma obtener las células en suspensión.

El establecimiento de las condiciones óptimas para poder llevar a cabo el estudio de la toxicidad por aluminio en el modelo de las células en suspensión de *C. arabica* L. se realizó por Martínez-Estévez y colaboradores (2001), quienes modificaron la composición del medio de cultivo de una línea de células en suspensión de *C. arabica*, disminuyendo la concentración del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962) a la mitad de la fuerza iónica a pH 4.3; de esta forma las condiciones se asemejan a las condiciones de toxicidad presentes en suelos.

Se ha observado, en trabajos previos, que el Al inhibe el crecimiento de esta línea celular en comparación con las células control (Martínez-Estévez *et al.*, 2003) y que este efecto ha sido relacionado con la inhibición de la actividad de la enzima fosfolipasa C (PLC), con la inhibición de la formación de segundos mensajeros como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG) (Chee-González, 2009; Martínez-Estévez *et al.*, 2003), así como la inhibición en la formación de ácido fosfatídico (PA) proveniente de la vía PLC (Ramos-Díaz *et al.*, 2007) en presencia de este metal. También, en el grupo de trabajo se ha analizado la actividad enzimática total de la superóxido dismutasa (SOD) en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. tratadas con AlCl₃ a diferentes tiempos de exposición, así como los niveles de H₂O₂ excretados por las células (Esquivel-Hernández, 2016; Ramírez-Benítez *et al.*, 2011) y la actividad de la cafeína sintasa en el mismo modelo de estudio en tratamientos con AlCl₃ y en condiciones de luz (Pech-Kú, 2016).

Actualmente existen pocos estudios sobre la relación que existe entre la fuente de N y el Al en cultivos de importancia agrícola y no se cuenta con antecedentes sobre la relación que puede existir entre la fuente nitrogenada y la toxicidad por Al en suspensiones celulares de manera conjunta, por ello es importante evaluar si la fuente de nitrógeno tiene un efecto en la toxicidad por Al en el crecimiento de suspensiones celulares de *C.*

arabica L., en el contenido de Al total y libre, así como en su perfil proteico, en la localización intracelular del Al^{3+} y el contenido de NO_3^- en los extractos celulares expuestos o no a $AlCl_3$.

1.6 JUSTIFICACIÓN

Conociendo la problemática que existe con la acidez de los suelos y la toxicidad por Al^{3+} , que resulta en la disminución de la productividad del cultivo de cafeto, así como los antecedentes sobre los efectos a nivel celular ante estas condiciones en el modelo de suspensiones celulares de *C. arabica* L., es posible determinar si la fuente de N afecta la toxicidad por Al, teniendo en cuenta que la toma por parte de las células de las fuentes de N contenidas en el medio varía el pH de la solución en la que se encuentre y por ende la presencia de Al^{3+} en las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

1.7 HIPÓTESIS

La fuente de N afecta la toxicidad por Al en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

1.8 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la fuente nitrogenada en la toxicidad por Al en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

1.8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. con diferentes fuentes de N.
2. Evaluar el efecto de las diferentes fuentes de N en la toxicidad por Al en dos etapas del ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L.
3. Evaluar el efecto de la fuente nitrogenada en la concentración de Al libre y Al total en suspensiones celulares de *C. arabica* L. tratadas con $AlCl_3$.
4. Estudiar la localización del Al^{3+} a nivel celular en suspensiones celulares de *C. arabica* L. crecidas con la fuente nitrogenada y tratadas con $AlCl_3$.
5. Determinar el efecto de la fuente nitrogenada sobre el perfil proteico de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. tratadas o no con $AlCl_3$.

6. Evaluar el efecto de la fuente nitrogenada sobre el contenido de NO_3^- en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. tratadas o no con AlCl_3 .

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se siguió en el presente trabajo de investigación se representa en la figura 1.6.

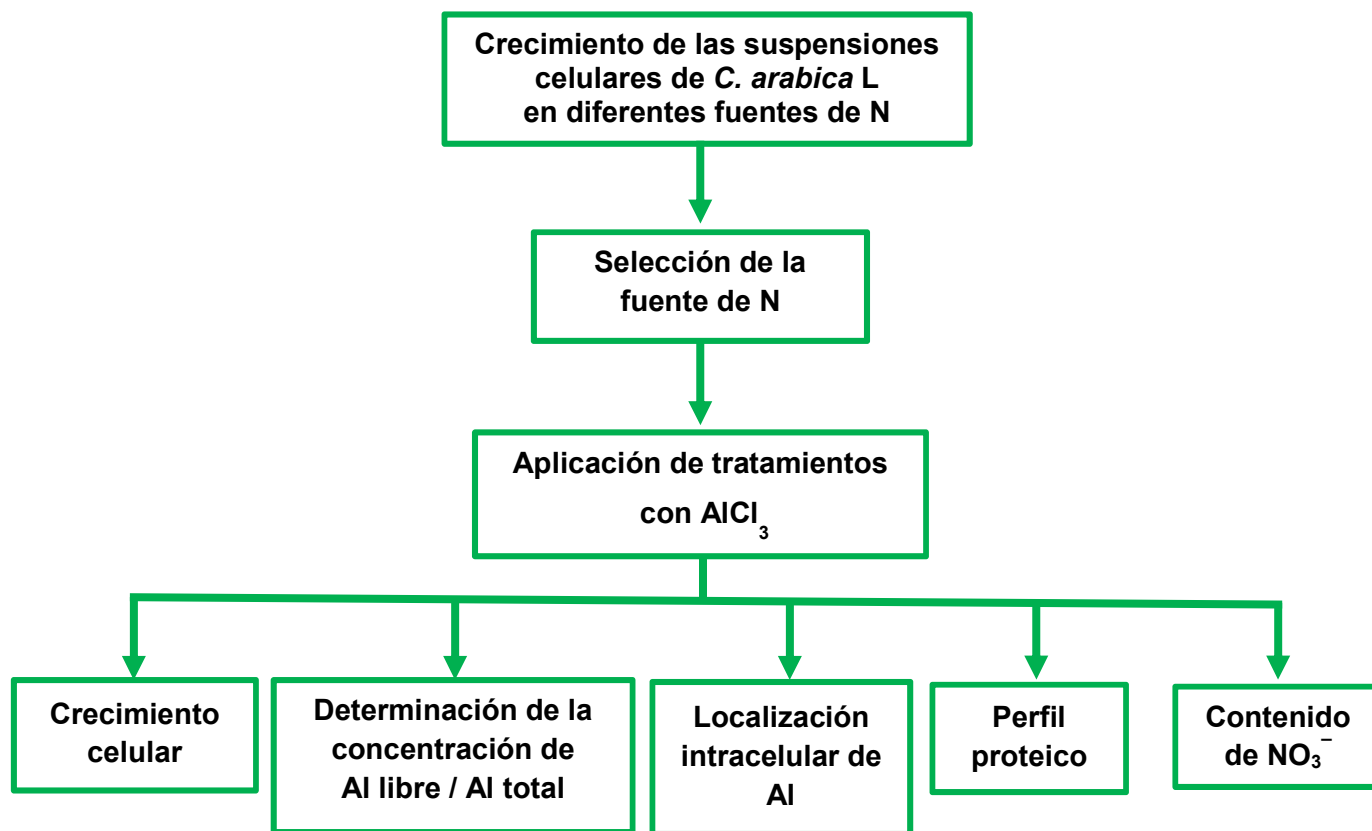


Figura 1.6 Estrategia experimental realizada en el presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FUENTE NITROGENADA EN EL CRECIMIENTO CELULAR EN UN MODELO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *C. arabica* L.

2.1. INTRODUCCIÓN

Las células crecidas en cultivo de tejidos proporcionan una población más homogénea de células y también son mucho más convenientes para trabajar en el laboratorio. Si se brinda el entorno adecuado, este tipo de cultivos pueden multiplicarse e incluso expresar propiedades diferenciadas en condiciones *in vitro*. Otra facilidad de este sistema es que las células pueden ser observadas continuamente bajo el microscopio o analizadas por métodos bioquímicos, y los efectos de añadir o eliminar moléculas específicas, tales como hormonas o factores de crecimiento, pueden explorarse sistemáticamente (Alberts *et al.*, 2015).

Cuando se cultivan tejidos vegetales en un medio estéril que contiene nutrientes y reguladores de crecimiento apropiados, muchas de las células se estimulan para proliferar indefinidamente de una manera desorganizada, produciendo una masa de células relativamente indiferenciadas llamadas callos. El callo puede disociarse mecánicamente en células individuales, que crecerán y se dividirán como cultivo en suspensión. Si los nutrientes y los reguladores del crecimiento son cuidadosamente manipulados, se obtiene un modelo ideal para evaluar diferentes condiciones de crecimiento (Alberts *et al.*, 2015).

El N es el cuarto elemento más abundante en los organismos vivos, lo cual lo convierte en un macronutriente necesario para el crecimiento y desarrollo normal (Hakeem *et al.*, 2014), y muchos organismos tienen la capacidad de utilizar diferentes formas de este elemento, ya sea como N orgánico, NO_3^- ó NH_4^+ (Bloom, 2015).

En el caso de las plantas son el NO_3^- y el NH_4^+ las fuentes de N preferidas (Rehman *et al.*, 2014; Hakeem *et al.*, 2011; Leleu y Vuylsteker, 2004), las cuales desarrollaron diferentes estrategias para poder asimilarlas, como la de utilizar vías de señalización para poder tomar una u otra fuente nitrogenada. Estas vías funcionan a nivel celular para la coordinación del crecimiento y desarrollo, de acuerdo con su contenido tanto externo como interno. Actualmente, la identificación y la caracterización de la señalización a nivel

local y sistémico, así como la integración, coordinación y organización de la respuesta a N en plantas es aún escasa (Hakeem *et al.*, 2014).

Otro elemento que también se encuentra presente en el entorno de la mayoría de los cultivos que se desarrollan en condiciones de suelos ácidos es el Al, donde se ha observado que en concentraciones micromolares de Al³⁺ el crecimiento de la raíz de muchas especies de plantas es inhibido (Chee-González, 2009; Delhaize *et al.*, 1995; Kochian, 1995), y también se tiene evidencia que en sistemas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* el Al inhibe el crecimiento celular, tal es el caso de modelos como *Glycine max* (Stass y Horst, 1995), *Nicotiana tabacum* (Ikegawa *et al.*, 2000) *Coffea arabica* (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), *Lycopersicum esculentum* (Yakimova *et al.*, 2007) y *Arabidopsis thaliana* (Matsumoto *et al.*, 2015).

Con base a los antecedentes descritos, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del N sobre la toxicidad por Al en suspensiones celulares de *C. arabica* L, en medios de cultivo modificados en su fuente de N total.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Para este estudio se utilizaron suspensiones celulares de *C. arabica* L, línea 2, que provienen de callos disgregados obtenidos de hojas dicotiledonares de embriones cigóticos de semillas de cafeto, cultivada *in vitro* en medio Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado por Martínez-Estévez *et al.*, (2001). Estas suspensiones celulares fueron cultivadas cada catorce días, utilizando como fuente de nutrientes la mezcla de sales basales, como se indica en el Cuadro 2.1. El pH del medio fue ajustado a 4.3 antes de su esterilización. Las condiciones en el cuarto de cultivo consistieron en oscuridad, a una temperatura de 25°C, humedad relativa de 65% y en agitación constante en orbitador a 100 rpm.

Cuadro 2.1 Componentes y concentración del medio MS a la mitad de su fuerza iónica. Medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las suspensiones celulares, utilizando como fuente de nutrientes la mezcla de sales basales comercial.

Medio MS ½ de la fuerza iónica		
Componente	Reactivo	Concentración gL⁻¹
Sales	MS Basal	2.16
Componentes orgánicos	Cisteína-HCl	0.025
	Myo-inositol	0.1
	Tiamina-HCl	0.01
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	0.001
	6-N-bencil amino purina	0.001
	Sacarosa	30

2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR DE LA LÍNEA L2

Se realizó la caracterización de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. a partir de suspensiones de catorce días de crecimiento. Estas fueron separadas de su medio de cultivo por filtración al vacío en condiciones estériles, se tomó de este filtrado un gramo de peso fresco de células y se sembraron en 50 mL de medio MS a la mitad de su fuerza iónica, a pH 4.3. Las suspensiones celulares se trataron bajo condiciones de oscuridad a 100 rpm, 25°C y a una humedad relativa de 65%. Se evaluaron los parámetros de crecimiento por peso fresco, peso seco del paquete celular, así como el pH y la conductividad del medio de cultivo, en los días cero, siete y catorce de crecimiento.

2.2.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR, pH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

Para evaluar el peso fresco se pesó el paquete celular obtenido al día cero, siete o catorce, luego de separar a las células del medio de cultivo por filtración al vacío.

Para obtener el peso seco, en el correspondiente día de evaluación, se congeló el paquete celular obtenido a -20°C y se liofilizó en el equipo LABCONCO 4.5 por un período de tres días. Transcurrido este tiempo se tomó el material liofilizado y se pesó, obteniendo de esta manera el peso seco.

Para la determinación del pH y la conductividad eléctrica del medio de cultivo se realizó la medición al medio obtenido, luego de separar las células por filtración al vacío en cada día de evaluación. Para medir estas variables se utilizó un potenciómetro marca Conductronic Pc 18 para obtener el dato de pH y para la conductividad se utilizó un conductímetro marca HANNA Instruments modelo HI 8733.

2.2.4 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE K EN EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Como lo indica el Cuadro 2.2, el reactivo utilizado para la fuente de NO_3^- fue KNO_3 , el cual adiciona una importante cantidad de potasio (K) al medio de cultivo, modificando la concentración original en el medio MS. Por lo tanto, fue necesario evaluar el efecto de la concentración adicional de K sobre el crecimiento de las suspensiones celulares.

Los medios elaborados para este experimento fueron los siguientes:

- a) **Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica:** se elaboró el medio MS a la mitad de la fuerza iónica con las soluciones madre (Cuadro 2.2), adicionado con 30 gL^{-1} de sacarosa, ajustando el pH a 4.3 previo al proceso de esterilización.

- b) **Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + K:** se elaboró el medio MS a la mitad de la fuerza iónica, con las soluciones madres (Cuadro 2.2), adicionado con 30 gL^{-1} de sacarosa y con 20.6 mM de KCl. De igual forma se ajustó el pH a 4.3 previo a su esterilización.

Para evaluar ambos medios de cultivo se tomaron suspensiones celulares de *C. arabica* L de catorce días del ciclo de cultivo. Las células fueron separadas del medio de cultivo

por filtración al vacío en condiciones estériles, y se tomó de este filtrado un gramo de células, el cual se resembró en 50 mL de cada medio correspondiente (MS ½ fuerza iónica y MS ½ fuerza iónica + K).

Cuadro 2.2 Componentes y concentración del medio MS elaborado con soluciones madre a la mitad de la fuerza iónica utilizado para las evaluaciones en el presente trabajo.

Medio MS ½ fuerza iónica		
Solución	Reactivo	[mM]
A	NH ₄ NO ₃	20.6
	KNO ₃	9.4
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.5
	KH ₂ PO ₄	0.62
B	KI	0.0025
	H ₂ BO ₃	0.05
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.03
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0005
C	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00005
	CoCl ₂ .2H ₂ O	0.00005
D	Na ₂ EDTA	0.05
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.05
Componentes orgánicos	Cisteína-HCl	0.14
	Myo-inositol	0.56
	Tiamina-HCl	0.03
	2,4-D	0.0136
	6-BAP	0.0044

Las evaluaciones de peso fresco y peso seco del paquete celular, pH y conductividad del medio se realizaron por duplicado, cada tres días, durante veinticuatro días de crecimiento, utilizando la metodología descrita en el apartado 2.2.3 de este documento.

2.2.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS FUENTES NITROGENADAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR EN SUSPENSIONES CELULARES

Para la evaluación de las dos fuentes nitrogenadas en el crecimiento celular en suspensiones celulares de *C. arabica* L. se utilizaron soluciones madre para la

elaboración de las distintas formulaciones, cambiando la fuente nitrogenada total (Cuadro 2.3) y así medir parámetros como peso fresco, peso seco, pH y conductividad. Los medios de cultivo se modificaron de la siguiente forma:

a) Medio MS ½ de la fuerza iónica + K: este medio es el mencionado en el punto b del apartado 2.2.4 de este documento y los componentes se especifican en el Cuadro 2.2. Este medio de cultivo se utilizó como testigo para la evaluación de las distintas fuentes nitrogenadas. Se le adicionó 20.6 mM de KCl y se ajustó el pH a 4.3 previo a su esterilización.

b) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NO₃⁻]: medio de cultivo MS a la mitad de la fuerza iónica (Cuadro 2.2), donde la única fuente de N fue el KNO₃ (30 mM) como N total. Se adicionó 30 gL⁻¹ de sacarosa y el pH se ajustó a 4.3 previo a su esterilización.

c) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NH₄⁺]: también es un medio de cultivo MS a la mitad de la fuerza iónica (Cuadro 2.2); se eliminó el componente KNO₃ de la formulación original y se adicionó 30 mM de NH₄⁺ como única fuente de N total en forma de NH₄Cl. Se agregó 30 gL⁻¹ de sacarosa y el pH se ajustó a 4.3 previo a su esterilización.

d) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NH₄⁺]+[NO₃⁻]+[K]: en este medio de cultivo se modificó la relación NO₃⁻ : NH₄⁺ de la formulación original de MS (1962), donde se utilizaron los reactivos de KNO₃ y NH₄Cl a una concentración de 9.85 mM y 20.6 mM respectivamente, y se agregó además 20.1 mM de KCl. Se agregó 30 gL⁻¹ de sacarosa y el pH del medio de cultivo se ajustó a 4.3 previo a su esterilización.

Para iniciar con la evaluación de las fuente de N en el crecimiento celular se tomó un gramo de las suspensiones celulares de catorce días de crecimiento, los cuales fueron separadas del medio de cultivo por filtración al vacío en condiciones estériles, y se sembraron en 50 mL de cada medio correspondiente, según los tratamientos mencionados en el apartado 2.2.5. Se realizaron evaluaciones de pH, conductividad, peso fresco y peso seco en el día cero, siete y catorce del ciclo de cultivo, según la metodología mencionada en el apartado 2.2.3.

Cuadro 2.3 Modificación del medio MS en la fuente de N total. Medios utilizados para evaluar el efecto de la fuente nitrogenada en el crecimiento celular de suspensiones

	Medio A	Medio B	Medio C	Medio D
Medio Base (MB)	MS ½ modificado, [K⁺] = 30.6 mM			
Fuente de N	9.35 mM KNO ₃ 10.30 mM NH ₄ NO ₃	30 mM KNO ₃	30 mM NH ₄ Cl	9.85 mM KNO ₃ 20.60 mM NH ₄ Cl
Relación NO₃⁻ : NH₄⁺	20:10	30:0	0:30	10:20
N Total	30 mM	30 mM	30 mM	30 mM

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

Las suspensiones celulares de *C. arabica* L2 normalmente son cultivadas en un medio MS a la mitad de su fuerza iónica (Cuadro 2.1), a pH 4.3. Sin embargo, para este estudio y debido a que posteriormente se realizaron diversos cambios en el medio de cultivo, fue necesario hacer una caracterización del crecimiento celular, y así conocer el comportamiento de las suspensiones celulares antes de ser cultivadas en los medios de cultivo modificados.

Para llevar a cabo dicha caracterización se midió el peso fresco, el peso seco de la masa celular, el pH y la conductividad eléctrica del medio de cultivo, según la metodología mencionada en el apartado 2.2.3, en los días cero, siete y catorce del ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

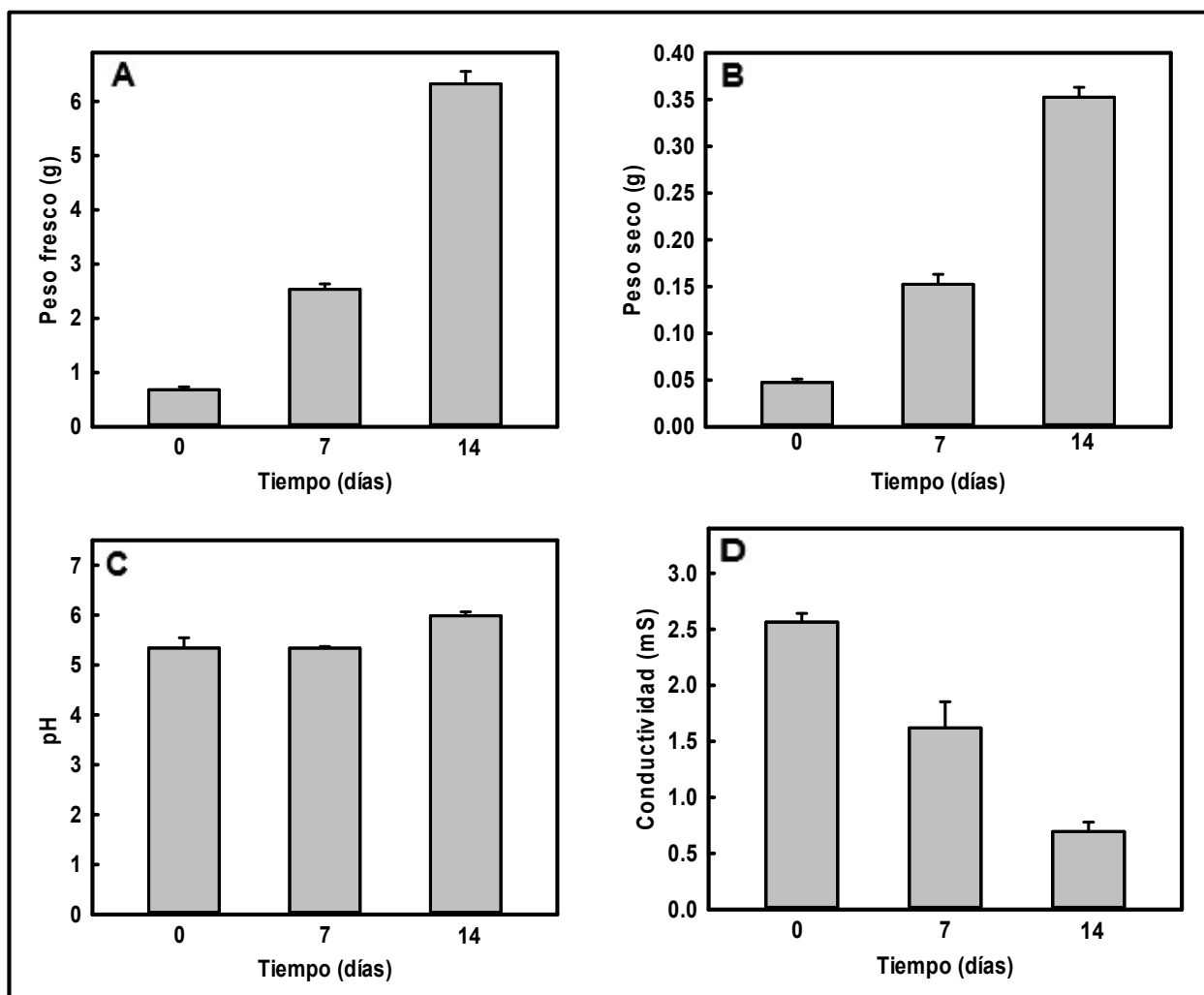


Figura 2.1. Caracterización de suspensiones celulares de *C. arabica* L en medio MS a la mitad de su fuerza iónica a pH 4.3. Las células se mantuvieron en cultivo por 14 días y se realizaron evaluaciones en el día cero, siete y catorce del ciclo de cultivo, (A) peso fresco, (B) peso seco, (C) pH y (D) conductividad del medio de cultivo. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos réplicas \pm SE.

Como se puede observar en la Figura 2.1, tanto para el peso fresco y seco tuvieron valores crecientes durante el período de evaluación, el cual demostró que existió crecimiento celular, y, por lo tanto, toma de nutrientes, como se muestra en la Figura 2.1D con los valores de conductividad en el medio de cultivo donde disminuye gradualmente. Este resultado evidenció la toma de nutrientes por parte de las células del medio de cultivo, ya que este parámetro indica la cantidad de iones o electrolitos disueltos en esta solución. En cuanto al pH (Figura 2.1C), este aumentó en una unidad desde el día cero de evaluación, pasando de 4.3 a 5.3, y este valor se mantuvo también

en el día siete, pero al día catorce hubo un leve aumento, donde alcanzó valores cercanos a seis.

2.3.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE K EN EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO CELULAR, EN EL VALOR DE pH Y CONDUCTIVIDAD

Como se indica en el apartado 2.2.4, para determinar el efecto de la concentración de K en el medio en el crecimiento celular se evaluaron dos medios de cultivo diferentes, elaborados según Murashige y Skoog (1962) a partir de soluciones madre. En la Figura 2.2 se muestran los resultados obtenidos para ambos medios de cultivo evaluados cada tercer día durante 24 días para los medios de cultivo Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica y Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + K.

A pesar de que el medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + K contenía 20.6 mM de KCl en comparación con el medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica, los resultados obtenidos para los parámetros de peso fresco, peso seco y pH fueron muy similares entre sí, con la diferencia que en el parámetro de conductividad sí se presentaron diferencias entre los dos medios de cultivo evaluados, donde se obtuvo una mayor conductividad a lo largo de los días de evaluación en el medio adicionado con K (Figura 2.2B) en comparación con el medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica (Figura 2.2A).

Considerando que en el grupo de trabajo, y en este modelo de estudio en particular, los días de evaluación para la determinación de la toxicidad por Al son los días catorce, los resultados presentados en las Figuras 2.2.A y 2.2.B no presentaron mayores variaciones en este día de crecimiento celular, lo que sugiere que será posible evaluar en este mismo día de cultivo los tratamientos con $AlCl_3$ en las suspensiones celulares cultivadas en los medios de cultivo modificados en la fuente de N total.

2.3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS FUENTES NITROGENADAS EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Para establecer las condiciones para el estudio del efecto de la fuente nitrogenada ante la toxicidad por Al en las suspensiones celulares fue necesario evaluar dos fuentes inorgánicas de N, como lo son el NH_4^+ ó el NO_3^- como fuente total de N en el medio de cultivo, en los días cero, siete y catorce de crecimiento.

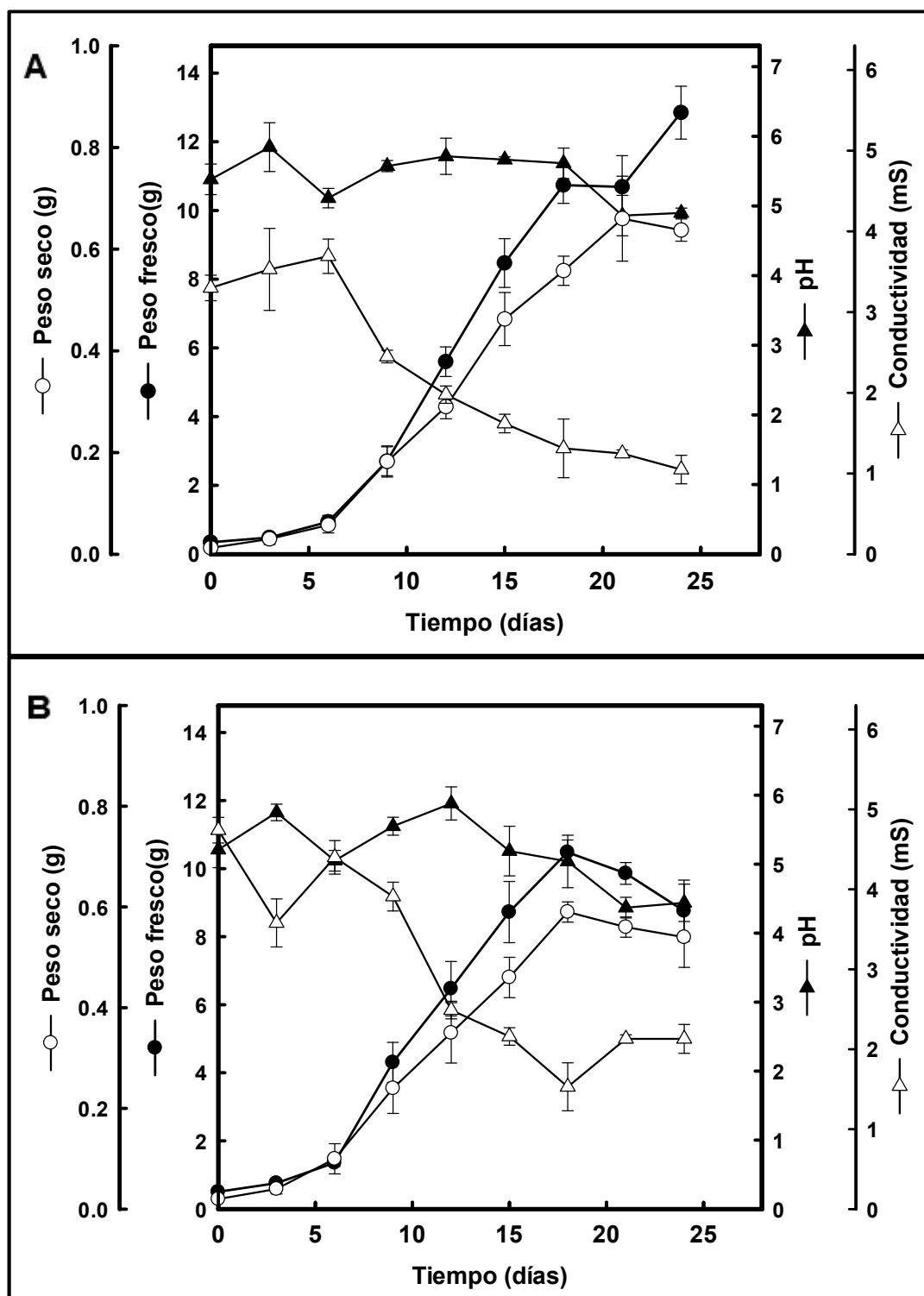


Figura 2.2. Efecto de la concentración de K en el medio de cultivo en el crecimiento celular. Células del día catorce de cultivo fueron colocadas en **(A)** medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica a pH 4.3, y **(B)** medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica adicionado con 20.6 mM de KCl, a pH 4.3; ambos medio a partir de soluciones madre, evaluadas en un ciclo de cultivo de 24 días. Los parámetros evaluados fueron (▲) pH, (△) conductividad, (●) peso fresco y (○) peso seco. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con dos réplicas \pm SE.

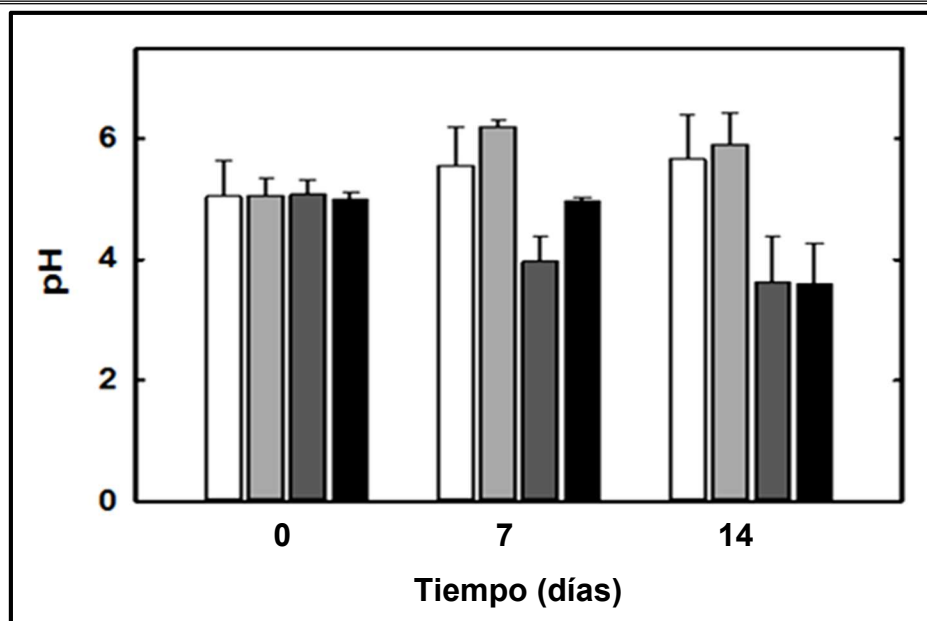


Figura 2.3 Valor de pH en el medio de cultivo modificado en la fuente de N total. (□) Medio MS ½ de la fuerza iónica + 20.6 mM KCl; (▒) Medio MS ½ de la fuerza iónica + $[\text{NO}_3^-]$; (▓) Medio MS ½ de la fuerza iónica + $[\text{NH}_4^+]$; (■) Medio MS ½ de la fuerza iónica + $[\text{NH}_4^+] + [\text{NO}_3^-] + [\text{K}]$, evaluados en los días cero, siete y catorce de crecimiento de las suspensiones celulares. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

Como se observa en la Figura 2.3, el valor de pH obtenido para el día cero, en los cuatro medios de cultivo se mantuvo alrededor de 5. En el día siete, las células que crecieron en los cuatro medios de cultivos empezaron a modificar el pH del mismo. En el medio testigo y el medio modificado con la fuente de NO_3^- aumentaron este valor, a un pH entre 5.5 y 6. El medio modificado con la fuente de NH_4^+ presentó una disminución en este parámetro, que comparándolo con el testigo disminuyó en dos unidades, llegando a un pH de 4, y en el medio modificado en la relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 1:2$ se mantuvo similar al valor obtenido desde el día cero de evaluación. Estos resultados fueron aún más marcados en el día catorce de evaluación, ya que el medio testigo y el medio modificado con la fuente de NO_3^- obtuvieron valores de pH similares entre sí, con valores cercanos a 6. Por otro lado, tanto el medio modificado con NH_4^+ (medio C, Cuadro 2.3) como el modificado en su relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 1:2$ (medio D, Cuadro 2.3), disminuyeron en dos unidades el valor de pH en relación al valor obtenido en el día siete de evaluación, donde se obtuvo un valor pH de 4.

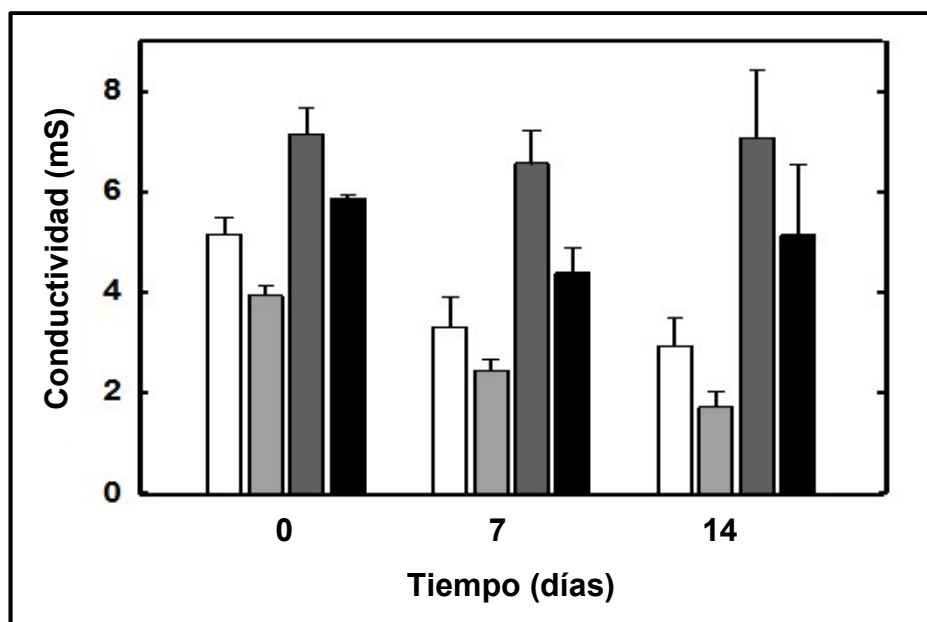


Figura 2.4 Conductividad eléctrica en el medio de cultivo modificado en la fuente de N total. (□) Medio MS ½ de la fuerza iónica + 20.6 mM KCl; (▤) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NO₃⁻]; (▥) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NH₄⁺]; (■) Medio MS ½ de la fuerza iónica + [NH₄⁺]+[NO₃⁻]+[K], evaluados en los días cero, siete y catorce de crecimiento de las suspensiones celulares. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas ± SE.

En la Figura 2.4 se muestra como las células incubadas en el medio de cultivo que se utilizó como testigo (medio A, Cuadro 2.3) y el modificado con NO₃⁻ (medio B, Cuadro 2.3) consumieron los nutrientes del medio de cultivo, ya que los valores de conductividad, en los tres días evaluados mantuvieron un comportamiento decreciente conforme pasaban los días de crecimiento, iniciando con valores alrededor de 5 mS y finalizando en el día catorce con valores alrededor de 2 mS. Caso contrario sucedió con el medio modificado con NH₄⁺ (medio C, Cuadro 2.3) y con el medio modificado en su relación NO₃⁻ : NH₄⁺ 1:2 (medio D, Cuadro 2.3), ya que los valores obtenidos de conductividad eléctrica para estos medios de cultivo no muestran mayores diferencias a lo largo de los días de evaluación, ya que el primero se mantuvo en 7 mS y el segundo se mantuvo alrededor de 5 mS durante los catorce días de evaluación.

Por otro lado, los parámetros de peso fresco y peso seco del paquete celular cultivado en los distintos medios de cultivo, son claves para conocer si existe un efecto al modificar la fuente de N total en el medio de cultivo. Por lo tanto, se realizaron mediciones de dichos parámetros en los mismos días mencionados anteriormente y se pudo observar diferencias en los cuatro medios de cultivo evaluados (Figura 2.5). En el

día cero, los cuatro medios de cultivo se comportaron de forma similar, tanto para peso fresco como para peso seco, pero en los días siete y catorce las diferencias fueron más marcadas, sobre todo en las células del medio modificado con NH_4^+ y del medio modificado en la relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 1:2$, en las cuales existió una disminución en el crecimiento en relación con el testigo de hasta tres veces en el día catorce de evaluación.

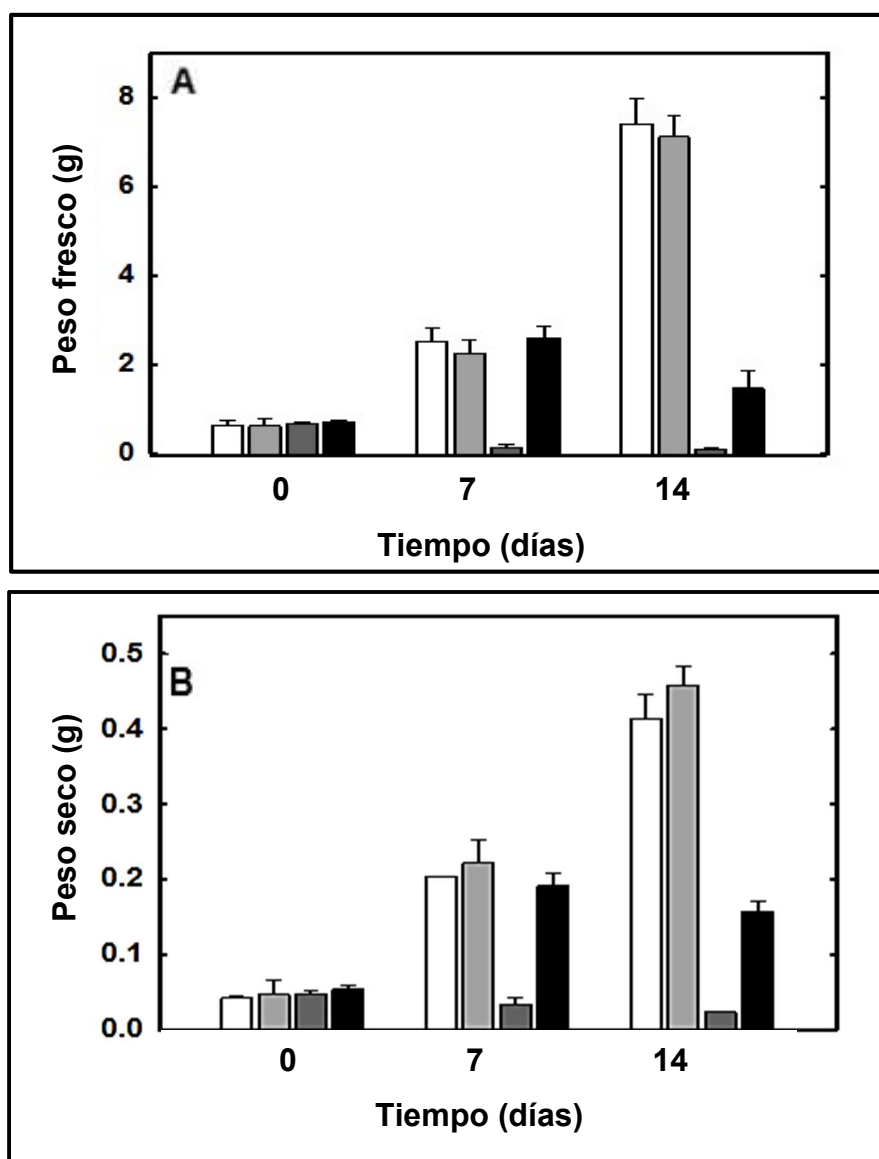


Figura 2.5 Crecimiento del paquete celular de las suspensiones celulares cultivadas en medios modificados en la fuente de N total. (A) peso fresco y (B) peso seco en (□) Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + 20.6 mM KCl; (▒) Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + $[\text{NO}_3^-]$; (■) Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + $[\text{NH}_4^+]$; (■) Medio MS $\frac{1}{2}$ de la fuerza iónica + $[\text{NH}_4^+]$ + $[\text{NO}_3^-]$ + $[\text{K}]$, evaluados en los días cero, siete y catorce de crecimiento de las suspensiones celulares. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

En el día siete de evaluación, los paquetes celulares obtenidos, tanto en el medio testigo como en el modificado con NO_3^- , se obtuvieron poco más de 2 g en peso fresco y 0.2 g en peso seco; mientras que para el día catorce, se obtuvieron cerca de 6.5 g en peso fresco y alrededor de 0.45 g en peso seco para ambos medios de cultivo.

Para el medio de cultivo modificado con NH_4^+ se obtuvieron paquetes celulares con pesos por debajo a 1 g en peso fresco para los días siete y catorce, evidenciándose poco crecimiento celular en comparación con el obtenido en el medio de cultivo testigo mencionado anteriormente, ya que la diferencia entre los pesos de los paquetes celulares obtenidos al final de la evaluación (día catorce) es de un 85%. De igual forma, el peso seco para el mismo tratamiento en los días siete y catorce de evaluación se obtuvieron pesos por debajo de 0.05 g, presentando una diferencia cercana al 90% en comparación con el testigo en el día catorce de evaluación.

Para el caso del medio de cultivo modificado en la relación $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 1:2$, el crecimiento en peso fresco obtenido en el día siete fue similar al medio control y al modificado con NO_3^- , donde se obtuvieron poco más de 2 gramos; pero, para el día catorce de evaluación, este mismo tratamiento presentó una disminución cercana al 50% en su peso fresco en relación al obtenido en el día siete, mientras que para el peso seco, en el día siete se obtuvieron cerca de 0.2 gramos y en el día catorce 0.16 gramos, evidenciando una importante disminución en comparación con el testigo, mayor al 50% al día catorce de evaluación.

2.4 DISCUSIÓN

El N es, cuantitativamente el nutriente más esencial para el crecimiento y el metabolismo en el ciclo de la vida de las plantas (Liu *et al.*, 2014). Es por lo anterior, que se decidió estudiar el efecto de este elemento en la toxicidad por un factor abiótico, como lo es la toxicidad por Al, considerando que el N, al ser un macroelemento requerido en importantes cantidades por las células vegetales, tanto la toma como la asimilación, puede estar involucrado en un óptimo funcionamiento.

Para esto fue necesario caracterizar el crecimiento celular en el modelo de estudio utilizado en el grupo de trabajo, y así fue posible conocer el comportamiento en las condiciones normales de crecimiento.

Al estudiar la respuesta de las células con el medio de cultivo a la mitad de la fuerza iónica y a pH 4.3, (Figura 2.1), los resultados obtenidos en los parámetros evaluados como el pH y la conductividad eléctrica fueron similares a los obtenidos por Martínez-Estévez y colaboradores (2001), quienes obtuvieron la línea L2 de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. en el grupo de trabajo.

Para realizar dicha caracterización se eligieron días de crecimiento específicos. En el día cero es posible conocer los valores en el inicio de la evaluación, el día siete se utilizó como parámetro en el inicio de la fase exponencial de crecimiento, y el día catorce es el día que, en promedio, las células se encuentran en la mitad del período de la tasa específica de crecimiento, la cual es constante y es medible (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). Utilizando estos tres puntos para evaluar el comportamiento del modelo de estudio es posible utilizarlo como parámetro en otros estudios en las modificaciones en el medio de cultivo para las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

La modificación en el medio de cultivo para el estudio del efecto de la fuente nitrogenada fue necesario para obtener las condiciones adecuadas para determinar si la fuente de N modifica la respuesta celular ante el tratamiento con $AlCl_3$, en diferentes condiciones de cultivo. Como lo indica Ohira y colaboradores (1973), es necesario adaptar el medio de cultivo, dependiendo de los requerimientos del modelo de evaluación. Por lo anterior, se decidió adicionar en el medio de cultivo testigo la concentración de 20.6 mM de K, la cual varió al utilizar KNO_3 como fuente de NO_3^- , y así estandarizar las condiciones de crecimiento de las células en suspensión.

Como lo mencionan Atafar y colaboradores (2008), la adición de los diferentes componentes nutricionales al medio puede variar el valor de pH en la solución y por ende la concentración de algunos metales pesados, provocando efectos adversos al desarrollo óptimo de los cultivos. Los autores lograron determinar que la mezcla de altos niveles de algunos de los compuestos utilizados comúnmente como fertilizantes (N, P, K) disminuyen el valor del pH en la solución y aumentan la disponibilidad de algunos metales pesados como lo son el Pb, Cd y As, evidenciando efectos adversos en el óptimo desarrollo radical de las plantas de trigo y en su productividad.

Lo anterior puede compararse con los resultados de las evaluaciones del medio de cultivo modificado en el contenido de N total, específicamente el medio modificado con

NH_4^+ (Figura 2.3), ya que fue en este medio de cultivo el valor de pH disminuyó hasta en un 50% en comparación con el testigo, mientras que el modificado con NO_3^- mantuvo el valor de pH similar al del medio testigo, evidenciando la estabilidad de las condiciones en este parámetro evaluado.

En cuanto a las modificaciones con las distintas fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo de las suspensiones celulares (Figura 2.5), se pudo notar la preferencia de la fuente de nitrato en el crecimiento, ya que en el día siete y en el día catorce de evaluación los resultados en peso fresco y peso seco fueron similares al medio testigo, no así con la fuente de amonio, donde sí se notaron diferencias.

Plett y colaboradores (2015), indican que la fuente de nitrógeno preferida para por las plantas es el NO_3^- , donde utilizan los transportadores NRT1 Y NRT2 para su absorción, aunque también afecta la interacción con factores ambientales, las concentraciones y las variaciones de las formas de N que se encuentren disponibles en el suelo. Esta preferencia por NO_3^- como fuente de N por parte de las plantas se ha observado en el cultivo de maíz. Al evaluar la formación de los diferentes aminoácidos y la medición de la actividad de diferentes enzimas involucradas en la asimilación de N en hojas y raíces de este cultivo, los niveles aumentaron específicamente a lo largo del ciclo de cultivo, cuando se utilizó nitrato como fuente de N total.

En condiciones en las que se desarrolla el cultivo de cafeto, que son suelos aerobios, las dos fuentes predominantes de N inorgánico son el NO_3^- y el NH_4^+ , pero la forma más común de encontrar es el NO_3^- (Hakeem *et al.*, 2014), tal es el caso del medio de cultivo modificado con NO_3^- , donde se obtuvo un crecimiento similar al obtenido en el medio testigo.

Además, a nivel celular la fuente de N puede alterar las propiedades de la pared celular. Wang *et al.*, (2015) indican que los contenidos de pectina y hemicelulosa decrecen cuando las plantas crecen en presencia de NH_4^+ pero los niveles se incrementan cuando son cultivadas con NO_3^- , produciendo un desbalance en su estructura dependiendo de la forma de N que se encuentre disponible.

El pH es también un factor importante, ya que los cambios en este parámetro dependen de la forma predominante de N presente en la solución en la que se encuentre (Figura 2.3) (Wang *et al.*, 2015). Cuando el NH_4^+ es la fuente dominante de N, el pH disminuye

considerablemente, caso contrario cuando es el NO_3^- la fuente de N total disponible, donde el valor de pH aumenta al ser asimilados por las células. Estos cambios en el valor de pH provoca modificaciones en la carga eléctrica de la pared celular, haciéndola sensible en la parte superficial de la misma (Shomer *et al.*, 2003). Esto podría sugerir los cambios tan marcados obtenidos tanto en el valor de pH en los medios de cultivo (Figura 2.3), como el efecto en el crecimiento celular (Figura 2.5), en las suspensiones cultivadas en el medio modificado con NH_4^+ y el modificado con $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 2:1, en comparación con el testigo.

Hakeem y colaboradores (2014), también indican que el nitrato puede afectar directamente la expresión de genes asociados con la toma específica para esta fuente nitrogenada, así como su transporte y su asimilación en plantas superiores, como el caso del café. Existen reportes donde se ha visto que la mayoría de los cultivos prefieren al NO_3^- como fuente de N ó una mezcla de $\text{NH}_4^+ - \text{NO}_3^-$ (Zhao *et al.*, 2013). Esto puede explicar el efecto que se observó en los resultados obtenidos en este trabajo, principalmente en el crecimiento de las células en las suspensiones celulares, cuando se expusieron ante los diferentes medios de cultivo evaluados modificados en el contenido de N total (Figura 2.5).

Por lo tanto, las condiciones óptimas para poder llevar a cabo el estudio de la modificación de la fuente nitrogenada en el efecto en la toxicidad por Al en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., es utilizando como única fuente de N total el NO_3^- , ya que al utilizar esta fuente de N inorgánico las suspensiones celulares no se ven afectadas en el crecimiento, y es posible realizar evaluaciones de hasta 24 días de cultivo.

En resumen, el medio modificado con NO_3^- como fuente de N total fue el medio seleccionado para evaluar la toxicidad por Al en suspensiones celulares, aplicando tratamientos de 500 μM de AlCl_3 . Como se presenta a continuación se evaluaron aspectos fisiológicos de crecimiento, contenidos de Al extra e intracelular, localización intracelular y parámetros bioquímicos, que nos permitieran conocer el efecto de esta fuente nitrogenada en el mismo modelo de estudio en el grupo de trabajo y, de esta forma, poder integrarse en estudios anteriores.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL NO_3^- EN LA TOXICIDAD POR Al EN LAS SUSPENSIONES CELULARES DE *C. arabica* L.

3.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se analizó el efecto del NO_3^- en la toxicidad por Al en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. que se cultivaron en tres medios de cultivo MS modificados y que se trataron o no con 500 μM de AlCl_3 , evaluando el crecimiento celular, el contenido de Al total y libre, y la localización intracelular de Al^{3+} .

Se conoce que la asimilación de N determina el crecimiento y la productividad de muchos cultivos (Krapp *et al.*, 2014), y como lo afirman Crawford y Forde (2002), el NO_3^- es la primera fuente de N disponible en la mayoría de los suelos y la preferida por la mayoría de los cultivos agrícolas.

Como lo indica Xu *et al.*, (2016), en el suelo no solo se encuentran nutrientes que favorecen el desarrollo de las plantas, también se pueden encontrar compuestos, que aunado a otras condiciones pueden afectar, de una u otra forma el óptimo crecimiento y desarrollo de los cultivos, como lo es la presencia de Al, el cual se ha caracterizado como el primer factor limitante para el desarrollo de las plantas en suelos de condición ácida. Uno de los factores que puede afectar la toxicidad por Al en la rizosfera son las formas nitrogenadas que podrían estar presentes en dicha solución (Wang *et al.*, 2015), y también, las altas concentraciones de Al en el medio, las cuales pueden causar alteraciones en el proceso bioquímico del N a nivel celular de dichos cultivos, el cual se considera importante en la producción de proteínas (Castro de Souza *et al.*, 2016).

El $\text{Al}^{3+} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{Al}(\text{OH})^{2+} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ son los compuestos que más daño ocasionan a los cultivos a nivel intracelular, lo que demuestra que los polímeros de Al son, en general, más tóxicos que las formas monoméricas de este metal. (Kochian *et al.*, 2015). Es posible que la membrana plasmática, por su composición química, sea poco permeable a las formas ionizadas del Al, mientras, que los compuestos de Al electrónicamente neutros o los complejos de Al, como $\text{Al}(\text{OH})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o AlCl_3 sean más móviles (Casierra-Posada y Aguilar-Avenidaño, 2007; Casierra-Posada, 2002).

De la misma manera, diversos estudios han evidenciado que la presencia de las formas inorgánicas de N en la rizosfera afectan el pH en esta zona. Por ejemplo, la toma de NO_3^- por parte de las plantas, la vuelve alcalina, debido al consumo de iones H^+ , mientras que la toma de NH_4^+ la vuelve ácida (Wang *et al.*, 2015).

Existen antecedentes que afirman que la solubilidad del Al aumenta cuando el pH de la solución en la que se encuentra disminuye, por lo que es posible especular que la presencia de NH_4^+ en la solución aumenta la presencia de Al^{3+} y la toxicidad por este metal en plantas sensibles, mientras que la presencia de NO_3^- causa el efecto opuesto (Wang *et al.*, 2015).

Se sabe que el Al afecta negativamente a las plantas, especialmente a las más sensibles; sin embargo, los estudios que implican fuentes de N inorgánico y el estrés por Al^{3+} son incipientes (Castro de Souza *et al.*, 2016).

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto del NO_3^- como única fuente de N sobre la toxicidad del Al que afecta el crecimiento celular, evaluando tanto el contenido como la localización de este metal en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., que fueron tratadas con 500 μM de AlCl_3 .

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 TRATAMIENTOS CON AlCl_3

En el capítulo anterior se pudo determinar como el NO_3^- es la fuente de N que permite evaluar el crecimiento celular cuando se utiliza como fuente de N total, en el medio MS a la mitad de su fuerza iónica en las suspensiones celulares *C. arabica* L.

Para conocer si la fuente de N afecta la toxicidad por Al en el modelo de estudio, fue necesario elaborar tres medios de cultivo MS modificados, que se amplían a continuación:

- a) **Medio MS:** Este medio de cultivo se presenta en el cuadro 2.1 de este documento. Es el medio base utilizado para el mantenimiento de la línea de suspensiones celulares de *C. arabica* L. línea L2.

- b) **Medio MS + K:** Este medio es el mencionado en el apartado 2.2.5a de este documento.
- c) **Medio MS + NO₃⁻:** Los componentes y la formulación de este medio de cultivo se especifica en el apartado 2.2.5b.

Para iniciar con los tratamientos con Al, se tomó un gramo en peso fresco de células filtradas al vacío para separarlas del medio de cultivo, y se colocaron en matraces con 50 mL de medio MS, medio MS + K ó medio MS + NO₃⁻, en condiciones estériles. Los tratamientos con AlCl₃ se realizaron a una concentración final de 500 μM. Las condiciones de crecimiento se llevaron a cabo en la oscuridad, a una temperatura de 25 °C, a una humedad relativa de 65% y a una agitación constante en orbitador a 100 rpm.

Las evaluaciones se realizaron en los días 13, 14, 15 para la etapa exponencial de crecimiento de las suspensiones celulares y en los días 23, 24 y 25 para la etapa estacionaria de crecimiento, midiendo los parámetros de peso fresco y peso seco del paquete celular, así como el pH y la conductividad del medio de cultivo, de la misma manera que se especifica en el apartado 2.2.3 de este documento.

3.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE Al

Para la cuantificación del contenido de Al total en las suspensiones celulares, se tomaron células de 14 días de crecimiento cultivadas en cada medio de cultivo evaluado (medio MS, medio MS + K y medio MS + NO₃⁻). Posteriormente fueron separadas del medio de cultivo respectivo por filtración al vacío, y se tomó un gramo en peso fresco de células, el cual fue inoculado de manera individual en 25 mL de medio de cultivo fresco correspondiente según su caso y se mantuvieron en condiciones de adaptación por 30 minutos, en oscuridad y a una agitación continua de 100 rpm. Transcurrido este tiempo, se adicionó AlCl₃ a una concentración final de 500 μM, y se incubó por una hora y se utilizaron las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Cuando se cumplió el tiempo de tratamiento, las células se separaron nuevamente del medio de cultivo por filtración al vacío, y se colectó tanto el medio de cultivo como el paquete celular por separado.

3.2.2.1 NIVELES DE Al TOTAL EN CÉLULAS

El paquete celular que se obtuvo, como se indica en el apartado 3.2.2, se colocó en crisoles previamente enjuagados con HNO_3 al 5% (v/v) y se secó en un horno a una temperatura de 80 °C durante un día para obtener el peso seco. Posteriormente se pasó a una mufla, donde se realizó una rampa de calentamiento, iniciando con 100°C hasta llegar a 500°C, y se mantuvo a esta temperatura por 3 horas para, de esta manera, obtener las cenizas. Estas cenizas fueron digeridas en una placa de calentamiento con 5 mL de HCl 40% (v/v) hasta secar. Posteriormente, las muestras se disolvieron con 1 mL de HCl Q. P. y se aforó hasta 5 mL con agua destilada. La concentración de Al total fue determinada a través de espectrometría de absorción atómica (PERKIN-ELMER).

Para la cuantificación de Al total se realizó una curva estándar de hasta 1000 μM de Al a partir del reactivo comercial $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ en ácido nítrico al 2% (PERKIN-ELMER). Dicha curva se preparó con diluciones en una solución de cloruro de lantano al 0.1% (p/v) para evitar la ionización de los estándares. Las absorbancias de las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 309.3 nm en un espectrómetro de absorción atómica.

Para dicho experimento se realizó una curva estándar de Al. En la Figura 3.1 se muestra el resultado después de evaluar diferentes concentraciones de Al, donde se observa la linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9972$), que indica la precisión en la preparación y dilución de los patrones utilizados.

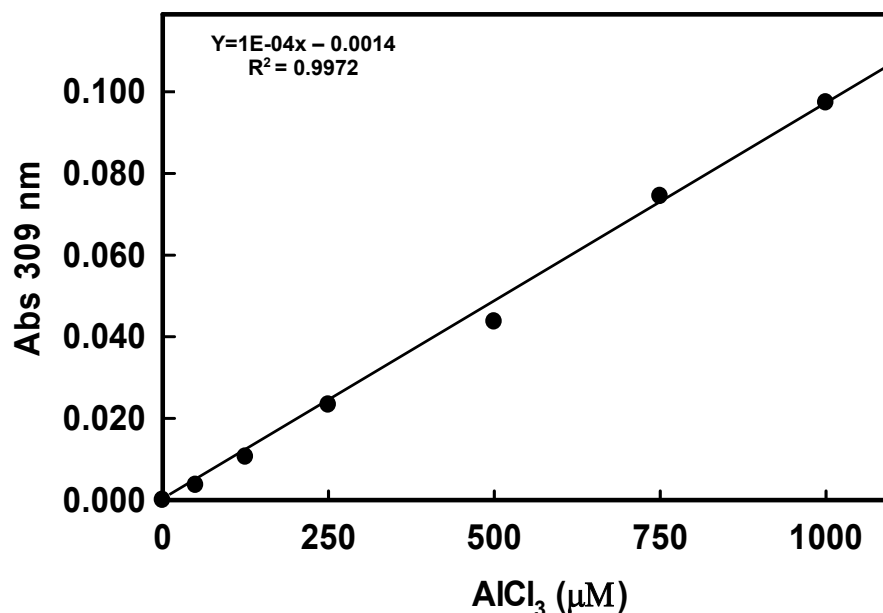
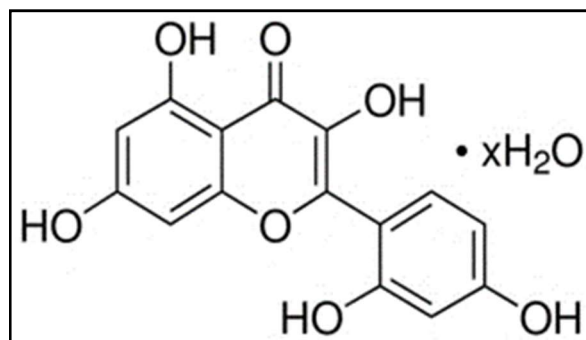


Figura 3.1 Curva estándar de la concentración de Al total. Se utilizó el reactivo comercial $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ en ácido nítrico al 2% (PERKIN-ELMER) como estándar. La absorbancia de las muestras se midió en el espectro de absorción atómica a 309 nm. En la curva se indicó la recta de calibrado (y) y el coeficiente de determinación (R^2). El resultado es el promedio de tres determinaciones por triplicado.

3.2.2.2 DETERMINACIÓN DE Al LIBRE

El medio de cultivo que se colectó luego de filtrar las suspensiones tratadas o no con AlCl_3 que se mencionó en el apartado 3.2.2, se incubó con el reactivo morin (2,3,4,5,7-pentahidroxi flavona) (Figura 3.2), disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración final de 500 μM durante una hora en condiciones de oscuridad.



2' 3' 4' 5' 7' pentahidroxi flavona

Figura 3.2 Estructura química de morin

El morin al acomplejarse con el Al^{3+} (Figura 3.3) emite fluorescencia, la cual se cuantificó en el fluorómetro marca Eppendorff BioSpectrometer® fluorescence, a una longitud de onda de 400 nm de excitación y 520 nm de emisión.

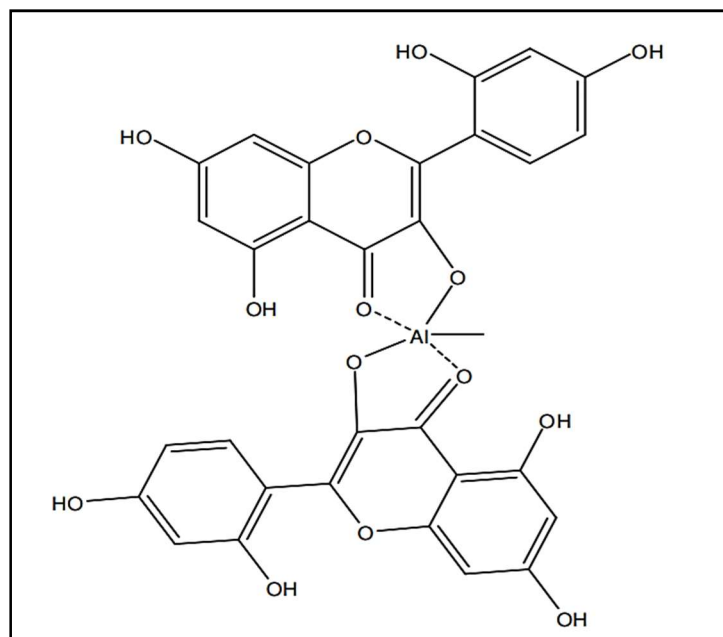


Figura 3.3. Complejo formado por Al-morin

En la Figura 3.4 se muestra el resultado de la curva estándar luego de evaluar diferentes concentraciones Al^{3+} . Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones de AlCl_3 empleados para el trasado de la curva de calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9815$), que indica la precisión en la preparación y dilución de los patrones utilizados.

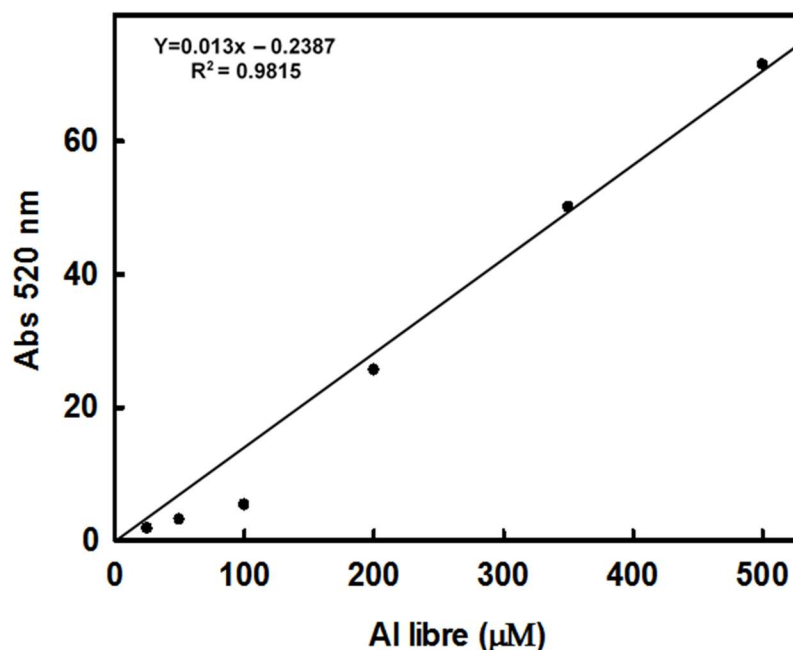


Figura 3.4 Curva estándar de la concentración de Al^{3+} . Se utilizó AlCl_3 como estándar. La absorbancia de las muestras se midió en el fluorómetro a 520 nm. En la curva se indicó la ecuación de la recta (y) y el coeficiente de determinación (R^2). El resultado es el promedio de tres determinaciones por duplicado.

3.3 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE Al^{3+}

Para la localización de Al^{3+} a nivel intracelular se utilizaron suspensiones celulares de 14 días de cultivo, y con la ayuda de la observación en microscopio confocal FlouView™ FV1000 (Olympus, Japan) con lámpara de mercurio, fue posible identificar el fluoróforo morin.

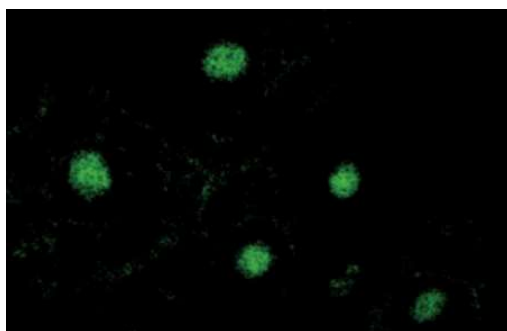


Figura 3.5 Visualización con morin, fluorocromo selectivo para Al^{3+} , en células de raíz de *Camellia sinensis*. Tomado de Hajiboland y Poschenrieder (2015).

Para facilitar la identificación intracelular de la presencia del AI en diferentes organelos se utilizó el DAPI (4,6-diamidido-2-fenilindol), el cual permite visualizar el ADN en el núcleo de las células (Figura 3.6), ya que se une fuertemente a las regiones ricas en adenina y timina y emite la señal al excitarse a 360 nm y a una emisión de 405 nm.

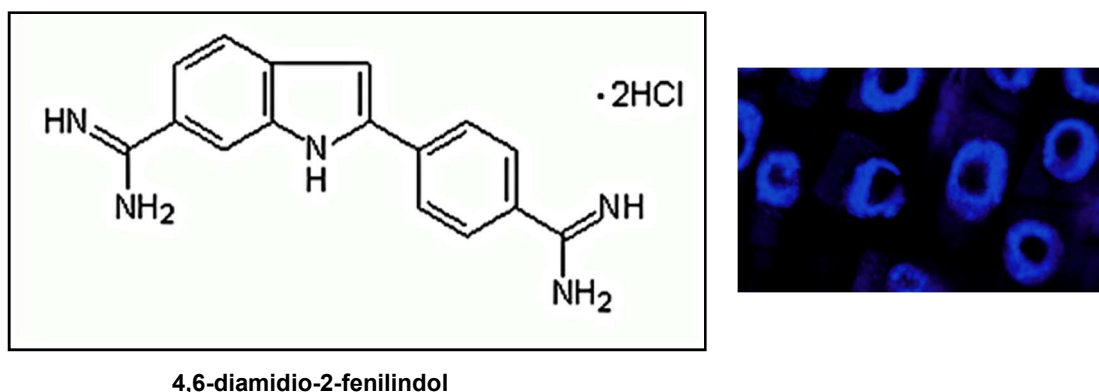
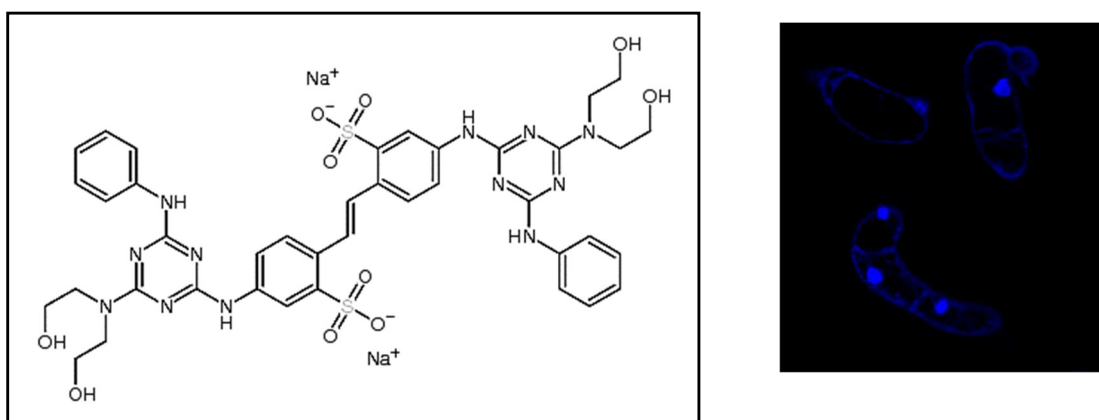


Figura 3.6 Estructura química y visualización de DAPI, fluorocromo selectivo para núcleo en células de raíz de *Camellia sinensis*. Tomado de Hajiboland y Poschenrieder (2015).

Otro fluoróforo que se empleó fue el blanco de calcofluor (CFW por sus siglas en inglés) que se compone de una sal disódica del ácido 4,4'-bis-(4-anilino-bis-dietilamino-5-triazín-2-ilamino)-2,2'-estilbeno disulfónico, que se acompleja con los polisacáridos con uniones β 1-3 o β 1-4 de celulosa y quitina que se encuentran en la pared celular (Figura 3.7), que emite fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y de emisión de 367 nm.



4,4'-bis-(4-anilino-bis-dietilamino-5-triazín-2-ilamino)-2,2'-estilbeno disulfónico

Figura 3.7 Estructura química y visualización de CFW, fluorocromo selectivo para pared celular en suspensiones celulares de *Daucus carota*. Tomado de Flores-Rico *et al.*, (2009).

Para esta identificación intracelular se inició tomando un gramo en peso fresco de las suspensiones celulares cultivadas en los tres medios de cultivo evaluados (MS, MS + K ó MS + NO₃⁻), se transfirieron a su respectivo medio de cultivo nuevo y se mantuvieron en condiciones de adaptación por 30 minutos, en oscuridad y a una agitación continua de 100 rpm. Transcurrido este tiempo, se adicionó AlCl₃ a una concentración final de 500 μM, y se incubó por una hora en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Luego se tomó 1 mL de las suspensiones celulares y se transfirió a tubos eppendorff, se centrifugó a 1000xg por un minuto, se retiró el sobrenadante y se realizaron 3 enjuagues consecutivos con MES (2-morfolin-4-ácido iletosulfónico) a pH 6, con las mismas condiciones de centrifugación mencionadas anteriormente. Luego se incubaron con los 3 fluoróforos utilizados: morin (500 μM), DAPI (10 μM) y blanco de calcofluor (20 μM) durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos, justo antes de ser observadas en el microscopio confocal.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AlCl₃ EN EL CRECIMIENTO CELULAR

Para conocer el efecto de 500 μM de AlCl₃ en el crecimiento celular de las suspensiones cultivadas en medios de cultivo modificados en la fuente de N total, fue necesario evaluar los parámetros tales como el pH y la conductividad eléctrica del medio de cultivo, el peso fresco y el peso seco del paquete celular, según la metodología mencionada en el apartado 3.2.1, en los días 13, 14, 15, 23, 24 y 25 del ciclo de cultivo.

Como se observa en la Figura 3.8, el valor de pH obtenido en los medios de cultivo de las suspensiones tratadas o no con AlCl₃ hasta por 25 días presentan diferentes valores entre sí. En la Figura 3.8A, se presentan los resultados en los días 13, 14 y 15 de evaluación, para los tres diferentes medios de cultivo en los que se cultivaron las suspensiones celulares, los cuales se encuentran en la fase exponencial de la curva de crecimiento del ciclo de cultivo, y en la Figura 3.8B se presentan los resultados para los tres medios de cultivo en los días 23, 24 y 25, los cuales se encuentran en la fase estacionaria de la curva de crecimiento correspondiente a las suspensiones celulares de *C. arabica* L. Se puede observar que en el día 13 de evaluación, las suspensiones que no se trataron con AlCl₃ mantuvieron el valor de pH entre 5 y 6, a diferencia de las que sí fueron tratadas con AlCl₃ en los medios testigo y el modificado con K, donde el valor de

pH disminuyó alrededor de 1.5 unidades. Por otro lado, en el medio MS + NO₃⁻, tanto para las suspensiones tratadas como sin tratar con 500 μM de AlCl₃ el valor de pH fue similar al obtenido en el medio control. En el día 14 de evaluación se presentaron valores de pH cercanos a 5 en los tres medios de cultivo de las suspensiones sin tratamiento, pero en sus respectivos tratamientos con AlCl₃, tanto en los medios MS como en el MS + K los valores de pH disminuyeron a 4.45, no así en el medio MS + NO₃⁻ el cual se mantuvo cercano a 5. En el día 15 de evaluación, en los tres medios de cultivo de las suspensiones que crecieron en ausencia de AlCl₃ se obtuvieron valores alrededor de 5.2, mientras que en las tratadas con AlCl₃ 500 μM se obtuvieron valores de pH cercanos a 4.7, con la diferencia que en el medio MS + NO₃⁻ se obtuvo un pH de 5.

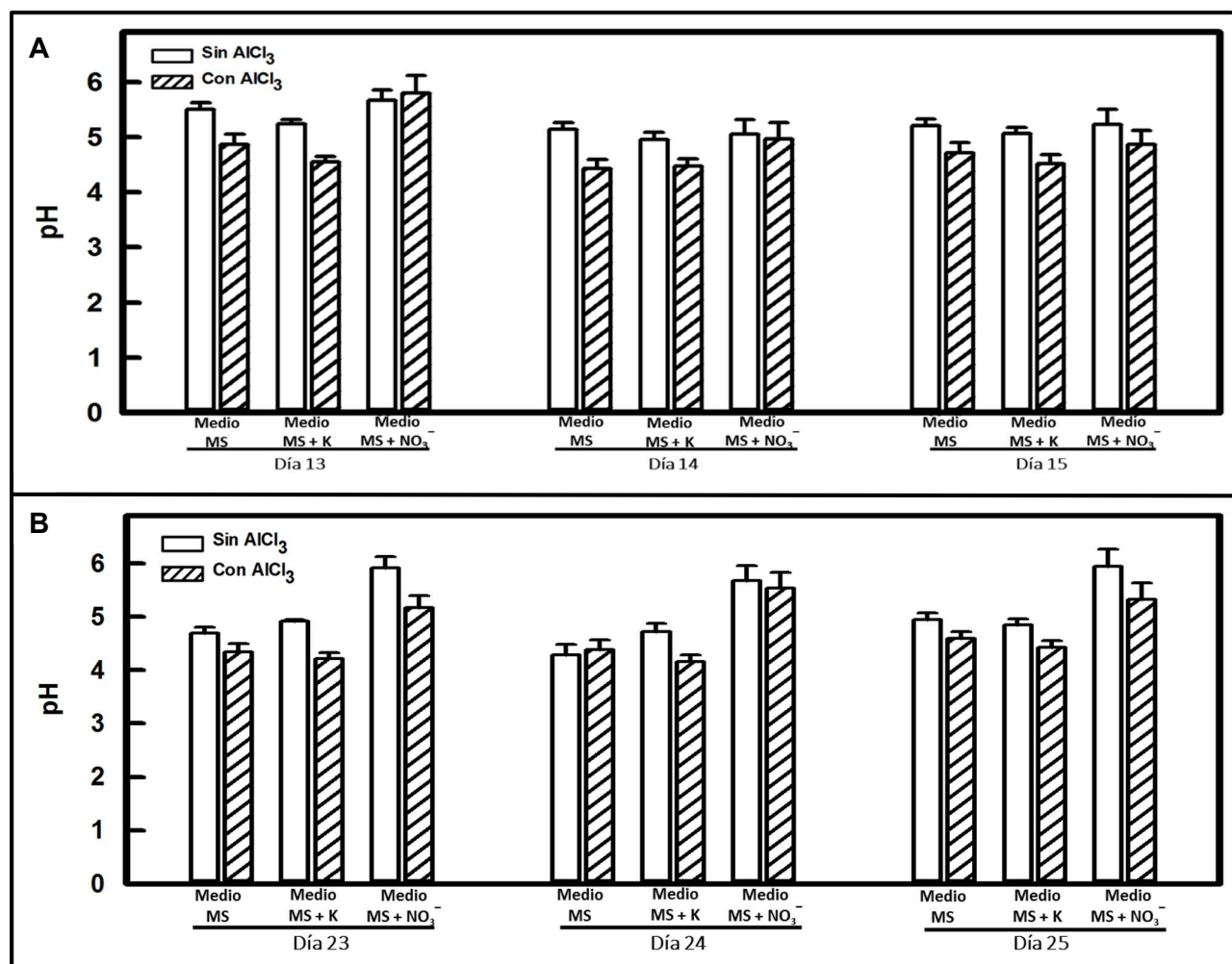


Figura 3.8 Efecto del AlCl₃ en el valor de pH en el medio de cultivo de las suspensiones de *C. arabica* L. evaluados en (A) etapa exponencial y (B) etapa estacionaria. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas ± SE.

Por otro lado, en la Figura 3.8B, se pueden observar los valores de pH para los tres medios de cultivo evaluados en la fase estacionaria, específicamente en los días 23, 24 y 25 de cultivo. Para el día 23, en el caso de los medios de cultivo de las suspensiones que crecieron en ausencia de AlCl_3 , tanto en el medio MS como el medio MS + K se obtuvieron valores de pH alrededor de 4.8, mientras que las que se desarrollaron en presencia de AlCl_3 obtuvieron valores alrededor de 4.3. En el medio MS + NO_3^- , el valor de pH de las suspensiones que crecieron sin AlCl_3 fue cercano a 6 y en el que sí tuvo tratamiento con AlCl_3 fue de 5.2, valores superiores a los obtenidos en los otros medios de cultivo evaluados.

Para los demás días evaluados, tanto para el día 24 como el día 25 de cultivo los resultados fueron similares a los mencionados anteriormente. En los medios MS y MS + K el pH fue inferior a 5, pero en el medio MS + NO_3^- el pH es muy cercano a 6, esto en el medio sin tratamiento, mientras que en el medio que sí tuvo tratamiento el pH llegó a 5.5, siendo estos valores menos ácidos en comparación con los mencionados para los otros medios evaluados.

En la Figura 3.9 se muestran los resultados para la conductividad eléctrica para los tres medios de cultivo evaluados, que fueron tratados o no con $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 por 25 días de evaluación.

En la Figura 3.9A se puede observar una clara diferencia en los valores obtenidos de conductividad entre los tres medios de cultivo evaluados, y es aún más marcada entre el medio testigo en comparación con los medios MS + K y MS + NO_3^- , ya que en estos últimos se obtuvieron valores de conductividad mayores en relación con el medio testigo. En el medio MS, en los días correspondientes a la fase exponencial (13, 14 y 15) los resultados para los medios de cultivo de las suspensiones cultivadas en ausencia de AlCl_3 obtuvieron valores alrededor de 1 mS y de 1.5 a 2.5 mS en los medios que estuvieron en presencia de AlCl_3 , que en este último caso fue aumentando gradualmente durante los días de evaluación mencionados anteriormente. La conductividad eléctrica para el medio MS + K en ausencia de AlCl_3 inició con 2.8 mS en el día 13, y se mantuvo cercano a este valor en los días 14 y 15, hasta que en el día 23 se evidencia un aumento a 4.6 mS, el valor más alto obtenido para los tres medios de cultivo evaluados. En el mismo medio, pero tratado con Al, el valor de la conductividad inició con un valor cercano a 3.5 mS, y se mantuvo con valores similares en el resto de días de evaluación.

Para el caso del medio MS + NO₃⁻ existió una marcada diferencia en los valores iniciales de conductividad eléctrica entre el medio que no fue tratado y el que sí fue tratado con AlCl₃ para los días 13, 14 y 15. En este sentido, en el medio MS + NO₃⁻ de las suspensiones sin tratamiento, el resultado obtenido en el día 13 de evaluación fue de 2.1 mS, y se mantuvo cercano a este valor en los días 14 y 15, pero, al evaluar en los días de la fase estacionaria, específicamente en el día 23, presentó un aumento, y llegó a 3.5 mS. De igual manera, este comportamiento se mantuvo en los dos días restantes evaluados, mientras que en el medio con tratamiento con Al se obtuvieron valores variables a lo largo de los días de exposición, los cuales iniciaron con 3.7 mS en el día 13, luego se presentaron valores fluctuantes entre 3.5 mS y 2.7 mS hasta el día 24, y en el día 25 de evaluación se obtuvo el valor más alto, el cual fue de 4 mS.

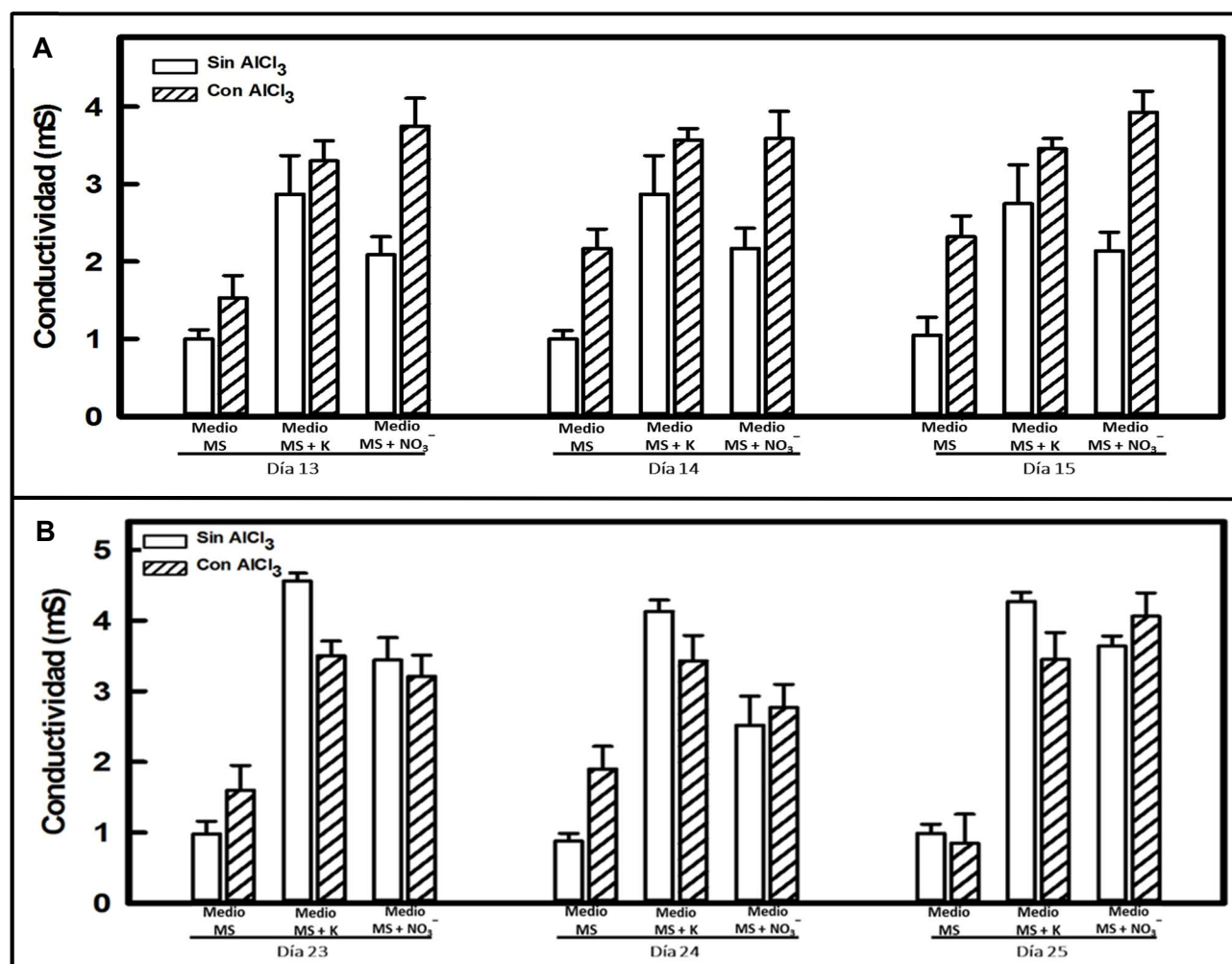


Figura 3.9 Efecto del AlCl₃ en la conductividad eléctrica en el medio de cultivo de las suspensiones de *C. arabica* L. Evaluados en (A) etapa exponencial y (B) etapa estacionaria. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

Al evaluar el crecimiento celular, entre los parámetros más importantes se encuentran el peso fresco y el peso seco del paquete celular, ya que al conocer la masa obtenida para este caso en particular es posible determinar el efecto en el crecimiento de la fuente de N ante la toxicidad por Al en nuestro modelo de estudio.

En la Figura 3.10 se muestran los valores obtenidos de peso fresco de las células para cada medio de cultivo en los diferentes días de crecimiento evaluados.

En la Figura 3.10A, se presentan los resultados en los días de la etapa exponencial de la curva de crecimiento de las suspensiones celulares y se observan marcadas diferencias entre los medios de cultivo sin tratamiento y sus respectivos tratamientos con AlCl_3 , donde los pesos de las masas celulares de las suspensiones celulares sin tratamiento

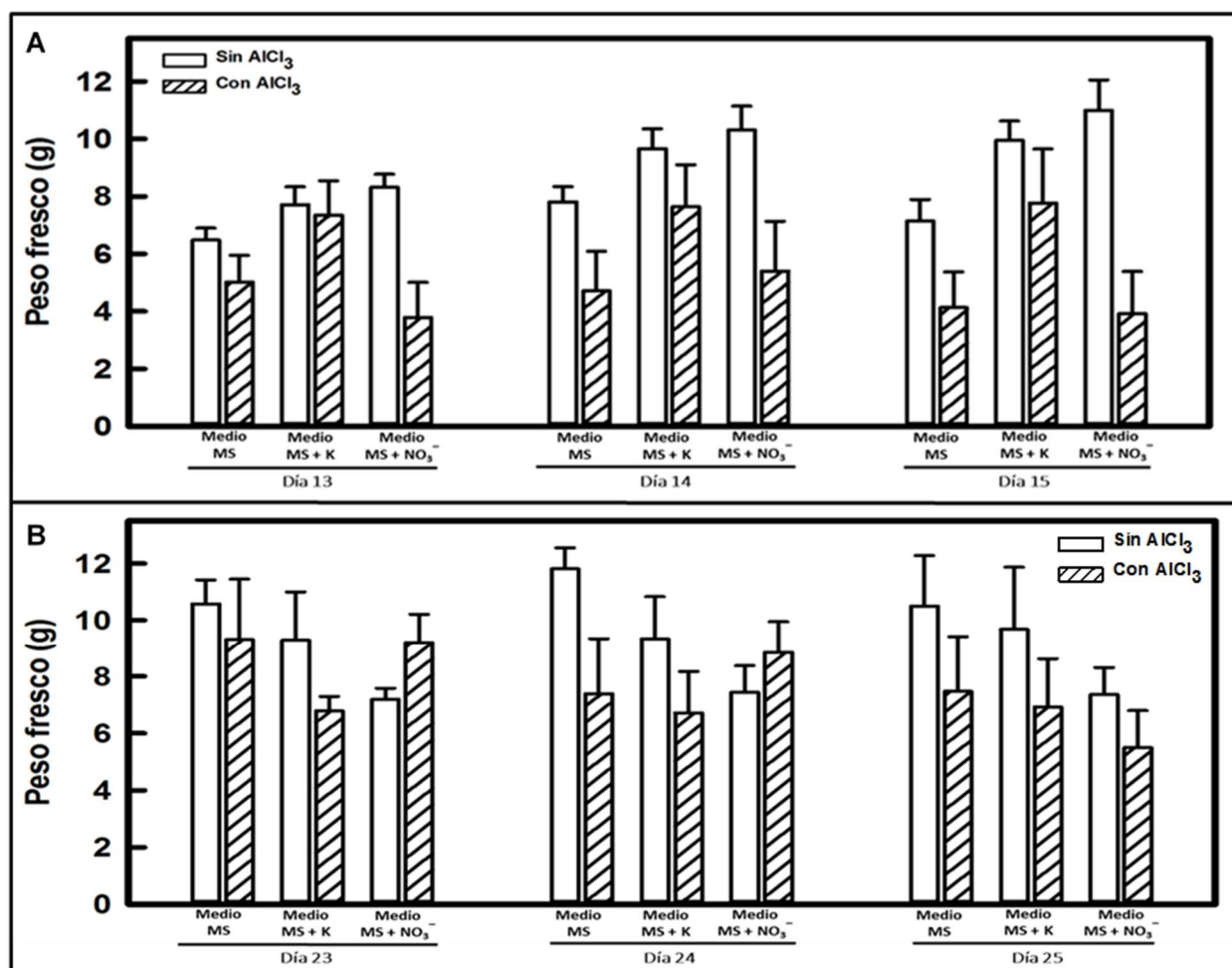


Figura 3.10 Efecto del AlCl_3 en el peso fresco de las suspensiones de *C. arabica* L. Evaluado en (A) etapa exponencial y (B) etapa estacionaria. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

aumentaron durante el transcurso de la evaluación, y se obtuvo el mayor peso en fresco en el paquete celular de las suspensiones cultivadas en el medio $MS + NO_3^-$, el cual se acercó a 11 g en el día 15. También se puede apreciar como las suspensiones que sí fueron tratadas con $AlCl_3$ disminuyeron su crecimiento en comparación con el testigo, el cual disminuyó hasta en un 50%, como es el caso de las suspensiones cultivadas en el medio de cultivo ($MS + NO_3^-$), el cual en el día 15 de evaluación su peso en fresco fue cercano a 4 g.

Para el caso de los resultados obtenidos en los días ubicados en la fase estacionaria los resultados varían según el medio de cultivo y su respectivo tratamiento. En estos días de evaluación, como se aprecia en la Figura 3.10B los pesos obtenidos en los tres medios de cultivo disminuyeron conforme avanzaron los días de evaluación. Es importante destacar que en los medios de cultivo MS y $MS + K$ el efecto en el crecimiento en las suspensiones celulares que se trataron con $AlCl_3$ se afectaron entre un 30 y 50% en comparación con su testigo, mientras que en el medio $MS + NO_3^-$ en el día 23 y 24 de evaluación se obtuvieron pesos superiores en las suspensiones tratadas en comparación con las no tratadas, donde las diferencias son de hasta 2 g entre el testigo y el tratamiento. En el día 25 de evaluación, en los tres medios de cultivo, el peso fresco en las suspensiones que fueron tratadas con $AlCl_3$ se vieron afectadas entre un 20 y 30% con respecto al testigo, que en este caso, en las células cultivadas en el medio MS se obtuvieron pesos de 10.5 g, seguido de las suspensiones que crecieron en el medio $MS + K$, con 9.7 g, y por último las suspensiones crecidas en el medio $MS + NO_3^-$ con 7.4 g; mientras que las que fueron tratadas con $AlCl_3$ obtuvieron pesos de 7.5 g, 7 g y 5.5 g respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, se evaluó el peso seco (Figura 3.11), como el parámetro del crecimiento celular en donde se ha extraído el exceso de líquido, por lo que se considera que es una mejor estimación del crecimiento del paquete celular. Para este caso en particular, es la misma muestra que se obtuvo para peso fresco, pero se eliminó el exceso de agua por medio del proceso de liofilización.

En las suspensiones celulares cultivadas en los tres distintos medios de cultivo y evaluadas en los días de la etapa exponencial (Figura 3.11A) se puede observar como los pesos en seco de las suspensiones que no fueron tratadas con Al se mantuvieron, para el caso de las que fueron cultivadas en el medio MS, alrededor de 0.35 g en los

días 13, 14 y 15, y las que sí fueron tratadas se obtuvieron pesos alrededor de 1.5 g en los mismos días de evaluación. Para las suspensiones que se cultivaron en el medio MS + K los pesos en los mismos días de evaluación fueron alrededor de 0.4 g y los tratados fueron alrededor de 0.3 g, mientras que para las que se cultivaron en el medio MS + NO₃⁻ fueron diferentes con respecto a las que se cultivaron en los otros medios de

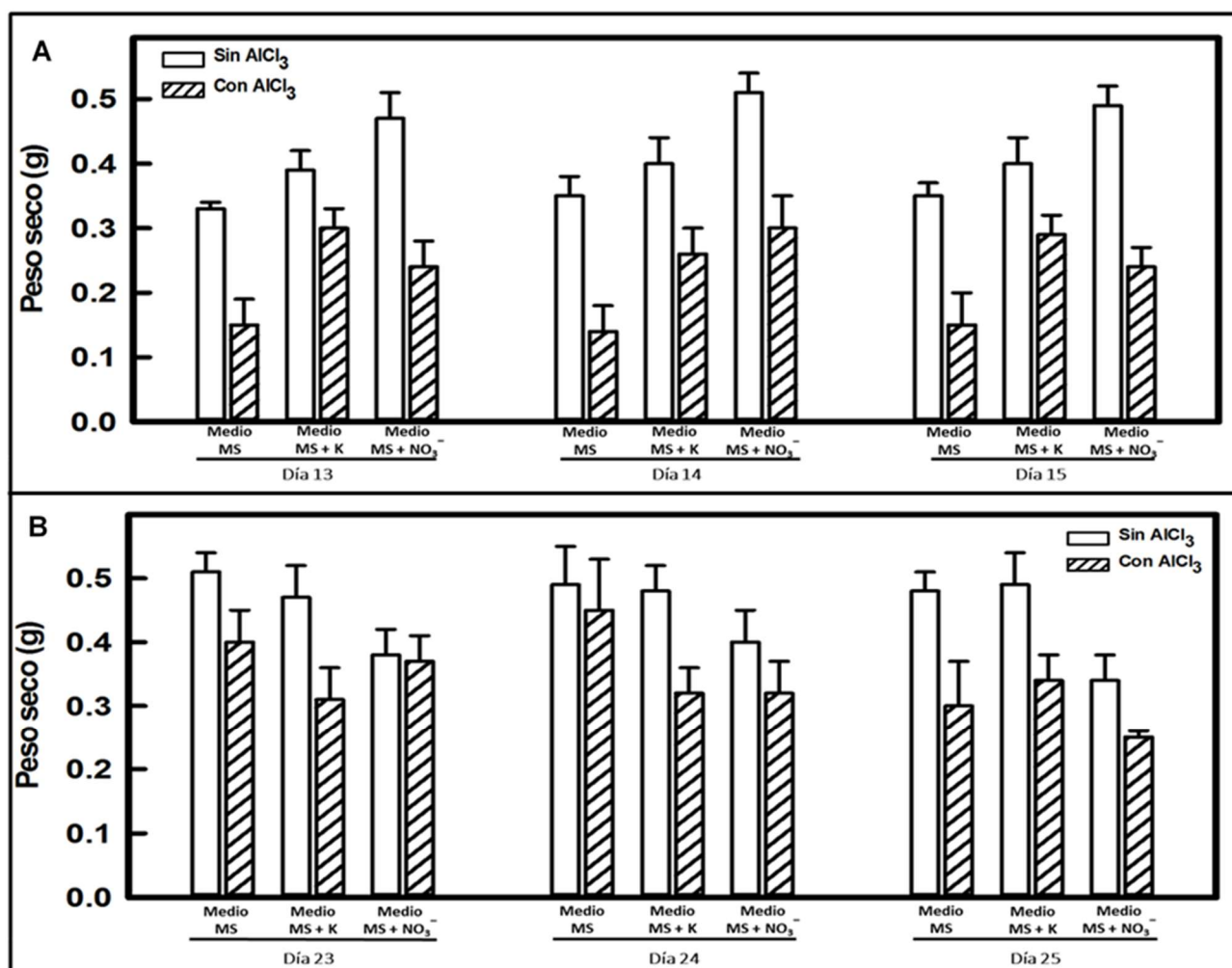


Figura 3.11 Efecto del AlCl₃ en el peso seco de las suspensiones de *C. arabica* L. Evaluados en (A) etapa exponencial y (B) etapa estacionaria. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas ± SE.

Por otro lado, en la Figura 3.11B, donde se encuentran los días 23, 24 y 25 de cultivo, las diferencias varían tanto entre los medios de cultivo control como en sus respectivos tratamientos. Llama la atención como los mayores valores en peso seco fueron los obtenidos en el medio MS y el medio MS + K sin tratamientos en estos días evaluados, ya que se obtuvieron valores cercanos a 0.5 g, no así para las suspensiones cultivadas

en el medio MS + NO₃⁻, ya que en los mismos días de evaluación los pesos obtenidos son de 0.4 g.

Para las suspensiones celulares tratadas con 500 μM de AlCl₃ se vieron afectadas entre un 20 a un 30% en el crecimiento en los tres medios de cultivo, en los días de la etapa estacionaria evaluados, con excepción del día 23, que en el caso de las suspensiones que se cultivaron en el medio MS + NO₃⁻ los resultados obtenidos, tanto en presencia como en ausencia de tratamiento obtuvieron el mismo peso (0.35 g).

3.4.2 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE Al

3.4.2.1 Al TOTAL

La determinación del Al total en este modelo de estudio, modificado en la fuente nitrogenada, nos permite evaluar cómo esta fuente de N inorgánico afecta la disponibilidad del Al en las suspensiones celulares de café, las cuales fueron tratadas durante una hora con 500 μM de AlCl₃.

Como se muestra en la Figura 3.12A, el contenido de Al total en las células cultivadas en los diferentes medios de cultivo fue similar entre ellos, donde se obtuvo alrededor de 4.5 μmol por gramo de células en las que se trataron con 500 μM de AlCl₃, mientras que en las que no se trataron no fue detectable.

Por otro lado, el contenido de Al total en los medios de cultivo (Figura 3.12B), que se determinó luego del tratamiento con 500 μM de AlCl₃, evidenció cambios entre los distintos medios de cultivo evaluados. En el medio testigo, en el que no se trató con Al, el contenido de Al total no fue detectable, mientras que en el que sí se trató con Al se obtuvo 0.15 μmol en 25 mL de medio de cultivo. En el medio MS + K, de igual forma que en el testigo, no se detectaron niveles de Al total en el medio que tuvo tratamiento con Al pero en el que sí se trató se obtuvo 0.19 μmol por 25 mL de medio de cultivo, el valor más alto obtenido en este experimento. Y por último, cabe resaltar que en el medio MS + NO₃⁻, tanto en el medio sin tratamiento como con tratamiento con 500 μM de AlCl₃ no se detectaron niveles algunos de Al total, notándose la amplia diferencia entre los valores obtenidos en la Figura 3.12B.

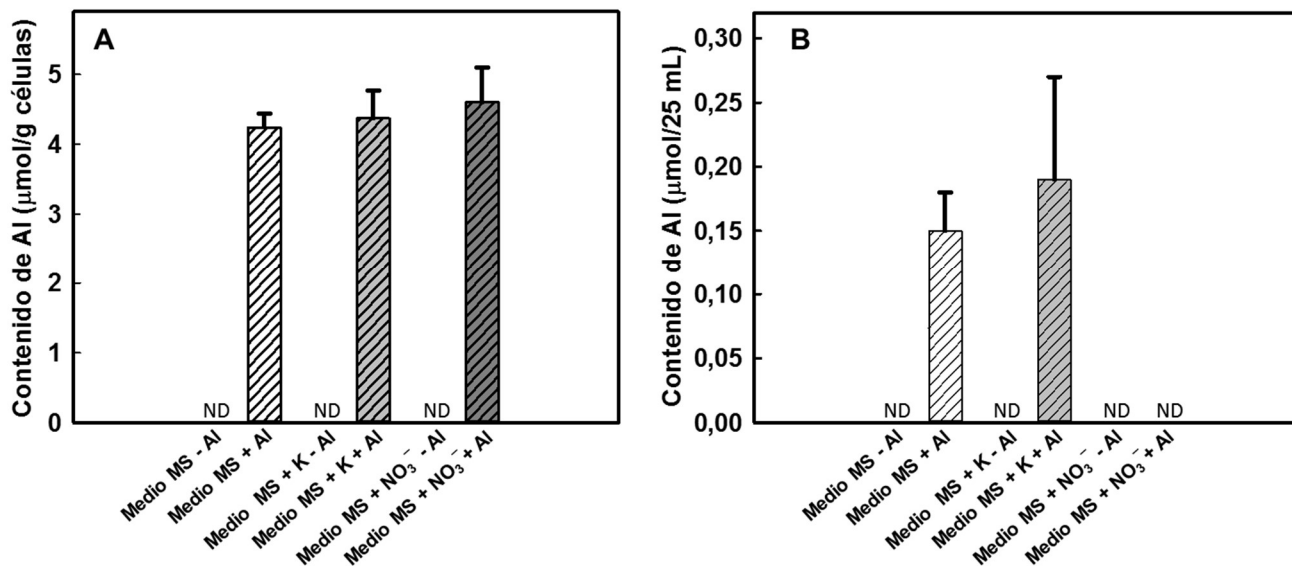


Figura 3.12 Determinación de la concentración de Al total en las suspensiones celulares, de *C. arabica* L. en tres distintos medios de cultivo tratadas o no con 500 µM de AlCl₃. Resultados obtenidos en (A) células y (B) medios de cultivo. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas ± SE.

3.4.2.2 CONTENIDO DE Al³⁺ LIBRE EN EL MEDIO DE CULTIVO

En la Figura 3.13 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de Al libre en el medio de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L., de 14 días de cultivo, tratadas o no por una hora con 500 µM de AlCl₃.

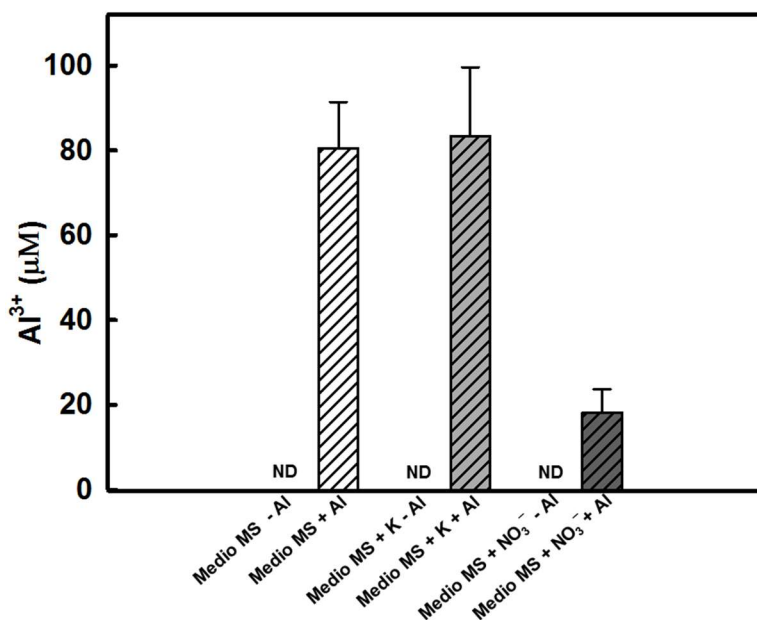


Figura 3.13 Determinación de la concentración de Al libre. Suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de crecimiento en los tres distintos medios de cultivo tratadas o no con 500 µM de AlCl₃. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas ± SE.

Las suspensiones al incubarlas tanto en el medio MS como en el medio MS + K y luego de tratarlas con 500 μM de AlCl_3 por una hora presentaron valores similares de Al libre, 80 μM aproximadamente, mientras que para el medio MS + NO_3^- , la concentración de Al^{3+} es considerablemente menor, cercano a 60 veces menos con referencia al testigo, llegando a 20 μM , lo que quiere decir que existe una disminución de aproximadamente un 75% en el contenido de Al libre en el medio MS + NO_3^- , en relación con los medios MS y MS + K.

3.5 LOCALIZACIÓN DE Al^{3+} INTRACELULAR

La visualización de la presencia del Al^{3+} se realizó en células de 14 días de cultivo en los tres medios evaluados, mediante el uso de los fluoróforos específicos (morin, DAPI y blanco de calcofluor), donde fue necesario establecer las condiciones adecuadas para este modelo de estudio.

En la Figura 3.14 se muestran las micrografías obtenidas en las observaciones realizadas por microscopía confocal.

Como se puede apreciar en las micrografías, es posible identificar, en el campo claro (Figura 3.14A), la integridad de las células observadas y su apariencia adecuada para evaluar tanto la presencia como el efecto del Al intracelular. Es de esta forma que se puede afirmar que en las suspensiones de los tres medios de cultivo que no se trataron con Al presentaron una buena apariencia, con adecuada turgencia, con los límites de la pared celular con buen aspecto y un óptimo desarrollo durante el transcurso del experimento; pero en las tratadas con Al se empiezan a notar diferencias entre las células cultivadas en los distintos medios de cultivo evaluados, observando posible formación de pequeñas vesículas en el citosol y pérdida de turgencia.

En la Figura 3.14B es posible identificar y diferenciar los núcleos y la pared celular de las células evaluadas, ya que se utilizaron los fluorocromos DAPI y blanco de calcofluor para poder distinguir estos componentes. Como se puede observar en las micrografías mencionadas anteriormente (Figura 3.14A) es posible notar algunas diferencias entre las células tratadas y sin tratar con AlCl_3 , como por ejemplo, en las células cultivadas en el medio MS, en la micrografía sin tratamiento es posible observar definida la pared celular y se identifica claramente el núcleo, mientras que en la micrografía de la célula donde sí existió tratamiento con Al se nota un doblés en la pared celular, indicando la posible

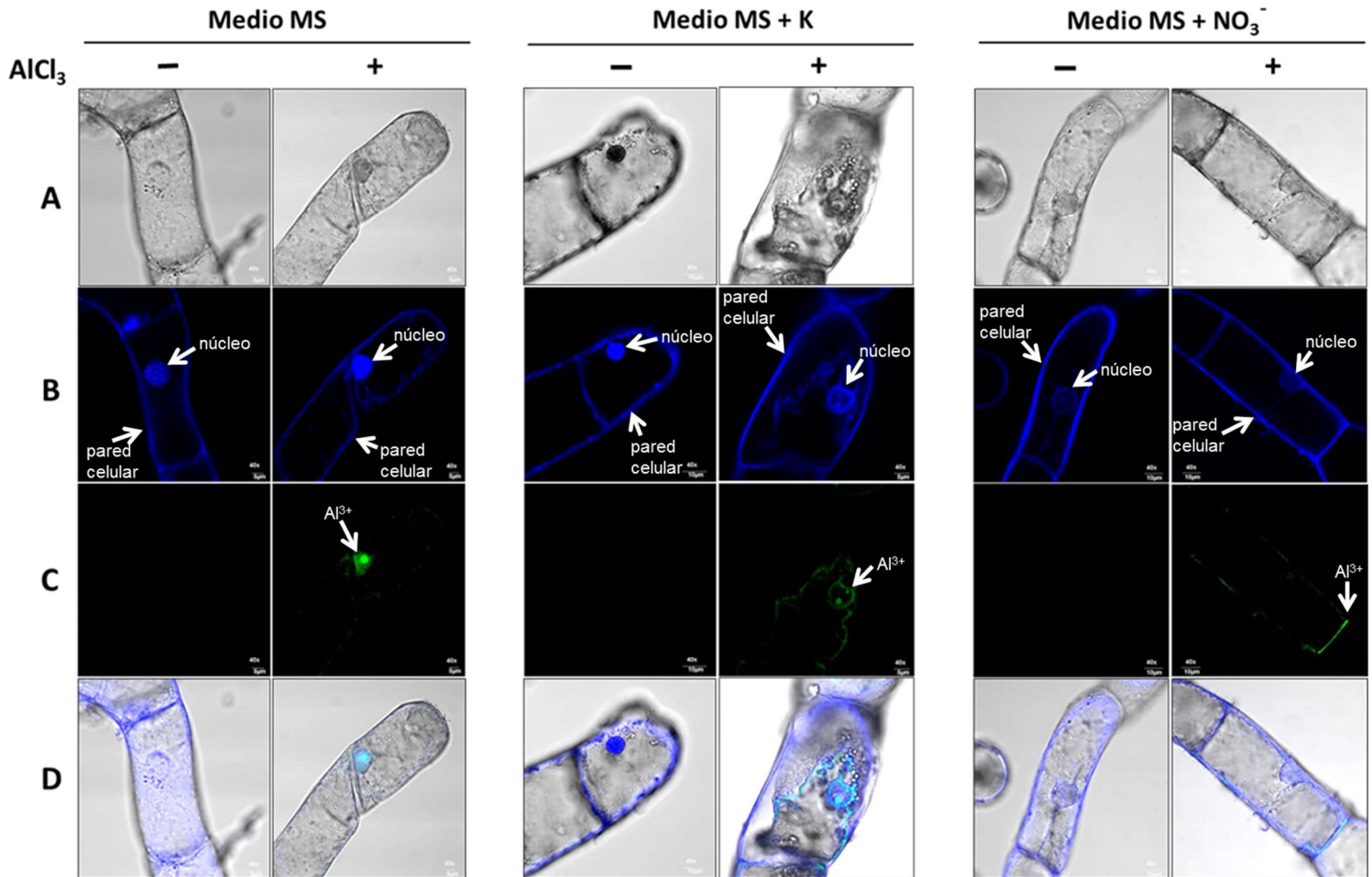


Figura 3.14 Localización intracelular de Al^{3+} . Suspensiones celulares de 14 días de cultivo en los medios MS, MS + K y MS + NO_3^- tratadas (+) o no (-) con $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 durante una hora y observadas al microscopio confocal. (A) morfología de las células en campo claro, (B) células incubadas con blanco de calcofluor y con DAPI, (C) células incubadas con morin y (D) co-localización.

pérdida de turgencia provocada por la exposición al Al. En las micrografías de las células cultivadas en el medio MS + K es posible notar un engrosamiento en la pared celular tanto en las células sin tratamiento como las que tuvieron tratamiento con Al, pero intracelularmente se puede apreciar perfectamente el núcleo, sugiriendo que los componentes del medio de cultivo, y posiblemente la modificación en la concentración de K esté contribuyendo en estas características que en las células cultivadas en el medio testigo no se observaron. Cabe mencionar además que en la micrografía de la célula cultivada en este mismo medio pero que fue tratada con Al se nota el posible desprendimiento de la membrana, ya que se puede observar que en el citosol se contienen restos de pared o membranas que con el blanco de calcofluor emiten señal, indicando que pudo haber sido provocado por la presencia del Al durante el tratamiento.

Para el caso de las células cultivadas en el medio MS + NO₃⁻ se puede observar como en la micrografía de la célula sin exponer al Al como la que sí tiene tratamiento con Al muestran integridad, tanto en la pared celular como en el núcleo al utilizar el blanco de calcofluor y el DAPI respectivamente, sugiriendo que posiblemente sea la modificación en el contenido de N total de este medio de cultivo el que esté favoreciendo a las células ante los efectos del AlCl₃.

En la Figura 3.14C, donde se identifica al Al³⁺ intracelular por medio del uso de morin, fue posible identificar algunas diferencias muy marcadas entre las células cultivadas en los diferentes medios modificados y entre las que tienen tratamiento de 500 μM de AlCl₃ y las que no lo tienen.

En la micrografía de la célula de las suspensiones celulares del medio MS sin tratamiento con Al no se percibe ningún tipo de señal, pero en la que sí se trató con AlCl₃ se logra identificar el Al³⁺ ubicado en el núcleo, al compararla con la Figura 3.14B. Para el medio MS + K, de igual forma que en las células testigo no se percibe ninguna señal en la micrografía obtenida de la muestra sin tratamiento, pero la que si se trató con Al es posible notar al Al³⁺ en el nucleolo, alrededor del núcleo y en los posibles restos de tejidos de pared desprendidos que se mencionó anteriormente.

De manera diferente se logra observar las micrografías de las células obtenidas de las suspensiones cultivadas en el medio MS + NO₃⁻, ya que en la micrografía donde se presenta la célula con tratamiento con 500 μM de AlCl₃ no es posible observar ninguna señal de presencia de Al³⁺ en el área intracelular, únicamente se observa una leve señal de la presencia de esta forma de Al en algunas zonas de la pared celular, indicando el importante efecto de la modificación del medio de cultivo ante el efecto de los tratamientos con AlCl₃.

Por último, en la Figura 3.14D es posible ver y comparar la co-localización de todos los fluorocromos utilizados para las células de las suspensiones de cultivo desarrolladas en los diferentes medios evaluados.

3.6 DISCUSIÓN

La toxicidad por Al es una de las mayores limitantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas que se encuentran en suelos de condición ácida (Grevinstuk y Romano, 2013), mientras que el N es un elemento de suma importancia para las plantas y los cultivos en general, el cual está disponible en suelos agrícolas como un macronutriente en las formas inorgánicas del mismo, como lo son el nitrato y el amonio (Krapp, 2015).

En la actualidad, se estima que aproximadamente la mitad de las tierras cultivables y con gran potencial para la producción de alimentos y biomasa son acidificados, es decir, están sujetos a toxicidad por el aluminio (Kochian *et al.*, 2004).

De esta manera, en el presente capítulo se evaluaron ambos elementos, tanto el Al como el N, en el modelo de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Se tiene reportes que el Al, en altas concentraciones, afecta el crecimiento al interferir en procesos metabólicos en la parte radical de las plantas. A nivel celular, esto da lugar a alteraciones de los procesos fisiológicos y bioquímicos y, por consiguiente, su productividad (Meriño-Gergichevich *et al.*, 2010). En este capítulo se observó que el AlCl_3 a una dosis de 500 μM afectó entre un 40 y un 50% el crecimiento celular (Figura 3.10 y 3.11), específicamente en la etapa estacionaria de evaluación para ambos parámetros.

Es importante resaltar que en el medio de cultivo que fue modificado con nitrato ($\text{MS} + \text{NO}_3^-$), durante 25 días de evaluación, el efecto por Al disminuyó considerablemente (Figura 3.11B). Como se puede observar en el día 23, no se evidencia diferencia en el peso seco de las células cultivadas en el medio modificado con nitrato como fuente de N total sin tratamiento con Al y las que se cultivaron de la misma forma, pero tratadas con 500 μM de AlCl_3 .

Como lo indican Krapp y colaboradores (2014), la asimilación de nitrato en plantas completas provee modificaciones en la arquitectura de las raíces de los cultivos y optimiza también la asimilación y el transporte, mejorando a su vez el metabolismo. De hecho, el nitrato, además de ser un nutriente, es una importante molécula de señalización.

Esto podría explicar los resultados obtenidos en este capítulo, ya que en el medio de cultivo donde se modificó la fuente de N total por únicamente nitrato (medio de cultivo MS + NO₃⁻), presentó variaciones en todos los parámetros evaluados en comparación con el medio MS y el medio de cultivo MS + K.

Además, tomando en cuenta los valores de pH obtenidos en las evaluaciones de los tres medios de cultivo, los resultados para el medio MS + NO₃⁻ fueron un tanto alcalinos en relación con los obtenidos en los otros medios de cultivo, lo cual puede provocar una disminución en el efecto del Al³⁺ en las muestras tratadas, ya que se conoce que a pH ácidos este metal se hace disponible en el medio en el que se encuentre, y al no encontrarse esta condición no causa el efecto de toxicidad esperado (Ryan *et al.*, 2011).

La fuente de N puede provocar cambios importantes en las plantas, y a nivel celular este efecto puede percibirse en cuestión de minutos, donde pueden existir cambios en la expresión de más de 1000 genes que se pueden involucrar hasta en la misma asimilación de nitrato (Krapp, 2015), así como en la regulación de la expresión de muchas proteínas que requieren ser usadas por la planta (transportadores de nitrato y enzimas para su asimilación, entre otros) (Krapp *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido que los transportadores de NO₃⁻, NRT1.1 y NRT2.1 podrían actuar como sensores del NO₃⁻ (Celis-Arámburo *et al.*, 2011), que para este caso podrían estar activándose de sobremanera, precisamente en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. cultivadas en el medio modificado con nitrato y así, desencadenar la disminución en el efecto en la toxicidad por Al.

Como se evidencia en la Figura 3.12, el contenido de Al total, tanto en células como en los medios de cultivo, presentó valores mayores en las suspensiones celulares cultivadas en el medio MS y en el medio MS + K, que en el medio de cultivo MS + NO₃⁻, existiendo una marcada disminución en el contenido de Al total en las suspensiones que fueron cultivadas en el medio de cultivo MS + NO₃⁻. Este resultado se puede relacionar con los datos obtenidos en el efecto en el crecimiento, donde se evidencia que a mayor acumulación de Al total, menor es el crecimiento celular, tanto para peso fresco (Figura 3.10) como para peso seco (Figura 3.11).

De igual manera, estos resultados pueden ser apoyados con los datos obtenidos en el contenido de Al libre (Figura 3.13), recordando que esta es la forma de Al que se

encuentra disponible para las suspensiones y que provoca la fitotoxicidad. Para esta evaluación los datos obtenidos son congruentes con los obtenidos en el peso fresco y en el peso seco, al evidenciar, con respecto al medio MS y al medio MS + K, diferencias marcadas en el contenido de Al^{3+} en el medio de cultivo, y en el medio modificado con nitrato ($\text{MS} + \text{NO}_3^-$), luego de ser tratados con $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 . Tal resultado puede sugerir que el óptimo crecimiento en las células cultivadas en el medio que utilizó al nitrato como fuente de N total puede estar beneficiando, aunque esté siendo expuesto a tratamientos con Al.

Se han realizado estudios en el cultivo de trigo (*Triticum* sp) donde se evidencia que algunos metales pesados como Co, Cu, Mo, Ni, Zn, Pb, Cd y As aumentan su concentración en la rizosfera luego de realizar fertilizaciones con los macronutrientes, entre ellos el N, lo cual provoca fitotoxicidad en los cultivos expuestos a estas áreas (Wuana y Okieimen, 2011). Esto a su vez puede ser confirmado por otro estudio también realizado en trigo (*Triticum bicolor*), el cual relaciona el cambio en el valor del pH de la rizosfera por la adición de elementos fertilizantes y la disponibilidad de metales pesados, los cuales aumentan su concentración al disminuir el pH en la solución del suelo, afectando la integridad radical del cultivo y el óptimo desarrollo del mismo, así como su productividad (Atafar *et al.*, 2008).

Lo anterior puede relacionarse con el resultado presentado en la Figura 3.8, donde al evaluar el valor de pH en los medios modificados con N aumentaron alrededor de un 20% en relación al testigo en la fase estacionaria del cultivo, y aunado a esto, el resultado en la concentración del Al^{3+} en el medio de cultivo modificado con NO_3^- (Figura 3.13) es 60 veces menor en relación con el medio testigo, lo que puede sugerir que la fuente nitrogenada, en este caso el NO_3^- provocó cambios en el valor del pH y este a su vez provocó un efecto en la concentración del Al^{3+} en el medio de cultivo, presentando el efecto inverso al presentado por los autores, el cual sería la disminución de la disponibilidad de este metal en dicha evaluación.

Como se puede apreciar en la Figura 3.14, en las micrografías obtenidas utilizando microscopía confocal, el Al^{3+} es fácilmente perceptible en las suspensiones cultivadas en los diferentes medios evaluados y además se pueden ver claras diferencias en el efecto que provocó la composición del medio de cultivo cuando las células fueron expuestas a AlCl_3 . En las suspensiones de 14 días de cultivo y expuestas a $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 durante

una hora, tanto en el medio MS como en el medio MS + K fue posible encontrar Al^{3+} intracelular, específicamente en el núcleo, confirmando su localización al comparar las micrografías obtenidas con DAPI, fluorocromo específico para la identificación de este organelo. En las células cultivadas también por 14 días en el medio modificado con NO_3^- (medio MS + NO_3^-) no se percibe la misma señal del Al^{3+} intracelular, únicamente se aprecia la presencia de este metal a nivel de pared celular, notándose como se acumula en esta parte de la célula, pero no logró internalizar. Posiblemente por este motivo las células en este tratamiento se aprecian íntegras y de buen aspecto, a pesar de que fueron expuestas a 500 μM de AlCl_3 .

En otros modelos de estudio, como en plantas de maíz (*Zea mays*) (Plett *et al.*, 2016) se evidencia como la fuente de N inorgánico mejora la utilización de este macronutriente. Celis-Arámburo y colaboradores (2011), sugieren que la vigorosidad mostrada en las plantas cultivadas con fuentes nitrogenadas es debido a la disminución en los efectos por estrés abiótico, entre ellos el estrés por Al, ya que parece estar mediado por señales derivadas del estado de N a nivel interno, desencadenando en un proceso inhibitorio.

CAPÍTULO IV

EFECTO DEL Al EN EL CONTENIDO DE NITRATOS Y EN EL PERFIL PROTEICO EN EL MODELO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *C.arabica* L.

4.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas en el modelo de estudio de suspensiones celulares de *C. arabica* L. y de cómo el Al puede provocar cambios bioquímicos cuando se utilizan diferentes medios de cultivo, evaluando el perfil proteico y el contenido total de nitratos en este modelo de estudio cultivado en tres medios diferentes.

El N es un elemento de suma importancia para las plantas y es requerido en grandes cantidades ya que representa entre el 1 y el 6% del peso de la mayoría de los cultivos, y forma parte de proteínas, ácidos nucleicos y de la mayoría de metabolitos secundarios involucrados en el metabolismo y crecimiento de las plantas (Patterson *et al.*, 2010), y bajo condiciones de suficiente N disponible las células vegetales pueden almacenar hasta 100 mM de NO_3^- en la vacuola (Mitra, 2015).

Las plantas deben sintetizar los aminoácidos que requieren tanto para el metabolismo primario (síntesis de proteínas) como para el metabolismo secundario, y esta síntesis de aminoácidos utiliza una gran parte de N asimilado, pues estos funcionan como precursores de las mismas proteínas y de muchos otros compuestos especializados (Buchanan *et al.*, 2015).

Factores abióticos como la presencia del Al afectan negativamente a las plantas, especialmente las más sensibles. Sin embargo, los estudios que implican al metabolismo del N sometido a estrés por Al^{3+} son incipientes (Castro de Souza *et al.*, 2016). Se conoce que el aluminio puede causar efectos nocivos en la asimilación de nitrógeno en las plantas (Pal'ove-Balang y Mistrik, 2011). Esto provoca una reducción en la concentración de nitrato en presencia de Al (Souza *et al.*, 2014). Por lo tanto, altas concentraciones de este elemento causan alteraciones en el proceso bioquímico del nitrógeno, que como se mencionó, se considera importante en el óptimo desarrollo de los cultivos (Castro de Souza *et al.*, 2016).

En el presente capítulo se muestran algunas determinaciones bioquímicas, como lo son el perfil proteico y el contenido total de NO_3^- , con el fin de conocer el efecto del Al en las suspensiones celulares cultivadas en tres medios de cultivo diferentes y modificados en la fuente de N total.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 TRATAMIENTOS

Para llevar a cabo estas determinaciones el protocolo se realizó de la misma manera como se indica en el apartado 3.2.1 de este documento, donde las evaluaciones se llevaron a cabo en el día siete ó 14 de cultivo, según cada caso.

Luego, las suspensiones se separaron del medio de cultivo por filtración al vacío y se continuó el protocolo como se especifica en el apartado 3.2.2 de este documento.

4.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las células obtenidas y congeladas en N_2 líquido, se maceraron con mortero de porcelana y pistilo hasta obtener un polvo fino al que se le añadió amortiguador de extracción conformado por Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 50 Mm, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM, glicerol 10% v/v, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 0.2 mM, DDT 0.5 M, PMSF 1 mM; en una relación de 2 mL por 1 gramo de peso fresco de células, las cuales se homogenizaron con un politrón durante un minuto en baño de hielo para evitar la degradación de las proteínas. Una vez homogenizadas las células maceradas y el amortiguador, se centrifugaron a 20100 xg por 30 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante.

La cuantificación de proteínas en los extractos se realizó por el método de Bradford (1976), el cual se considera como un método estable, rápido y sencillo para la determinación de proteínas. El método consiste en el cambio de color del colorante azul de Coomassie brilliant blue G-250 que forma un complejo al unirse a las proteínas en solución, provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante a 595 nm, el cual se midió en un espectrofotómetro. El colorante se une principalmente a residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina (Olson, 2016).

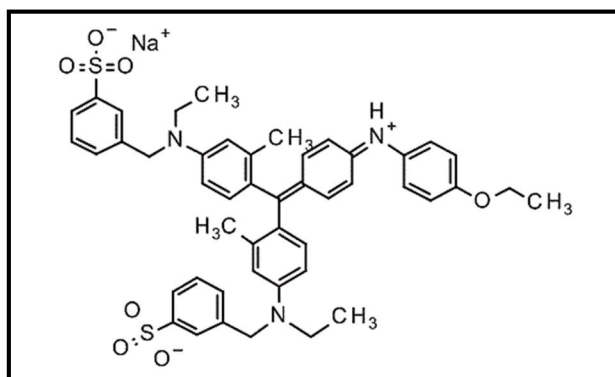


Figura 4.1 Estructura química del azul de Coomassie G 250 (Tomado de Olson y Markwell, 2007).

Se realizó una curva estándar de proteínas utilizando albúmina de suero bovino (BSA) (Figura 4.2). Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones de BSA para el trazado de la curva de calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9982$) lo que indica la precisión en la preparación y dilución de los patrones utilizados.

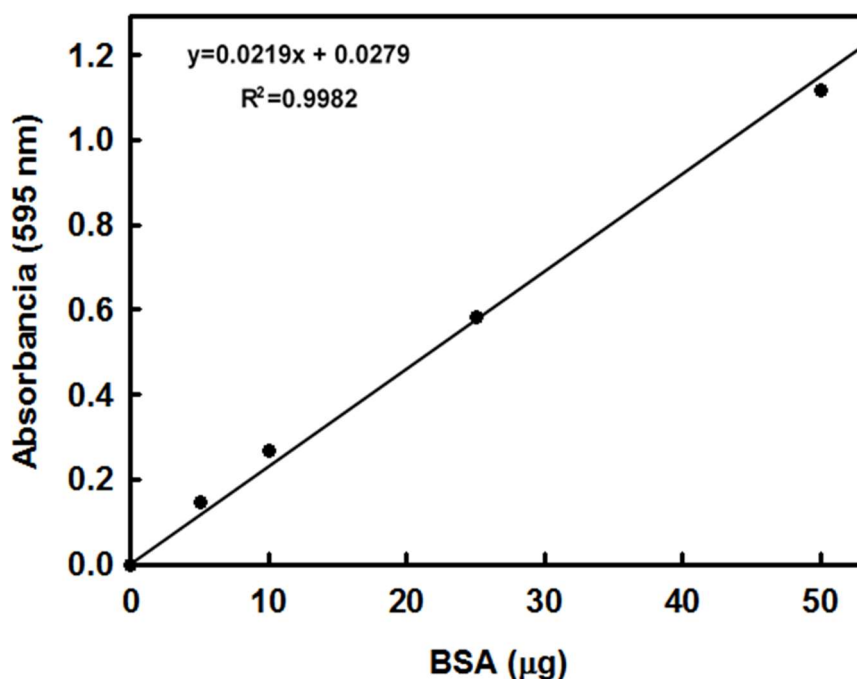


Figura 4.2 Curva estándar de la concentración de proteínas. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La absorbancia de las muestras se midió en el espectro de luz ultravioleta a 595 nm. En la curva se indicó la ecuación de la recta de calibrado (y) y el coeficiente de determinación (R^2). El resultado es el promedio de tres experimentos por duplicado.

4.2.3 PERFIL PROTEICO

Las proteínas presentes en los extractos totales se separaron por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida, de acuerdo con Laemmli (1970), con algunas modificaciones. Se utilizó el sistema de mini geles de BioRad, con geles de 1 mm de espesor con dos fases. La fase inferior de separación formada por el tampón Tris-HCl 0.75 M pH 8.8 + 0.2% SDS, acrilamida/bisacrilamida 15%, TEMED y persulfato de amonio 10%; y la fase superior de concentración formada por el tampón Tris-HCl 0.25 M pH 6.8 + 0.2% SDS, acrilamida/bisacrilamida 4%, TEMED y persulfato de amonio al 10%. 50 µg de la muestra proteica se mezclaron con la solución de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.01% y β-mercaptoetanol 2%, y se calentaron durante 5 min a 95°C antes de ser cargadas en el gel.

Para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas en la corrida del gel se utilizó un marcador de peso molecular marca BioRad.

La separación electroforética se realizó utilizando el amortiguador Tris-glicina 0.33 M pH 8.3, aplicando una intensidad de corriente de 80 mA en los primeros 20 min hasta notar las muestras cargadas en los pozos totalmente alineadas y luego se incrementó a 120 mA hasta terminar la corrida del gel.

Una vez concluida la corrida del gel, este se tiñó con una solución de Coomassie R-250 al 0.1%, diluido en 50% de metanol y 10% de ácido acético. Luego de la hora el gel se cambió a una solución que contenía 40% metanol y 10% ácido acético para desteñir el exceso y obtener bandas azules en un fondo transparente.

4.2.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE NITRATO

Para la determinación del contenido de NO_3^- en los extractos celulares obtenidos en el apartado 4.2.2 se siguió el protocolo sugerido por Cawse (1967). Se tomaron 10 µL de muestra y se adicionaron 1.49 mL de agua destilada en tubos de ensayo. Luego se agregó 0.1 mL de ácido sulfámico al 20%, se mezcló y se dejó reposar por 2 minutos. Después de transcurrido el tiempo de reposo se adicionaron 0.4 mL de ácido perclórico al 10%, se mezcló nuevamente y se midió la absorbancia inmediatamente en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 210 nm.

Para llevar a cabo la curva estándar de NO_3^- se utilizó una solución de KNO_3 de 1 mg/mL en un rango de 0 a 20 μg (Figura 4.3). Mediante el análisis de regresión lineal de las concentraciones de los patrones de KNO_3 para el trazado de la curva de calibración, se observa linealidad cercana a 1 ($R^2 = 0.9997$) lo que indica la precisión en la preparación y dilución de los patrones utilizados. El procedimiento fue el mismo que el realizado con las muestras.

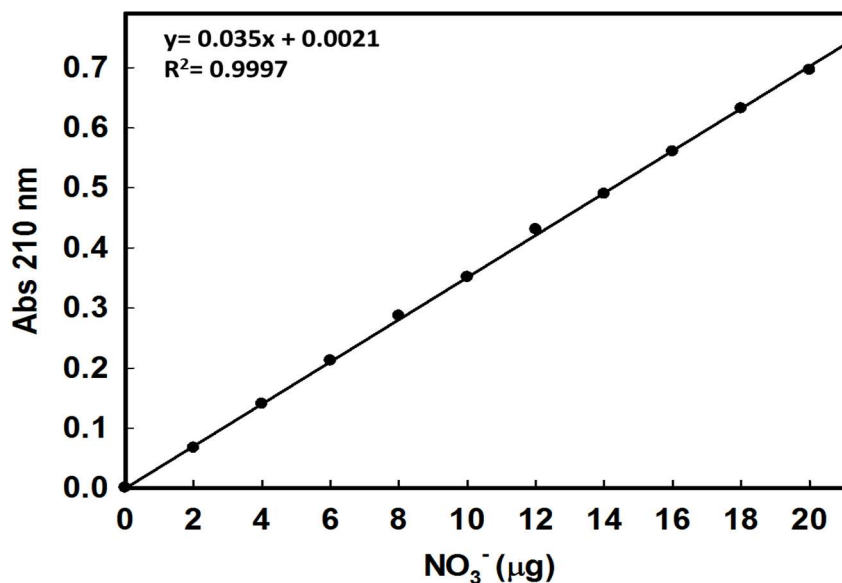


Figura 4.3 Curva estándar de la concentración de NO_3^- . Se utilizó una solución de KNO_3 como estándar. La absorbancia de las muestras se midió a 210 nm. En la curva se indicó la ecuación de la recta de calibrado (y) y el coeficiente de determinación (R^2). El resultado es el promedio de tres determinaciones por duplicado.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 EFECTO DEL AlCl_3 EN EL PERFIL PROTEICO

La evaluación de parámetros bioquímicos en modelos biológicos de estudio es de suma importancia para conocer, en este caso, la respuesta a factores abióticos que puede afectar el contenido de nitrato, y por ende, el contenido proteico. Es por esto que en el presente capítulo se evaluó tanto el el perfil proteico (Figura 4.4) como el contenido de NO_3^- (Figuras 4.5 y 4.6), ambos como parámetros evaluados en los extractos celulares de las suspensiones que fueron tratadas o no con 500 μM de AlCl_3 por una hora, luego de haber crecido en los respectivos medios de cultivo.

Se realizó un perfil proteico de los extractos celulares de las suspensiones cultivadas en los tres medios evaluados, tratadas o no con 500 μM de AlCl_3 , como se muestra en la Figura 4.4.

Se puede observar una gran cantidad de proteínas, la mayoría con una movilidad electroforética entre 0.06 a 0.46, donde se observaron algunos cambios entre los carriles que contenían las muestras de los extractos tratados o sin tratar con Al, y entre los medios de cultivo modificados en los que se cultivaron las suspensiones.

En el perfil proteico se puede observar que los extractos totales obtenidos del medio MS sin Al (carril 1) presentó un incremento en la intensidad de las bandas proteicas comparándolas con los extractos del medio MS con Al (carril 2).

En las bandas de los carriles 3 y 4, los cuales corresponden a los extractos del medio MS + K sin y con tratamiento con Al, se nota una mayor intensidad en las bandas que se encuentran en el carril número 3, que son las que no se trataron con Al, a diferencia de las sí se trataron, las cuales se encuentran en el carril número 4. Además, en el carril 4, a una movilidad electroforética de 0.17, 0.20 y 0.24 desaparecen bandas que en el carril 3 están presentes.

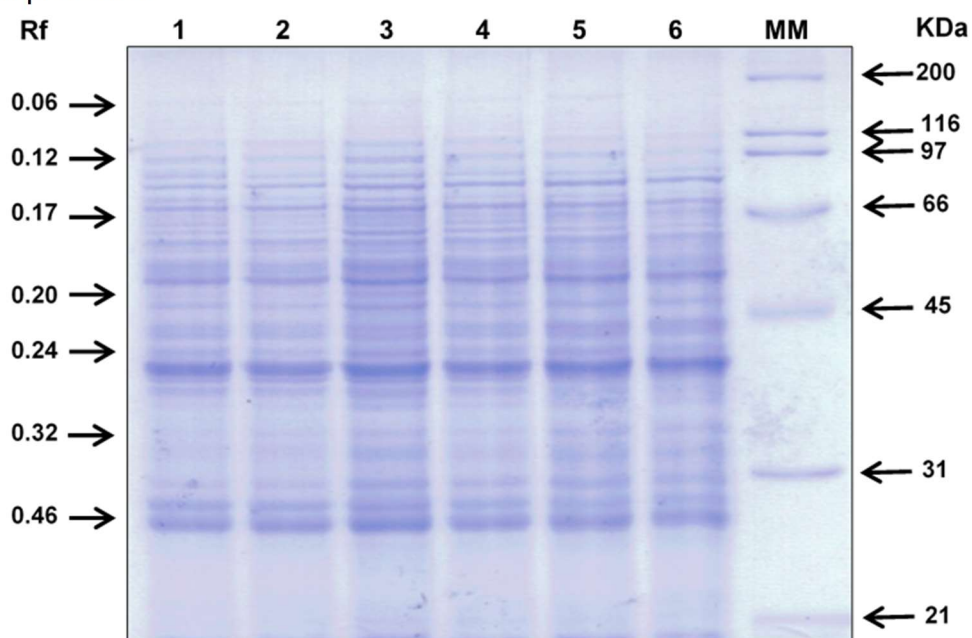


Figura 4.4 Perfil proteico al 15% SDS-PAGE. Se utilizaron 50 μg de proteína de los extractos totales de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo, cultivadas en los medios MS, MS + K y MS + NO_3^- , tratadas con o sin 500 μM de AlCl_3 por una hora. La tinción se realizó con azul de Coomassie. Carriles: extractos de las suspensiones cultivadas en medio **1.** MS sin Al, **2.** MS con Al, **3.** MS + K sin Al, **4.** MS + K con Al, **5.** MS + NO_3^- sin Al, **6.** MS + NO_3^- con Al.

En los carriles 5 y 6, correspondientes a los extractos totales de las suspensiones que se cultivaron en el medio MS + NO₃⁻, la intensidad entre las bandas tratadas y sin tratar con 500 μM de AlCl₃ es similar, pero, en el carril número 6 no se encuentran algunas bandas que en el carril número 5 sí se pueden observar, esto a una movilidad electroforética de 0.06, 0.12 y 0.20.

Además, es posible notar como existen diferencias en el perfil proteico entre los tres medios de cultivo evaluados. En el caso de los extractos de las suspensiones que se cultivaron por 14 días en el medio MS + NO₃⁻ no presentan las bandas a una movilidad electroforética de 0.32, que en los otros 4 carriles (1, 2, 3 y 4) sí están presentes, indistintamente si fueron tratadas o no con AlCl₃.

4.3.2 CONTENIDO DE NO₃⁻

Para conocer el contenido de NO₃⁻ que había sido asimilado por las suspensiones celulares se decidió evaluarlas sin realizarles ningún tratamiento con Al ni exponerlas a medios de cultivo fresco, realizando las mediciones en las células del día siete y catorce de cultivo. Al observar el resultado de la Figura 4.5 se puede ver una marcada diferencia en los valores de NO₃⁻ en los diferentes medios en los que se cultivaron las células como entre los días de evaluación, lo que indica que las diferencias en la composición de los medios de cultivo influyó en la disponibilidad y la asimilación de las fuentes nitrogenadas disponibles y la posible respuesta de las células que metabolizaron el N asimilado, ya que los contenidos de NO₃⁻ disminuyeron del día siete al día 14 de cultivo en los tres medios de cultivo evaluados. Las suspensiones celulares que se cultivaron en el medio MS + NO₃⁻ tuvieron un mayor contenido de NO₃⁻ en comparación con las suspensiones cultivadas en los otros medios de cultivo, tanto en el día siete como en el día 14.

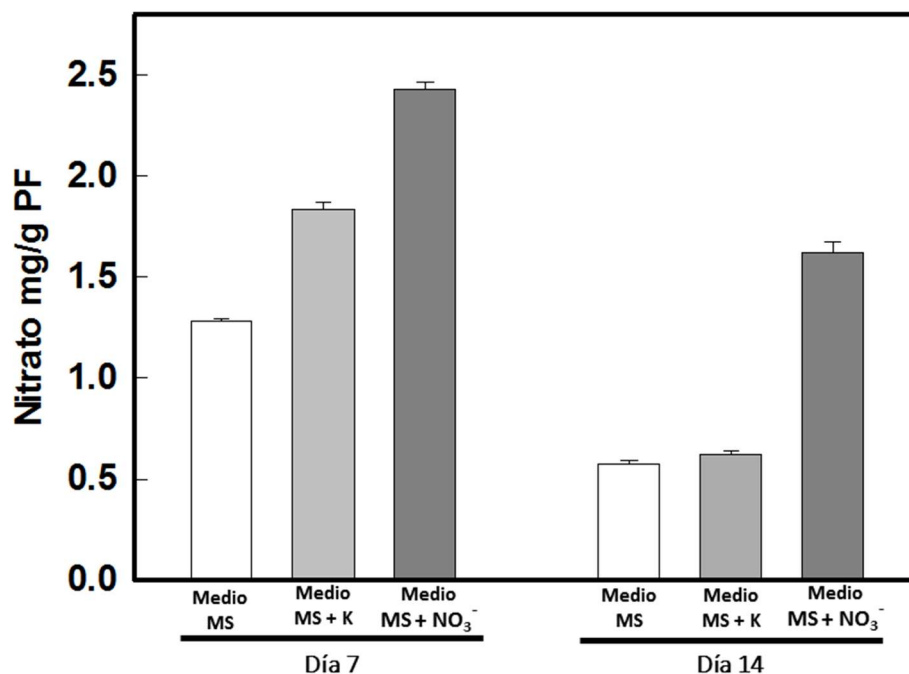


Figura 4.5 Determinación del contenido de nitrato en células con siete y 14 días de cultivo. Se utilizó extractos celulares de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. cultivadas en los medios MS, MS + K y MS + NO₃⁻. Cada valor representa la media de dos experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

Por otro lado, para conocer si la exposición del Al afectaba el contenido de NO₃⁻, se evaluaron las suspensiones celulares de 14 días cultivadas en los diferentes medios de cultivo, en esta ocasión tratadas o no con 500 μ M de AlCl₃, como se indica en el apartado 4.2.1.

Como se muestra en la Figura 4.5, el contenido de NO₃⁻ es un tanto mayor en las suspensiones que se trataron con AlCl₃, en comparación con el testigo (sin tratamiento), esto en los tres medios de cultivo evaluados. El contenido de NO₃⁻ para este momento de crecimiento celular, al ser expuestas al Al durante una hora de tratamiento, no se presentaron diferencias en las células cultivadas en los tres medios de cultivo evaluados.

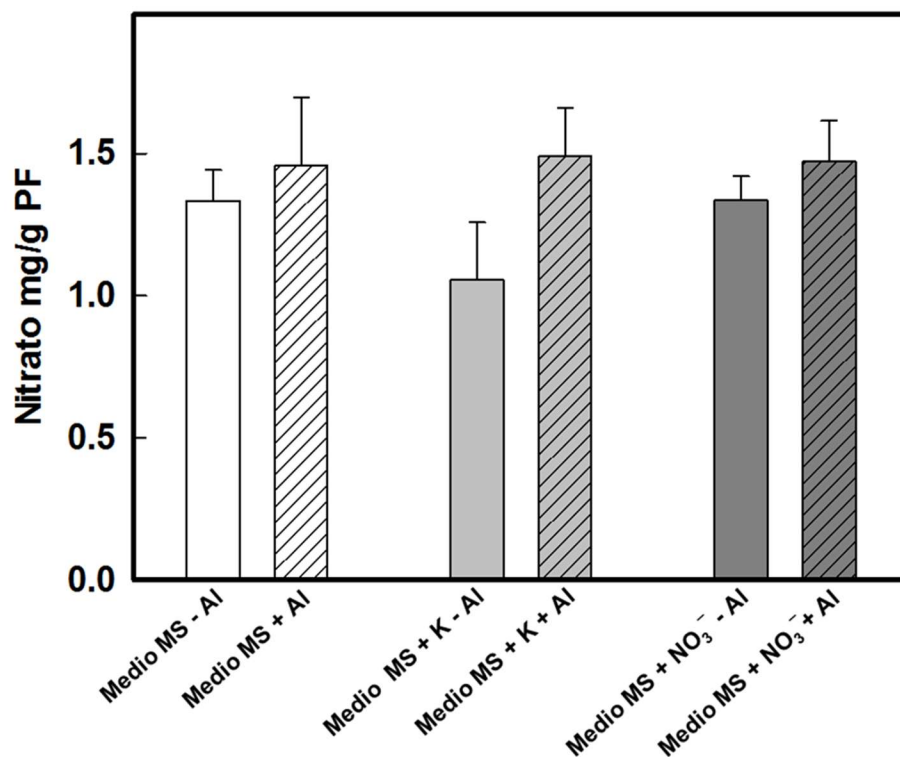


Figura 4.6 Determinación del contenido de nitrato en el día 14 de cultivo. Se utilizó extractos celulares de las suspensiones de *C. arabica* L. cultivadas en los medios MS, MS + K y MS + NO₃⁻, tratadas o no con 500 μ M de AlCl₃. Cada valor representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas \pm SE.

4.4 DISCUSIÓN

El estudio del efecto de factores abióticos en modelos de estudio de alta importancia económica en la producción agrícola ha venido cobrando relevancia para la investigación, ya que la productividad está relacionada con la habilidad de los mismos en la adaptación en respuesta a estos factores abióticos, como es el caso del estrés por Al en el modelo de estudio evaluado en el presente trabajo.

Los síntomas de fitotoxicidad por Al no siempre se correlacionan únicamente con una concentración crítica de Al en el medio de crecimiento (Sivaguru *et al.*, 2003). Así, aunque la presencia de Al es relevante en la expresión de la respuesta al daño por parte de este elemento, otros factores del medio tales como, pH, genotipo de la planta y especie vegetal, así como la edad fisiológica, entre otros factores, pueden también actuar en la modificación de la respuesta del modelo de estudio al Al (Gallardo *et al.*, 2005).

Es por lo anterior que es importante considerar el contenido y las modificaciones del medio de cultivo que en este trabajo se realizaron para determinar las respuestas del modelo de estudio ante los diferentes factores evaluados, como lo es el perfil proteico total y contenido de NO_3^- total en las suspensiones celulares en los distintos días de crecimiento.

En el caso del perfil proteico total (Figura 4.4) es evidente que los factores evaluados, como el contenido del medio de cultivo y los tratamientos con $500 \mu\text{M}$ de AlCl_3 afectaron el contenido proteico en los diferentes carriles obtenidos, como se puede apreciar en los carriles 1 y 2, correspondientes a los extractos de las suspensiones celulares del medio MS, con o sin tratamiento con Al, respectivamente; carriles 3 y 4 correspondientes a los extractos de las suspensiones cultivadas en el medio MS + K, con o sin tratamiento con Al respectivamente y los carriles 5 y 6 que refiere a los extractos totales de las suspensiones cultivadas en el medio MS + NO_3^- , con o sin tratamiento con Al respectivamente. Se puede apreciar que en los carriles 5 y 6 la intensidad de las bandas es mayor, esto puede deberse a lo que indican Krapp y colaboradores (2014), donde los autores afirman que el NO_3^- funciona como molécula señal en la activación de proteínas transportadoras de la misma molécula y de enzimas requeridas para la asimilación de esta fuente nitrogenada.

De igual forma, en el perfil proteico, al observar la presencia o ausencia de algunas bandas y la diferencia en la intensidad, se puede sugerir que es debido a los tratamientos con Al, donde la concentración de este metal puede estar afectando la expresión de algunas proteínas o enzimas importantes para el adecuado funcionamiento celular en el modelo de estudio.

Como se muestra en la Figura 4.5, el contenido de NO_3^- varió según la etapa de crecimiento celular y el medio en el que se cultivó, evidenciando que los componentes del medio de cultivo juegan un papel crucial en el contenido y el aprovechamiento de esta fuente nitrogenada, que así como lo afirma Krapp (2015), la disponibilidad de fuentes inorgánicas de N y en especial el NO_3^- funciona como molécula señal a nivel celular y dirige la absorción y la acumulación intracelular de este importante macronutriente. Por lo tanto, es posible que por tal razón existe un mayor contenido de NO_3^- en las suspensiones celulares en el día siete de evaluación que en el día 14, y esto indistintamente en el medio de cultivo evaluado, ya que en todos los casos existe

contenido de NO_3^- y posiblemente sea este el que las células estén asimilando como primera fuente de N.

En las suspensiones celulares que se cultivaron en el medio modificado con NO_3^- (medio MS + NO_3^-) existe un mayor contenido de este N inorgánico, tanto en el día siete como en el día 14 de crecimiento, en comparación con los otros dos medios de cultivo evaluados, que como se esperaba, las células al tener disponible únicamente NO_3^- como fuente de N total su contenido fue mayor en relación con los demás extractos evaluados (Figura 4.5).

Al evaluar el efecto del Al en el contenido de NO_3^- (Figura 4.6) en las suspensiones celulares de 14 días de cultivo y realizar el protocolo mencionado en el apartado 4.2.1, en el cual se expusieron los paquetes celulares a medios de cultivo fresco y luego se realizó el tratamiento con 500 μM de AlCl_3 , pudo influir el hecho de que se estimulara la nueva toma de nutrientes, ya que como se evidencia en la Figura 4.6 los valores obtenidos en el contenido de NO_3^- no evidenciaron diferencias entre las suspensiones cultivadas en los distintos medios de cultivo evaluados ni en los tratamientos con Al.

Es posible que estos resultados tengan relación con lo mencionado en los antecedentes de este trabajo, donde esta respuesta pudieran estar involucrada con la actividad de los transportadores para las fuentes de N inorgánico y su adecuada asimilación y posible almacenamiento intracelular. La interacción de estos transportadores, en el caso de los nitratos, con sus distintos patrones espaciales de expresión temporal, pueden estar estrechamente regulados por señales internas y externas, y así asegurar la apropiada asimilación y distribución del NO_3^- en diversas condiciones ambientales, disponibilidad de N y de desarrollo del modelo de estudio, donde se conoce que estas respuestas pueden darse en cuestión de minutos (Krapp, 2015).

Esto podría explicar la similitud en la respuesta y los datos obtenidos presentados en la Figura 4.6, que a pesar de las diferencias en la composición de los medios de cultivo y el tratamiento con Al, el contenido de NO_3^- en los extractos celulares tuvo la misma tendencia, y más aún en los datos obtenidos entre las suspensiones que se cultivaron en el medio MS y el medio MS + NO_3^- , tanto en ausencia como en presencia del Al.

Al modificar la fuente de N total utilizada en los medios de cultivo se consideró de suma importancia evaluar el comportamiento proteico en nuestro modelo de estudio a los 14

días de cultivo. Las proteínas producidas por las plantas superiores en respuesta al estrés pueden ser afectadas de una u otra forma (Krapp, 2015). La cuantificación de proteínas de manera precisa es esencial para todos los experimentos relacionados a proteínas. En muchos temas de investigación se han desarrollado diferentes métodos para cuantificar proteínas totales (Sivaguru *et al.*, 2003), como en el caso del presente estudio, donde se realizó un perfil proteico para analizar y comparar el efecto de la modificación del medio de cultivo en el efecto de los tratamientos con Al.

La rápida regulación postraducciona, como la modificación de proteínas, es el segundo mecanismo que controla la absorción y asimilación de nitrógeno (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010) y este efecto puede ser aún más marcado con la presencia de un factor de estrés abiótico (Kochian *et al.*, 2015), como lo es AlCl_3 500 μM utilizado en esta investigación.

Los resultados obtenidos en este capítulo lograron demostrar un efecto en el contenido de NO_3^- en los extractos de las suspensiones celulares, al modificar la fuente nitrogenada en los medios de cultivo evaluados. Sin embargo, los tratamientos con 500 μM de AlCl_3 durante una hora no se presentaron diferencias entre los valores obtenidos entre los medios de cultivo evaluados, lo que puede sugerir que el factor de estrés genera un efecto en la asimilación de este macronutriente en el modelo de estudio. Por otra parte, el perfil proteico demostró como la modificación de los medios de cultivo y la adición de Al a los tratamientos genera algunas diferencias en la visualización de bandas, lo que implica que las condiciones de cultivo y el estrés abiótico al que fueron sometidas afectó la expresión de proteínas, y que como lo afirma Krapp (2015), esto puede estar relacionado con la respuesta al estrés abiótico al que se exponen las suspensiones celulares, y la expresión de algunas proteínas puede verse afectada.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

La toxicidad por Al en cultivos de alta importancia agrícola, que se desarrollan en condiciones de suelos ácidos ha sido ampliamente estudiada, pero aún no se ha profundizado en modelos de suspensiones celulares, que involucren la interacción de los componentes de la solución en la que se desarrollen los cultivos, principalmente los macronutrientes presentes y que son requeridos para un óptimo crecimiento, como lo es la fuente de N inorgánico (Souza *et al.*, 2014).

Es por lo anterior que se decidió realizar este estudio, a partir de suspensiones celulares de *C. arabica* L.; en el que se evaluó el efecto de la fuente inorgánica de N ante la toxicidad por Al, considerando que el N es el elemento que es cuantitativamente es más requerido por los cultivos, mientras que el Al es el tercer elemento en abundancia en la corteza terrestre (en este estudio al evaluar el efecto de la modificación de la fuente de N total y la toxicidad del Al³⁺).

En los resultados mostrados en el capítulo dos (Figura 2.3), se determinó que la fuente de N contenida en el medio de cultivo afecta este parámetro, corroborando lo sugerido por Wang y colaboradores (2015), quienes mencionan que el NH₄⁺, al ser asimilado por las células, acidifica el valor de pH de la solución, pero cuando es el NO₃⁻ la fuente de N disponible y es asimilada por las suspensiones celulares, el pH se basicifica, lo que hace a esta condición un factor importante en los medios de cultivo evaluados y en la integridad de las células de *C. arabica* L. Por lo tanto, las condiciones óptimas para poder llevar a cabo el estudio de la modificación de la fuente nitrogenada y el efecto por la toxicidad por Al en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. fue utilizando NO₃⁻ como única fuente de N total.

Al utilizar esta fuente de N inorgánico las suspensiones celulares no se afectaron en el crecimiento y fue posible realizar evaluaciones en los mismos tiempos de cultivo celular, por lo que también fue posible realizar evaluaciones utilizando 500 µM de AlCl₃ en medios de cultivo modificados con NO₃⁻. Esto lo confirman Ryan y colaboradores (2011), quienes observaron que el NO₃⁻ mejora desde la arquitectura hasta el rendimiento de los cultivos, lo que evidencia que las fuentes nitrogenadas y especialmente el NO₃⁻ favorecen el desarrollo y la capacidad de respuesta de las plantas en los que se utiliza.

Se conoce que el estrés abiótico en los tejidos vegetales puede dañar a las células, pero existen estudios en los que se evidencia que concentraciones pequeñas de algunos metales, por ejemplo el Al, pueden ayudar a la planta en la tolerancia a condiciones extremas, que como lo indican Gil y Tujeta (2010), el Al puede actuar como molécula señal y puede desencadenar respuestas a la defensa de la planta y activarse varios procesos fisiológicos como la fotorrespiración, la fotosíntesis, el ciclo celular y la muerte celular programada.

Debido a que Al es un elemento reactivo en el medio en el que se encuentre, existen muchos mecanismos de toxicidad que implican su interacción con la pared celular de la raíz, la membrana plasmática y el simplasma, y se han reportado ampliamente los efectos fitotóxicos que desencadenan la presencia de este metal, de los cuales se pueden presentar desde estrés oxidativo (Esquivel-Hernández, 2016), daño estructural en la pared celular (Krapp, 2015) y la integridad de proteínas y enzimas (Kochian *et al.*, 2015).

Plett y colaboradores (2016), aseguran que factores abióticos afectan directamente el óptimo desarrollo de los tejidos vegetales, ya que dichos factores limitan la disponibilidad de fuentes nutricionales de alto requerimiento, entre ellas, las fuentes de N. esto puede compararse con el resultado mostrado en la Figura 3.11, ya que el peso seco de los paquetes celulares obtenidos en el día 14 de cultivo es mayor cuando las suspensiones se cultivaron en el medio modificado con NO_3^- como única fuente de N total, en comparación con su control, indicando que el NO_3^- es un nutrimento de alta importancia en el crecimiento celular, y, al comparar con las células del mismo día de cultivo, pero expuestas a 500 μM de AlCl_3 se afectaron en aproximadamente un 50% en el crecimiento.

De esta manera, fue posible determinar el efecto del Al en el peso seco de las suspensiones celulares en dos etapas de crecimiento celular, etapa exponencial (Figura 3.11A) y etapa estacionaria (Figura 3.11B), cultivadas en los tres medios de cultivo distintos. Al evaluar la etapa exponencial de crecimiento (3.11A), el efecto en el crecimiento, en los tres medios de cultivo, al aplicar 500 μM de AlCl_3 fue de aproximadamente el 50% con respecto a su control; pero en la etapa estacionaria (Figura 3.11B) este efecto disminuyó, principalmente en las suspensiones cultivadas en el medio modificado con NO_3^- (medio MS + NO_3^-), en el día 23 de cultivo, donde las

diferencias entre el control y el expuesto al Al fue mínimo. A raíz de estos resultados se pudo concluir que la fuente nitrogenada y la etapa de desarrollo de las suspensiones celulares son factores importantes al evaluar el efecto por el AlCl_3 en el crecimiento celular.

Estos resultados se pueden comparar con lo que enfatizan Plett y colaboradores (2016), en el cultivo de maíz (*Zea mays*). Ellos demostraron que el NO_3^- tiene la capacidad de disminuir el efecto por el estrés abiótico, en este caso, al utilizarlo en altas cantidades como fuente de N total, en plantas completas de maíz, ya que mejoró tanto la arquitectura como las condiciones de los tejidos radicales, y mejoró también la capacidad de respuesta ante factores abióticos, ya que esta fuente de N fortalece la integridad de las células de la raíz en las plantas de maíz.

En el presente trabajo también se evidenció el efecto de la composición del medio de cultivo en relación al contenido de Al total, tanto en células (Figura 3.12A), como en los medios de cultivo modificados (Figura 3.12B), y llamó especialmente la atención el resultado mostrado en la Figura 3.12B, en el cual el medio MS + NO_3^- tratado con 500 μM de AlCl_3 no presentó ningún contenido de Al total, demostrando una posible reacción química entre los componentes contenidos en este medio de cultivo modificado y el Al adicionado.

En cuanto al contenido de Al libre (Al^{3+}), evaluado en los tres medios de cultivo (Figura 3.13) fue posible determinar la disminución de hasta un 75% en el contenido de esta forma de Al en el medio que se modificó con NO_3^- como fuente de N total (medio MS + NO_3^-), en comparación con el control, evidenciando nuevamente que el contenido del medio de cultivo y el uso de nitrato como fuente de N total modifica la disponibilidad del Al^{3+} . Este resultado, a su vez, se correlaciona con el obtenido en la Figura 3.14. En estas micrografías fue posible observar e integrar, con los datos obtenidos en experimentos anteriores, la ubicación intracelular del Al^{3+} en células cultivadas en los medios MS y MS + K y tratadas con Al, pero en las células cultivadas también por 14 días en el medio MS + NO_3^- y tratadas con la misma concentración de AlCl_3 por una hora, se pudo observar como el Al^{3+} no ingresa más allá de la pared celular, esto probablemente debido a la modificación en la fuente nitrogenada, que le confiere una mayor resistencia al tratamiento con Al (Krapp *et al.*, 2014).

Diversos estudios han sugerido que la interacción del Al con la pared celular provoca la modificación de las propiedades de la misma, específicamente en la reducción de la plasticidad-elasticidad, en importantes enzimas como las expansinas, o aumentos en la solubilidad del Al^{3+} en la pared celular (Kochian *et al.*, 2015)., además de la interacción del Al^{3+} con las pectinas presentes en la pared celular de los tejidos vegetales que han sido expuestos a diferentes concentraciones de Al, datos que han demostrado Liu y colaboradores (2014).

En el mismo estudio (Liu *et al.*, 2014), se abordó el papel de la señalización de Al en células en plantas, así como los mecanismos de resistencia al Al y la integridad y la función de algunos genes y de algunas proteínas desde el inicio de las respuestas de resistencia a Al.

Zhao (*et al.*, 2013), mencionan que la fuente nitrogenada es un factor importante en lo que a absorción de Al por parte de los tejidos vegetales se refiere. Dichos autores concluyeron en sus estudios realizados en raíces de arroz, que el tratamiento con NO_3^- aumentó la carga negativa de la superficie de las raíces, mientras que los tratamientos con NH_4^+ la redujo, lo que modificó la absorción del Al en las raíces cultivadas en soluciones de NO_3^- o de NH_4^+ en las mismas concentraciones y expuestas a tratamientos con Al, lo que evidencia nuevamente que la composición del medio de cultivo juega un papel relevante ante la disponibilidad y la toxicidad por Al en modelos de estudios en plantas.

Al evaluar el contenido de nitratos en el modelo de suspensiones celulares de *C. arabica* L, se pudo determinar una amplia diferencia en el contenido de NO_3^- entre los extractos celulares obtenidos de las suspensiones cultivadas en los diferentes medios de cultivo y entre los días evaluados (Figura 4.5), ya que el contenido de nitrato en el día siete fue mayor que el obtenido en el día 14 de cultivo. De esta manera estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Zhu (*et al.*, 2016), quienes reportan que en el modelo de algas (*Ulva prolifera*) a mayor contenido de NO_3^- en el medio de cultivo se presenta una mayor asimilación de esta fuente de N inorgánico por parte de las algas.

Cabe además destacar, que en los extractos de las suspensiones celulares cultivadas en el medio de cultivo modificado con NO_3^- , el contenido de nitrato fue aún mayor en comparación con los demás extractos evaluados, superando hasta en un 20% el

contenido de NO_3^- en las suspensiones de siete días de cultivo y hasta en un 60% en las células de 14 días de cultivo, en comparación con las suspensiones celulares cultivadas en los medios MS y MS + K.

Buchanan y colaboradores (2015), aseguran que el nitrato funciona como molécula señal y como regulador de la toma y asimilación del mismo nitrato, ya que induce a la transcripción de los transportadores de nitrato, aumenta la actividad de las enzimas NR y NiR ó ya sea aumentando o reduciendo las necesidades de su propia asimilación.

Los mismos autores (Buchanan *et al.*, 2015), mencionan que la regulación transcripcional en respuesta al NO_3^- puede ser activado desde los 10 minutos luego de la adición de cantidades tan pequeñas de 100 nM de nitrato y no requiere de nueva síntesis de proteínas. Esto podría explicar el resultado mostrado en la Figura 4.6, ya que no se presentan diferencias en los contenidos de NO_3^- entre los tres medios de cultivo evaluados y tratados o no con 500 μM de AlCl_3 . Este resultado puede deberse a la exposición previa de las suspensiones celulares al medio de cultivo fresco por 30 minutos, para seguidamente ser tratados con AlCl_3 . Es posible que las suspensiones tuvieron una rápida respuesta a la composición del medio de cultivo fresco, especialmente la fuente de N que se encontró disponible, haciendo uso de los transportadores ampliamente descritos anteriormente.

Al evaluar el perfil proteico de las suspensiones celulares cultivadas en los diferentes medios de cultivo, utilizados en este trabajo, se notaron algunas diferencias que se presentan en la Figura 4.4, que como lo mencionan Del Pozo y colaboradores (2002), la actividad metabólica se puede ver afectada por diversos factores, y se puede ver reflejada en la síntesis de proteínas.

En un estudio recopilado por Kochian (*et al.*, 2015) en el cultivo de trigo (*Triticum* spp) se demostró que la presencia intracelular de Al está implicada en la regulación directa en la expresión de genes y en la función de proteínas, como el caso de la proteína transportadora TaALMT1, la cual está involucrada en el transporte de este metal al interior de la célula, esto en células de raíz de este modelo biológico. Además, los mismos autores mencionan que otros mecanismos involucrados en la resistencia al Al podría incluir cambios inducidos en el contenido de Ca^{2+} , cambios en el pH o en el

contenido de K^+ citosólico, y a su vez podrían desencadenar componentes adicionales en una vía de señalización provocada por el Al y afectar la síntesis de proteínas.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran el efecto de la fuente nitrogenada contenida en el medio de cultivo ante la toxicidad por Al, así como el contenido del Al total y libre en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., evidenciando que el NO_3^- como fuente de N inorgánico modifica la respuesta de las suspensiones celulares al evaluar el contenido tanto en medios de cultivo como a nivel intracelular de Al, así como en el contenido de nitratos y el perfil proteico, ya que se evidenció que en la etapa estacionaria en los cultivos celulares esta fuente de N disminuyó el efecto de la fitotoxicidad por Al en el crecimiento celular, modificó el valor del pH en el medio de cultivo, disminuyó el contenido de Al total en la solución del medio, disminuyó la concentración de la forma de Al^{3+} y a su vez la presencia a nivel intracelular, aumentó los niveles de NO_3^- en los extractos celulares y modificó el perfil proteico en suspensiones celulares de 14 días de cultivo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PRESPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

- La modificación en el contenido de K en el medio de cultivo no afectó en crecimiento celular en las suspensiones de *C. arabica* L.
- El NO_3^- fue la fuente de N inorgánico que permitió evaluar el crecimiento en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. por tiempos prolongados (hasta 25 días de cultivo).
- La fuente de N, en este caso el NO_3^- , modificó el efecto de la toxicidad por Al en el modelo de suspensiones celulares de *C. arabica* L., ya que el tratamiento de las células con AlCl_3 no modificó el crecimiento celular.
- El NO_3^- utilizado como fuente de N total en el medio de cultivo disminuyó el contenido tanto de Al libre como del Al total en las suspensiones de *C. arabica* L. tratadas con 500 μM de AlCl_3 .
- A nivel intracelular, la modificación en el medio de cultivo con la fuente nitrogenada disminuyó el contenido de Al^{3+} en las células de *C. arabica* L.
- La modificación en la fuente nitrogenada en los medios de cultivo no afectó el contenido de nitratos en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. tratadas con AlCl_3 .

6.2 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen a los primeros reportes en el estudio de la fuente de N y las suspensiones celulares de *C. arabica*, por lo tanto, se plantean las siguientes perspectivas:

- Realizar evaluaciones a tiempos cortos (minutos, horas) sobre el efecto de la toxicidad por Al en suspensiones celulares de *C. arabica* L., caracterizando con diferentes fuentes de N.
- Estudiar y caracterizar proteínas transportadoras específicas tanto para Al como para N, relacionadas con la asimilación y el efecto de la fuente nitrogenada y la toxicidad por Al en el modelo de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

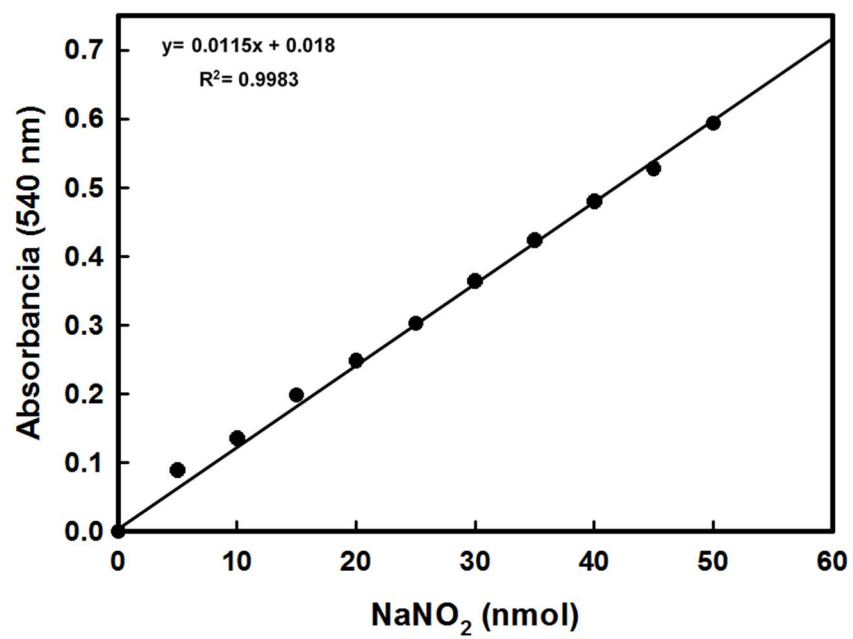
ANEXOS

Anexo I. Determinación de la actividad de la Nitrato Reductasa

Extracción proteica

1. Congelar con N líquido células de 14 días de cultivo.
2. Macerar con un mortero de porcelana y pistilo amortiguador de extracción hasta obtener un polvo fino.
3. Añadir amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 50 Mm, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM, glicerol 10% v/v, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, Na_3VO_4 0.2 mM, DDT 0.5 M, PMSF 1 mM), en una relación de 2 mL por 1 gramo de peso fresco de células
4. Homogenizar con un politrón durante un minuto en baño de hielo.
5. Centrifugar a 20100 xg por 30 minutos a 4°C.
6. Tomar el sobrenadante.
7. Cuantificar la concentración proteica por el método de Bradford (1976).
8. Tomar 75 µg de proteína a partir del extracto.
9. Añadir la mezcla de reacción (1.3 mL Tris HCl 0.05 M pH 7.5, 0.2 mL KNO_3 0.02 M pH 7.2) y el extracto proteico total en tubos de ensayo.
10. Preincubar a 30°C por 2 minutos.
11. Añadir 0.2 mL de NADH 0.003 M para iniciar la reacción.
12. Incubar a 30°C durante 10 minutos
13. Detener la reacción añadiendo 1 mL de Sulfanilamida al 1% (m/v) y 1 mL de N-1naftilendiamina al 0.2%.
14. Dejar reposar por 20 minutos.

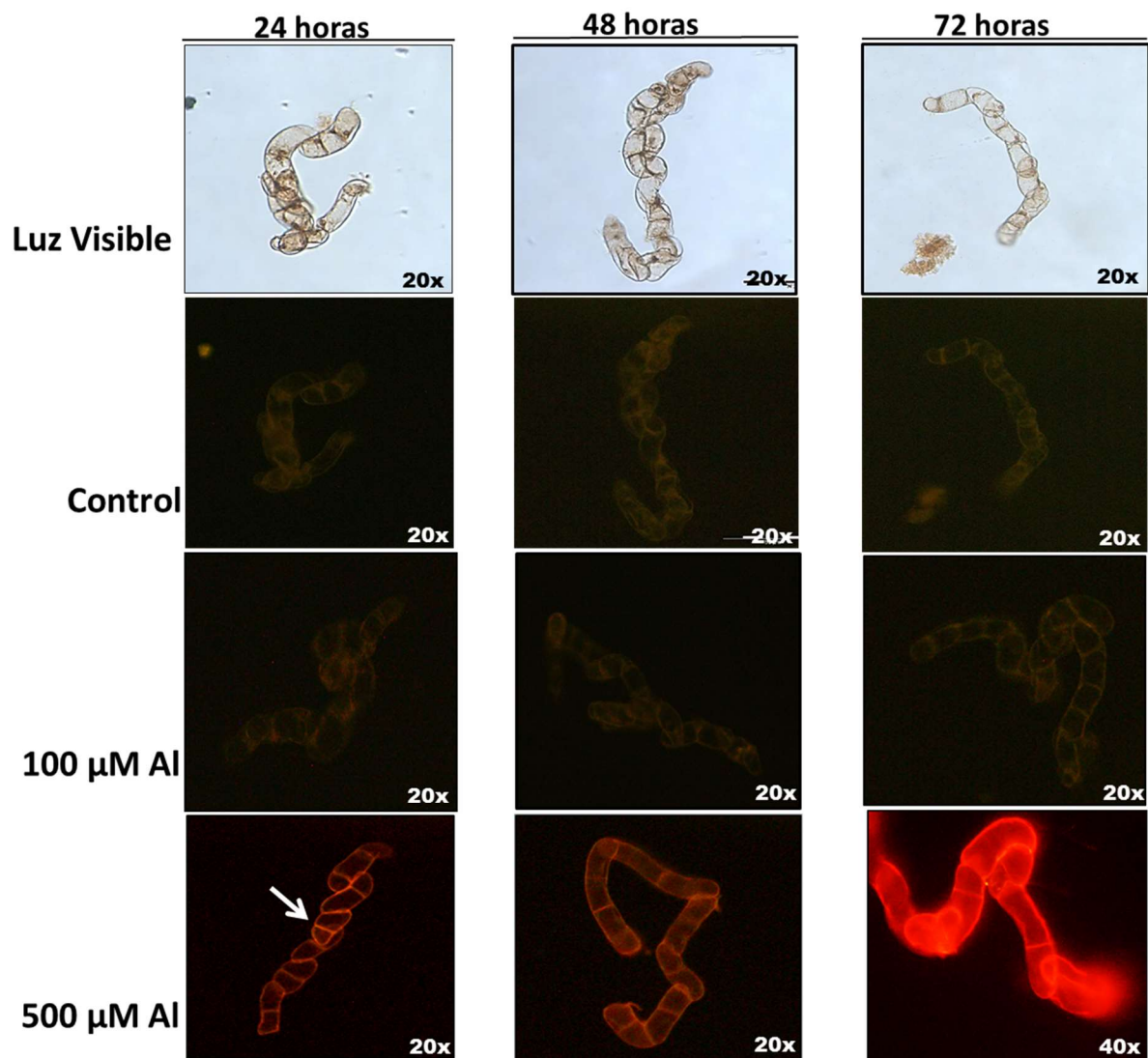
15. Centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos
16. Separar el sobrenadante.
17. Medir en el espectro a 540 nm.
18. Realizar una curva estándar de NaNO_2 en un rango de 0 a 50 nmol.

Anexo II. Curva estándar de NaNO₂

Anexo III. Localización de Al³⁺ intracelular con el fluorocromo Lumogallion en suspensiones de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo y tratadas con 100 y 500 μ M de AlCl₃

1. Tomar tres alícuotas de 5 mL de las suspensiones celulares de *C. arabica* L., de 14 días de cultivo.
2. Adicionar o no diferentes concentraciones de Al (reactivo comercial a 37 mM en 2% de HNO₃ PERKIN-ELMER).
3. Mantener las muestras en agitación constante durante 24 horas.
4. Tomar 1 mL de la muestra y centrifugar a 2000xg por 2 minutos.
5. Retirar el sobrenadante y adicional 1 mL del medio de cultivo fresco y centrifugar nuevamente. Realizar tres enjuagues consecutivos de la misma manera.
6. Agregar 1 mL de lumogallion 1 mM e incubar durante 1 hora en agitación constante.
7. Transcurrido el tiempo realizar de 2 a 3 enjuagues con medio de cultivo fresco y centrifugando a 2000xg.
8. Dejar la muestra en medio de cultivo fresco.
9. Tomar 50 μ L de la muestra y colocarla en un portaobjetos.
10. Observar en el microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de emisión de 580 nm y de excitación de 500 nm.
11. Realizar evaluaciones a las 48 y 72 horas de tratamiento con Al.

Anexos IV. Micrografías de observación de Al intracelular con lumogallion en suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo y tratadas con 100 y 500 μ M de Al



Anexo V. Determinación de la concentración de Al libre en suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo tratadas con 100 y 500 μM de AlCl_3 .

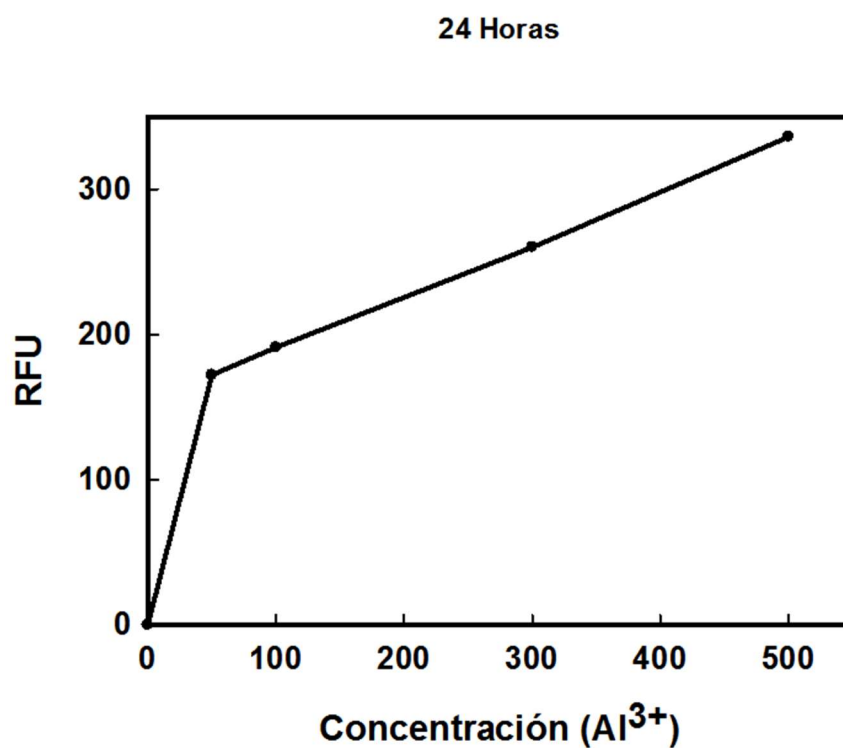
1. Tomar tres alícuotas de suspensiones celulares de 14 días de cultivo de 5 mL cada una.
2. Adicionar 0 μM , 100 μM ó 500 μM del reactivo comercial de Al 37 mM (en 2% de HNO_3) a las suspensiones, según cada muestra.
3. Mezclar con la ayuda de vortex e incubar por 24 horas.
4. Tomar 1200 μL de la muestra y centrifugar a 3000xg por 3 minutos.
5. Tomar 900 μL del sobrenadante y adicional 100 μL de morin (1 mM), dejando 10 minutos de tiempo de espera entre cada muestra.
6. Medir inmediatamente en el fluorómetro utilizando una celda de cuarzo, ajustando el equipo a una excitación de 10 nm, a una emisión de 5 nm y a un tiempo de lectura de 600 segundos.
7. Realizar mediciones de la misma muestra a las 48 y 72 horas.
8. Realizar una curva estándar para Al^{3+} para cada día de evaluación.

Anexo VI. Curva estandar para la determinación de Al libre en 24 horas de tratamiento.**Lectura**

Excitación: 10 nm

Emisión: 5 nm.

Tiempo de lectura: 600 segundos.

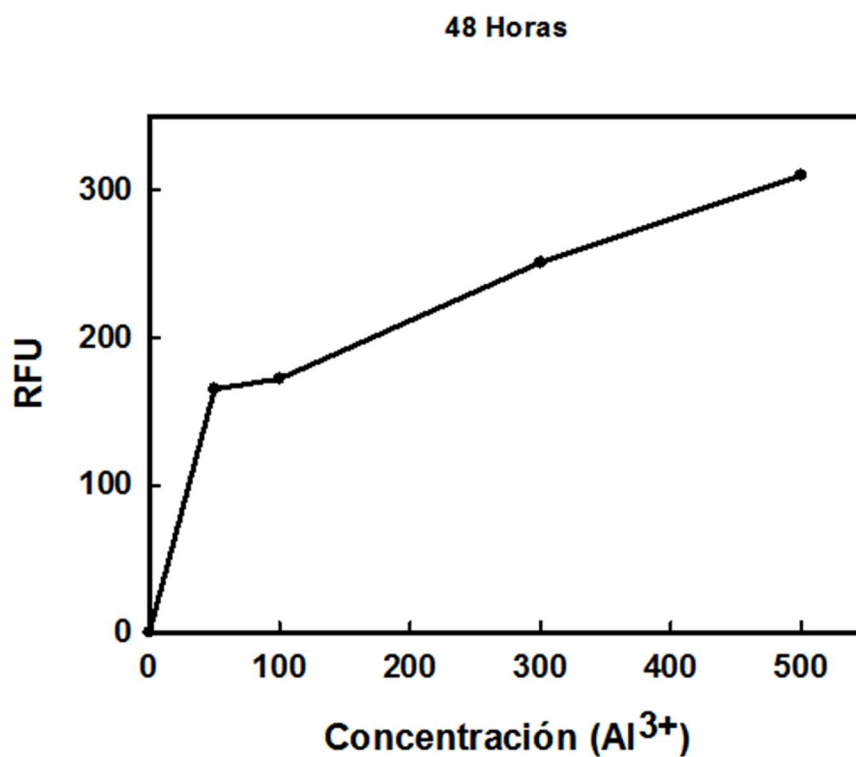


Anexo VII. Curva estandar para la determinación de Al libre en 48 horas de tratamiento.**Lectura**

Excitación: 10 nm

Emisión: 5 nm.

Tiempo de lectura: 600 segundos.

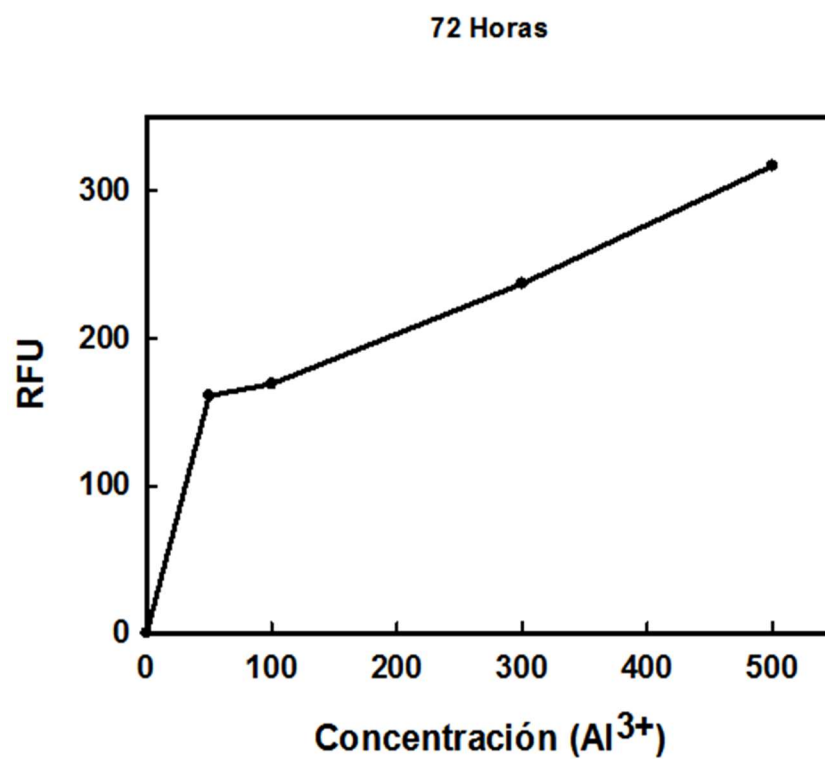


Anexo VIII. Curva estandar para la determinación de Al libre en 72 horas de tratamiento.**Lectura**

Excitación: 10 nm

Emisión: 5 nm.

Tiempo de lectura: 600 segundos.



Anexo IX. Determinación de la concentración de Al libre en 24, 48 y 72 horas en suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo, tratadas o no con 100 y 500 μM de Al.

Muestra \ Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
Control	0 μM	0 μM	0 μM
100 μM de Al	34.4 μM	41.3 μM	39.6 μM
500 μM de Al	204 μM	170 μM	231 μM

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., A. Johnson., J. Lewis., D. Morgan., M. Raff., K. Roberts y P. Walter (2015). Molecular Biology of the Cell. Sixth edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. New York, US. pp. 1342.
- Alvarado-Soto, M. y G. Rojas-Cubero (2011). El cultivo y beneficiado del café. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). EUNED, Costa Rica. pp. 184.
- Ahn, S. J., M. Sivaguro., H. Osawa., G.C. Chung y H. Matsumoto (2001). Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, 126, 1381-1390.
- Atafar, Z. A. Mesdaghinia., J. Nouri., M. Homae., M. Yunesian., M. Ahmadimoghaddam., A. H. Mahvi (2008). Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental Monitoring and Assessment*, 160, 83-89.
- Barrientos, E. (1990). Manejo de suelos cafetaleros, en: El cultivo del cafeto en México, Sáenz-Colín, A. (ed). Instituto Nacional del Café. México. pp. 125-141.
- Bae, H., E. Herman., B. Bailey., H-J. Bae y R. Sicher (2005). Exogenous trehalose alters *Arabidopsis* transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. *Physiologia Plantarum*, 125: 114-126.
- Baes, C.F. y R. Mesmer. (1976). The hydrolysis of cations. (ed). Jhon Wiley and Sons. New York. pp. 112.
- Blancaflor, E. B., D. L. Jones y S. Gilroy (1998). Alteration in the cytoskeleton accompany aluminium-induced growth inhibition and morphological roots of maize. *Plant Physiology*, 118: 159-172.
- Blamey, F.P (2001). The role of the root cell wall in aluminium toxicity. New perspectives, en: Plant Nutrient Acquisition, Ae, N., J. Arihara., K. Okada y A. Srinivasan. (eds). Springer. pp. 201-226.

- Bloom, A.J (2015). The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 10-16.
- Bojórquez, J. (2010). Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de café cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp. 97.
- Bolan, N.S. y M.J. Hadley (2003). Role of carbon, nitrogen and sulfur cycles in soil acidification, en: *Handbook of soil acidity*, Rengel, Z. (ed). New York. pp. 29-56.
- Bose, J., O. Babourina y Z. Rengel (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminum toxicity in plants. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 62, 2251–2264.
- Bradford, M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brown, L.C., J.W. Johnson (2015). Nitrogen and the hydrologic cycle. *Ohio State University AEX*, 463, 1-8.
- Buchanan, B., W. Gruissem y R. Jones. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD. pp. 1366.
- Buchanan, B., W. Gruissem y R. Jones. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Second edition. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD. pp. 1264.
- Calderón, G. O. D y L. A. D. Guambi (2014). Guía técnica para la producción y poscosecha del café. Sica. Tercera edición: COFENAC.
- Caputo, C. y A. Barneix (1997). Export of amino acids to the phloem in relation to N supply in wheat. *Plant Physiology*, 101, 853–860.
- Casierr-Posada, F (2002). Alteraciones inducidas por aluminio en el citoesqueleto de las plantas. *Revista Comalfi*, 29, 23-30.

- Casierra-Posada, F. y O. Aguilar-Avenidaño (2007). Stress for aluminum in plants: reactions in the soil, symptoms in plants and amelioration possibilities. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2, 246-257.
- Castillo, G., A. Contreras., A. Zamarripa., I. Méndez., M. Vázquez., F. Holguín y A. Fernández (1996). Tecnología para la producción de café. INIFAP, México. Folleto técnico No. 8. 88 p.
- Castro de Souza, L., D.C. Santos., L. Corrêa., T. Correa., T.J. da Silva., C.A. Pantoja., N.M. Castro., C. de Oliveira., S. Silva y A.E. De Araújo. (2016). Nitrogen compounds, proteins and amino acids in corn subjected to doses of aluminum. *African Journal of Agricultural Research*, 11, 1519-1524.
- Cawse, P. A (1967). The determination of nitrate in soil solution by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, 92, 311-315.
- Cazetta, J.O. y L.C. Vasques (2004). Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). *Scientia Agricola*, 61, 640-648.
- Celis-Arámburo, T.J., M. Carrillo-Pech., L.A. Castro-Concha., M. L. Miranda-Ham., M. Martínez-Estévez y I. Echevarría-Machado (2011). Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1456-1464.
- Chang R y K. Goldsby. (2013) Química. China: McGraw Hill Interamericana S.A. de C.V. Onceava edición. pp. 1100.
- Chee-González, L. (2009). Efecto de la adición de fósforo sobre la toxicidad por aluminio en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. México. pp. 100.
- Chee-González, L., J.A. Muñoz-Sánchez., G. Racagni-Di Palma y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2009). Effect of phosphate on aluminium-inhibited growth and signal transduction pathways in *Coffea arabica* suspension cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1497-1503.

- Chopin, F., M. Orsel., M.F. Dorbe., F. Chardon., H.N. Truong., A.J. Miller., A. Krapp., F. Daniel-Vedele. (2007). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant Cell*. 19, 1590-1602.
- Cleves, R. (2008). Pliego de condiciones para el cultivo de café. Instituto del Café de Costa Rica. Primera edición. pp.128.
- Conner, A.J. y C.P. Meredith. (1985). Strategies for the selection and characterization of aluminum-resistant variants from cell cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, 166, 466–473.
- Comin, F.A., J.A. Romero., V. Astorga., C. Garcia. 1999. Nitrogen Removal and Cycling in Restored Wetlands Used as Filters of Nutrients for Agricultural Runoff. *Water Science and Technology*, 35, 255–261.
- Crawford, N.M y A.D.M. Glass (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Review. *Trends in Plant Science*, 10, 389-395.
- Crawford, N.M y B.G. Forde. (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. pp. 25.
- Cullis, P.R. y B. Kruijff (1979). Lipid polymorphism and the functional role of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559, 339-420.
- Cuxim, R.J. (2012). Cambios en la fosforilación de proteínas en respuesta a la exposición del sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. a nitrato. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp. 94.
- Del Pozo, P.P., R.S. Herrera y M. García (2002). Dinámica de los contenidos de carbohidratos y proteína bruta en el pasto Estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con aplicación de nitrógeno y sin ella. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36, 275-280.
- Delhaize, E. y P.R. Ryan (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 103, 695-702.

- Delhaize, E., S. Craig., C.J. Beaton., R.J. Bennett., V.C. Jagdish y P.J. Randall (1993). Aluminium tolerance and mineral nutrition. *Federation of European Biochemical Societies*, 12, 2255-2262.
- De Boer, W. y G. Kowalchuk (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology Biochemistry*, 33, 853-866.
- Du, S., R. Zhang., P. Zhang., H. Liu., M. Yan., N. Chen., H. Xie y S. Ke (2016). Elevated CO₂-induced production of nitric oxide (NO) by NO synthase differentially affects nitrate reductase activity in *Arabidopsis* plants under different nitrate supplies. *Journal of Experimental Botany*, 67, 893-904.
- Eira, M.T.S., E.A. Amaral da Silva., R.D. De Castro., S. Dussert., C. Walters., J.D. Bewley y W.M.H. Hilhorts (2006). Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 149-163.
- Escalante, C. (2012). Efecto del aluminio sobre el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* var. *typica*) cultivadas en condiciones de hidroponía. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp.135.
- Esquivel-Hernández, L. (2016). Participación de la enzima superóxido dismutasa y la producción de peróxido de hidrógeno en la tolerancia al aluminio de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp. 79.
- Eticha, D., C. The., C. Welcker., L. Narro., A. Staß y W.J. Horst (2005). Aluminum-induced callose formation in root apices: inheritance and selection trait for adaptation of tropical maize to acid soils. *Field Crops Research*, 93, 252–263.
- Exley, C. y M.J. Mold (2015). The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 90-95.
- Fan, S.C., C.S. Lin., P.K. Hsu., S.H. Lin., Y.F. Tsay (2009). The *Arabidopsis* nitrate transport NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *The Plant Cell*, 21, 2750-2761.

- Fenilli, T.A.B., K. Reichardt., D. Dourado-Neto., P.C.O. Trivelin., J.L. Favarin., F. Costa y O.S. Bacchi (2007). Growth, development and fertilizer N recovery for a coffee crop growing in Brazil. *Scientia Agricola*, 64, 541-547.
- Fisher, J.M. (2008). Interactive effects of nitrogen deposition and fire on plant and soil chemistry in an alpine heathland. *Environmental Pollution*, 156, 409-416.
- Gallardo, F., M. Pino., M. Alvear y F. Borie (2005). Effect of aluminium on dry matter production and nitrate reductase activity of two wheat genotypes, growing in nutritive solutions. *Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal*, 5, 30-36.
- Gill, S.S. y N. Tujeta (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Glass, A.D., D.T. Britto., B.N. Kaiser., J.R. Kinghorn., H.J. Kronzucker., A. Kumar., M. Okamoto., S. Rawat., M.Y. Siddiqi., S.E. Unkles y J.J. Vidmar (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 855-864.
- Good, A.G., A.K. Shrawat y D.G. Muench (2004). Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 9, 597-605.
- Green, D.E., M. Fry y G.A. Blondin (1980). Phospholipids as the molecular instruments of ion and solute transport in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 77, 257-261.
- Grevenstuk, T. y A. Romano (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics*, 5, 1584-1594.
- Hajiboland, R. y C. Poschenrieder. (2015). Localization and compartmentation of Al in the leaves and roots of tea plants. *International Journal Of Experimental Botany*. 84. 86-100.

-
- Hakeem, K.R., A. Ahmad., M. Iqbal., S. Gucl y M. Ozturk (2011). Nitrogen efficient rice cultivars can reduce nitrate pollution. *Environmental Science and Pollution Research*, 18, 1184–1193.
- Hakeem, K.R., R. Chandna., A. Ahmad., M.I. Qureshi y M. Iqbal (2012). Proteomic analysis for low and high nitrogen responsive proteins in the leaves of rice genotypes grown at three nitrogen levels. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 168, 34–850.
- Hakeem, K.R., M. Sabir., F. Khan y R.U. Rehman (2014). Nitrogen regulation and signalling in plants, en: *Plant signalling: Understanding the molecular crosstalk*, Hakeem, K.R., R.U. Rehman y I. Tahir. (eds). Springer, India. pp. 117-131.
- Haug, A y C.E. Foy (1984). Molecular aspects of aluminium toxicity. *Critical Reviews in Plant Science*, 1, 345-373.
- Hortensteiner, S. y U. Feller (2002). Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *Journal of Experimental Botany*, 53, 927–937.
- Ikegawa H., Y. Yamamoto., H, Matsumoto. (2000) Responses to aluminum of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46, 503-514.
- Jones, D.L., E.B. Blancaflor., L.V. Kochian y S. Gilroy. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell Environment*, 29, 1309–1318.
- Jukanti, A. y A. Fischer (2008). A high-grain protein content locus on barley (*Hordeum vulgare*) chromosome 6 is associated with increased flag leaf proteolysis and nitrogen remobilization. *Plant Physiology*, 132, 426–439.
- Kaiser, W.M. y S.C. Huber (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1981-1989.

- Khamis, S., T. Lamaze., Y. Lemoine y C. Foyer (1990). Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. Relationships between electron transport and carbon assimilation. *Plant Physiology*, 94, 1436–1443.
- Kidd, P.S., M. Llugany., C. Poschnrieder., B. Gunsé y J. Barceló (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal Experimental Botany*, 52, 1339-1352.
- Kinraide, T.B. y U. Yemiyahu (2007). A scale of metal ion binding strengths correlating with ionic charge, Pauling electronegativity, toxicity, and other physiological effects. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 1201-1213.
- Kochian, L.V (1995). Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 237-260.
- Kochian, L.V., M.A. Piñeros y O.A. Hoekenga (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274, 175-195.
- Kochian, L.V., O.A. Hoekenga y M.A. Piñeros (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459–493.
- Kochian, L.V., M.A. Piñeros., J. Liu y J.V. Magalhaes (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 571-598.
- Krapp, A., L.C. David., C. Chandin., T. Girin., A. Marmagne., A.S. Leprince., S. Chaillou., S. Ferrairo-Méry., C. Meyer y F. Daniel-Vedele (2014). Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65, 789-798.
- Krapp, A (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115-122.
- Kollmeier, M., H.H. Felle y W.J. Horst (2000). Genotypical differences of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow

-
- involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122, 945-956.
- Kumar-Pand, J. y H. Matsumoto (2007). Molecular physiology of aluminum toxicity and tolerance in plants. *The Botanical Review*, 73, 326-347.
- Laemmli, U.K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lea, P.J (1997). Primary nitrogen metabolism, en: *Plant Biochemistry*, Day, P.M., J.B. Harborn (eds). Academic Press, New York. pp. 273-313.
- Leleu, O. y C. Vuylsteker (2004). Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany*, 55, 815–823.
- Leon, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. Tercera edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. IICA, Costa Rica. pp. 364.
- Li, W., M. Okamoto., N. Crawford., M. Yaeesh y A.D.M. Glass. (2007). Dissection of the *AtRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology*, 143, 425-433.
- Liang, C., M.A. Piñeros., T. Jiang., Z. Yao., L. Sun., J. Liu., J. Shaff., A. Coluccio., L.V. Kochian., H. Liao (2013). Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiology*, 161, 1347-1361.
- Liu, J., M.A Piñeros y L.V. Kochian (2014). The role of aluminum sensing and signalling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56, 221-230.
- Llugany, M., C. Poschenrieder y J. Barceló (1995). Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiologia Plantarum*, 93, 265-271.
- Lopes, P.F., M.C. Oliveira y P. Colepicolo (1997). Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 33, 225-231.
-

-
- Ma, Q.F., Z. Rengel y J. Kuo (2002). Aluminium toxicity in Rye (*Scale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips. *Annals of Botany*, 89, 241-244.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic press. London, Great Britain. pp. 889.
- Martínez-Estévez, M. (2001). Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida. México.
- Martínez-Estevez, M., J.A. Muñoz-Sánchez., V.M. Loyola-Vargas y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2001). Modification of the culture medium to produce aluminium toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 469-474.
- Martínez-Estevez, M., A. Ku-González., J.A. Muñoz-Sánchez., V.M. Loyola-Vargas., D. Pérez-Brito., R. Tapia-Tussell., J.A. Escamilla-Bencomo y S.M.T. Hernández-Sotomayor (2003). Changes in some characteristics between the wild and Al-tolerant coffee (*Coffea arabica* L.) cell line. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 69-78.
- Masclaux-Daubresse, C., M. Reisdorf-Cren y M. Orsel (2008). Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. *Plant Biology*, 10, 23–36.
- Masclaux-Daubresse, C., F. Daniel-Vedele., J. Dechorgnat., F. Chardon., L. Gaufichon y A. Suzuki (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany*, 105, 1141-1157.
- Massot, N., B. Nicander., J. Barceló., C. Poschenrider., E. Tillberg (2002). A rapid increase in cytokinin levels enhanced ethylene evolution precede Al^{3+} -induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation*, 37, 105-112.
- Matsumoto, H., D.E. Riechers., A.V. Lygin., F. Baluška., M. Sivaguru (2015). Aluminum signaling and potencial links with safener-induced detoxification in plants, en:

-
- Aluminum Stress Adaptation in Plants, Panda, S.K., F. Baluška. (ed). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 1-35.
- Mc Grath, S.P. y I.H. Rorison (1982). The influence of nitrogen source on the tolerance of *Holcus lanatus* L. and *Bromus erectus* Huds. to manganese. *New Phytologist*, 91, 443-452.
- Meriño-Gergichevich, C., M. Alberdi., A.G. Ivanov y M. Reyes-Díaz (2010). Al³⁺- Ca²⁺ interaction in plants growing in acid soils: Al-phytotoxicity response to calcareous amendments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10, 217-243.
- Miller, A. J. y M.D. Cramer (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274, 1–36.
- Mitra, G.N. (2015a). Regulation of nutrient uptake by plants. A biochemical and molecular approach. Bhubaneswar, Odisha, India. pp. 209.
- Mitra, G.N. (2015b). Nitrogen (N) uptake, en: Regulation of nutrient uptake by plants: A biochemical and molecular approach, Mitra G.N. (ed). Springer, India. pp. 9-24.
- Molina, E. (2001). Memoria: Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de cultivos en Costa Rica. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. pp. 18.
- Mossor-Pietraszewska, T (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 673-686.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth on bio-assays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 608-612.
- Nelson, D.L y M.M. Cox. (2013). Lehninger. Principles of Biochemistry. Sixth edition. W. H. Freeman and Company. New York. pp. 1198.
- Neto, A.P., J.L. Favarin., A. Rodrigues dos Reis., T. Tezotto., R.E. Munhoz de Almeida., J. Lavres y L.A. Gallo (2015). Nitrogen metabolism in coffee plants in response to nitrogen supply by fertigation. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27, 41-50.

-
- Nemie-Feyissa, D., A. Królícka., N. Førland., M. Hansen., B. Heidari., C. Lillo. (2013). Post-translational control of nitrate reductase activity responding to light and photosynthesis evolved already in the early vascular plants. *Journal of Plant Physiology*, 170, 662-667.
- Ohira, K., K. Ojima y A. Fujiwara (1973). Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspensions culture. *Plant and Cell Physiology*, 14, 1113-1121.
- Ojima, K., H. Abe., K. Ohira. (1984). Release of citric acid into the medium by aluminium-tolerant carrot cells. *Plant and Cell Physiology*, 25, 855–858.
- Ojima, K. y K. Ohira (1983). Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant and Cell Physiology*, 24, 789–797.
- Okamoto, M., A. Kumar., W. Li., Y. Eang., M.Y. Siddiqi., N.M. Crawford., A.D. Glass. (2006). High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology*, 140, 1036-1046.
- Olson, B.J.S.C (2016). Assay for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73, A.3A.1 – A.3A.32.
- Olson, B.J.S.C y J. Markwell (2007). Assay for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 48, 3.4.1-3.4.29.
- Owen, A.G. y D.L. Jones (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 651-657.
- Panda, S.K. y F. Baluška. (2015). Signalling and communication in plants, en: *Aluminum Stress Adaptation in Plants*, Panda, S.K. y F. Baluška (eds). Springer International Publishing, Switzerland. pp. 274.
- Pal'ove-Balang, P y I. Mistrik (2011). Effect of aluminium on nitrogen assimilation in roots of *Lotus japonicus*. *Plant Biosystems*, 145, 527-531.

-
- Parker, D.R y P.M. Bertch. (1992). Identification and quantification of the "Al₁₃" tridecameric polycation using Ferron. *Environmental Science & Technology*, 26, 914-921.
- Patterson, K., T. Cakmak., A. Cooper., I. Lager., A.G. Rasmusson y M.A. Escobar (2010). Distinct signalling pathways and transcriptome response signature differentiate ammonium-and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment*, 33, 1486-1501.
- Pavan, M. A., F.T. Bingham., P.F. Pratt. (1982). Toxicity of aluminum to coffee in ultisoils and oxisoils amended with CaCO₃, MgCO₃ and CaSO₄·2H₂O. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 1201-1207.
- Pech-Kú, R.J. (2016). Estudio de la relación entre el estrés por aluminio y la biosíntesis de cafeína en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. pp. 94.
- Perdomo, C., M. Barbazán y J. Durán (2006). Memoria: Nitrógeno. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. pp 74.
- Pereyra-Cardoso, M. (2001). Asimilación del nitrógeno en plantas. Facultad de Agronomía. Universidad de La Pampa. pp. 15.
- Pessarakli, M. (2008). Acid soil and aluminum tolerance in turfgrasses, en: Handbook of turfgrass management and physiology, Pessarakli, M. (eds) University of Arizona, Tucson, Arizona, USA. pp. 375-388.
- Plett, D., L. Holtham., U. Baumann., E. Kalashyan., K. Francis., A. Enju., J. Toubia., U. Roessner., A. Bacic., A. Rafalski., K.S. Dhugga., M. Tester., T. Garnett y B.N. Kaiser (2016). Nitrogen assimilation system in maize is regulated by developmental and tissue-specific mechanisms. *Plant Molecular Biology*, 92, 293-312.
- Poschenrieder, C., B. Gunsé., I. Corrales y J. Barceló (2008). A glance into aluminium toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, 400, 356-368.
- Ramírez, F. D. (2009). Review: Coffee cultivation in tropical conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56, 9-23.

-
- Ramos, L., S. Mellado., S. Ramadán., L. Bulacio., C. López (2006). Empleo de blanco de calcofluor para el estudio de las especies de *Malassezia* por microscopía directa. Revista Argentina de Microbiología, 38, 4-8.
- Ramos-Díaz, A., L. Brito-Argáez., T. Munnik., S. Hernández-Sotomayor. (2007). Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipaseC pathway. Planta, 225, 393-401.
- Ramirez-Benítez, J.E., J.A. Muñoz-Sánchez., K.M. Becerril-Chi., M.L. Miranda-Ham., L.A. Castro-Concha., S.M.T. Hernández-Sotomayor. (2011). Aluminum induces changes in oxidative burst scavenging enzymes in *Coffea arabica* L. suspension cells with differential Al tolerance. Inorganic Biochemistry, 105, 1523-1528.
- Reis, A.R., J.L. Favarin., L.A. Gallo., M.M. Moraes., T. Tezotto y J.J. Lavres. (2011). Influence of nitrogen fertilization on nickel accumulation and chemical composition of coffee plants during fruit development. Journal of Plant Nutrition, 34, 1853-1866.
- Rehman, K., M. Sabir., F. Khan y R. Rehman. (2014). Nitrogen regulation and signalling in plants, en: Plant Signalling: Understanding the Molecular Crosstalk, Hakeem, K.R., R.U. Rehman y I. Tahir. (eds). Springer, India. pp 355.
- Rengel, Z. (2002). pH as the master variable. Handbook of Plant Growth. University of Western Australia. Marcel Dekker Inc. Australia. pp. 472.
- Roberts, N.J. y R.C. Menary (1994). Effect of nitrogen on growth, flower yield, oil composition, and yield in *Boronia megastigma* Nees. Journal of Plant Nutrition, 17, 2035-2052.
- Rochat, C. y J.P. Boutin (1991). Metabolism of phloem-borne amino-acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate-fed pea-plants (*Pisum sativum* L.). Journal of Experimental Botany, 42, 207-214.
- Rorison, I.H (1985). Nitrogen source and the tolerance of *Deschampsia flexuosa*, *Holcus lanatus* and *Bromus erectus* to aluminium during seedling growth. Journal of Ecology, 73, 83-90.

- Rosas, F., B.A. Babcock., D.J. Hayes. (2015). Nitrous oxide emission reductions from cutting excessive nitrogen fertilizer applications. *Climate Change*, 132, 353-367.
- Rossato, L., P. Laine y A. Ourry (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: Nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1655–1663.
- Ryan, P.R., J.M. DiTomaso y L.V. Kochian (1993). Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitive and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany*, 44, 437-446.
- Ryan, P., S. Tyerman., T. Sasaki., Y. Yamamoto., W. Zhang y E. Delhaize (2011). The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *Journal of Experimental Botany*, 62, 9-20.
- Sade, H., B. Meriga., V. Surapu., J. Gadi., M.S.L. Sunita., P. Suravajhala., P.B. Kavi-Kisor (2016). Toxicity and tolerance of aluminium in plants: tailoring plants to suit to acid soils. *Biometals*, 29, 187-210.
- Schier, G.A. y C.J. McQuattie (1999). Effect of nitrogen source on aluminum toxicity in nonmycorrhizal and ectomycorrhizal pith pines seedling. *Journal of Plant Nutrition*, 22, 951-965.
- Schiltz, S., N. Munier-Jolain., C. Jeudy., J. Burstin., C. Salon (2005). Dynamics of exogenous nitrogen partitioning and nitrogen remobilization from vegetative organs in pea revealed by N *in vivo* labelling throughout seed filling. *Plant Physiology*, 137, 1463–1473.
- Serrano, C. R. G. (2013). The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 104, 894-900.
- Shomer, I., A.J. Novacky., S.M. Pike., U. Yermiyahu., T.B. Kinraide (2003). Electrical potentials of plant cell walls in response to the ionic environmental. *Plant Physiology*, 133, 411-422.

-
- õpson, R.J., H. Lambers y M.J. Dalling (1983). Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. *Plant Physiology*, 71, 7-14.
- Sivaguro, M. y W.J. Horst (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116, 155-163.
- Sivaguru, M., T. Fujiwara., T. Samaj., F. Baluška., Z. Yang., H. Osawa., T. Maeda., D. Volkmann y H. Matsumoto (2000). Aluminium-induced 1→3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmadesmata: a new mechanism of Al toxicity in plants. *Plant Physiology*, 124, 991-1005.
- Sivaguru, M., B. Ezaki., Z.H. He., H. Tong., H. Osawa., F. Baluška., D. Volkmann., H. Matsumoto (2003). Aluminium-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 2256-2266.
- Souza, L.A., L.S. Camargos y L.F. Aguiar (2014). Effect of aluminum on nitrogen compounds in *Urochloa* spp. *Annual Review of Biochemistry*, 3, 33-39.
- Srivastava, H.S (1990). Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 19, 725-733.
- Stass, A. y W.J. Horst (1995). Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture. *Plant Soil*, 17, 113-118.
- Stevenson, F.J (1982). Organic forms of soil nitrogen. Nitrogen in agricultural soils. *American Society of Agronomy*, 22, 383-411.
- Suzuki, A. y D.B. Knaff (2005). Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. *Photosynthesis Research*, 83, 191-217.
- Taylor, G. J y C.D Foy (1985). Mechanisms of aluminum tolerance in *Triticum aestivum* L. (wheat). Differential pH induced by winter cultivars in nutrient solutions. *American Journal Botany*, 72, 695– 701.

-
- Vazquez, M.D., C. Poschenrieder., I. Corrales., J. Barceló (1999). Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology*, 119, 435-444.
- Wang, W., X.Q. Zhao., R.F. Chen., X.Y. Dong., P. Lan., J.F. Ma y R.F. Shen (2015). Altered cell wall properties are responsible for ammonium-reduced aluminium accumulation in rice roots. *Plant, Cell and Environment*, 38, 1382-1390.
- Watanabe, T., M. Osaki y T. Tadano (1998). Effects of nitrogen source and aluminium on growth of tropical tree seedlings adapted to low pH soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44, 655-666.
- Wendler, R., P.O. Carvalho., J.S. Pereira y P. Millard (1995). Role of nitrogen remobilization from old leaves for new leaf growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. *Tree Physiology*, 15, 679–683.
- Wuana, R. A., y F. E. Okieimen (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network*, 2011, 1-20.
- Xia, J., N. Yamaji., T. Kasai y J.F. Ma (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 107, 18381-18385.
- Xu, Q., Y. Wang., Z. Ding., L. Song., Y. Li., D. Ma., Y. Wang., J. Shen., S. Jia., H. Sun y H. Zhang (2016). Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 162-172.
- Yakimova, E.T, V.M. Kapchina-Toteva y E.J. Woltering (2007). Signal transduction events in aluminium-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*, 164, 702-708.
- Yaroshevsky, A (2006). Abundances of chemical elements in the earth's crust. *Geochemistry International*, 44, 48-55.

- You, J.F., Y.F. He., J.L. Yang y S.J. Zheng (2005). A comparison of aluminium resistance among polygonum species originating on strongly acidic and neutral soils. *Plant and Soil*, 276, 143-151.
- Zhang, B., P. Liu., Y.S. Yang y G.D. Xu (2007). Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Botany Studies*, 48, 435–444.
- Zhao, X.Q., R.F. Shen y Q.B. Sun (2008). Ammonium under solution culture alleviates aluminum toxicity in rice and reduces aluminum accumulation in roots compared with nitrate. *Plant and Soil*, 315, 107-121.
- Zhao, X.Q., S.W. Guo., F. Shinmachi., M. Sunairi., A. Noguchi., I. Hasegawa y R.F. Shen (2013). Aluminium tolerance in rice is antagonistic with nitrate preference and synergistic with ammonium preference. *Annals of Botany*, 111, 69-77.
- Zhu, M., Z. Liu., H. Shao y Y. Jin (2016). Effects of nitrogen and phosphate enrichment on the activity of nitrate reductase of *Ulva Prolifera* in coastal zone. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 169-175.