



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL DESARROLLO DE
PLÁNTULAS DE CAFETO (*Coffea arabica* var. *Typica*)
CULTIVADAS EN CONDICIONES DE HIDROPÓNIA**

Tesis que presenta

CAMILO ANDRÉS ESCALANTE MAGAÑA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012





Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL DESARROLLO DE
PLANTAS DE CAFÉ (Coffea arabica var. Typica)
CULTIVADAS EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA

Tesis que presenta

CARLOS ANDRÉS ESCALANTE MAGAÑA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas, Opción Biotecnología y Biología Molecular)

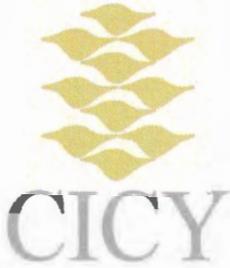
Mérida, Yucatán, México

2012



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 del aluminio sobre el desarrollo de plántulas de cafeto (*Coffea arabica* var. *Typica*) cultivadas en condiciones de hidroponía**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vazquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 17 de Diciembre de 2012.

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, 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: _____



I. Agr. CAMILO ANDRÉS ESCALANTE MAGAÑA

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 (CONACyT; No. 24572/50626) titulado "Análisis de la tolerancia a aluminio en plántulas transgénicas de café cultivadas *in vitro* obtenidas con la integración del gen AVP1" bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente doy gracias a dios por la vida, la salud y bienestar, por permitirme tener la familia tan especial donde me he formado, a aquellas personas que puso en mi camino y que han participado en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres, Camilo y Socorro, por su apoyo incondicional, esfuerzo, dedicación, sus consejos y sobre todo doy gracias a su sacrificio y amor incansable que me han dado, les doy las gracias por educarme con buenos principios, por enseñarme los buenos valores, por enseñarme a valorar a las personas que me rodean a lo largo de esta vida, agradezco por estar a mi lado en los momentos difíciles y de felicidad. A mis hermanos, Jesús y Adán, por estar conmigo cuando los necesite. Familia, gracias por todo su amor y por todos esos buenos momentos que hemos pasado y que no cambiaría por nada del mundo.

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

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 242989, otorgada para mis estudios de maestría.

A mi asesor el Dr. Manuel Martínez Estévez por permitirme estar en su grupo de trabajo, por su dedicación, consejos, amistad y sobre todo ser una excelente persona. Por sus conocimientos enseñados durante todos estos años. Le doy gracias por guiarme en la realización de este estudio ya que sin usted no hubiera sido posible.

Gracias a la Dra. Ileana Echevarría Machado por ser muy buena persona y maestra, por todos aquellos consejos que me dio en los seminarios durante la realización de este trabajo y sobre todo por toda la ayuda brindada.

A mi comité tutorial, a la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda, por todos conocimientos, propuestas y consejos brindados, les doy de todo corazón las gracias.

Gracias a mi comité revisor de tesis, la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, a la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda, por su tiempo dedicado a la revisión y corrección de la tesis.

A la M.C. Fátima Medina Lara y a la M.C. Lucila Sánchez Cach, por compartir sus conocimientos, metodologías y consejos para la realización de esta tesis, gracias por su amistad.

Doy las gracias también al Dr. Alfredo Sandoval Esquivel y al Dr. Ismael Méndez López del INIFAP de Tuxtla Chico, Chiapas. Por su donación de la semilla de café para los experimentos.

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

A todos mis amigos que han formado parte del laboratorio 07, Emanuel, Enid, Nancy, Luis Fernando, Luis Gamica, Erín, Ricardo, Gladys, Neto, Ángel, Teresita, Neto 2, Anahí, Celsi, Fanny, gracias por todos los momentos agradables que pasamos.

A mis amigos del CICY, a Carlos, Gaby, Ángela, Rocío, Nayvi, Juan, Daniel y Emily Marín, gracias por los buenos momentos dentro y fuera del mismo.

A todos mis amigos, que han formado parte de mi vida y han estado en todo momento, gracias por darme su amistad.

A mi novia Marta, quien ha estado en todo momento conmigo, a la que ha sido mi mejor amiga, mi compañera de vida, mi cómplice en todo momento y quien ha estado cuando más lo he necesitado, gracias por ensayar conmigo a altas horas de la noche mis presentaciones para los tutoriales y seminarios de grupo, le agradezco a Dios por cruzarla en mi camino, porque eres gran parte fundamental de mi vida.

Y por último a mi perro Tom, quien fue como un hijo para mí, por dedicarme su vida, su amistad y por ser el primero que me recibía en mi casa cada semana que llegaba.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo quiero dedicar a mis padres, Camilo y Socorro; a mis hermanos, a mi novia Marta; sin todos ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tanto sacrificio invertido y desveladas me sirvieron de mucho y aquí está el fruto. Les agradezco de todo corazón a todos con todo mi ser y por estar en mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	7
ANTECEDENTES	7
1.1. EL CAFETO	7
1.1.1. CENTRO DE ORIGEN Y LA DIVERSIFICACIÓN DEL CAFÉ.....	8
1.1.2. TAXONOMÍA	9
1.1.3. MORFOLOGÍA DE LA PLANTA DE CAFÉ.....	10
1.1.4. PRODUCCIÓN EN MÉXICO	16
1.1.5. CARACTERÍSTICAS DE LA PRODUCCIÓN NACIONAL	17
1.1.6. CARACTERÍSTICAS IDEALES DEL SUELO PARA LA PRODUCCIÓN DEL CAFÉ	17
1.1.7. REQUERIMIENTOS CLIMÁTICOS	18
1.2. SUELOS ÁCIDOS	18
1.2.1. DISPONIBILIDAD DE NUTRIENTES EN SUELOS ÁCIDOS	20
1.3. ALUMINIO.....	21
1.3.1 GENERALIDADES	21
1.3.2. LA SATURACIÓN DE ALUMINIO EN EL SUELO	22
1.3.3. ABSORCIÓN DEL ALUMINIO EN PLANTAS	22
1.3.4. TRASLOCACIÓN DEL ALUMINIO A LA PARTE AEREA.....	24
1.3.5. CONTENIDO DE Al EN PLANTAS.....	25
1.3.6. EFECTOS BENÉFICOS	25

1.3.7. TOXICIDAD DE ALUMINIO EN PLANTAS	26
1.3.8. TOLERANCIA AL ALUMINIO	32
1.3.9. TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN CAFETO	34
1.4. HIDROPONÍA	35
1.4.1. DEFINICIÓN	35
1.4.2. IMPORTANCIA Y APLICACIONES	36
1.4.3. SUSTRATOS	36
1.4.4. SOLUCIONES NUTRITIVAS	37
1.5. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA.....	39
1.5.1. CULTIVO DE EMBRIONES	39
1.5.2. FACTORES QUE AFECTAN EL CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS	40
1.6. DIFERENCIAS ENTRE LA EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA Y SOMÁTICA.....	40
1.7. ESTUDIOS EN CAFETO A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS	42
1.8. PEROXIDASAS	43
1.8.1. CLASE III DE PEROXIDASAS VEGETALES.....	44
1.8.2. FUNCIONES.....	45
1.8.3. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	46
1.9. ESTUDIOS SOBRE LA RELACIÓN ALUMINIO-PEROXIDASAS.....	47
HIPÓTESIS	49
OBJETIVO GENERAL	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	50
BIBLIOGRAFÍA.....	52
CAPÍTULO II	73
EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE CAFETO (<i>COFFEA ARABICA</i> VAR. <i>TYPICA</i>) CULTIVADAS EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA.....	73
2.1. INTRODUCCIÓN	73
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	74
2.2.1. MATERIAL VEGETAL	74
2.2.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS.....	75
2.2.3. EXTRACCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS	75
2.2.4. PRUEBA PILOTO DE ADAPTACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE CAFETO TRANSFERIDAS DE <i>IN VITRO</i> A MEDIO HIDROPÓNICO	75
2.2.5. EVALUACIÓN DEL CULTIVO EN EL PERIODO DE ACLIMATACIÓN.....	76
2.2.6. ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALUMINIO	77
2.2.7. MEDICIÓN DEL pH DE LA SOLUCIÓN EN PRESENCIA DE Al EN DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO.....	78
2.2.8. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALUMINIO EN LAS RAÍCES DE CAFETO POR MICROSCOPIA Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA.....	78
2.2.9. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL Al, K, Ca, P EN ÓRGANOS VEGETALES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-AES POR SUS SIGLAS EN INGLÉS)	79
2.2.10. DETERMINACIÓN DE LA FUGA DE ELECTROLITOS EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS (RAÍZ, TALLO Y HOJA).....	79
2.2.11. COSECHA DE TEJIDOS	80

2.2.12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD	80
2.2.13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS EN RAÍCES Y HOJAS	81
2.2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	81
2.3. RESULTADOS	82
2.3.1. PRUEBA PILOTO DE ADAPTACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE CAFETO TRANSFERIDAS DE <i>IN VITRO</i> A MEDIO HIDROPÓNICO	82
2.3.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS.....	83
2.3.3. DISCUSIÓN	91
2.3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ALUMINIO Y NUTRIMENTOS EN RAÍCES, TALLOS Y HOJAS EN LAS PLÁNTULAS DE CAFETO	93
2.3.4.1. CUANTIFICACIÓN DE ALUMINIO	94
2.3.4.2. CUANTIFICACIÓN DE CALCIO	95
2.3.4.3. CUANTIFICACIÓN DE POTASIO.....	95
2.3.4.4. CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO	96
2.3.5. DISCUSIÓN	96
2.3.6. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE pH DE LAS SOLUCIONES EN UN CURSO TEMPORAL EN PRESENCIA DE Al A DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO	98
2.3.7. DISCUSIÓN	99
2.3.8. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALUMINIO EN LAS RAÍCES DE CAFETO POR TINCIÓN CON HEMATOXILINA	101
2.3.9. DISCUSIÓN	102
2.3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS EN RAÍCES Y HOJAS DE	

PLÁNTULAS DE CAFETO EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AI	103
2.3.11. DISCUSIÓN	104
2.3.12. CUANTIFICACIÓN DE LA FUGA DE ELECTROLITOS EN RAÍCES, TALLOS Y HOJAS DE PLÁNTULAS DE CAFETO EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AL..	106
2.3.13. DISCUSIÓN	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110
CAPÍTULO III	119
DISCUSIÓN GENERAL	119
BIBLIOGRAFIA.....	127
CAPÍTULO IV	133
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	133
4.1. CONCLUSIONES GENERALES.....	133
4.2. PERSPECTIVAS.....	134

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología de la parte aérea del café.....	11
Figura 1.2. Características morfológicas del café.....	12
Figura 1.3. Morfología floral del café.....	13
Figura 1.4. Estructura del fruto del café.....	14
Figura 1.5. Morfología del fruto y semilla de café.....	15
Figura 1.6. Distribución y clasificación de los estados con mayor producción de café en México.....	16
Figura 1.7. Principales nutrientes del suelo y su disponibilidad que va estrechamente relacionada con el pH del suelo lo cual se observa que la mayoría de estos nutrientes esenciales están disponibles a pH de 6 a 7.	20
Figura 1.8. Etapas o estadios de la embriogénesis somática y la cigótica.....	42
Figura 1.9. Las diversas funciones y desempeños de las peroxidasas clase III.....	46
Figura 1.10. Estrategia experimental.....	51
Figura 2.1. Efecto de diferentes concentraciones de Al en el crecimiento de las plántulas de <i>C. arabica</i> var. <i>Typica</i>	83
Figura 2.2. Efecto del Al en plántulas de <i>C. arabica</i> var. <i>Typica</i> al día 60.....	84
Figura 2.3. Efecto del Al sobre los pesos frescos y secos de raíces de cafeto en presencia de diferentes concentraciones de 0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3	85
Figura 2.4. Efecto del Al sobre los pesos frescos y secos en tallos de cafeto (<i>C. arabica</i> var. <i>Typica</i>) a concentraciones de 0, 100, 300 y 500 μM de Al.	86
Figura 2.5. Efecto del Al sobre los pesos frescos y secos en hojas de cafeto (<i>C. arabica</i>	

var. Typica) a concentraciones de 0, 100, 300 y 500 μM de aluminio.	87
Figura 2.6. Cuantificación de las hojas en el día 0 y el día 60 de tratamiento con AlCl_3 ..	88
Figura 2.7. Efecto del Al sobre altura de la plántulas de cafeto en los diferentes tratamientos (0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3).....	89
Figura 2.8. Mediciones en relación a la longitud de la raíz en plantas de <i>C. arabica</i> var. Typica, en el día 0 y el día 60 de tratamiento.....	90
Figura 2.9. Comportamiento del pH a diferentes días de cultivo.....	99
Figura 2.10. Tinción con hematoxilina de raíces de café al día 60 de cultivo.....	102
Figura 2.11. Actividad específica de peroxidasa en raíces y hojas de plántulas de <i>C. arabica</i> . cada barra representa una media entre 3 repeticiones por tratamiento (n = 3 plántulas).	104
Figura 2.12. Porcentaje de la fuga de electrolitos en órganos (raíces, tallos y hojas) de plántulas de cafeto expuestas a diferentes concentraciones de Al (100, 300 y 500 μM de AlCl_3) y el testigo, cada barra representa una media entre 3 repeticiones por tratamiento (n = 3 plántulas).	107

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Taxonomía del café según Smith y Marzocca, (1981)	10
Cuadro 1.2. Principales factores limitantes del crecimiento vegetal asociados con las condiciones ácidas del suelo.	19
Cuadro 1.3. Elementos comunes en la corteza terrestre	21
Cuadro 1.4. Solución modificada de Hoagland Solución modificada de Hoagland (Martínez-Cordero <i>et al.</i> , 2004).	38
Cuadro 2.1. Medición de longitud del tallo, raíz y hoja entre el día 0 y 30 DDT	82
Cuadro 2.2. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) presente en diferentes tejidos de <i>C. arabica</i> var. <i>Typica</i>	84
Cuadro.2.3. Contenido de aluminio y nutrimentos presentes en los diferentes órganos de <i>C. arabica</i> .var. <i>Typica</i>	94
Cuadro 2.4. Diferencias de pH presente en la solución nutritiva a diferentes días de cultivo de <i>Coffea arabica</i> var. <i>Typica</i>	99

ABREVIATURAS

AACT1	Transportador de Citrato Activado por Aluminio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALMT1	Transportador de Malato Activado por Aluminio
AO	Ácidos Orgánicos
BSA	Albúmina de suero bovino
DDT	Días después de ser transferidas
DTT	Ditiotreitol
EC	Clasificación enzimática
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
FE	Fuga de electrolitos
ICP-AES	Espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MO	Materia Orgánica
Nramp	Resistencia natural asociado a macrófagos
Nrat1	Nramp transportador de aluminio 1
pH	Potencial de hidrógeno
PI	Fosfatidil Inositol

PI 4-K	Fosfatidil Inositol 4-cinasa
PIP 5-K	Fosfatidil Inositol Fosfato 5-cinasa
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
POX	Peroxidasa
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
PVPP	Polivinilpirrolidona
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

RESUMEN

El cafeto (*Coffea* spp.) es cultivado en más de 50 países, siendo Brasil el principal productor a nivel mundial. A pesar de que hay muchas especies de este cultivo, sólo *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, son las de importancia económica. El cafeto se cultiva en suelos con mucha materia orgánica, que tienden a ser ácidos (pH de 4.5 a 5.5). Estos suelos ácidos representan entre el 40 y el 50% de los suelos arables del mundo, siendo el aluminio uno de los factores limitantes para la productividad de los cultivos. Se ha determinado que el aluminio está presente en algunos suelos donde se produce el cafeto. El aluminio se encuentra en el suelo en forma de aluminosilicato o de óxidos de aluminio, siempre que éstos sean suelos medianamente ácidos o neutros. Existen reportes de que la toxicidad por Al^{3+} presenta como síntoma inicial y más dramático la inhibición de la elongación de las raíces, también este metal interviene en el transporte de nutrientes e impide la toma de los mismos, por lo tanto la planta puede presentar deficiencias en la toma de fósforo, potasio, calcio, entre otros. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del aluminio sobre el crecimiento de plántulas de cafeto cultivadas en condiciones de hidroponía durante 60 días de tratamiento con diferentes concentraciones de este metal. En los resultados se presenta el efecto del aluminio sobre el crecimiento de la plántula, así como la concentración endógena de nutrimentos en los diferentes órganos de la plántula y la presencia de aluminio en el tejido. También se determinó el efecto de este metal sobre la actividad de peroxidasa. Los resultados mostraron que el efecto del Al en plántulas de café tiene un efecto negativo en la morfología de la planta, a concentraciones de 500 μ M de Al provocó abscisión de hojas, inhibió el crecimiento tanto radical como en la parte aérea; este metal se acumula mayormente en raíz pero también es absorbido y traslocado a la parte aérea; el pH es un factor importante a considerar para la disponibilidad del Al; en raíces la acumulación del metal fue en la zona meristemática y de diferenciación; al cuantificar la actividad de POX se observó que es mayor en raíz donde está presente el Al y se sugiere que esta enzima podría actuar como un sistema de tolerancia.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea* spp.) is grown in over 50 countries, Brazil being the number one producer worldwide. Although there are many species of this crop, only *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, are economically important. Coffee is grown in soils with a high content of organic matter, which tend to be acidic (pH 4.5 to 5.5). These acidic soils make up between 40 and 50% of the world's arable soils, aluminum being one of the limiting factors in crop productivity. Studies have shown that aluminum is present in some soils where coffee is produced. Aluminum is found in the soil as aluminosilicate or aluminum oxide, provided that these soils are acidic or neutral medium. There are some reports that show that Al toxicity symptoms appear more drastic and as an inhibitor of root elongation. This metal is involved in the transport of nutrients as well as the prevention of the seizure of the same; thus the plant can be deficient in making phosphorus, potassium, calcium, among others. The aim of this research was to determine the effect of aluminum in the growth of coffee seedlings grown in hydroponic conditions for 60 days of treatment with different concentrations of this metal. The results show the effect of aluminum on seedling growth and the endogenous concentration of nutrients in various organs of the seedling, as well as the presence of aluminum in the tissue. The study also determined the effect of the metal on the peroxidase activity. The results demonstrated that the effect of Al on coffee plantlets has a negative effect on the morphology of the plants. Concentrations of 500 μM of Al provoked abscission of leaves, thus inhibiting the radical growth in the air. The metal accumulated mostly in the root and absorbed and translocated to the shoot. The pH was an important factor to consider for the availability of Al. In the roots, metal accumulation was in the meristematic and differentiation region. When the activity of POX was quantified, we observed that this activity was greater in the roots where Al was present. These results suggest that this enzyme could act as a tolerance system.

INTRODUCCIÓN

El cafeto (*Coffea arabica* L.), es originario de las tierras altas de más de 1000 msnm en Etiopía y Sudán en el continente africano (ICAFFE-MAG, 1989), también es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y uno de los cultivos tropicales perennes con mayor área cultivada en el mundo, la cual comprende alrededor de 11.2×10^6 ha (Berthouly, 1997; Carneiro, 1999).

El cafeto (*Coffea ssp.*) es cultivado en más de 50 países, siendo Brasil el principal productor a nivel mundial. A pesar de que hay muchas especies de este cultivo, sólo *C. arabica* y *C. canephora*, son las de mayor importancia económica (ICAFFE-MAG, 1989; Coste, 1992; USDA, 2009).

En México se cultivan comercialmente las dos especies de café más importantes: *C. arabica* L., la cual es la de mayor importancia en extensión, difusión, calidad y valor en el mercado nacional e internacional, aportando el 95% de la producción y *C. canephora*, conocida como café Robusta. La producción de café en México de la especie *C. arabica* L. está representada por las variedades comerciales conocidas como cafés árabes, siendo la variedad Typica conocida con los nombres de Criollo, Café arábico, Corriente o Nacional, la cual es la de mayor distribución (Castillo *et al.*, 1996).

La propagación del cafeto se realiza sexualmente a través de semillas y las plantas se cultivan en un sombreador de 6 a 24 meses hasta que pueden ser llevadas a campo (Cobley, 1976). El cafeto también se propaga asexualmente mediante estacas, injerto de yemas y mediante el empleo de cultivo de tejidos *in vitro* (suspensiones celulares, cultivo de ápices, embriogénesis somática, embriones cigóticos, etc.) (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Por sus requerimientos agronómicos el cafeto, se cultiva en suelos ácidos con gran cantidad de materia orgánica y con un rango de pH entre 4.5 a 5.5. Esto es un problema en algunas zonas productoras de café en México, porque estos suelos ácidos están ampliamente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales, donde constituyen aproximadamente el 30% del área total de la tierra del planeta, así como el 50% de los suelos arables del mundo.

INTRODUCCIÓN

Los suelos ácidos limitan la producción vegetal a nivel mundial y constituyen una limitante para el cultivo de plantas comestibles como son el maíz, el arroz, el trigo y la soya (Kochian *et al.*, 2004). Por lo tanto, el crecimiento pobre de este tipo de cultivos se puede deber a la toxicidad por H^+ , disposición de nutrientes y la toxicidad por metales (Kidd *et al.*, 2001), siendo la toxicidad por aluminio el principal metal que causa efectos desfavorables para estos cultivos.

El aluminio es el metal más abundante y el tercer elemento más común en la corteza terrestre. Representa aproximadamente el 8% del peso total de los suelos. Los suelos ácidos representan el 50% de los suelos arables del mundo, y en éstos, el Al es uno de los factores limitantes para la productividad de los cultivos. Éste se encuentra en el suelo en forma de alumino-silicatos o de óxidos de aluminio, siempre que éstos sean suelos medianamente ácidos o neutros. Sin embargo, en los suelos ácidos las formas en las que se encuentra son: Al^{3+} , $Al(OH)^{2+}$ o $Al(OH)_2$. Éstas son formas tóxicas para las plantas por estar disponibles en solución, lo que limita su crecimiento (Foy, 1984; 1988; Kinraide, 1991; Kochian, 1995).

Cuando el pH del suelo es ligeramente ácido ó neutro, el Al se encuentra principalmente como depósitos insolubles y son esencialmente inactivos biológicamente. La acidez del suelo aumenta gradualmente como resultado de los efectos del medio ambiente, especialmente la lluvia ácida (Delhaize y Ryan 1995).

El Al, en general, provoca en las plantas síntomas similares a los producidos por la deficiencia de fósforo (hojas pequeñas de color verde oscuro, maduración tardía, amarillamiento y muerte de los ápices de las hojas); también provoca síntomas similares a los producidos por deficiencia o reducción del transporte de calcio (enrollamiento de las hojas jóvenes y colapso de los meristemos). Las raíces de las plantas que son afectadas por el aluminio son pequeñas y quebradizas. El Al asimismo interfiere con la absorción, el transporte y la utilización de nutrientes (Thawornwong y Van Diest, 1974; Pavan y Bingham, 1982).

El contenido de Al soluble en el suelo oscila entre 1-33 ppm, pero rara vez excede las 4 ppm. Cuando aumentan las concentraciones de aluminio (para muchas especies de plantas este metal se encuentra entre 1-2 ppm) inhiben la división celular y el

alargamiento de la raíz, dando lugar al desarrollo de raíces pobres, reducción de la toma de agua y nutrientes, susceptibilidad a la sequía y, posteriormente, una disminución significativa en el rendimiento (Foy, 1983).

En los últimos años, se han logrado importantes avances en el estudio sobre la toxicidad que produce el Al y por lo tanto esto ha sido de mucha ayuda para la comprensión de las respuestas fisiológicas y la tolerancia de las plantas a la toxicidad de este metal. Sin embargo, quedan muchas preguntas por responder. Por ejemplo, el Al es un inhibidor efectivo de la fotosíntesis, pero los mecanismos involucrados no han sido plenamente comprendidos todavía. Muchas plantas pueden acumular altos niveles de Al que se encuentra en el suelo a nivel de tejidos, pero ahora se sabe que existe un transportador de aluminio y este es específico para el Al^{3+} el cual se ha identificado en arroz (*Oryza sativa*) y se encuentra en la membrana plasmática, este tipo de transportador es llamado *Nrat1* y pertenece a la familia de los *Nramp* (*natural resistance-associated macrophage protein*) y se ha demostrado que cuando se apaga esta proteína, tanto la entrada como la acumulación en la savia disminuye, (Xia *et al.*, 2010) y cómo éste se trasloca en estos tejidos. Hasta el momento se está empezando a comprender los mecanismos de desintoxicación en los acumuladores de aluminio (Li-Song, 2006).

Como el café se cultiva en suelos ácidos, existe la posibilidad de que este cultivo presente problemas de toxicidad por aluminio ya que dicho metal se hace soluble a pH ácido, y puede estar disponible para la planta de café, teniendo un efecto negativo y puede repercutir en el rendimiento del cultivo y por lo tanto en la economía de los productores de café.

Con todos estos antecedentes se decidió evaluar el efecto que tienen diferentes concentraciones de aluminio sobre el desarrollo de cultivos hidropónicos de plántulas de café (*Coffea arabica* var. *Typica*).

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado-Soto M. y Rojas-Cubero G. (1994). El Cultivo y Beneficiado del Café. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia, pp. 184.
- Berthouly M. (1997). Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. En Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.
- Carneiro M.F. (1999). Advances in coffee biotechnology. AgBiotechNet, 1: 1-14. Disponible en: <http://www.agbiotechnet.com/reviews/jan99/html/Carneiro.htm>.
- Castillo G., Contreras A., Zamarripa A., Méndez I., Vázquez M., Holguín F. y Fernández A. (1996). Tecnología para la Producción de Café en México, 1ª Reimpresión; INIFAP: México. pp. 1-11.
- Cobley L.S. (1976). The botany of tropical crops. Longman. New York, E.U.A, pp. 371.
- Coste R. (1992). Coffee - The Plant and the Product. MacMillan Press, London.
- Delhaize E. y Ryan P.R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiology, 107: 315-321.
- Foy C.D. (1983). Plant adaptation to mineral stress in problem soils. Iowa State Journal of Research, 57: 339-354.
- Foy C.D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. In F. Adams (ed.) Soil Acidity and Liming. Agronomy Monograph no. 12 (2nd ed.) ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI. pp. 57-97.
- Foy C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soils. Communications in Soil Science and Plant Analyss, 19: 959-987.
- ICAFIE-MAG. (1989). Manual de recomendaciones para el cultivo del café. Ged. ICAFE. Programa cooperativo. Costa Rica. 122 pp.
- Kidd P.S., Llugany M., Poschenrieder C., Gunsé B. y Barceló J. (2001). The role of root

- exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1339-1352.
- Kinraide T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant and Soil*, 134: 167-178.
- Kochian L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 237-260.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A. y Piñeros M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and Phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 459-93.
- Li-Song C. (2006). Physiological Responses and Tolerance of Plant Shoot to Aluminum Toxicity. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32: 143-155.
- Pavan M.A. y Bingham F.T. (1982). Toxicity of aluminium to coffee seedlings grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 46: 993-997.
- Thawomwong N. y Van Diest A. (1974). Influences of high acidity and aluminum on the growth of lowland rice. *Plant and Soil*, 41: 141-159.
- USDA (United States Department of Agriculture) Coffee: World Markets and Trade, Foreign Agricultural Service, Circular Series FCOFF 2-09, December 2009.
- Xia J.X., Yamaji N., Kasai T. y Ma J.F. (2010). Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.*, 107: 18381-19385.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. EL CAFETO

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado nacional e internacional y representa una importante fuente de ingresos para millones de personas productoras en Asia, África y Latinoamérica (Carneiro, 1999); en el mundo se conocen más de 70 especies de café pero sólo dos son las más importantes comercialmente: *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre; 70% del café tratado en el mundo es arábigo y 30% es Robusta (*C. canephora*). Otras especies tales como *C. congensis*, *C. dewevrei* y *C. racemosa* han sido de interés para caracterizarlas genéticamente, incluyendo resistencia a pesticidas, enfermedades y para usarlas en programas de mejoramiento genético (Etienne, 2005; Eira *et al.*, 2006). Como se sabe la especie *Coffea arabica* es la de mayor importancia económica y por ello las principales variedades cultivadas en el mundo son:

Typica, también conocida como café criollo o arábico. Fue la primera variedad que llegó a nuestro continente y también a México, a finales del siglo XVIII. Se le considera la variedad patrón, originaria de Etiopía. Es de porte alto y da frutos de color rojo y amarillo. Si se deja libre en su crecimiento, puede alcanzar más de 4 m de altura, las ramas secundarias nacen opuestas y en pares alternos formando ángulos de 60° con el eje o el tronco principal. Sus entrenudos son muy largos. Las hojas nuevas son de color bronceado. El fruto es alargado, de buen tamaño y de magnífico rendimiento, como posee un sistema radical poco profundo, tiende a sufrir deficiencias nutricionales.

Bourbón, originaria de la Isla Bourbón en África (durante la Revolución Francesa recibió el nombre de Islas Reunión), llegó a México procedente de Guatemala por el Soconusco. También existe el Bourbón amarillo originario de Brasil. El Bourbón es una de las variedades más cultivadas en el estado de Chiapas, México. Es de porte alto y es de alta calidad. Sus hojas tiernas son generalmente de color verde. El ángulo de la rama primaria respecto a su salida del tallo es de 58°. Las hojas son anchas y redondeadas.

Mundo Novo, variedad originaria de Brasil, es un híbrido natural de porte alto y también de gran calidad. Es producto de un cruce natural entre bournón y Typica. Es de porte alto y sus ramas secundarias son muy largas, su maduración es más tardía que la variedad Typica. Existen dos tipos: uno cuyo fruto madura de color rojo y el otro con fruto de color amarillo (<http://www.redcafe.org/>; Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

1.1.1. Centro de origen y la diversificación del café

El lugar de origen del café arábico es Etiopía, país donde se inició su cultivo (Anthony *et al.*, 1999), una evidencia que corrobora esta hipótesis es que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas de Sudán actualmente, el café arábico crece en forma silvestre sobre los 1 500 msnm (Leon, 2000). La fecha de inicio de su cultivo se estima a inicios del siglo VIII, luego por varios siglos, hasta el siglo XV, el cultivo se mantuvo como un monopolio de los árabes en las cercanías del Mar Rojo, con una fuerte expansión hacia Yemen (ex Arabia del Sur) en el siglo XIV, y hacia el Oriente Medio durante el siglo XV (Anthony *et al.*, 1999).

La primera introducción de café en Europa se dio en 1706, y sólo se introdujo una planta desde Java al jardín botánico de Amsterdam, a partir del cual se originaron la mayoría de variedades cultivadas actualmente en el mundo (Anthony *et al.*, 1999). Luego de la firma de paz entre Holanda y Francia en 1714, el alcalde de Ámsterdam obsequió una planta al rey Luís XIV, este individuo se adaptó exitosamente en el Jardín de Plantas de París y produjo rápidamente semillas (Anthony *et al.*, 1999). Un año después el sultán de Yemen obsequió algunas plantas a Francia, que luego fueron enviadas a la Isla de Bourbon, hoy Isla de la Reunión (Lashermes *et al.*, 1996).

Las primeras introducciones de café al continente Americano se dieron a inicios del siglo XVIII. Desde Ámsterdam enviaron unas plantas hacia la Guyana Holandesa, hoy Surinam, y de París a la isla de Martinica en las Antillas, de donde en 1719 el cultivo se extendió rápidamente hacia la Guyana Francesa, y luego en 1727 hacia Brasil. Por otro lado, los ingleses introdujeron plantas de café a Jamaica en 1730 y hacia finales del siglo XVIII (Anthony *et al.* 1999) e inicios del siglo XIX el cultivo se extendió por toda América tropical

(León, 2000).

Según estos reportes, está claro que los cafés de Yemen dieron origen a dos tipos de café *arabico*: 1) *C. arabica* var. *Typica (arabica)*, conocido comúnmente como café Árábigo, *Typica* o *Típica*, que constituyó la base genética de las primeras variedades cultivadas en América y Asia; y 2) *C. arabica* var. *Bourbon* que fue difundido a partir de la isla Bourbon (Krug *et al.*, 1939; Anthony *et al.*, 1999). Por lo tanto, todas las variedades cultivadas en América Latina hasta mediados del siglo XX compartieron la base genética del café *Typica* (Anthony *et al.*, 1999). Estas evidencias sobre el origen del cultivo de café en América Latina también explican los procesos de erosión genética por las que atravesaron las bases genéticas *Typica* y *Bourbon*. Como consecuencia, los cultivares actuales derivados de estos dos grupos genéticos, debido a su reducida base genética, son altamente susceptibles a nuevas plagas y enfermedades, presentan baja adaptabilidad a nuevas condiciones de cultivo (Wilches, 1995) y las posibilidades para el mejoramiento genético son también limitadas fuertemente (Anthony *et al.*, 2002).

1.1.2. Taxonomía

El café pertenece al género *Coffea* (Cuadro 1.1) y la taxonomía de los géneros es complicada; diferentes autores incluyen de 60 a 100 especies que se agrupan en cuatro secciones o sub-géneros; *Eucoffea*, *Mascarocoffea*, *Paracoffea* y *Argoffea*.

No obstante, el subgénero más utilizado es el de *Eucoffea* en donde únicamente entra la clasificación de las tres especies más cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras según el orden siguiente: *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex-Froehner y *C. liberica* Bull ex-Hiem (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Cuadro 1.1 Taxonomía del café según Smith y Marzocca, (1981) citado por Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophita</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliattea</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Sub-sección	<i>Eucoffea</i>
Especie	<i>Coffea arabica, C. canephora , C. liberica.</i>

1.1.3. Morfología de la planta de café

Sistema radical

Las raíces del cafeto están divididas en: pivotante, axiales o de sostén, laterales y raicillas.

La pivotante puede considerarse como la raíz central, su longitud máxima en una planta adulta es de 50 a 60 cm. Las raíces axiales o de sostén y las laterales se originan a partir de la pivotante; de las laterales generalmente se desarrollan las raicillas que, en un alto porcentaje (80-90%). Se encuentran en los primeros 30 cm del suelo con un radio de 2 a 2.5 m a partir de la base del tronco. Las raicillas son muy importantes porque le permiten a la planta la absorción de agua y nutrimentos a partir del suelo (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Tallo

El tallo de las plantas del cafeto es leñoso, erecto y de longitud variable de acuerdo con el clima y tipo de suelo; en las variedades comerciales varía entre 2.0 y 5.0 m de altura. De igual manera el tallo presenta la particularidad de producir tres tipos de yemas que originan diferentes partes de la planta: el tallo, bandolas y hojas (Figura 1.1). Posee dos tipos principales de tallos y ramas, ortotrópicas y plagiotrópicas, el tallo que desarrolla la planta en el vivero es ortotrópico que es el tallo central sobre el cual salen ramas primarias y a su vez pueden producir ramas terciarias en sus nudos este conjunto son las ramas plagiotrópicas (Alvarado y Rojas, 1994).

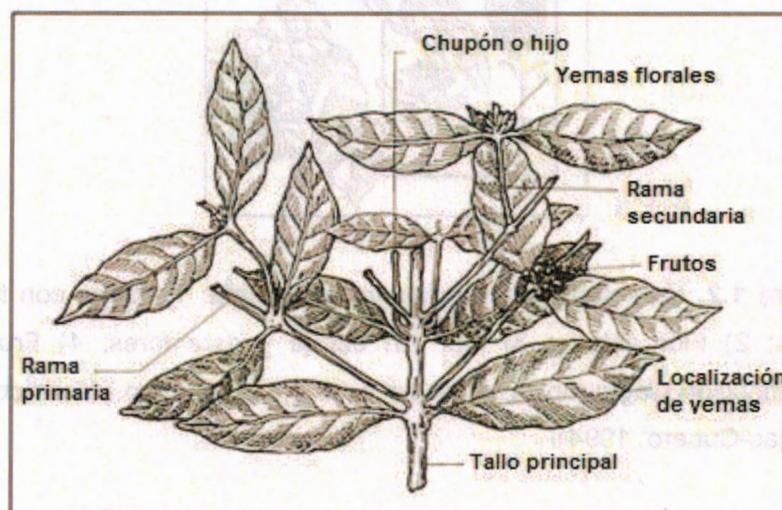


Figura 1.1. Morfología de la parte aérea del café (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Ramas

Las ramas son conocidas también como ramas laterales o ramas primarias. Éstas son opuestas y/o alternas y dan origen a las ramas secundarias; que a su vez, pueden originar ramificaciones terciarias o palmilla.

Las ramas laterales tienen un punto apical de crecimiento que va formado de nuevas hojas y entrenudos. El número de éstos pueden variar de un año a otro y

consecuentemente, las axilas que se forman dan origen al número de flores y por ende a los frutos (Figura 1.2) (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

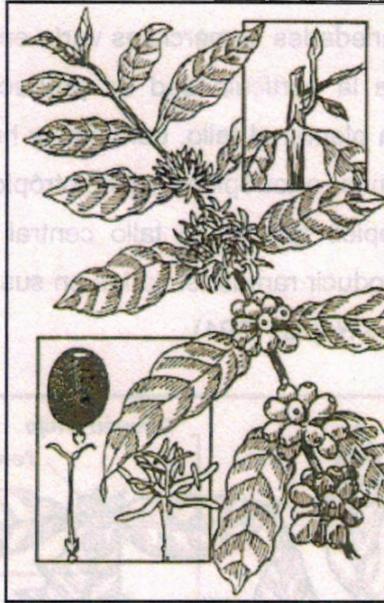


Figura 1.2. Características morfológicas del café: 1) Rama con fruto y flores; 2) Flor abierta; 3) Flor sin corola y estambres; 4) Fruto; 5) Ramificación plagiotrópica, mostrando un eje ortotrópico (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Hojas

La lámina de la hoja mide aproximadamente de 12 a 24 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, variando su forma de elíptica a lanceolada.

En la parte inferior, en el ángulo que forman en el nervio central y lateralmente, existen unos agujeros de forma irregular que se abren en cámaras diminutas, llamadas "domocios", cuya función no se conoce aún; sin embargo, con frecuencia viven en ellas ácaros muy pequeños. El tamaño de la hoja no sólo varía entre especies y cultivares, sino también de acuerdo con las condiciones de sombra o plena exposición de sol a que está sometida la planta (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Flores

En las axilas de las hojas se presentan las yemas florales de 1 a 3 ejes, los que se dividen en 2 o 6 ramificaciones cortas de 2 a 4 mm, coronando cada una en una flor, la cual está formada por el cáliz, la corola, los estambres y el pistilo.

El cáliz es poco desarrollado y se encuentra asentado en la base de la flor. La corola es un tubo largo, de forma cilíndrica en la base que termina en cinco pétalos y mide de 6 a 12 mm; cuando el botón floral no se ha abierto es de color verde; conforme se va abriendo adquiere el color blanco. Los estambres son cinco y se encuentran insertos en el tubo de la corola, alternando con los pétalos. Los cuales son filamentos finos y sostienen anteras largas, las cuales se abren longitudinalmente cuando están maduras para liberar el polen. Las flores poseen un ovario súpero con dos óvulos formando así el gineceo (Figura 1.3).

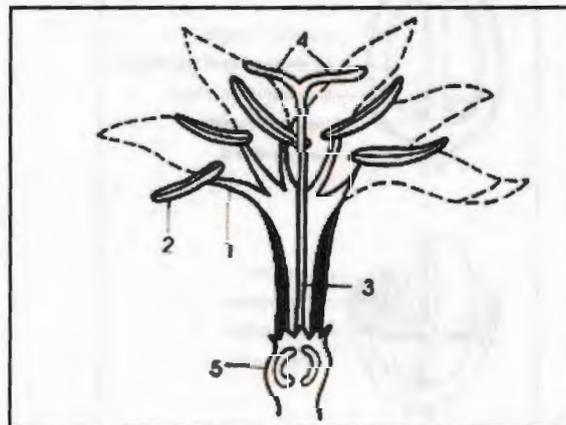


Figura 1.3. Morfología floral del café. 1) Estambres; 2) Anteras; 3) Pistilo; 4) Estigmas; 5) Ovarios (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

La floración del café permanece pocos días, es inducida primero, por días cortos, y posteriormente, cuando hay humedad suficiente, ya sea proveniente de la lluvia o del riego. El número de floraciones varía según el patrón de precipitación de una región determinada.

Cuando se abre la flor, las anteras ya han liberado gran cantidad de polen; por esta razón, la autofecundación se da en un alto porcentaje. Una vez que el polen alcanza los óvulos, la fertilización se completa durante cuatro o seis días (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Fruto

Después de la fecundación, el ovario se transforma en fruto y sus dos óvulos en semillas. El fruto maduro es una drupa elipsoidal en los cultivares comerciales, ligeramente aplanada, cuyos tres ejes principales miden entre 12 y 18 mm de longitud, 8 y 14 mm de ancho y de espesor aproximadamente de 7 a 10 mm. En el ápice queda el disco con una depresión central que corresponde a la base del estilo.

El fruto es de superficie lisa y brillante, de pulpa delgada; está constituido (Figura 1.4) de tres partes diferentes: el epicarpio o epidermis; el mesocarpio o pulpa y el endosperma o semilla. Cuando madura puede ser de color rojo o amarillo, dependiendo del cultivar (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

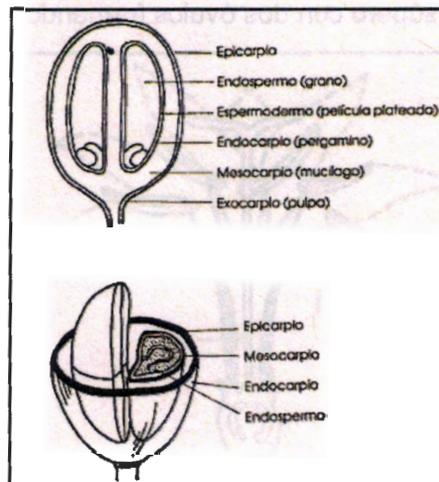


Figura 1.4. Estructura del fruto del café (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

Semilla

Su principal componente es el endospermo, debido a que el embrión, que se encuentra en la parte basal es de tamaño reducido. El endospermo es coriáceo, verdoso o amarillento y forma un repliegue que se inicia en el surco de la cara plana. Está protegido por una cubierta muy delgada conocida como película plateada y ésta a su vez está protegida por el pergamino. En el fruto se distinguen tanto una capa externa más oscura

y densa denominada endospermo duro como una más clara denominada endospermo suave (Figura 1.5)

El embrión de una semilla mide de 1 a 2 mm, consta de un hipocótilo y de dos cotiledones yuxtapuestos y mide de 2 a 5 mm de largo. Al germinar el embrión, lo primero que brota es la radícula que penetra en la tierra produciendo raicillas.

El hipocótilo, al crecer, levanta los cotiledones envueltos por el pergamino, la película plateada y los restos del endospermo duro que posteriormente se degenerarán. Al desaparecer las envolturas cotiledonales, los cotiledones se extienden horizontalmente y entre ellos se desarrolla la plúmula, es decir un tallo tierno que luego formará el tallo maduro y el follaje restante (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

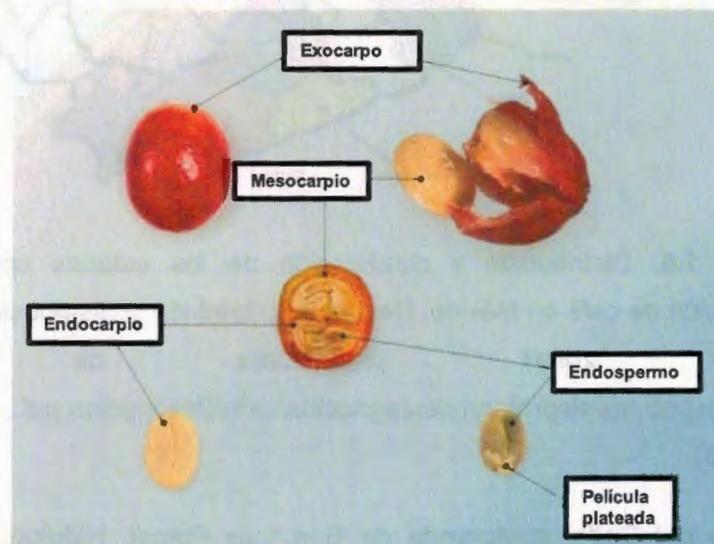


Figura 1.5. Morfología del fruto y semilla de café (tomado de <http://www.cafedecolombia.com>)

1.1.4. Producción en México

Se introdujo a México en el año de 1796 en la Región de Córdoba, Veracruz. Hoy en día su cultivo se ha extendido a toda la república, siendo 11 los principales estados que dominan su producción, estos estados se agrupan en cuatro regiones (Figura 1.6).



Figura 1.6. Distribución y clasificación de los estados con mayor producción de café en México. Destacando también la distribución de las cuatro zonas productoras de café (w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/cafe/Descripcion.pdf, octubre de 2010).

1. Vertiente del Golfo: comprende de San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla, México, Veracruz.
2. Vertiente del Océano Pacífico: a ésta pertenecen Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit y parte de Oaxaca.
3. Región Soconusco: está conformada por gran parte de Chiapas, en esta región se produce una parte importante del café orgánico que es altamente demandado en los mercados de los Estados Unidos y Europa.

4. Región Centro Norte de Chiapas.

1.1.5. Características de la producción nacional

México es un productor por excelencia del género *C. arabica* y de ésta las variedades Typica, Mundo Novo y Caturra.

Sólo 4% de la producción de café corresponde a la especie Robusta (*C. canephora*) que se cultiva principalmente en zonas bajas de Chiapas y Veracruz y su importancia estriba en que se destina en su mayoría a la industria productora de café soluble. La producción es predominantemente de café soluble y orgánico. El 92% de los productores de café poseen superficies menores a 5 ha.

México ocupa el séptimo lugar a nivel mundial como productor de café, después de Brasil, Colombia, Indonesia, Vietnam, Etiopía e India. La variedad que produce es la *arabica*, conocida por ese nombre debido a su origen. El café en México es producido por cerca de 300 mil productores, agrupados en 16 organizaciones. La superficie sembrada abarca en 2007; 801.9 mil ha, en 15 estados de la República Mexicana.

En México se produce, hasta ahora, 96% de *Coffea arabica* y 4% de *Coffea canephora*. La especie *arabica*, con mayor valor en los mercados nacional e internacional. Para el cultivo de café el suelo debe tener una buena textura, es decir, suelos francos o migajonosos ya que la aireación es fundamental para el crecimiento de la raíz (Alvarado-Soto y Rojas-Cubero, 1994).

1.1.6. Características ideales del suelo para la producción del café

C. arabica es una especie que que necesita ciertos requiere de suelos con características tales como: 1) suelos profundos de excelentes condiciones físicas y altos en bases intercambiables, donde deben estar bien drenados; 2) preferiblemente ser de condiciones

ácidas cuyos rangos de pH oscilen entre 4.5 y 5.5. Aun así se pueden obtener buenos rendimientos en suelos aun más ácidos, siempre que las propiedades físicas sean buenas y 3) esta especie requiere mayormente de suelos permeables, bien aireados y con textura abierta o contenidos adecuados de arcillas (Castillo *et al.*, 1996).

1.1.7. Requerimientos climáticos

El cafeto de la misma manera necesita de ciertas condiciones climáticas para que favorezcan su producción y su cultivo, si bien el mejor café se produce en aquellas áreas que se encuentran en altitudes entre 1 200 y 1 700 msnm, también donde la precipitación pluvial anual sea de 750-3000 mm anuales; donde la temperatura media anual sea de 16° y 27 °C. Pero aún más importante es la distribución de esta precipitación en función del ciclo de la planta. Se puede decir que el cultivo requiere una lluvia (o riego) abundante y uniformemente distribuida desde comienzos de la floración hasta finales del verano (Noviembre- Septiembre) esto para favorecer el desarrollo del fruto y de la madera. Además, se ha visto que la respuesta fotosintética y síntesis bioquímica de la planta se ve muy influida por el período climático del año. Así los diferentes niveles de clorofilas, carotenóides, etc., se ven modificados en función de las temperaturas y de la intensidad luminosa (Castillo *et al.*, 1996).

1.2. SUELOS ÁCIDOS

Los suelos ácidos, son suelos con un rango de pH de 5.5 o inferior, siendo esto uno de los factores más importantes en la disminución de la producción agrícola mundial. Aproximadamente, el 30% de la superficie total de tierras del mundo consiste en suelos ácidos, y cerca del 50% son suelos ácidos potencialmente cultivables. La producción de cultivos básicos y cultivos de cereales en particular, se ve afectada negativamente por los suelos ácidos. Los suelos ácidos se caracterizan por presentar niveles tóxicos de Al, manganeso, y hierro, así como las deficiencias de varios elementos minerales esenciales, como el fósforo que es el nutriente limitante en los suelos ácidos (Kochian *et al.*, 2004).

La explicación del pobre crecimiento vegetal en los suelos ácidos incluyen la toxicidad por Al, toxicidad por Mn, baja provisión de N (principalmente en forma de NH_4^+), deficiencia de P, deficiencia de Mo y concentraciones tóxicas de ácidos fenólicos. Se ha considerado al propio ión H^+ como la principal causa del pobre crecimiento vegetal, por otro lado. Arnon y Johnson (1942) sugieren que el bajo suministro de Ca^{2+} a pH bajo es la principal causa en un menor crecimiento de la planta. En el Cuadro 1.2, se observan los efectos de algunos elementos causando toxicidad, deficiencia y menor disponibilidad del agua en los suelos ácidos.

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

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

1.2.1. Disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos

La disponibilidad de nutrientes en el suelo está determinado por el pH. En suelos muy ácidos los nutrientes se toman difíciles de adquirir para la planta, lo que nos indica que el pH es un factor determinante para la disposición de nutrientes o elementos (Figura 1.7).

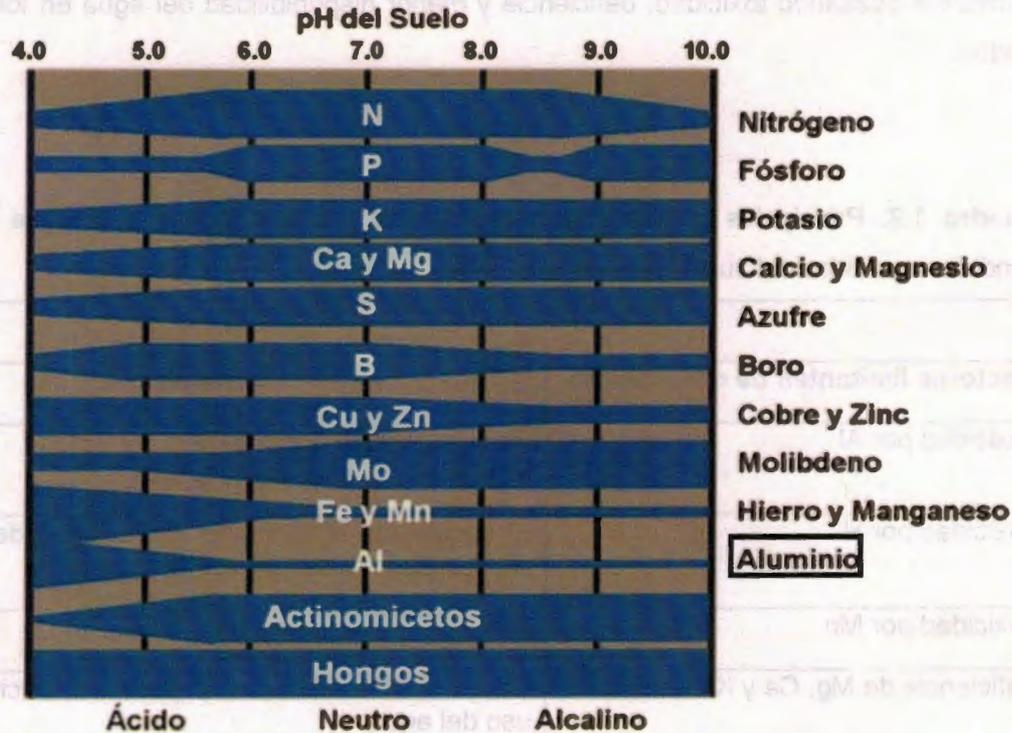


Figura 1.7. Principales nutrientes del suelo y su disponibilidad que va estrechamente relacionada con el pH del suelo lo cual se observa que la mayoría de estos nutrientes esenciales están disponibles a pH de 6 a 7 (Tomado de http://www.terraGIS.bees.unsw.edu.au/terraGIS_soil).

1.3. ALUMINIO

1.3.1 Generalidades

El aluminio no es un elemento esencial para las plantas o los animales. La mayoría de los productores de plantas han escuchado que el Al puede ser demasiado perjudicial para las plantas. Sin embargo, muchos pueden no ser conscientes que hay múltiples formas de Al en el suelo y la mayoría de ellos no son directamente perjudiciales para las plantas. Se considera como el metal más abundante en la corteza terrestre (Cuadro 1.3). Dado que muchas plantas y especies son sensibles a concentraciones micromolares del Al, el riesgo de los suelos a ser tóxicos por aluminio es considerable. El Al puede estar en otras formas químicas como aluminosilicatos y óxidos de aluminio; sin embargo, la solubilización del Al se ve favorecida por bajo pH. La acidificación del suelo puede desarrollarse naturalmente, cuando los cationes básicos son lixiviados de los suelos, pero puede ser acelerada por algunas prácticas agrícolas y por la lluvia ácida (Delhaize y Ryan, 1995.)

Cuadro 1.3. Elementos comunes en la corteza terrestre (Haug, 1984).

Elementos	Abundancia relativa (% en peso)
Oxígeno	46.60
Silicio	27.72
Aluminio	8.13
Hierro	5.00
Calcio	3.63
Sodio	2.83
Potasio	2.59
Magnesio	2.09
Titanio	0.44
Hidrógeno	0.14
Fósforo	0.12
Manganeso	0.1
Todos los otros elementos	0.61
Total	100.0

1.3.2. La saturación de aluminio en el suelo

El Al^{3+} es un catión soluble, que puede ser evaluado en el porcentaje de saturación de suelos midiéndose en la misma forma que los principales cationes de nutrientes que son absorbidos por las plantas. El Al se mantiene en los sitios negativos de la arcilla y MO (adsorbida). A esta forma adsorbida de catión Al^{3+} se le llama Al intercambiable. Algunos de los iones de Al son liberados a la solución del suelo. Esta forma libre de Al en la solución es la forma más dañina para las plantas (Haug, 1984).

El pH del suelo es probablemente el factor más importante para el control de la cantidad de Al en la solución del suelo. El Al soluble está presente en el suelo cuando el pH empieza a caer por debajo de pH 6.0. Sin embargo, es intrascendente en la gran mayoría de los suelos hasta que el pH desciende por debajo de pH 5.5 Raramente es un problema hasta que el pH del suelo cae por debajo de pH 5.0. Sin embargo, la cantidad de Al soluble aumenta drásticamente en casi todos los suelos cuando el pH del suelo cae por debajo de pH 5.0 (Spectrum Analytic Inc.).

En estudios hidropónicos se ha visto que cuando las soluciones con concentraciones micromolares de aluminio, éste puede comenzar a inhibir el crecimiento de raíces en los primeros 60 min. Sin embargo, existe poca información acerca de las causas de estrés que presentan las plantas cuando se tiene la mayor inhibición de crecimiento o de cambios en el crecimiento. Para entender los mecanismos de toxicidad por aluminio, es esencial identificar los sitios principales donde se manifiesta este metal, identificar tanto las características anatómicas como las metabólicas, siendo consciente de que el aluminio podría tener efectos diversos y actuar de manera diferente en diferentes especies agrícolas (Haug, 1984; Taylor, 1988; Rengel, 1992).

1.3.3. Absorción del aluminio en plantas

Como se ha mencionado antes, el aluminio no se encuentra disponible para la planta si el pH del medio no baja por debajo de 5, ya que a valores de pH neutros (6 a 8) es bastante insoluble (Stumm y Morgan, 1970). Es importante saber la especie de Al que está presente en la solución ya que no sólo el aluminio monomérico puede causar toxicidad,

sino se ha demostrado que las plantas también pueden tomar formas poliméricas (Wagatsuma y Kaneko, 1987).

Los mecanismos de absorción del aluminio no se conocían bien hasta hace algunos años, Xia *et al.*, (2010) reportan que en *Oriza sativa* y levaduras, existe un transportador específico para el Al^{3+} al que se le ha dado el nombre de Nrat1 (*Nramp aluminum transporter 1*) y que la expresión está regulada por un factor de transcripción (ART1). En dicho estudio se reporta que este transportador está localizado en la membrana plasmática y sólo se encuentra en el ápice radicular, así como en la zona de maduración, pero no se encuentra en células epidermales.

De igual manera existen varios reportes que indican las vías de entrada del Al a la planta, los cuales podrían ser:

- Por simple permeabilidad a través de la membrana celular en forma de compuestos neutros (Haug, 1984);
- A través de estructuras micelas lipídicas, cuya formación es inducida por la presencia del metal en el medio y que facilitan su entrada en forma de partículas cargadas (Cullis y Kruijff, 1979);
- Por medio de algún tipo de transportador unido a fosfolípidos propios de la membrana o algún otro agente quelante (Green *et al.*, 1980).

Por medio de inhibidores metabólicos se ha demostrado que la absorción de aluminio a través de la raíz es un proceso que no requiere energía, pues estos inhibidores metabólicos parecen mostrar un efecto positivo sobre la captación del metal.

Al disminuir la temperatura, disminuye la absorción de aluminio, pero este hecho se interpreta más como una disminución de los lugares de absorción que como consecuencia de la reducción de la actividad metabólica (Wagatsuma, 1983).

1.3.4. Traslocación del aluminio a la parte aérea

Los mecanismos de traslocación tampoco están muy claros, en algunas especies la concentración de aluminio en la parte aérea de la planta aumenta al incrementarse la concentración de este metal a nivel radicular. Por el contrario, en otras plantas, esta traslocación parece que sólo se produce cuando la concentración radicular sobrepasa un nivel umbral, lo que podría significar una saturación de los lugares de absorción del aluminio y/o la destrucción de barrera que ejerce la membrana citoplasmática (Wagatsuma, 1984).

Se ha reportado y se sugiere que los iones polivalentes como el aluminio circulen a través de la raíz vía apoplasto, aunque una pequeña fracción podría seguir la vía del simplasto. La endodermis, con la Banda de Casparí, impide la vía apoplástica y se ha visto que esta estructura varía sus características de grosor y su grado de suberificación en función de la especie, la edad y del estado fisiológico de las plantas (Wagatsuma, 1984).

El mecanismo de transporte del aluminio en las plantas no se conoce exactamente. Pero dado que el aluminio puede formar complejos con los ácidos carboxílicos. Se ha reportado que la toma de Al por el sistema radical es un proceso de intercambio que involucra los sitios de unión de Ca en la superficie de las células de la raíz. Este proceso empieza cuando las raíces son expuestas al metal, después de un periodo corto de tiempo, siendo el ápice de la raíz el principal sitio de toma del Al (Roy *et al.*, 1988).

La pared celular es el principal sitio de unión del Al, antes de entrar al citoplasma, debido a la carga negativa de sustancias como la pectina. Sin embargo, la membrana plasmática funciona como una barrera al movimiento pasivo del Al hacia el interior de la célula (Pessarakli, 2008). Por otro lado, en células de la raíz de plantas resistentes al Al, se producen compuestos que se unen al Al para formar compuestos no tóxicos, como son fosfatos, ácidos orgánicos (citrato, malato y oxalato) y algunas proteínas (fosfolipasa, glucanasa, NAD cinasa) al ser inducidas por el Al libre (Taylor y Macfie, 1994; Kochian y Jones, 1997; Mukherjee y Asanuma, 1998).

1.3.5. Contenido de Al en plantas

La mayoría de las plantas presentan una concentración interna de Al que oscila entre 50 y 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS, sin embargo pero hay reportes donde se han identificado plantas llamadas hiperacumuladoras de aluminio y que son menos sensibles a este metal (Kinzel, 1982). Por otro lado, las plantas que acumulan más de 1 mg Al g^{-1} PS, Se designan hiperacumuladoras (Chenery, 1948), pudiendo algunas acumular más de 10 mg Al g^{-1} PS, un ejemplo de éstas es *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.*, 1997, 1998, 2004).

1.3.6. Efectos benéficos

El aluminio no se considera un elemento esencial, pero en algunos estudios se demuestra que pequeñas concentraciones de este elemento pueden tener un efecto favorecedor en el crecimiento tanto de la parte radical como la aérea de la planta (Foy, 1984; Bollard, 1983). Estos efectos seguramente son indirectos, ya que Foy (1984) y Pilon-Smits *et al.*, (2009) consideran que el estímulo podría venir dado por:

- Aumento de la disponibilidad de Fe en suelos calcáreos (suelos ricos en carbonato cálcico, con un pH entre 7.3 y 8.5).
- Aumento de la fracción de Fe biológicamente activo en la planta.
- Incremento de la absorción de P mediante el bloqueo de cargas negativas en las paredes celulares.
- Prevención o corrección de la toxicidad de P, Cu o Mn.
- Alteración de la distribución de los reguladores de crecimiento.
- Acción fungicida.
- Acción contra herbívoros.

Hay que tener en cuenta que las plantas tolerantes al Al o estimuladas por este metal no utilizan los mismos mecanismos de resistencia. Así, estas plantas se pueden dividir en: 1)

plantas que excluyen al aluminio, 2) plantas que acumulan el aluminio en la raíz, 3) plantas que acumulan aluminio, por lo que la razón del efecto beneficioso varía de una especie a otra (Osaki *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 2009).

1.3.7. Toxicidad de aluminio en plantas

Los principales efectos tóxicos del aluminio se dan en la raíz (Clarkson, 1969). El aluminio altera rápidamente el patrón de crecimiento celular, como consecuencia, el tejido pierde organización (Bennet *et al.*, 1985a), el crecimiento longitudinal de la raíz principal se reduce, se favorece el crecimiento y proliferación de las raíces laterales, que con el tiempo, también pueden verse afectadas inhibiendo su crecimiento. En conjunto el sistema radicular presenta un color pardo, mostrando raíces cortas, engrosadas y de igual manera pueden presentarse ramificaciones (Alam y Adams, 1979).

Por otro lado, en la parte aérea los síntomas son difíciles de identificar. Algunas plantas parecen tener síntomas de deficiencia de P, Ca, Mg (Jornes y Hecht-Buchholz 1985) o de Fe (Foy, 1984). Estos síntomas podrían sugerir que la toxicidad por aluminio interfiere con otros elementos nutritivos esenciales para la planta y que no son sólo debidos a una inhibición del crecimiento del sistema radicular (Lee y Pritchard, 1984; Poschenrieder *et al.*, 1992). Los daños causados por la toxicidad del aluminio se pueden agrupar en:

Cambios en las cantidades y funciones de las proteínas

El aluminio induce cambios en las cantidades de proteínas de membrana (Mistrík *et al.*, 2000) y citoplasmáticas (Huttová *et al.*, 1998) pero aunque hay muchas evidencias, no se ha encontrado una función directa que relacione estas proteínas con la tolerancia al Al (Ownby y Hruschka, 1991; Basu *et al.*, 1994b; Somers *et al.*, 1996). En otros casos se ha reportado que el gen que codifica para estas proteínas se encontraba tanto en la variedad tolerante como en la sensible, por lo que parecen más bien involucradas en la respuesta al estrés por aluminio que a la tolerancia al mismo (Mistrík *et al.*, 2000). También dicho metal interfiere en la función de distintas enzimas mediante substitución de otros metales

específicos. Estas interacciones provocan la inhibición de la actividad enzimática o su inducción (Barceló y Poschenrieder, 1992). Se ha visto que el Al puede causar una inhibición en la actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática, de esta manera puede impedir la formación y el mantenimiento del gradiente de H⁺, puesto que se sabe que esta bomba es la encargada en muchos procesos de transporte de iones hacia el interior de la célula en donde se necesita de la salida de H⁺ para mantener el potencial electroquímico de la membrana (Ryan *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2001, 2002).

La cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una de las mayores vías por la cual se transmiten señales tales como las de luz, estrés por temperatura, estrés mecánico, heridas, patógenos, sequía, salinidad, señalización hormonal y privación de nutrientes y también es el caso del estrés por Al (Ligterink y Hirt, 2001; Osawa y Matsumoto, 2001). En estudios realizados por Osawa y Matsumoto, (2001), demostraron usando varios inhibidores de fosforilación y desfosforilación de proteínas, reportaron que la inhibición del Al también tuvo como respuesta un flujo de salida de malato, esto realizado en trigo y de esta manera sugieren que la fosforilación de proteínas, posiblemente está relacionado con la activación de un canal aniónico específico para malato y su señalización fue comprobada con la utilización de un inhibidor de proteínas cinasas de amplia gama.

Vías de transducción de señales

El reconocimiento del estrés se sabe que activa vías de transducción de señales las cuales transmiten información dentro de las células individuales o en toda la planta. Estas vías conducen a la expresión de genes y resulta en una modificación de procesos moleculares como celulares. En plantas, existe poca investigación sobre la señalización mediada por el Al a través de segundos mensajeros, sin embargo algunos estudios sugieren que el estrés por Al desencadena una cascada de señalización, por lo cual se da un aumento en el Ca citosólico, esto se ha observado en ápices de raíces de trigo expuestas a Al (Zhang y Rengel, 1999). También se ha reportado que los mecanismos de toxicidad del Al podrían deberse a que este metal interactúa con los componentes de la vía de transducción de señales mediada por fosfoinosítidos (Jones y Kochian, 1997), ruta

en la cual la fosfolipasa C desempeña un papel importante y se ha visto de igual manera que el AI puede inhibir la actividad de esta enzima (Kochian, 1995; Jones y Kochian, 1997; Kochian *et al.*, 2005), por lo que se menciona que el AI posee la capacidad de unión a esta enzima muy superior al Ca (Garzon, 2003).

En reportes hechos por Martínez-Estévez *et al.*, (2001) usando como modelo de estudio suspensiones celulares de *Coffea arabica*, sugieren que el AI desorganiza el metabolismo de los fosfolípidos de la membrana, observaron que cuando a las suspensiones celulares fueron incubadas con concentraciones de AI (200 a 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), el patrón de fosforilación de proteínas cambió, las proteínas fosforiladas con una masa molecular de 18, 31 y 53 kDa incrementaron dramáticamente después del tratamiento *in vivo* con AI. Por otro lado cuando el AI fue adherido en condiciones *in vitro* para la reacción de fosforilación, no se encontraron diferencias en la fosforilación de proteínas, sugieren que en los tratamientos *in vivo* en suspensiones celulares de café y en presencia de AI afectan la actividad de algunas proteínas cinasas.

Por otro lado Martínez-Estévez *et al.*, (2003) reportaron que el AI tiene un efecto sobre la actividad de la PLC y de lípido cinasas. Se observó que cuando a las células estaban en presencia del AI y a periodos cortos (1 min) la actividad de la PLC aumentó así como también la formación de hasta dos veces de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), pero cuando las células estuvieron en periodos más largos la actividad de la PLC fue inhibida en más de 50%. También reportan que aumentaron las actividades de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI 4-K), la fosfatidil inositol fosfato 5-cinasa (PIP 5-K) y la diacilglicerol cinasa, por lo cual sugieren que el AI puede tener efectos diferentes en la vía de señalización del fosfatidil inositol (PI) en función del tiempo de exposición de las células en presencia del AI, estos resultados sugieren también que el AI reprime el metabolismo de los fosfolípidos de membrana que regulan no sólo a la PLC sino otras enzimas que pudieran tener un papel importante en las vías de señalización. Otro estudio que existe es el de Piña-Chablé y Hernández-Sotomayor (2001), donde observaron que el AI tiene un efecto inhibitorio sobre la PLC y raíces transformadas de *Catharantus roseus*.

Además Osawa y Matsumoto (2001), sugieren que la fosforilación de proteínas es necesaria para la transducción de señales que están involucradas en la activación del flujo de salida de complejos AI-malato, donde se sabe que el malato puede pasar a través

de canales aniones específicos para ácidos orgánicos que podrían estar involucrados en la tolerancia al Al.

Daños en la estructura y función de las membranas

Se ha identificado que el Al se puede unir a los grupos fosfato de los fosfolípidos, cambiando las propiedades de fluidez y alterando todos los procesos de transporte y actividad enzimática asociada a membranas (Caldwell *et al.*, 1982; Barceló *et al.*, 1996; Bennet *et al.*, 1985b; Haug, 1984; Stass y Horst, 1995). La rápida inhibición radicular, por parte del aluminio, en ápices radiculares sería debido a una reducción del flujo de oxígeno en los tejidos radiculares más que a una interferencia directa del aluminio con el transporte electrónico mitocondrial (Horst, 1995). La disminución de la fotosíntesis viene también dada por una disminución de los niveles de clorofilas (Ohki, 1986). La interacción aluminio-membrana acaba comportando una elevada entrada de aluminio en la célula, reduce la permeabilidad al agua (Zhao *et al.*, 1987) y afecta al potencial de membrana (Olivetti *et al.*, 1995, Miyasaka *et al.*, 1989).

Inhibición de la síntesis de ADN

Existen estudios que revelan que el aluminio ha sido localizado en el núcleo de las células de la raíz (Barceló *et al.*, 1996). También se ha visto que forma complejos con los ácidos nucleicos (Trim, 1959) y asimismo se puede unir a los grupos fosfato del ADN (Matsumoto *et al.*, 1976). Además en otros reportes se ha observado la inhibición de la mitosis y de la síntesis del ADN en raíces expuestas a Al (Clarkson, 1965; Horst *et al.*, 1983; Matsumoto *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 1993).

Algunos autores como Matsumoto *et al.*, (1977), afirman que la mayor parte del aluminio en el núcleo se halla unido a la cromatina, provocando una disminución en su actividad. La unión del aluminio con el ADN incrementó la estabilidad de la molécula, reduciendo su capacidad de replicación (Matsumoto *et al.*, 1976; Morimura *et al.*, 1978a; 1978b)

Inhibición de la división celular

El ciclo de la división celular en la raíz es aproximadamente de 24 h. Como es un proceso relativamente lento, el factor que más contribuye a la elongación radicular es la expansión de las células ya divididas. El aluminio es capaz de inhibir la elongación radicular de 1-2 h después del tratamiento, por lo que las interacciones del aluminio con la elongación celular jugarían un papel decisivo en la inhibición del crecimiento de la raíz. La inhibición de las células meristemáticas podría no ser la causa primaria de la disminución del crecimiento radicular (Bennet *et al.*, 1987), ya que parece que el efecto primario podría darse sobre las células de la cofia, que ejercerían una función reguladora sobre las células meristemáticas (Bennet y Breen, 1991a).

Interferencia en la nutrición mineral y el metabolismo

Se han descrito interferencias con la mayoría de los elementos necesarios para la nutrición mineral, algunos efectos que tiene el Al sobre la nutrición mineral serían:

Calcio

Uno de los problemas principales se da con la calmodulina, que regula los niveles intracelulares de Ca. El aluminio puede interaccionar con ésta (Siegel y Haug, 1983) e inducir cambios conformacionales y por tanto afectar a los valores normales de Ca intracelular. Dado que el Ca puede actuar de mensajero secundario, el aluminio sería el responsable indirecto de una incorrecta regulación del crecimiento.

Magnesio

En condiciones de toxicidad por aluminio se observa una disminución de los niveles de Mg (Blamey *et al.*, 1993). El mantenimiento de la estructura ribosómica requiere de la presencia de cationes divalentes, en particular de Mg. Este elemento tiene una función

esencial en la agregación de las subunidades ribosómicas necesarias para la síntesis de proteínas.

Cuando los niveles de Mg son deficientes, como sucede en el caso de toxicidad por Al, las subunidades ribosómicas se separan y cesan la síntesis de proteínas (Horst y Marscher, 1993).

Potasio

En estudios realizados en *Zea mays* se ha observado que está más afectada la traslocación que la absorción (Cumming *et al.*, 1985). Esto disminuye los niveles de K en la parte aérea. Como el proceso de apertura y cierre estomático está regulado por el K, la disminución de la concentración de este elemento, desregula este proceso, disminuyendo la transpiración (Ohki, 1986).

En cuanto a la absorción de K, se ha observado que la absorción disminuye en plantas de algodón (Lance y Pearson, 1969) y arroz (Foy *et al.*, 1978) cuando estas especies fueron tratadas con Al; sin embargo, también se ha observado un efecto contrario. La inhibición de la absorción de K puede ser reversible cuando el metal se le retira, por lo que se puede especular que el Al actúa como bloqueador externo de los canales de K (Garzón, 2003).

Por otro lado, otros reportes indican que la inhibición de los canales de potasio no es externa y éste es producido una vez que el Al ha penetrado al interior de la célula, esto puede sugerir que ciertos componentes de la membrana plasmática como del citosól son requeridos en la inhibición de la absorción de K (Nichol *et al.*, 1993).

Fósforo

A pH fisiológico y en general a pH entre 4.5-7.0 se produce una fuerte interacción aluminio-fósforo, incrementándose considerablemente la cantidad de fósforo inmovilizado en la raíz, disminuyendo por lo tanto el fósforo disponible en la parte aérea (Lee y Pritchard, 1984).

Algunos de los problemas más importantes causados por la toxicidad por aluminio son la reducción de P y S, formando compuestos de unión con el Al, así como la reducción de la disponibilidad de otros cationes a través de la interacción competitiva.

Dado que Al es el metal más abundante en el suelo, y dado que el Al soluble es tóxico para las plantas, es importante saber la cantidad de Al presente en el suelo y lo que controla su disponibilidad para las plantas. La disponibilidad de Al no se comprende totalmente, pero ciertos factores del suelo se sabe que tienen un efecto significativo como por ejemplo, la cantidad total de Al presente en un determinado tipo de suelo, también el pH del suelo, los tipos y cantidades de arcilla en el suelo y la materia orgánica del suelo.

1.3.8. Tolerancia al aluminio

Se han realizado estudios sobre la tolerancia a este metal y se han encontrado genotipos tolerantes en diversas especies (Foy, 1984; Taylor, 1988; Devine, 1982; Massot *et al.*, 1991, 1992; Guevara *et al.*, 1992; Llungany *et al.*, 1994). Es importante saber cuáles son los mecanismos de tolerancia ya que aproximadamente 30% de los terrenos o tierras cultivables presentan problemas de acidez y toxicidad por aluminio (Taylor, 1988) y se podría mejorar la productividad sin el gasto económico que se hace como por ejemplo el encalado del suelo. Hay una gran variabilidad en la tolerancia de Al en algunas especies y esto ha sido útil para los productores en el desarrollo de cultivares tolerantes al aluminio. Así como a los investigadores que estudian la fisiología y la bioquímica de la tolerancia al Al.

El trigo ha sido un modelo particularmente útil para estos estudios, ya que se han reportado hasta 10 veces las diferencias en la tolerancia al Al entre genotipos. Algunas variedades de trigo poseen un número mayor o menor de genes que codifican para proteínas involucradas en la tolerancia a Al (Berzonsky, 1992). Se ha demostrado que los ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato) juegan un papel fundamental tanto en la exclusión del Al como su internalización a la célula (Kochian *et al.*, 2005; Ma, 2007) estos aniones son queladores del Al en forma no tóxica, dentro de estos mecanismos están involucrados una serie de genes que son activados por la acción del Al, uno de estos

genes responsables de la secreción de malato inducida por Al es el *ALMT1* esto en trigo, para citrato se han encontrado los *HvAACT1* y *SbMATE*, estos en cebada y sorgo respectivamente (Sakaki *et al.*, 2004; Fukurawa *et al.*, 2007; Magalhaes *et al.*, 2007), por otro lado utilizando líneas mutantes de *Arabidopsis* y arroz sensibles al Al, se han identificado a los genes *AIS1* y *ALS3* para *Arabidopsis* (Larsen *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2007) y *STAR1* y *STAR2* para arroz (Huang, 2009), *ALS3* se especula es que estos genes están involucrados en la redistribución de Al de la parte radical hacia otros tejidos menos sensibles, mientras que *ALS1* se menciona que es el responsable de la secuestación del Al llevándolo a vacuolas (Larsen *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2007).

La pérdida deliberada de otros genes en la derivación de líneas transgénicas a evitado que se conozcan otros diferentes mecanismos en la tolerancia al Al y su posible contribución al respecto. Gran parte del trabajo sobre la tolerancia Al se centra en el trigo y la mayor parte de la discusión que se sigue, se limita a describir los acontecimientos recientes en la comprensión de la tolerancia al aluminio de esta especie (Delhaize *et al.*, 1993a, 1993b). Los mecanismos de tolerancia al aluminio (Taylor, 1988; 1991) se pueden agrupar en mecanismos de exclusión o internos:

Mecanismos de exclusión

Se ha observado que el Al puede activar canales aniónicos que permiten la exclusión de moléculas que tienen bajo peso molecular como los ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato) con los que Al puede ser quelado para así no permitir su entrada y de esta manera se puede excluir su ingreso (Kochian *et al.*, 2005).

Se ha reportado que el Al puede ser inmovilizado en el apoplasto, por la modificación de las propiedades de unión al Al de la pared celular, de igual manera se ha comprobado que un mecanismo que poseen las plantas es la permeabilidad selectiva de la membrana citoplasmática por lo que el Al no puede ingresar, también que las raíces pueden inducir cambios en el pH de la rizósfera (alcalinización) y de esta manera el aluminio no puede estar disponible, además se sugiere que puede existir exudación de ligandos quelados de fosfato (Pellet *et al.*, 1996), y de polipéptidos (Basu *et al.*, 1994b; 1999).

Mecanismos internos de tolerancia

Una vez que el aluminio ingresa a la célula igualmente pueden establecer complejos de coordinación con ácidos orgánicos o polipéptidos en el citosol y de esta manera puede ser excluido de la célula o puede atravesar el tonoplasto para ser almacenado o compartimentalizado en la vacuola. Se ha reportado también que este metal puede inducir la expresión de genes o también síntesis de proteínas (algunas con uniones específicas al Al) involucrados en la tolerancia de este metal (Kochian *et al.*, 2005).

1.3.9. Toxicidad del aluminio en cafeto

Se han hecho diversos estudios en cafeto, uno de los primeros reportes hechos sobre la toxicidad del aluminio en plantas de café fue publicado por Pavan y Bingham (1982), ellos pudieron evaluar el efecto del aluminio en solución nutritiva utilizando diferentes concentraciones de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (0, 0.037 y 0.148 mM), en este estudio observaron que el primer síntoma de la toxicidad del aluminio en plantas de cafeto como en otras especies de plantas es la inhibición del crecimiento de la raíz, también pudieron observar que las raíces laterales fueron más delgadas, más cortas y en menor número. Las raíces primarias se oscurecen después de estar expuestas al tratamiento con aluminio, ya que de poseer un color blanco éstas se tornan de color café después de estar pocas semanas en presencia del metal, las hojas se observan más pequeñas y presentan clorosis en el borde seguido del enrollamiento de las mismas (Pavan y Bingham, 1982). Estos efectos han sido asociados a la actividad del Al, en comparación con las otras especies de aluminio presentes en la solución.

También otros reportes que existen son los de Pavan y Bingham (1982) y Pavan (1983), en hojas de cafeto expuestas a aluminio, encontraron una reducción del contenido celular de Ca y PO_4 intracelular y un aumento en el contenido intracelular de Al. Martínez y Monerat (1992) mencionan que en plantas de cafeto el Al es preferentemente acumulado en el sistema radical y sólo pequeñas cantidades son transportadas al tallo.

De igual manera, en nuestro laboratorio existe también un trabajo realizado por Bojórquez-Quintal (2010) en el que se evaluó el efecto del aluminio sobre el crecimiento

radical de plántulas de *Coffea arabica* obtenidas de embriones cigóticos en condiciones *in vitro*, como conclusión se obtuvo que el crecimiento radical depende de la concentración a la cual está expuesta: dosis de 100 y 300 μM tienen un efecto estimulador, mientras que una dosis de 500 μM inhibe el crecimiento radical; también, al evaluar el contenido de Al en raíces y brotes de *C. arabica*, se observó una mayor asociación del metal en la raíz y pequeñas cantidades en los brotes. Sugiere que el efecto del aluminio sobre el crecimiento vegetal puede depender de la dosis, la especie, así como del tipo de tejido, entre otros factores.

Asimismo existen otros reportes en los que se ha observado el efecto tóxico del aluminio en suspensiones celulares, un ejemplo es el de Martínez-Estévez (2001), en el cual se demostró que la dosis letal media fue 25 μM de Al y que este metal entra a las células después de 30 min de incubación (Martínez-Estévez *et al.*, 2001).

1.4. HIDROPONÍA

1.4.1. Definición

La hidroponía se define como la técnica o forma de cultivar plantas en sustratos inorgánicos sin suelo. Para ello, se utiliza una combinación precisa de diferentes sales minerales que contienen todos los nutrientes que requieren las plantas para su crecimiento y maduración. Esta técnica es, además, una alternativa para la producción intensiva de alimentos ricos en proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales (Uresti-Pesina *et al.*, 2007).

Según la FAO (1990), el término hidroponía aplica a la producción sin suelo como medio de cultivo, eso incluye los cultivados en agua. Entre los sistemas hidropónicos más utilizados se encuentran los cultivos en agua que pueden ser en inmersión o de Gericke, flotantes, de recirculación de nutrientes y la técnica de flujo laminar de nutrientes (NFT, *Nutrient film technique*) (Resh, 1997).

1.4.2. Importancia y aplicaciones

La importancia de la hidroponía, como sistema de producción agrícola, está vinculada a distintos contextos como son el económico, el ecológico y el social, debido a que sirve de herramienta en los sectores o lugares donde una planta no puede crecer. Con la hidroponía se pueden producir alimentos en zonas áridas, así como en zonas tropicales o en zonas donde el clima es demasiado frío, también se pueden producir plantas en lugares donde el agua tiene un alto contenido de sales, además de producir plantas y frutos en aquellos lugares en donde la agricultura no es posible, debido a las limitaciones del suelo. La técnica de hidroponía tiene la ventaja del reciclamiento o reutilización de la solución nutritiva drenada, evitando con esto la contaminación de las corrientes subterráneas y mantos acuíferos (Izquierdo, 2000).

Las tecnologías de producción en hidroponía en condiciones abiertas y en sistemas controlados (invernaderos) han incrementado el rendimiento de las hortalizas por unidad de superficie; sin embargo, para maximizar la producción, se aplican altas cantidades de fertilizantes y otros productos químicos, los cuales deben ser utilizados racionalmente cuando son aplicados directamente al suelo, debido a que el uso inadecuado del agua de riego, lixivia nutrientes tales como nitratos y fosfatos que contaminan las aguas subterráneas (Klock-Moore y Broschat, 2001; Zuniga-Estrada *et al.*, 2004).

1.4.3. Sustratos

El sustrato en hidroponía es todo aquel material sólido distinto del suelo; que puede ser natural o sintético, mineral u orgánico, el cual se coloca en un contenedor o bancal, en forma pura o mezclado, para que permita el anclaje del sistema radicular del cultivo (Cenid-Raspa, 2003).

El cultivo hidropónico utiliza sustratos como soporte de las plantas en lugar de tierra. No existe el sustrato ideal; cada uno presenta una serie de ventajas e inconvenientes y su elección dependerá de las características del cultivo a implantar, las variables ambientales y de la instalación. El sustrato debe ser liviano, que presente cierto grado de porosidad, tamaño apropiado sin bordes cortantes y que sea químicamente inerte (Resh, 1997;

Manson, 1990; Ansorena, 1994).

Los sustratos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Entre los sustratos inorgánicos, se encuentran: la arena, la grava, la piedra volcánica (Martínez y García, 1993; Soto y Ramírez, 2001) y el ladrillo molido (Calderón y Cevallos, 2003). En cuanto a los sustratos orgánicos, se encuentran: el aserrín, la cascarilla de arroz (FAO, 1990), la fibra de coco (Ballester y Rubio, 1999), la cascarilla de arroz quemada y el carbón vegetal (Calderón y Cevallos, 2003).

Para lograr un buen desarrollo, las plantas deben estar bajo apropiadas condiciones nutricionales y ambientales. La composición de la solución nutritiva es uno de los factores esenciales para el crecimiento del cultivo. Ésta debe contener los nutrientes esenciales para lograr un buen desarrollo del cultivo y su composición dependerá de la especie, la variedad, el estado de desarrollo y la parte aprovechada de la planta, también se debe controlar constantemente el pH y la conductividad eléctrica (Resh, 1997).

1.4.4. Soluciones nutritivas

En los cultivos hidropónicos todos los elementos esenciales se suministran a las plantas disolviendo las sales fertilizantes en agua para preparar la solución de nutrientes. La elección de las sales que deberán ser usadas depende de un elevado número de factores, la proporción relativa de iones que debemos añadir a la composición se comparará con la necesaria en la formulación del nutriente. Las diferentes sales fertilizantes que podemos usar para la solución de nutrientes tienen a la vez diferente solubilidad, es decir, la medida de la concentración de sal que permanece en solución cuando la disolvemos en agua. En los cultivos hidropónicos las sales fertilizantes deberán tener una alta solubilidad, puesto que deben permanecer en solución para ser tomadas por las plantas, por ejemplo el calcio puede ser suministrado por el carbonato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) o por el sulfato de calcio (CaSO_4); este último es más barato, pero su solubilidad es muy baja (Llanos Peada, 2001).

Debe haber por lo menos tres elementos macronutrientes presentes en el medio nutritivo en forma de cationes, ellos son; potasio, calcio y magnesio. Los tres aniones macronutrientes son nitratos, fosfatos y sulfatos. Todos los elementos macronutrientes

deben por lo tanto ser suministrados por tres sales, por ejemplo; nitrato de potasio, fosfato de calcio y sulfato de magnesio. En adición a los elementos mayores o macronutrientes, una concentración apropiada de elementos menores debe ser suministrada a la solución a bajos pero adecuados niveles, y el pH debe ser mantenido en unos rangos deseables.

Hoagland y Arnon (1950) formularon dos soluciones nutritivas las cuales han sido ampliamente utilizadas y el término Solución de Hoagland proviene de los laboratorios caseros del mundo, dedicados a la nutrición de las plantas a nivel mundial (Cuadro 1.4). La solución de Hoagland contiene iones amonio como también de nitrato dando como resultado una mejor solución amortiguadora. La solución fue modificada por Jhonson *et al.*, (1957). La composición de la solución nutritiva, con unos nuevos y pequeños cambios, en la composición de los micronutrientes, está en el Cuadro 1.4.

Cuadro 1.4. Solución modificada de Hoagland (Martínez-Cordero *et al.*, 2004).

	Fórmula	Concentración
MACRONUTRIENTES		
Nitrato de potasio	KNO ₃	1.2 mM
Nitrato de calcio	Ca(NO ₃) ₂	0.8 mM
Fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	0.2 mM
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	0.2 mM
MICRONUTRIENTES		
Cloruro de calcio	CaCl ₂	50 µM
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	12.5 µM
Sulfato de manganeso	MnSO ₄	1 µM
Sulfato de zinc	ZnSO ₄	1 µM
Sulfato cúprico	CuSO ₄	0.5 µM
Molidato de sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.1 µM
Cloruro de níquel	NiCl ₂ .6H ₂ O	0.1 µM
Hierro-ácido etilendiaminotetraacético	Fe-EDTA	10 µM

1.5. EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

El cultivo de embriones se ha usado para diferentes propósitos, como: estudiar los requerimientos nutricionales de embriones en desarrollo, rescatar embriones híbridos que se hayan derivado de cruzamientos interespecíficos e intergenéricos, para producir monoploides y superar la latencia de las semillas. Igualmente, el cultivo de óvulos intactos se ha empleado para el rescate de embriones (mediante la polinización y la fertilización *in vitro*) y para inducir la embriogénesis somática a partir de nucelas de algunas especies de plantas. El desarrollo de los embriones vegetales se caracteriza por dos estados distintos: el estado temprano, que es heterotrófico, y el estado tardío, que es autotrófico. Los embriones globulares heterotróficos se desarrollan a expensas del endosperma y poseen una baja capacidad de síntesis; el desarrollo de los embriones en estado de "corazón" depende de ciertos nutrimentos como aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, purinas y pirimidinas que se encuentran en el saco embrionario y reguladores de crecimiento vegetal (RCV) (Roca y Mroginski, 1991).

Diversos estudios con cruzamientos interespecíficos demostraron la importancia del desarrollo normal del endosperma a el desarrollo del embrión. Renner (1914) observó que los embriones híbridos originados de cruzamientos entre *Oenothera biennis* y *O. muricata* y entre *O. biennis* y *O. lamarckiana* crecieron inicialmente en forma normal, pero más tarde tuvieron un crecimiento muy lento debido a la desintegración del endosperma después de la fertilización (Roca y Mroginski, 1991).

1.5.1. Cultivo de embriones

Hannig (1904) fue el primero en demostrar que es posible a partir óvulos de la planta remover embriones cigóticos maduros y cultivarlos en un medio estéril que contenga los nutrimentos esenciales; en este medio los embriones se pueden desarrollar normalmente y germinar. Laibach (1925, 1929) obtuvo cultivos relativamente exitosos de embriones híbridos maduros procedentes del cruzamiento incompatible de *Linum perenne* x *L. austriacum*, y de ellos recuperó plantas normales.

El cultivo de embriones se utiliza también para el rescate de material de propagación en

los frutales deciduos cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad (Tukey, 1934; Blake, 1939; Danielsson, 1950; tomado de Roca y Mroginski, 1991); también ha servido para obtener híbridos en especies como peras y albaricoques, en las cuales se presenta aborto de los embriones (Lammerts, 1942). El cultivo de embriones ha ayudado al mejoramiento genético de especies arbóreas porque acorta el periodo de siembra-floración; los embriones cultivados *in vitro* no necesitan un periodo de latencia anterior a la germinación. Asimismo, ha sido efectivo para acortar el ciclo de mejoramiento de *Iris* spp., porque acorta el periodo de latencia de las semillas que oscila entre unos pocos meses y varios años; esta latencia se debe a algunos inhibidores del crecimiento del embrión presentes en el endosperma (Randolph y Cox, 1943) y en la cubierta de la semilla (Lenz, 1955). Por medio del cultivo de embriones, es posible acortar la latencia y producir plántulas para el trasplante a las dos o tres semanas (Roca y Mroginski, 1991).

1.5.2. Factores que afectan el cultivo de embriones cigóticos

En el cultivo de embriones existen factores que pueden afectar este proceso, estos son factores que debemos de tomar en cuenta puesto que pueden afectar dicho cultivo ya sea obteniendo embriones deformes o que no tengan desarrollo alguno, estos factores son: medio de cultivo, osmolaridad y reguladores de crecimiento vegetal (Roca y Mroginski, 1991).

1.6. DIFERENCIAS ENTRE LA EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA Y SOMÁTICA

Es importante tener presente las diferencias que existen entre la embriogénesis cigótica y la somática, ya que el café se ha multiplicado, por lo menos a nivel de laboratorio, mediante estos dos procesos. Una primera diferencia entre embriones cigóticos y somáticos son sus sistemas de iniciación. Los embriones cigóticos se forman a partir de la unión de los gametos, la doble fecundación y las plantas que se originan son híbridas por la recombinación meiótica de sus genes.

Por el contrario, los embriones somáticos se originan de células vegetativas de un único

individuo y las plantas resultantes son duplicados genéticos o clones de la planta madre. Sin embargo, tanto los embriones cigóticos como los somáticos comparten similar ontogenia. Ambos embriones pasan por los estados globular, torpedo y cotiledonal en especies dicotiledóneas y coníferas (Figura 1.8) (Ammirato, 1987) o por los estados globular, escutelar y coleoptilar en monocotiledóneas (Gray y Purohit, 1991).

No obstante, existen diferencias significativas que limitan su uso como método de propagación. Por ejemplo, especies que son monoembrínicas y producen embriones cigóticos vía un suspensor, generalmente dan origen a embriones somáticos por un sistema evolutivo poco desarrollado donde se forma una masa de tejido embrional (denominado complejo proembrional) con múltiples embriones somáticos. Las razones para este retroceso hacia un tipo de desarrollo primitivo son desconocidas (Gray y Purohit, 1991). Dicha masa de embriones somáticos se desarrolla en forma asincrónica, de tal forma que múltiples estados de desarrollo embrional están presentes en el cultivo en cualquier momento. Al desarrollarse en diferentes momentos están sujetos a cambios en el régimen nutricional del medio de cultivo. En este ambiente fluctuante desde el punto de vista nutricional, los embriones se vuelven desorganizados, forman nuevas células embriogénicas y de esta manera contribuyen a la asincronía. También ocurre una germinación precoz, donde dichos embriones forman sólo raíces o tallos; no es una germinación que de origen a una plántula normal. Otro problema es que los embriones somáticos generalmente muestran anomalías estructurales como cotiledones extras y meristemas apicales pobremente desarrollados (Ammirato, 1987).

Todos estos problemas se deben a las condiciones de cultivo y no a factores intrínsecos de los embriones somáticos, ya que embriones cigóticos inmaduros al ser removidos de las semillas y cultivados *in vitro* presentan similares irregularidades (Norstog, 1965). Otra diferencia significativa entre embriones cigóticos y somáticos, es que a los embriones somáticos les falta la fase de quiescencia (Gray, 1987). Por el contrario, los embriones somáticos continúan creciendo, algunos germinan, otros se vuelven desorganizados y se transforman en tejido proembrional y otros mueren. La falta de una fase de reposo en los embriones somáticos es el mayor obstáculo de su utilización como semilla artificial (Gray y Purohit, 1991).

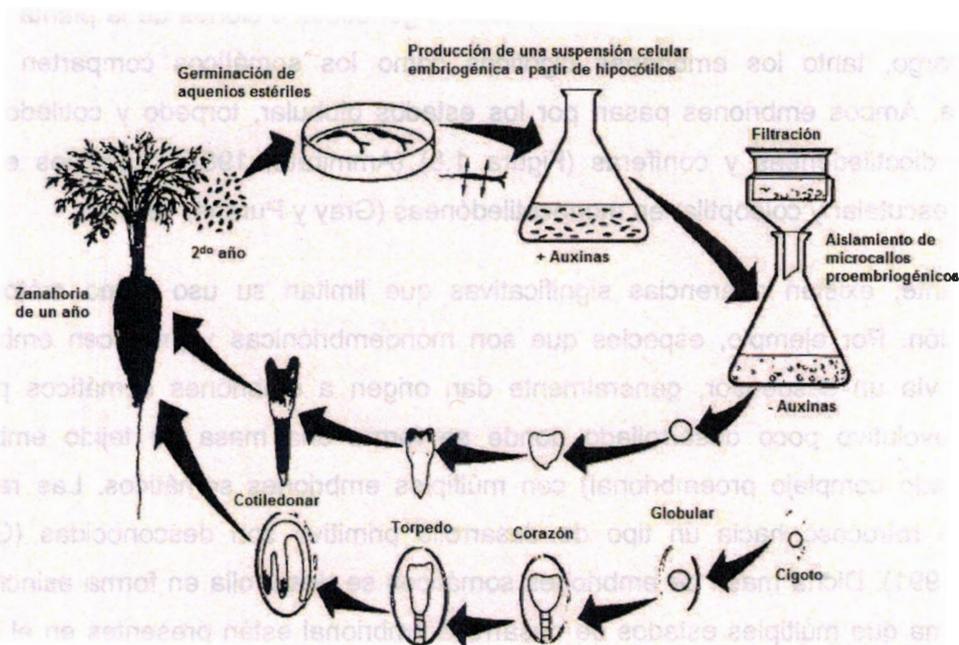


Figura 1.8. Etapas o estadios de la embriogénesis somática y la cigótica (Dodeman *et al.*, 1997).

1.7. ESTUDIOS EN CAFETO A PARTIR DE EMBRIONES CIGÓTICOS

Los embriones cigóticos de cafeto han sido utilizados para estudios de diferentes tipos, como es la conservación a temperaturas muy bajas (Abdelnour-Esquivel *et al.*, 1992) así como para el estudio de los efectos del aluminio sobre el crecimiento radicular (Bojórquez-Quintal, 2010).

En nuestro laboratorio, Bojórquez-Quintal (2009) estableció las condiciones óptimas de germinación de embriones cigóticos de plantas de cafeto (*Coffea arabica* L.). Estableciendo las condiciones optimas para la germinación y crecimiento *in vitro*, también estableció un protocolo de desinfección y extracción de embriones cigóticos a partir de semillas de café y de igual manera reportó que el medio de cultivo óptimo para la germinación de los embriones cigóticos fue el medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) a la mitad de su fuerza iónica en condiciones de fotoperiodo, ya que se obtuvo un tiempo de

germinación de 5 días en promedio; además observó un mejor aspecto morfológico de los embriones germinados.

En este trabajo (Bojórquez-Quintal, 2009) se utilizaron diferentes RCV para medir el efecto que éstos tienen sobre la germinación de embriones cigóticos, encontrando que el ácido giberélico fue el que mostró una mejor respuesta.

Como conclusión de este trabajo (Bojórquez-Quintal, 2009), se encontró que las condiciones óptimas de germinación de embriones cigóticos de semillas de café en el menor tiempo posible fue el medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) a la mitad de su fuerza iónica en el cual obtuvo embriones cotiledonales a los 5 días en comparación a los 30 días correspondientes a la germinación de semillas *in vitro* de café y 60 días correspondientes a los métodos tradicionales.

1.8. PEROXIDASAS

Se sabe que el Al desencadena peroxidación lipídica y estrés oxidativo en raíces debido a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Yamamoto *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2007). Para contrarrestar el efecto de las ROS, las plantas han desarrollado diversos mecanismos de defensa antioxidante. Estos mecanismos implican enzimas antioxidantes y compuestos específicos de bajo peso molecular (Kochhar y Kochhar, 2005; Lee *et al.*, 2007). Se sabe que el Al tiene fuerte afinidad por las biomembranas, causando la rigidización de membranas y la peroxidación de lípidos (Yamamoto *et al.*, 2003). El Al también puede estar asociado con fosfatos y grupos carboxilo y pueden acumularse en las membranas debido a su baja tasa de cambio. La acumulación de Al ocasiona cambio en la estructura y función de las membranas (Oteiza, 1994).

Las plantas han desarrollado mecanismos en los cuales están involucrados la resistencia al Al y dentro de estos mecanismos están las enzimas antioxidantes, tales como: la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1), la peroxidasa (POX, EC 1.11.1.7), la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) y la glutatión reductasa (GR, EC 1.6.4.2), así como moléculas no enzimáticas de bajo peso molecular, tales como

el ácido ascórbico (AAS), el glutatión reducido (GSH) y compuestos fenólicos tales como los tocoferoles, los flavonoides, los carotenoides y el ácido úrico (Guo *et al.*, 2007; Kochhar y Kochhar, 2005; Lee *et al.*, 2007; Dabrowska *et al.*, 2007). Para este trabajo nos centraremos en estudiar las peroxidasas (POX, EC 1.11.1.7).

El término peroxidasa fue utilizado por primera vez por Linossier (1898) para describir una enzima extraída de raíces de rábano. Estas peroxidasas fueron observadas en cultivos celulares de varias especies de plantas, como tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Pickering *et al.*, 1973), haba (*Vicia faba*) (Arnison y Boll, 1975), espinaca (*Spinacia oleracea*) (Sticher *et al.*, 1981) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Griffing y Fowke, 1985).

De acuerdo con las estructuras y las propiedades catalíticas, estas enzimas fueron divididas en tres superfamilias: (1) las peroxidasas animales tales como la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), (2) las catalasas (EC 1.11.1.6) y (3) las peroxidasas vegetales.

Las peroxidasas vegetales pueden encontrarse en hongos, bacterias y levaduras (Welinder, 1992). Basado en diferentes estructuras primarias, la súper familia de peroxidasas vegetales pueden dividirse en tres clases: I, II y III.

Las peroxidasas de clase I incluyen enzimas intracelulares en plantas, bacterias y levaduras. La clase II son generalmente peroxidasas fúngicas extracelulares. Estas enzimas han sido descubiertas por primera vez en 1983 (Farrell *et al.*, 1989) y son llamadas lignina peroxidasas o ligninasas porque catalizan la despolimerización de lignina. Las peroxidasas de clase III son las peroxidasas clásicas en plantas superiores. Éstas son definidas como peroxidasas secretadas.

En plantas superiores son dos las clases de peroxidasas; la clase I (ascorbato peroxidasa) y III (guaiacol peroxidasa).

1.8.1. Clase III de peroxidasas vegetales

Las peroxidasas vegetales, Clase III (EC 1.11.1.7 donadores de H₂O₂, oxireductasas) tienen afinidad por guaiacol, que es considerado como un sustrato universal para este tipo

de enzimas, por lo tanto son comúnmente llamadas como guaiacol peroxidasas (Hiraga *et al.*, 2001).

Estas peroxidasas no están muy bien definidas, ya que catalizan la oxidación de muchos sustratos incluyendo componentes fenólicos tales como el guaiacol (Siegel, 1993). Así, son llamados “no específicos” o “peroxidasas dependientes de fenoles” (Otter y Polle, 1994).

1.8.2. Funciones

Las peroxidasas de plantas son enzimas multifuncionales que han sido detectadas en plantas en etapas de germinación hasta la senescencia.

El patrón general de la reacción catalizada por estas enzimas es la siguiente:

- a) $\text{Prx} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Comp I} + \text{H}_2\text{O}$
- b) $\text{Comp I} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{Comp II} + \text{AH}$
- c) $\text{Comp II} + \text{AH}_2 \rightarrow \text{Prx} + \text{AH} + \text{H}_2\text{O}$

Durante este ciclo de peroxidación estándar, la peroxidasa o peroxidasa férrica nativa (Prx) es convertida en el componente I (Comp) catalizando la reducción de H_2O_2 , entonces el componente I y II catalizan las reacciones sucesivas de deshidrogenación de un amplio rango de moléculas donadoras de electrones tales como componentes fenólicos, precursores de lignina, auxinas o metabolitos secundarios. En términos generales, el sitio activo de las peroxidasas es la ferriprotoporfirina. En realidad, el componente I contiene un hemo ferroso ($\text{Fe IV}=\text{O}$), que se somete a dos pasos sucesivos por AH_2 para transformar por sí mismo en un componente II (Comp II) y una forma nativa de la enzima conteniendo un hemo férrico (Fe III). Cuando el sustrato oxidado es un componente fenólico, la reacción conduce a la generación de radicales fenoxi que son acoplados espontáneamente para formar polímeros de lignina (Chen y Schopfer, 1999).

La clase III de peroxidasas vegetales están involucradas en un rango general de procesos

fisiológicos (Figura 1.9) como se menciona están envueltas en todo el ciclo de vida de la planta (Passardi *et al.*, 2005).

Por ejemplo, están involucradas en el metabolismo de la pared celular (Barceló y Pomar, 2001; Passardi *et al.*, 2004b), la cicatrización de heridas (Bernards *et al.*, 1999; Allison y Schultz, 2004) y asimismo en el catabolismo de las auxinas (Gazaryan *et al.*, 1996). También se cree que están implicadas en la eliminación de H_2O_2 , la oxidación de tóxicos reductantes, la defensa contra el ataque de patógenos o insectos, así como la simbiosis y el crecimiento celular normal. En adición las peroxidasas clase III pueden generar altos índices de ROS (Liszky *et al.*, 2003; Passardi *et al.*, 2004a).

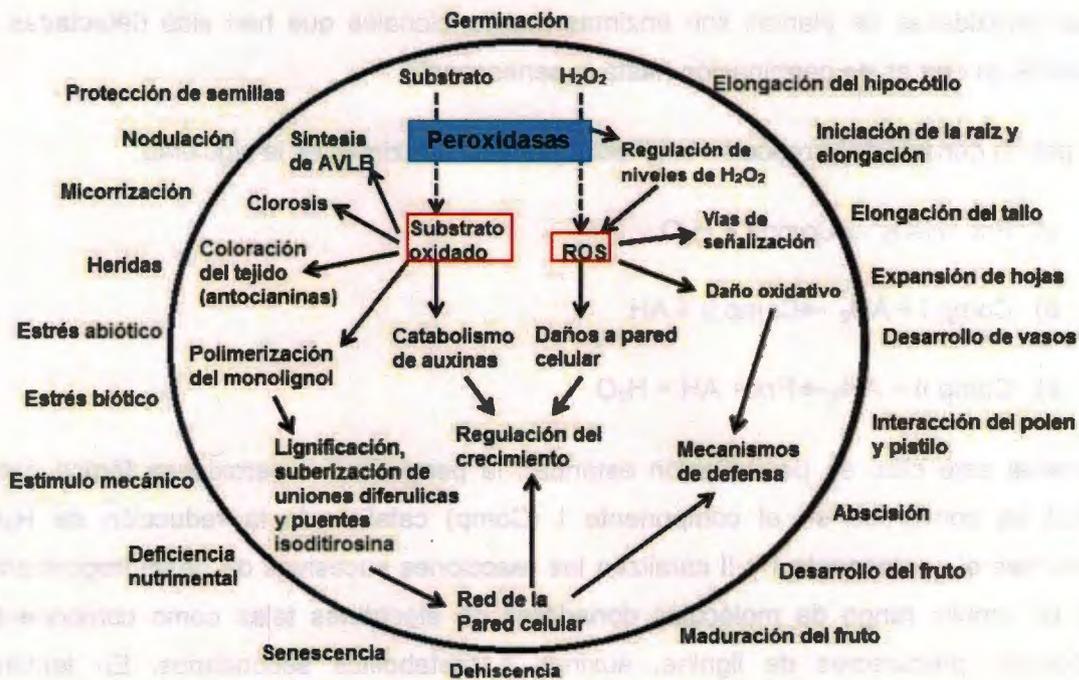


Figura 1.9. Las diversas funciones y desempeños de las peroxidasas clase III (AVLB = α -3', 4'-anhidrovinblastina) (Cosio y Dunand, 2009).

1.8.3. Localización subcelular

Las peroxidasas clase III son encontradas mayormente en el apoplasto y las vacuolas (Takabe *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2002).

Estas son enzimas secretadas y que contienen una péptido señal fuera del retículo endoplasmático, por lo tanto, estas enzimas se pueden encontrar en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi y en vesículas de transporte (Mader, 1992).

Chibbar y Van Huystee (1986) muestran otra compartimentalización celular de estas enzimas ya que la actividad de las peroxidasas fue detectada en mitocondria, núcleo y membrana plasmática.

Por otro lado, se han reportado que isoperoxidasas con un punto isoeléctrico ácido que son encontradas en la pared celular (Mader, 1992; Passardi *et al.*, 2004), mientras que las isoperoxidasas básicas fueron también en vacuola o en pared celular. Hu *et al.*, (1989) han demostrado que las peroxidasas catiónicas pueden aislarse de la pared celular.

1.9. ESTUDIOS SOBRE LA RELACIÓN ALUMINIO-PEROXIDASAS

Existen estudios que relacionan al aluminio con la actividad de peroxidasas en plantas. Los iones de aluminio muestran una fuerte afinidad por las cargas negativas de la pectina en la pared celular y de la membrana plasmática. Esto sugiere que la interacción Al-membrana causa un cambio estructural de la bicapa fosfolipídica y acelera su peroxidación, afectando la función de las membranas, como la permeabilidad y la actividad de las proteínas membranales (Cakmak y Horst, 1991). Las relaciones entre la superficie negativa de la membrana plasmática y la sensibilidad al aluminio también apoyan la idea acerca de las membranas como un sitio blanco de la toxicidad al aluminio (Yermiyahu *et al.*, 1997). Ha sido reportado que el Al facilita la producción de radicales libres de hierro y así la peroxidación de lípidos, que es una causa directa de la ruptura de la membrana plasmática y la muerte celular (Yamamoto *et al.*, 1997). Por otro lado, las moléculas antioxidantes y las enzimas antioxidantes previenen la peroxidación de lípidos inducida por Al (Ezaki *et al.*, 1996).

Existe evidencia sobre la unión entre el catión Al y el estrés oxidativo es que el Al induce la expresión de los genes de estrés oxidativo en *Arabidopsis thaliana* y su expresión en plantas transgénicas mejora los daños causados por el estrés oxidativo o Al (Richards *et al.*, 1998; Ezaki *et al.*, 2000).

Tamas *et al.*, (2002) estudiaron el efecto del estrés por Al sobre la actividad de la peroxidasa y las isoenzimas peroxidadas, estas actividades fueron estudiadas en raíces de dos cultivares de cebada que contrastan con la sensibilidad a el Al. En este estudio ellos reportan que el tratamiento con Al indujo un enorme aumento de la actividad de la peroxidasa dependiente de guaiacol especialmente en raíces de cebada cv. Alfor sensibles a Al. Después de 48 horas de tratamiento con Al, en las raíces del cv. Alfor fue donde se encontró que la actividad fue hasta 5.5 veces más alta que en las raíces testigo. En contraste, la actividad de la peroxidasa en las raíces cv. Bavaria resistentes a Al mostraron aproximadamente la mitad de la actividad que en las raíces sensibles a Al. También el SDS-PAGE reveló que al menos cinco isoenzimas de peroxidadas que son activadas en presencia de Al.

También en dicho estudio se pudo apreciar la inhibición de crecimiento de las raíces sensibles al Al, el cv. Alfor, y represento el 44%, pero en las resistentes a dicho metal, el cv. Bavaria, se observo que sólo el 21% tuvieron esta inhibición en comparación con las plantas testigo. La mayor actividad de la peroxidasa, así como una mayor inhibición de crecimiento de las raíces sensibles cv. Alfor sugieren que se aumenta el estrés oxidativo generado por los tratamientos a Al y es significativamente diferente Alfor comparado con Bavaria (Tamas *et al.*, 2002).

HIPÓTESIS

Si el aluminio en forma de Al^{3+} modifica el crecimiento en otras especies de plantas, entonces es probable que pudiera tener el mismo efecto en plántulas de cafeto cultivadas en hidroponía.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del aluminio sobre el crecimiento de plántulas de cafeto cultivadas en condiciones de hidroponía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el crecimiento de las plántulas a diferentes concentraciones de Al en condiciones de hidroponía.
- Determinar las concentraciones de aluminio y nutrimentos (K, Ca, P) en raíces, tallos y hojas de las plántulas cafeto.
- Estudiar los cambios de pH de las soluciones en un curso temporal en presencia de Al en diferentes días de cultivo.
- Identificar la distribución del aluminio en raíces de cafeto por microscopía y tinción con hematoxilina.
- Determinar la actividad de peroxidasas en raíces y hojas de plántulas de cafeto expuestas a diferentes concentraciones de Al.
- Cuantificar la fuga de electrolitos en raíces, tallos y hojas de plántulas de cafeto expuestas a diferentes concentraciones de Al.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto que pudiera tener el Al sobre el crecimiento de plántulas de café cultivadas en condiciones de hidroponía, se diseñó un modelo experimental (Figura 1.10). Como poses inicial las semillas de *C. arabica* var. Typica, se desinfectaron y los embriones fueron extraídos para ser germinados en medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) a la mitad de su fuerza iónica (B₅/2) para la obtención de plántulas. Posteriormente a las plántulas se les midió la longitud de la raíz y luego fueron transferidas a la agrolita en condiciones de hidroponía para un periodo de aclimatación de aproximadamente de 15 a 21 días y fueron colocadas en un cuarto de cultivo en condiciones de fotoperiodo a 25 °C, después del periodo de aclimatación las plantas fueron tratadas con las diferentes concentraciones de AlCl₃ (100, 300 y 500 μM) y como testigo se usaron plántulas que crecieron en ausencia de este metal y fueron 5 replicas por cada tratamiento evaluado. Durante todo el tratamiento se realizaron mediciones de pH, número de hojas por planta y la altura de la planta. Al finalizar el tratamiento que fue de 60 días las plántulas se cosecharon y se determinó la longitud de la raíz, se seccionaron las plántulas en raíz, tallos y hojas para posteriormente cuantificar la concentración de Al y nutrientes (P, Ca y K), así como para la histolocalización e identificación del Al en raíces por tinción con hematoxilina.

A los 60 días de cultivo, las plántulas se cosecharon para la cuantificación de la actividad de peroxidasa espectrofotométricamente tanto de hojas como de raíces y se determinó la actividad de estas enzimas por espectrofotometría. Se cuantificó la fuga de electrolitos, y los resultados obtenidos se les realizó una prueba de varianza de dos vías y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey (P<0.05).

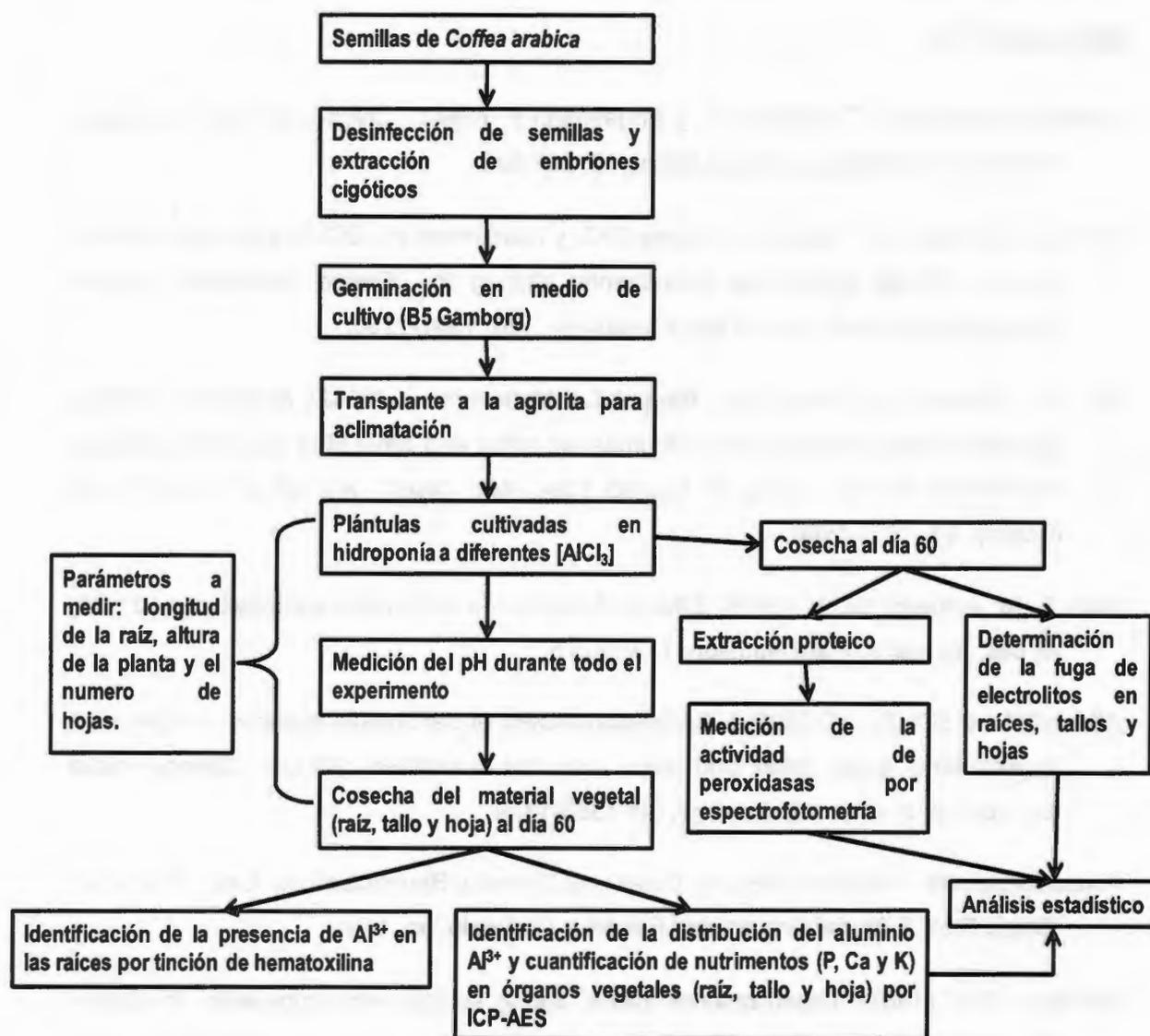


Figura 1.10. Estrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel A., Villalobos V. y Engelmann F. (1992). Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Letters*, 13: 297-302.
- Ahn S.J., Sivaguru M., Osawa H., Chung G.G. y Matsumoto H. (2001). Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, 126: 1381-1390.
- Ahn S.J., Sivaguru M., Chung G.C., Rengel Z. y Matsumoto H. (2002). Aluminium induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Journal of Experimental Botany*, 53: 1959-1966.
- Alam S. M. y Adams W. A. (1979). Effects of aluminium on nutrient composition and yield of oat. *Journal of Plant Nutrition*, 1: 365-375.
- Allison S.D. y Schultz J.C. (2004). Differential activity of peroxidasa isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1363-1379.
- Alvarado-Soto M. y Rojas-Cubero G. (1994). *El Cultivo y Beneficiado del Café*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia, pp. 184.
- Ammirato P.V. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis. In: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds) *Plant tissue and cell culture*. Liss, New York, pp. 57-81.
- Andrews J., Adams S.R., Burton K.S. y Edmondson R.N. (2002). Partial purification of tomato fruit peroxidase and its effect on the mechanical properties of tomato fruit skin. *Journal Experimental of Botany*, 53: 2393-2399.
- Ansorena J. (1994). Sustratos: Propiedades y caracterización. In *Fundamentos de Nutrición*. Ediciones Mundi-empresa. Madrid, España, pp. 73-105.
- Anthony F., Astorga C. y Berthaud J. (1999). Los recursos genéticos: las bases de una

-
- solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la caficultura en Centroamérica. San José, Costa Rica, pp. 369-406.
- Anthony F., Astorga C., Topart P., Bertrand B. y Lashermes P. (2002). La caracterización de las variedades de café (*Coffea arabica*) por los marcadores moleculares: ¿mito o realidad?. Boletín PROMECAFE, 93: 9-13.
- Arnison P.G. y Boll W.G. (1975). Isoenzymes in cell cultures of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. contender): isoenzymatic differences between stock suspension cultures derived from a single seedling. Canadian Journal of Botany, 53: 261-271
- Arnon D.I. y Johnson C.M. (1942). Influence of hydrogen ion concentration on the growth of higher plants under controlled conditions. Plant physiology, 17: 525-539.
- Arroyo Márquez M.V. Hidroponía, área de educación para la salud del centro de actualización del magisterio en el Distrito Federal, México, Actualizarte, pp. 16-21.
- Ballester J.E. y Rubio A.E. (1999). Efectos de sustratos en el desarrollo del chile picante *Capsicum frutescens* bajo invernadero en el trópico húmedo. Guácimo, Costa Rica, pp. 64.
- Barcelo A.R. y Pomar F. (2001). Oxidation of cinnamyl alcohols and aldehydes by a basic peroxidase from lignifying *Zinnia elegans* hypocotyls. Phytochemistry, 57: 1105-1113.
- Barceló J. y Poschenrieder C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. Suelo y Planta, 2: 345-361.
- Barceló J., Poschenrieder C., Vazquez M.D. y Gunsé B. (1996). Aluminium phytotoxicity: Aluminium phytotoxicity: a challenge for plant scientists. Fertilizer Research, 43: 217-223.
- Basu A., Basu U. y Taylor G.J. (1994a). Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of *Triticum aestivum* L. under conditions of aluminum stress. Plant Physiology, 104: 1007-1013.

- Basu U., Basu A. y Taylor G.J. (1994b). Differential exudation of polypeptides by roots of aluminum-resistant and aluminum-sensitive cultivars of *Triticum aestivum* L. in response to aluminum stress. *Plant Physiology*, 106: 151-158.
- Basu U., Good A.G., Aung-Taing A., Slaski J.J., Basu A., Briggs K.G. y Taylor G.J. (1999). A 23-kDa root exudate polypeptide co-segregates with aluminum resistance in *Triticum aestivum*. *Physiologia Plantarum*, 106: 53-61.
- Bennet R.J., Breen C.M. y Fey M.V. (1985a). Aluminium uptake sites in the primary root of *Zea mays* L. *South African Journal of Plant and Soil*, 2: 1-6.
- Bennet R.J., Breen C.M. y Fey M.V. (1985b). Aluminium induced changes in the morphology of the quiescent centre, proximal meristem and growth region of the root of *Zea mays* L. *South African Journal of Botany*, 51: 355-262.
- Bennet R.J., Breen C.M. y Fey M.V. (1987). The effects of aluminium on root cap function and development in *Zea mays* L. *Environmental and Experimental Botany*, 27: 91-104.
- Bennet R.J. y Breen C.M. (1991a). The recovery of roots of *Zea mays* L. from various aluminium treatments: towards elucidating the regulatory processes that underline root growth control. *Environmental and Experimental Botany*, 31: 153-163.
- Bernards M.A., Fleming W.D., Llewellyn D.B., Priefer R., Yang X., Sabatino A. y Plourde G.L. (1999). Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiology*, 121: 135-146.
- Berzonsky W.A. (1992). The genomic inheritance of aluminum tolerance in "Atlas 66" wheat. *Genome*, 35: 689-693.
- Blamey F.P.C., Asher C.J., Kelven G.L. y Edwards D.G. (1993). Factors affecting aluminium sorption by Calcium pectate. *Plant and Soil*, 149: 87-94.
- Bojórquez-Quintal J. E. de A. (2009). Establecimiento de las condiciones optimas de germinación de embriones cigóticos de plantas de cafeto (*Coffea arabica* L.), tesis de licenciatura, Facultad de química (UADY), Mérida Yucatán.

-
- Bojórquez-Quintal J. E. de A. (2010). Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Bollard E.G. (1983). Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition; Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, 15, A. Läuchli & R. L. Bielski (eds).
- cafedecolombia.com
- Cakmak I. y Horst W.J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidasa activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- Calderón F. y Cevallos F. (2003). Los sustratos (en línea). Bogotá, CO. Consultado en septiembre de 2010, disponible en <http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/LosSustratos.htm>.
- Caldwell C.R. y Haug A. (1982). Divalent cation inhibition of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} -ATPase activity and its reversal by monovalent cations. *Physiologia Plantarum*, 54: 112-118.
- Cançado G.M.A., Loguercio L.L., Martins P.R., Arentoni S.N., Paiva E. y López M.A. (1999). Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 99: 747-754.
- Carneiro M.F. (1999). Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*, 1: 1-14. Disponible en: <http://www.agbiotech.net/reviews/jan99/html/Carneiro.htm>.
- Castillo G., Contreras A., Zamarripa A., Méndez I., Vázquez M., Holguín F. y Fernández A. (1996). Tecnología para la Producción de Café en México, 1ª Reimpresión; INIFAP: México. pp. 1-11.
- Cenid-Raspa. (2003). Agricultura protegida. Libro Técnico No. 1. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria Relación-Agua-Suelo-Planta-Atmosfera. INIFAP. Gómez Palacio, Dgo., México, pp.111 .

- Chen S. y Schopfer P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions: A novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260: 726-735.
- Chenery E.M. (1948). Aluminium in the plant world. I. general survey in dicoyledons. *Kew Bulletin*, 2: 173-183.
- Chibbar R.N. y Van Huystee R.B. (1986). Immunochemical localization of peroxidase in cultured peanut cells. *Journal of plant Physiology*, 123: 477-486.
- Clarkson D.T. (1965). The effect of Aluminium and some other trivalent metal cations on cell division in the root apices of *Allium cepa*. *Annals of Botany*, 29: 309-315.
- Clarkson D.T. (1969). Metabolic aspects of aluminium toxicity and some possible mechanisms for resistancets. In: Rorison IH, ed. *Ecological aspects of the mineral nutrition in plants*. Oxford: Blackwell, pp. 38-39.
- Cosio C. y Dunand C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany*, 60: 391-408.
- Cregan P. *The Acid Soil Problem Defined*, the regional institute Ltd. Disponible en: <http://www.regional.org.au/au/roc/1981/roc198109.htm>.
- Cullis P.R. y Kruijff B. (1979). Lipid polymorphism and the functional role of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559: 339-420.
- Cumming J.R., Ecbert R.T. y Evans L.S. (1985). Effect of aluminium on K uptake by red spruce seedling. *Canadian Journal of Botany*, 63: 1099-1103.
- Dabrowska G., Kata A., Goc A., Szechynska-Hebda M. y Skrypek E. (2007). Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. *Acta Biologica Cracoviensia*, 1: 7-17.
- Delhaize E., Craig S., Beaton C.D., Bennet R.J., Jagadish V.C. y Randall P.J. (1993a). Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. *Plant Physiology*, 103: 685-693.

-
- Delhaize E., Ryan P.R. y Randall P.J. (1993b). Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminium-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiology*, 103: 695-702.
- Delhaize E. y Ryan P.R. (1995). Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology*, 107: 315-321.
- Devine T.E. (1982). Genetic fitting of crops to problem soils, In: *Bleeding Plants for less favorable environments*. M. N. Christiansen & L. W. Lewis (eds); John Wiley & Sons, New York.
- Dodeman V.L., Ducreux G. y Kreis M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1493-1509.
- Eira M.T.S., Amaral da Silva E.A., de Castro R.D., Dussert S., Walters C., Bewley J.D. y Hilhorts W.M.H. (2006). Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 149-163.
- Etienne H. (2005). Somatic embryogenesis protocol: *Coffee (Coffea arabica* L. and *C. Canephora* P.), S.M. Jain and P.K. Gupta (eds.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, pp. 167-179.
- Ezaki B., Tsugita S. y Matsumoto H. (1996). Expression of moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: posible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiologia Plantarum*, 96: 21-28.
- Ezaki B., Gardner R.C., Ezaki Y. y Matsumoto H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 122: 657-665.
- Farrell R.L., Murtagh K.E., Tien M., Mozuch M.D. y Kirk T.K. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 322-328.
- FAO (Food and Agricultura Organization of the United Nations, IT), (1990). *Soilless Culture for Horticultural Crop Production*, pp.180.
-

- Foy C.D., Chaney R.L. y White M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 511-566.
- Foy C.D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum, and manganese toxicities in acid soil. *In* F. Adams (ed.) *Soil Acidity and Liming*. Agronomy Monograph no. 12 (2nd ed.) ASA-CSSA-SSSA. Madison, WI. pp. 57-97.
- Furukawa J., Yamaji N., Wang H., Mitani N., Murata Y., Sato K., Katsuhara M., Takeda K. y Ma J.F. (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiology*, 48: 1081-1091.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Garzón T. (2003). Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Gatica A.M., Arrieta G. y Espinoza A.M. (2007). Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. CVS. Caturra and Catuaí. *Agronomia costarricense*, 31: 85-94.
- Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A. y Thorneley R.N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, 313: 841-847.
- Gilsanz J.C. Hidroponía, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), septiembre 2007.
- Gray D.J. (1987). Quiescence in monocot and dicot somatic embryos induced by dehydration. *In*: Proceedings of the Symposium on Synthetic Seed Technology for the Mass Cloning, of Crop Plants: Problems and Perspectives. *HortScience*, 22: 810-814.
- Gray D.J. y Purohit A. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed

- technology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10: 33-61.
- Green D.E., Fry M. y Bloning G.A. (1980). Phospholipids as molecular carriers of ion and solute transport in biological membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, USA, 77: 257-261.
- Griffing L.R. y Fowke L.C. (1985). Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplasts: intracellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. *Protoplasma*, 128: 22-30.
- Guevara P., Poschenrieder C. y Barceló J. (1992). Differential response of four maize (*Zea mays* L.) Varieties to aluminium toxicity. *Suelo y Planta*. 2: 713-721.
- Guo T.R., Zhang G.P. y Zhang Y.H. (2007). Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 57: 182-188.
- Hannig E. (1904). Zur physiologie pflanzlicher embryonen; 1: Uber die culture von cruciferen-embryonen ausserhalb des emrbyosacks. *Bot. Ztg*, 62: 45-80.
- Harrington E.G. y Morales M.M. *Café en la Clase: Un Manual Sobre el Café Orgánico y el Café Bajo Sombra*. Disponible en: www.lasnubes.org/wordpress/wp-content/uploads/2010/03/Manual.pdf
- Haug A. (1984). Molecular aspects of aluminium toxicity in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1: 345-373.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y. y Matsui H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42: 462-468.
- Hoagland D.R. y Amon D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station, Circulation*, 347: 1-32.
- Homés M.V. (1963). The method of systematic variations. *Soil Science*, 96: 380-386.
- Horst W.J. (1995). The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher

plants: a review. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd*, 158: 419-428.

Horst W.J. y Marscher H. (1993). Mineral nutrition of higher plants. Academic Press Limited, eds. Great Britain.

Horst W.J., Wagner A. y Marscher H. (1983). Effect of aluminium on root growth, cell division rate and mineral element contents in roots of *Vigna unguiculata* genotypes. *Z. Pflanzenphysiologie*, 109: 95-103.

Hu C., Smith R. y Van Huystee R. (1989). Biosynthesis and localization of peanut peroxidases: a comparison of the cationic and the anionic isozymes. *Plant Physiology*, 135: 391-397.

Huang C.F., Yamaji N., Mitani N., Yano M., Nagamura Y. y Ma J.F. (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, 21: 655-667.

Huttová L., Tamás L. y Mistřík I. (1998). Quantitative changes in maize cytoplasmic proteins induced by aluminium. *Biologia Plantarum*. 41: 547-554.

Illés P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidl I., Baluska F. y Ovecka M. (2006). Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4201-4213.

infoagro.com/herbaceos/industriales/cafe.htm, [acceso Octubre de 2010].

Izquierdo J. (2000). Hidropónia escolar. FAO para América Latina y el Caribe, Chile.

Jones D.L. y Kochian L.V. (1997). Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *Febs Letters*, 400: 51-57.

Jornes A. y Hecht-Buchholz Ch. (1985). Aluminiuminduzierter Magnesium –und Calcium –mangel im Laborversuch bei Fichtensämlingen. *Allgem Forst*. 40: 1248-1252.

-
- Kinzel H. (1982). Die calcicolen und calcifugen, Basiphilen und Acidophilen pflanzen; "Pflanzenökologie una Mineralstoffwechsee" (KINZEL H. ed.), Ulmer-Verlag, Stuttgart, p. 216-380.
- Klock-Moore K.A. y Broschat T.K. (2001). Effect of four growing substrates on growth of ornamental plants in two irrigation systems. *Hortechology*: 11: 456-460.
- Kochhar S. y Kochhar V.K. (2005). Expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in relation to combined stress of cadmium and heat in *Vigna mungo* seedlings. *Plant Science*, 168: 921-929.
- Kochian L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 237-260.
- Kochian L.V. y Jones D.L. (1997). Aluminum and resistance in plants. In: *Research issues in aluminum toxicity*. R. A. Yokel and M. S. Golub, Ed.; Taylor & Francis Publishers, Washington, DC, USA., p. 69-89.
- Kochian L.V., Hoekenga O.A. y Piñeros M.A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and Phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 459-93.
- Kochian L.V., Piñeros M.A. y Hoekenga O.A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil*, 274: 175-195.
- Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K. y Fujimura T. (1992). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 28: 11-14.
- Laibach F. (1925). Das taubwerden von Bastardsamen und die kunstliche Aufzucht fruh absterbender Bastardembryonen. *Zeitschrift Bot.*, 17: 417-459.
- Laibach F. (1929). Ectogenesis in plants. *Journal of Heredity*, 20: 201-208.
- Lammerts W.E. (1942). Embryoculture an effective technique for shortening the breeding

- cycle of deciduous trees and increasing germination of hybrid seeds. *American Journal of Botany*, 29: 166-171.
- Lance J.C. y Pearson R.W. (1969). Effects of low concentration of Al on growth and water and mineral uptake by cottons roots. *Proceedings- Soil Science Society of America*, 33: 95-98.
- Larsen P.B., Stenzler L.M., Chin-Yin T., Degenhardt J., Howell S.H. y Kochian L.V. (1997). Molecular and physiological analysis of *Arabidopsis* mutants exhibiting altered sensitivities to Aluminium. *Plant and Soil*, 192: 3-7.
- Larsen P.B., Geisler M.J.B., Jones C.A., Williams K.M. y Cancel J.D. (2005). ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 41: 353-363.
- Larsen P.B., Cancel J., Rounds M. y Ochoa V. (2007). *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta*, 225: 1447-1458.
- Lashermes P., Trouslot P., Anthony F., Combes M.C. y Charrier A. (1996). Genetic diversity for RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica*, 87: 59-64.
- Lee J. y Pritchard M.V. (1984). Aluminium toxicity expression on nutrient uptake, growth and root morphology of *Trifolium repens* L. *Plant and Soil*, 82: 101-116.
- Lee Y.P., Kim S.H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S. y Kwon S.Y. (2007). Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 26: 591-598.
- Lenz L.W. (1955). Studies in *Iris* embryo culture; 1: Germination of embryos of the subsection *Hexapogon* Benth. (sect. *Regelia sensu* Dykes). *Aliso*, 3: 173-182.
- Leon J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. aum. y rev. San José, Costa Rica, IICA, p. 350-364.

-
- Ligterink W. y Hirt H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: Versatile signalling tools. *International Review of Cytology*, 201: 209-275.
- Linossier G. (1898). Contribution a l'étude des ferments oxidants. Sur la peroxidase du pups. *Comptes Rendus de la Société de Biologie, Paris*, 50: 373-375.
- Liszky A., Kenk B. y Schopfer P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217: 658-667.
- Liu D. y Jiang W. (1993). Effects of aluminium on root growth, cell division, and nucleoli of garlic (*Allium sativum* L.). *Environmental Pollution*, 82: 295-299.
- Llanos-Peada P.H. (2001). La solución nutritiva, nutrientes comerciales, formulas completas. WALCO S.A. Bogotá D.C., Colombia, 13: 81-87. Disponible en: www.walcoagro.com
- Llugany M., Massot N., Wissemeier H., Poschenrieder C., Horst W.J. y Barceló J. (1994). Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *Zeitschrift Pflanzeneraehr Bodenk*, 157: 447-451.
- Ma J.F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review of Cytology*, 264: 225-252.
- Mader M. (1992). Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. In: Penel C, Gaspar T, Greppin M (eds) Topic and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects. University of Geneva, Geneva, p. 37-46.
- Magalhaes J.M., Liu J., Guimaraes, C.T., Lana U.G.P., Alves V.M., Wang Y-H., Schaffert R.E., Hoekenga O.A., Shaff J.E., Pineros M.A., Klein P.E. y Kochian L.V. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, 39: 1156-1161.
- Manson J. (1990). Comercial hydroponics. *In Vegetable Crops*. First edition. Colorcraft Ltd. Hong Kong, p. 170.
-

- Martínez E. (2000). Los cultivos hidropónicos y la desinfección de sustratos, universidad politécnica de Madrid, España.
- Martínez E. y García M. (1993). Cultivos sin suelo: Hortalizas en clima mediterráneo. *In* Sustratos. Reus, S. L. (Ed.). Ediciones de Horticultura. España, p.19-40.
- Martínez H.E.P. y Monnerat P.H. (1992). Aluminum response of two coffee varieties in nutritive solution, Proceedings of the XVIII Brazilian Coffee, Research Congress, 1: 105-106.
- Martínez-Cordero M.A., Martínez V. y Rubio F. (2004). Cloning and functional characterization of the high-affinity K⁺ transporter HAK1 of pepper. *Plant Molecular Biology*, 56: 413-421.
- Martínez-Estévez M. (2001). Estudios sobre la toxicidad del aluminio en suspensiones celulares de café, Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Mérida, México.
- Martínez-Estévez M., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Aluminum increases phosphorylation of particular proteins in cellular suspension cultures of coffee (*Coffea arabica*). *Journal of Plant Physiology*, 158: 1375-1379.
- Martínez-Estévez M., Racagni-Di Palma G., Muñoz-Sánchez J.A., Brito-Argáez L., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositides pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1297-1303.
- Marulanda C. y Izquierdo J. (2003). La Huerta Hidropónica Popular: Manual Técnico. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe 3a. Edic. Santiago, Chile, p. 131.
- Massot N., Poschenrieder C. y Barcelo J. (1991). Aluminium assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and Hematoxylin staining. *Suelo y Planta*, 1: 25-32.
- Massot N., Poschenrieder C. y Barcelo J. (1992). Differential response of three bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars to aluminium. *Acta Botanica Neerlandica*, 41: 293-298.

-
- Matsumoto H., Hirasawa F., Torikai H. y Takahashi E. (1976). Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. *Plant Cell Physiology*, 17: 127-137.
- Matsumoto H., Morimura A. y Takashashi T. (1977). Binding of aluminium to DNA of DNP in pea root nuclei. *Plant and Cell Physiology*, 18; 987-993.
- Matsumoto H. y Morimura S. (1980). Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminium. *Plant Cell Physiology*, 21: 951-959.
- Mistrík I., Tamás L. y Huttová J. (2000). Quantitative changes in maize membrane proteins induced by aluminium. *Biologia Plantarum*, 43: 85-91.
- Miyasaka S.C., Kochian L.V., Shaff J.E. y Foy C.D. (1989). Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺, transport, and root cell membrane potentials. *Plant Physiology*, 91: 1188-1196.
- Montero S.M., Singh B.K. y Taylor R. (2006). Evaluación de seis estructuras de producción hidropónica diversificada en el trópico húmedo de Costa Rica. *Tierra Tropical*, 2: 27-37.
- Morimura A. y Matsumoto H. (1978a). Association of aluminium with nuclei and inhibition of cell division in onion roots. *Zeitschrift Pflanzen physiology*, 88: 395-401.
- Morimura A. y Matsumoto H. (1978b). Effect of alumium on some properties and template activity of purified pea DNA. *Plant and Cell Physiology*, 19: 429-436.
- Mukherjee S.K. y Asanuma S. (1998). Possible role of cellular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminum tolerance in *Pradyrhizobium japonicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1511-1516.
- Neuenschwander B. y Baumann T.W. (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10: 608-612.
-

- Nichol B.E., Oliveira L.A., Class A.D.M. y Siddiqi M.Y. (1993). The Effects of Aluminum on the Influx of Calcium, Potassium, Ammonium, Nitrate, and Phosphate in an Aluminum-Sensitive Cultivar of Barley (*Hordeum vulgare*), *Plant Physiology*, 101: 1263-1266.
- Norstog K. (1965). Induction of apogamy in megagametophytes of *Zamia integrifolia*. *American Journal of Botany*, 52: 993-999.
- Ohki K. (1986). Photosynthesis, chlorophyll and transpiration responses in aluminium stressed wheat and sorghum. *Crop Science*, 26: 572-575.
- Olivetti G.P., Cumming J.R. y Etherton B. (1995). Membrane potential depolarization of root cap cells precedes aluminum tolerance in snapbean. *Plant Physiology*, 109: 123-129.
- Osaki M., Watanabe T. y Tadano T. (1997). Beneficial Effect of Aluminum on Growth of Plants Adapted to Low pH Soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 551-563.
- Osawa H. y Matsumoto H. (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant Physiology*, 126: 411-420.
- Oteiza P.I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308: 374-379.
- Otter T. y Polle A. (1994). The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell-wall associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Cell Physiology*, 35: 1231-1238.
- Ownby J.D. y Hruschka W.R. (1991). Quantitative changes in cytoplasmatic and microsomal proteins associated with aluminium toxicity in two cultivars of winter wheat. *Plant, Cell and Environment*, 14: 303-309.
- Passardi F., Longet D., Penel C. y Dunand C. (2004a). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65: 1879-1893.

-
- Passardi F, Penel C, Dunand C. 2004b. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9: 534-540.
- Passardi F., Cosio C., Penel C. y Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24:255-265.
- Pavan M.A. y Bingham F.T. (1982). Toxicity of aluminium to coffee seedlings grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 46: 993-997.
- Pavan M.A. (1983). Aluminio em solos ácidos do Parana: Relação entre o alumínio não-trocável e solúvel, como pH, CTC, porcentagem de saturação de Al e matéria orgânica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 7: 39-46.
- Pellet D.M., Papernik L.A. y Kochian L.V. (1996). Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiology*, 112: 591-597.
- Pessarakli M. (2008). Acid Soil and Aluminum Tolerance in Turfgrasses, in: *Handbook of Turfgrass Management and Physiology*, University of Arizona Tucson, Arizona, U.S.A., p. 375-388.
- Pickering J.W., Powell B.L., Wender S.H. y Smith E.C. (1973). Ferulic acid: a substrate for two isoperoxidases from *Nicotiana tabacum* tissue cultures. *Phytochemistry*, 12: 2639-2643.
- Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M. y Schiavon M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-274.
- Pintro J., Barloy J. y Fallavier P. (1995). Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution. I. discrimination of two corn cultivars. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 7:121-128.
- Piña-Chable M.L. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 65: 45-56.

- Poschenrieder C., Massot N., Guevara P. y Barceló J. (1992). Aluminium : II. Toxicity in humans, animals and plants. *Circular Farmaceutica*, 313: 27-42.
- Ramírez-Paz A.A. (2000). Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares, Tesis de licenciatura, Zamorano, Honduras.
- Ramos R.A., Wondyifraw T., Martínez F., Gonzalez M.E., Endale G., Alemayehu T y Zerihun A. (2009). Plant regeneration through somatic embryogenesis in three ethiopian *Coffea arabica* Lin. Hybrids. *Biotechnologia vegetal*, 9: 19-26.
- Randolph L.F. y Cox L.G. (1943). Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proceedings of the American for Society for Horticultural Science*, 43: 284-300.
- redcafe.org/variedades%20caf%E9.htm, [acceso Octubre de 2010].
- Rengel Z. (1992). Role of Calcium in Aluminium Toxicity. *New Phytologist*, 121: 499-513.
- Renner O. (1914). Befruchtung und Embryobildung bei *Oenothera lamarckiana* und einigen verwandten Arten. *Flora*, 107: 115-150.
- Resh H.M. (1997). *Cultivos hidropónicos; nuevas técnicas de producción*. 4.ed. Madrid: Mundi-Prensa, p. 378
- Roca W.M. y Mroginski L.A. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), p. 143-151; 295-299.
- Roy A.K., Sharma A. y Talukderv G. (1988). Some aspects of aluminum toxicity in plants. *Botanical Review*, 54: 145-178.
- Ryan P.R., Shaff J.E. y Kochian L.V. (1992). Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum tolerant wheat cultivars. *Plant Physiology*, 99: 1193-1200.
- Sasaki T., Yamamoto Y., Ezaki B., Katsuhara M., Ahn S.J., Ryan P.R., Delhaize E. y Matsumoto H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate

- transporter. *Plant Journal*, 37: 645-653.
- Siegel B.Z. (1993). Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, 12: 303-312.
- Siegel N. y Haug A.R. (1983). Aluminium interaccion with Calmodulin: Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochemistry et Biophysica Acta*, 744: 36-45.
- Somers D.J., Briggs K.G. y Gustafson P.J. (1996). Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. *Physiologia Plantarum*, 97: 694-700.
- Soto F. y Ramírez M. (2001). Hidroponía. Editorial INA. San José, Costa Rica. p. 11-14.
- spectrumanalytic.com/support/library/ff/Soil_Aluminum_and_test_interpretation.htm, [acceso Septiembre de 2010].
- Stass A. y Horst W.J. (1995). Effect of aluminium on membrane properties of soybean (*Glycine max*) cells in suspension culture, R. A.; Grundon, N. J.; Rayment, G. E.; Probert, M. E. (ed.): *Plant Soil Interactions at Low pH*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht – Boston– London, p. 279-284.
- Sticher L., Penel C. y Greppin H. (1981). Calcium requirement for the secretion of peroxidases by plant cell suspensions. *Journal of Cell Science*, 48: 345-353.
- Stumm W. y Morgan J.J. (1970). *Aquatic Chemistry*; Wiley Interscience, New York.
- Takabe K., Takeuchi T., Sato M., Ito M. y Fujita M. (2001). Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *Journal of Plant Research*, 114: 1021-1029.
- Tamás L., Huttová J., Hajasová L. y Mistrik I. (2002). The effect of aluminium on polypeptide pattern of cell wall proteins isolated from the roots of Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23: 161-168.

Taylor G.J. (1988). The physiology of aluminum phytotoxicity. *In* Sigel, A Sigel, Metal Ions in Biological Systems, Marcel Dekker, New York, 24: 123-163.

Taylor G.J. (1988). The physiology of aluminum tolerance. . *In*: Metal Ions in Biological Systems. Aluminium and its Role in Biology; H.Siegel & A.Siegel (eds). Marcel Deckker, Inc. New York, 24: 165-198.

Taylor G.J. (1991). Current views of aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, 10: 57-93.

Taylor G.J. y Macfie S.M. (1994). Modeling the potential for boron amelioration of aluminum toxicity using the Weibull function. *Canadian Journal of Botany*, 72: 1187-1196.

terragis.bees.unsw.edu.au/terraGIS_soil, [acceso Septiembre de 2010].

Trim R.R. (1959). Metal ions as precipitants for nucleic acids and their use in the isolation of polynucleotides from leaves. *Biochem Journal*, 72: 289-304.

Uresti-Pesina R., Garcia-Delgado M.A., Resendiz-Ramirez Z., Bustos-Vazquez G., Basanta-Cornide R., Padron-Torres E., Mata-Vazquez H. y Cervantes-Martínez J.E. (2007). Cultivo de Tomate Cherry en Sistema Hidropónico, UAT-UAM Mante, Cd. Mante, Tamaulipas.

USDA (United States Department of Agriculture) Coffee:World Markets and Trade, Foreign Agricultural Service, Circular Series FCOFF 2-09, Diciembre 2009.

w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/café/Descripcion.pdf, [acceso Octubre de 2010].

Wagatsuma T. (1983). Effect of non-metabolic conditions on the uptake of Al by plant roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 29: 323-330.

Wagatsuma T. (1984). Characteristics of upward translocation of aluminum in plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 30: 345-358.

Wagatsuma T. y Kaneko K. (1987). High toxicity of hidroxí-aluminium polymer ions to plant roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, 33: 57-67.

-
- Watanabe T., Osaki M. y Tadano T. (1997) Aluminum-induced growth stimulation in relation to calcium, magnesium, and silicate nutrition in *Melastoma malabathricum* L. *Soil Science and Plant Nutrition* 43: 827-837.
- Watanabe T., Osaki M., Yoshihara T. y Tadano T. (1998) Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, 201: 165-173.
- Watanabe T., Jansen S. y Osaki M. (2004). The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, 165: 773-780.
- Welinder K.G. (1992). Plant peroxidases: structure-function relationships. In: Penel C, Gaspar T, Greppin H, eds. *Plant peroxidases*. Switzerland: University of Geneva, p. 1-24.
- Wilches M.A.V. (1995). Uso de los marcadores moleculares RAPDs para evaluar la diversidad genética de los recursos genéticos de café *Coffea arabica* L. Tesis de Mestría. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE, p.56
- Xia J.X., Yamaji N., Kasai T. y Ma J.F. (2010). Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.*, 107: 18381-19385.
- Yamamoto Y., Hachiya A. y Matsumoto H. (1997). Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspensión-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology*, 38: 1333-1339.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S. y Matsumoto H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant Soil*, 255: 239-243.
- Yermiyahu U., Brauer D.K. y Kinraide T.B. (1997). Sorption of aluminum to plasma membrane vesicles isolated from roots of Scout 66 and Atlas 66 cultivars of wheat. *Plant Physiology*, 115: 1119-1126.
- Zhang W.H. y Rengel Z. (1999). Aluminum induces an increase in cytoplasmic calcium in

intact wheat root apical cells. Australian Journal of Plant Physiology, 26: 401-409.

Zhao G., Sucoff E. y Stadelman E.J. (1987). Al and Ca²⁺ alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* root cortex cells. Plant Physiology, 83: 159-162.

Zúñiga-Estrada L., Martínez-Hernandez J.J., Baca-Castillo G.A., Martínez-Garza A., Tirado-Torres J. L. y Kohashi-Shibata J. (2004). Producción de chile pimiento en dos sistemas de riego bajo condiciones hidropónicas. Agrociencia: 38: 207-218.

CAPÍTULO II

EFFECTO DEL ALUMINIO SOBRE EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE CAFETO (*Coffea arabica* var. *Typica*) CULTIVADAS EN CONDICIONES DE HIDROPONÍA

2.1. INTRODUCCIÓN

La toxicidad por aluminio tiene impactos significativos en el crecimiento de las plantas. Aproximadamente el 30% de las tierras del mundo son potencialmente suelos ácidos y en este conjunto con la presencia del aluminio, las plantas pueden verse afectadas en la producción (Von y Mutert, 1995). Cuando los rangos de pH están por debajo de 5, el Al es solubilizado en el suelo y esta especie de Al es la más dañina para las plantas (Kinraide y Parker, 1989; 1990; Kinraide, 1991), el primer síntoma de la toxicidad por Al es la inhibición del crecimiento de la raíz, resultando en una reducción y daño en el sistema radical, limitando la toma de agua y nutrientes minerales (Barceló y Poschenrieder, 2002; Kochian *et al.*, 1995). Se ha demostrado que el Al puede provocar deficiencia en Ca, Mg, Mo, Si y P, estos efectos son complicados de explicar puesto que el Al interactúa con otros iones en diferentes genotipos de plantas y bajo diferentes condiciones de estrés (Fageria *et al.*, 1988; Foy, 1992), en estudios hechos por Illes *et al.* (2006), éstos encontraron que la elongación de la raíz de plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro* era inhibida con 300 μM de AlCl_3 . Se ha reportado que el Al puede interactuar directa o indirectamente con factores que influyen la desorganización del citoesqueleto, tales como niveles de Ca (Jones *et al.*, 1998) Mg y calmodulina (Grabski *et al.*, 1998), también puede cambiar el potencial eléctrico de la membrana plasmática (Takabatake y Shimmen, 1997), puede modificar la formación de callosa (Horst *et al.*, 1997), así como la composición de lípidos de la membrana plasmática (Zhang *et al.*, 1997). Por otro lado una respuesta común de los brotes de plantas expuestas a Al incluyen: cambios celulares y ultra estructurales en hojas, reducción en la apertura estomática, disminución en la actividad fotosintética, clorosis y necrosis de igual manera en hojas, una disminución total en el tamaño y número de hojas, así como también una disminución en la biomasa de la parte aérea (Thomton *et al.*, 1986).

Se sabe que en determinados taxones el Al puede ejercer un efecto benéfico, principalmente en especies adaptadas a suelos ácidos, como *Melastoma malabathricum*, *Miscanthus sinensis* y *Camellia sinensis* (Pilon-Smits *et al.*, 2009). Se ha observado que el Al puede prevenir el efecto tóxico del H, Fe y P cuando este último elemento se encuentra en exceso. De igual manera, se ha reportado que el Al puede mejorar la toma de nutrientes, inducir un sistema antioxidante, así como mejorar el crecimiento de las raíces y los brotes de determinadas especies; asimismo se le ha atribuido un papel insecticida (Ghanati *et al.*, 1995).

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado internacional y con mayor área cultivada en el mundo, esta planta por sus requerimientos agronómicos, se cultiva en suelos con una concentración elevada de materia orgánica, y que por lo tanto, poseen una acidez importante. Por tal motivo, en el presente trabajo se evaluó el efecto del aluminio sobre el desarrollo de plántulas de café en condiciones de hidroponía. Se evaluaron plántulas expuestas a diferentes concentraciones de Al, tomando en cuenta parámetros como el número de hojas, la longitud de la raíz y la altura de la planta. Se observaron cambios en el pH en la solución nutritiva en un curso temporal en plántulas tratadas y testigos, también se cuantificó el contenido de este metal en diferentes órganos (raíces, tallos y hojas), de igual manera se histolocalizó la presencia de Al en raíces tratadas con este metal por tinción con hematoxilina y se observó si existió daño en membrana tanto en hojas y raíces por fuga de electrolitos, se evaluó la actividad de peroxidasa, una enzima antioxidante.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se utilizaron plántulas de café que se obtuvieron de semillas de *C. arabica* var. *Typica* provenientes del campo experimental de Rosario Izapa, las cuales fueron donadas por el Dr. Alfredo Sandoval Esquivel y el Dr. Ismael Méndez López, investigadores del INIFAP de Tuxtla Chico, Chiapas.

2.2.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

La desinfección de semillas se realizó de la siguiente manera: se eliminó el pergamino o endocarpio y la piel plateada de la semilla, posteriormente las semillas se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 2 h, posteriormente se decantó esta solución, se enjuagaron con agua estéril (destilada y desionizada); se le adicionó etanol al 70% y se agitaron las semillas durante 5 min, se lavaron de nuevo con agua estéril (dos veces); se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 30% durante 10 min y de nueva cuenta se enjuagaron con agua estéril (destilada y desionizada) hasta eliminar el hipoclorito de la solución. Por último, se dejaron embebiendo en agua estéril entre 48 a 72 h, hasta la extracción de los embriones.

2.2.3. EXTRACCIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS

Para la extracción de los embriones cigóticos para la germinación, luego de 72 h de la imbibición, se extrajeron los embriones de y se colocaron en cajas petri con medio B₅ (Gamborg *et al.*, 1968) a la mitad de su fuerza iónica (B₅½) a pH 5.8.

Una vez sembrados los embriones en las cajas petri, se mantuvieron en oscuridad por 8 días a 25 °C en posición vertical para facilitar el crecimiento, posteriormente en un cuarto de cultivo se incubaron en fotoperíodo a 25 °C, con iluminación 16/8 h día/noche (Bojórquez-Quintal, 2009; Loyola-Vargas Vazquez-Flota, 2006).

2.2.4. PRUEBA PILOTO DE ADAPTACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE CAFETO TRANSFERIDAS DE *in vitro* A MEDIO HIDROPÓNICO

Se realizó una prueba piloto, en donde se transfirieron seis plántulas de *C. arabica* var. *Typica* (obtenidas de embriones cigóticos y cultivadas *in vitro*) a recipientes con agrolita (sustrato inerte), fueron regadas con solución nutritiva de Hoagland. En un experimento se dejaron transcurrir de 15 a 21 días para la aclimatación de las primeras plántulas. Durante este periodo de tiempo los riegos fueron a los días 7, 14 y 21, utilizando 250 mL de

solución Hoagland a un pH de 6.8, manteniendo las plántulas en un cuarto de cultivo con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad.

Durante la aclimatación de las plántulas, los recipientes que las contenían fueron recubiertos con bolsas de nylon y sellados con ligas de hule. Cada 7 días aproximadamente, a la bolsa se le hicieron pequeñas aberturas hasta dejar las plántulas a condiciones de ambiente en el cuarto de cultivo.

Después de la aclimatación, las plantas fueron evaluadas por un periodo de 30 días; las variables medidas fueron: la longitud del tallo y de raíz, así como el ancho de hoja. Las mediciones se realizaron a los 0 y 30 días después de ser transferidas (DDT) y se usaron tres plántulas.

2.2.5. EVALUACIÓN DEL CULTIVO EN EL PERÍODO DE ACLIMATACIÓN

Con los resultados positivos en la adaptación de las plántulas de café en la adaptación al medio hidropónico en la prueba piloto, se prosiguió a establecer un total de 25 plántulas en condiciones de hidroponía.

Se utilizaron 25 plantas las cuales tuvieron una edad aproximada de 2 años cultivadas *in vitro* en un medio MS semi-sólido (Murashige y Skoog, 1962). Las plantas se transfirieron a la agrolita, la cual fue esterilizada para evitar problemas de contaminación por hongos, bacterias, etc.

Las plantas se dejaron aproximadamente 21 días para su aclimatación en condiciones de fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 25 °C, esta actividad se realizó de igual manera que en el experimento de la prueba piloto.

Durante el tiempo de aclimatación (15-21 días) los riegos se realizaron con solución Hoagland modificada a un pH 6.8, se aplicaron tres riegos (7, 14 y 21 días respectivamente), cada recipiente con la planta fue regada con 250 mL aprox. de solución Hoagland.

Los recipientes contaron con un sistema de filtración con el fin de cambiar la solución y

facilitar las recolecciones de la solución y mediciones de pH, de esta manera tuvo la certeza que la solución está en el rango de pH deseado para la planta, dicho pH se midió con un potenciómetro de la marca Hatch.

2.2.6. ESTABLECIMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ALUMINIO

Para evaluar el efecto del Al sobre el crecimiento de las plántulas, al término del periodo de aclimatación (21 días después de ser transferidas al sistema hidropónico), las plántulas fueron etiquetadas de acuerdo al tratamiento al que estarían sometidas. Los tratamientos en presencia de aluminio fueron: 100, 300 y 500 μM de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a pH de 4.3, también se establecieron dos testigos: 0 μM de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a pH 4.3 y 6.8 respectivamente, cada tratamiento contó con un total de 5 réplicas.

Una vez establecidas las condiciones para los tratamientos, se tomó como tiempo cero al comienzo del experimento hasta el día 60 donde finalizó el periodo del experimento. Cada tratamiento fue aplicado en forma de solución nutritiva Hoagland más la concentración micromolar de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Las concentraciones de este compuesto fueron 100, 300 y 500 μM , a un pH de 4.3. Durante todo el experimento (60 días). Para los tratamientos testigo se utilizaron dos condiciones, uno a pH 4.3 y otro 6.8; las plántulas se regaron cada dos días con 100 mL de solución, estos riegos fueron a partir del día 0 hasta el 60. Periodo en el cual las plantulas estuvieron en un cuarto de fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad a 25°C de igual manera que en el periodo de aclimatación.

Durante el tiempo del experimento las variables que se evaluaron fueron: la longitud de la raíz, la altura de la planta y el número de hojas; al término del experimento las plantas fueron pesadas completas y después fueron seccionadas en raíces, tallos y hojas.

2.2.7. MEDICIÓN DEL pH DE LA SOLUCIÓN EN PRESENCIA DE Al EN DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO

Se realizó la medición del pH de la solución en presencia y ausencia del Al durante todo el experimento, al igual que el riego, cada dos días se tomaron 20 mL de solución drenada para evaluar los cambios de pH en los diferentes días de cultivo, esto se hizo para todo el cultivo sometido a diferentes tratamientos con aluminio a bajos rangos de pH (4.3), ya que dicho experimento siempre se cuidó que la solución nutritiva se encuentre a este pH, las muestras fueron colectadas cada dos días y se midieron con un potenciómetro marca Hach.

2.2.8. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALUMINIO EN LAS RAÍCES DE CAFETO POR MICROSCOPIA Y TINCIÓN CON HEMATOXILINA

Con el fin de localizar la presencia de aluminio en las raíces, en el día 60 del cultivo, las plántulas se cosecharon, se enjuagaron las raíces en agua destilada y se prosiguió a tomar una sección de la raíz secundaria para hacer la tinción con hematoxilina misma que se realizó de acuerdo a lo reportado por Polle *et al.*, (1978) y Cancado *et al.*, (1999).

Para la tinción con hematoxilina las raíces de las plántulas fueron transferidas a tubos de ensayo de 10 mL, posteriormente se adicionó agua destilada y se agitaron a 56 g durante 20 minutos, al finalizar el tiempo, se decantó el agua destilada de los tubos de ensayo y se prosiguió a adicionar la solución de hematoxilina (0.2% de hematoxilina en 0.02% de yoduro de potasio) a los tubos de ensayo, luego éstos se recubrieron con papel aluminio para evitar que la hematoxilina se oxide, como siguiente paso los tubos se mantuvieron en agitación por 12 h, al finalizar este paso se decantó el colorante y se realizaron varios lavados con agua destilada; esto se efectuó para eliminar el exceso de colorante, por último estos segmentos de raíces se observaron en el estereoscopio marca Leica, con el fin de localizar y evaluar la presencia del complejo aluminio-hematoxilina en la raíz.

2.2.9. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL Al, K, Ca, P EN ÓRGANOS VEGETALES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-AES por sus siglas en inglés)

Para la identificación y cuantificación de la distribución del Al, K, Ca y P en los órganos, las plantas fueron cosechadas al final de los tratamientos, lavadas con agua desionizada y posteriormente se seccionaron en raíces, tallos y hojas, cada sección se guardó en una bolsa de papel y se etiquetó, todas las muestras recolectadas se secaron en una estufa eléctrica a 60 °C durante 72 h, hasta peso constante, luego cada muestra se pesó de nuevo para obtener el peso seco y fueron almacenadas para el análisis posterior.

Para el análisis mineral se utilizó una digestión ácida en un horno de microondas marca CEM MARS-Xpress con placa giratoria, extracción de gases, con control computarizado de temperatura, presión y potencia, en donde a cada tubo o recipiente se le adicionó el peso conocido de la muestra (100 mg) y se agregó HNO₃:H₂O₂ en una proporción 5:1, el microondas fue programado para la digestión y en dicho programa se utilizó una corrida de 1 200 W, en una rampa de 15 min a 200°C, 10 min a 200°C, 5 min a 170°C según el método para material vegetal establecido por la Dra. Laura Hernández Terrones en la UCIA-CICY Unidad Cancún, México. Después de la digestión las muestras se aforaron con agua (Milli Q) a un volumen de 25 mL y se prosiguió a cuantificar en un espectrofotómetro de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente marca IRIS Intrepid II XDL ThermoElectron Co, acoplado con un nebulizador ultrasónico CETAC U5000AT.

2.2.10. DETERMINACIÓN DE LA FUGA DE ELECTROLITOS EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS (RAÍZ, TALLO Y HOJA)

La determinación de la fuga de electrolitos se determinó de acuerdo a lo reportado por Lin *et al.*, (1985) con modificaciones, la fuga de electrolitos se realizó en discos de hojas, tallos y raíces testigo, en presencia y ausencia de AlCl₃ y las lecturas se tomaron en un conductímetro marca (Jenway 4010, Jenway Ltd., Dunmow, Essex, UK), se pesaron 200

mg de raíz, tallos y hojas. Estas muestras se colocaron en viales de plástico y se les añadió 20 mL de agua desionizada estéril, estas muestras se incubaron a 28°C por 2 h en agitación constante, se prosiguió a hacer la primera medición de conductividad a la cual se le llamó lectura L1, después de lo cual se prosiguió a esterilizar los viales en un tiempo de 20 minutos a 121°C, se esperó a que las muestras estuvieran a temperatura ambiente (25°C) y se prosiguió a medir la conductividad y se le llamó lectura 2 L2, la fuga de electrolitos se sacó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FE} = (L1/L2) \times 100$$

Donde: FE = Fuga de electrolitos

2.2.11. COSECHA DE TEJIDOS

Las plántulas se retiraron de los tratamientos con aluminio, se enjuagaron tres veces con agua estéril destilada y se secaron con un papel absorbente para eliminar residuos de agua. Se tomó toda la raíz y las hojas, se pesaron entre 0.2 a 0.5 gr del tejido y se prosiguió a congelarlo en nitrógeno líquido y almacenarlo a -80 °C, para la posterior extracción de la proteínas.

2.2.12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La extracción de las proteínas totales se realizó de acuerdo al método reportado por Martínez-Juárez (2004) con algunas modificaciones. Secciones de las raíces y hojas se molieron en un mortero previamente congelado con nitrógeno líquido hasta tener un polvo fino, al cual se le adicionó una pequeña cantidad (1%) de PVPP. El polvo se recuperó en un tubo eppendorf previamente congelado y se le adicionó un amortiguador de extracción (2.5 mL g⁻¹ de tejido fresco) que contenía: 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 1 M NaCl, glicerol 5%, 4 mM EDTA, 0.1 mM de PMSF, 1mM de DTT y 0.2% de PVPP. Se homogenizó el tejido con un politrón durante 30 min a 4°C. Posteriormente el extracto se centrifugó a 8 972 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante (fracción soluble) se fraccionó en alícuotas de 200 µL los cuales se almacenaron -80°C hasta su utilización para los análisis posteriores. La

concentración de proteína se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) utilizando como proteína una curva patrón de albúmina de suero bobino (BSA).

2.2.13. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS EN RAÍCES Y HOJAS

La actividad de las peroxidasas se determinó de acuerdo a lo reportado por Sánchez-Zamorano (2009). A partir de una alícuota de extracto proteico de 200 μL , fueron tomados 10 μL de extracto para las reacciones enzimáticas, a tubos de ensayo se les adicionó un amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 6.0), fueron utilizados como sustratos 18 mM de guaiacol y 4.9 mM de H_2O_2 , obteniendo un volumen final de 2 mL, se midieron los cambios de absorbancia debido al producto de oxidación del guaiacol y estos cambios fueron seguidos A_{470} ($\epsilon = 26.6 \text{ mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$) durante un tiempo de reacción de 6 min y las lecturas se realizaron cada 20 s. A una temperatura constante de 25°C. La actividad específica de la enzima fueron expresadas como U/mg^{-1} de proteína.

2.2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

2.3. RESULTADOS

2.3.1. PRUEBA PILOTO DE ADAPTACIÓN DE LAS PLÁNTULAS DE CAFETO TRANSFERIDAS DE *in vitro* A MEDIO HIDROPÓNICO

Las plántulas de *C. arabica* var. *Typica* después de ser transferirlas a recipientes con agrolita, se aclimataron con éxito y se lograron adaptar a este tipo de cultivo hidropónico. Los resultados de crecimiento de las plántulas se vio reflejada en un incremento en la longitud del tallo, las raíces y las hojas (Cuadro 2.1). Con estos resultados se comprobó que el café se adaptó a un cultivo en agrolita.

Cuadro 2.1. Medición de longitud del tallo, raíz y hoja entre el día 0 y 30 DDT

Planta	Longitud del tallo		Raíz		Hoja	
	0 DDT	30 DDT	0 DDT	30 DDT	0 DDT	30 DDT
1	4.9	5.5	3.2	4.1	0.5	0.6
2	4.8		3.6		0.6	
3	5.7	6.1	3.7	4.5	0.9	1.2
4	5.1		3.5		1	
5	5.5	5.9	3.6	4.0	0.5	0.7
6	5.3		3.2		0.6	

2.3.2. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLÁNTULAS

EL café es un cultivo que por su naturaleza agronómica se cultiva en suelos con pH bastante bajo, condición del suelo donde podría darse un efecto tóxico del Al; por lo que se realizó el análisis del efecto del Al sobre el crecimiento de plántulas de cafeto obtenidas a partir de embriones cigóticos y mantenidas en condiciones de hidroponía. Como primer resultado obtenido se tiene que el Al a diferentes concentraciones parece modificar la longitud de la raíz principal, el número de raíces secundarias y terciarias, así como en general el número de hojas y la biomasa de las plantas, dependiendo de la concentración de Al aplicada (Figura 2.1 y 2.2), se puede observar que conforme la concentración de aluminio aumenta de 0 a 500 μM , el sistema radicular de las plantas muestra más daño y presentó menor contenido en raíces laterales así como también, un menor tamaño de la planta, modificaciones en el número y la apariencia de las hojas.

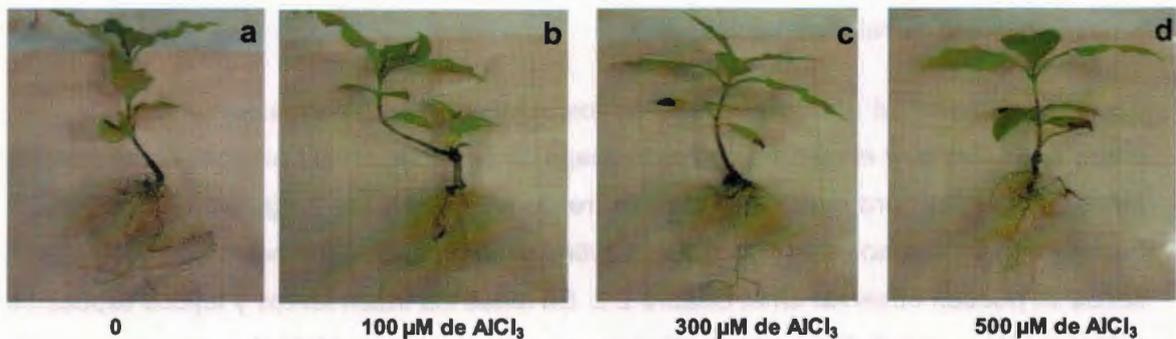


Figura 2.1. Efecto de diferentes concentraciones de Al en el crecimiento de las plántulas de *C. arabica* var. Typica. a) Testigo del experimento a un pH de 4.3, b) plántulas con un tratamiento de 100 μM de aluminio, c) tratamiento con 300 μM de aluminio y finalmente d) 500 μM de aluminio.

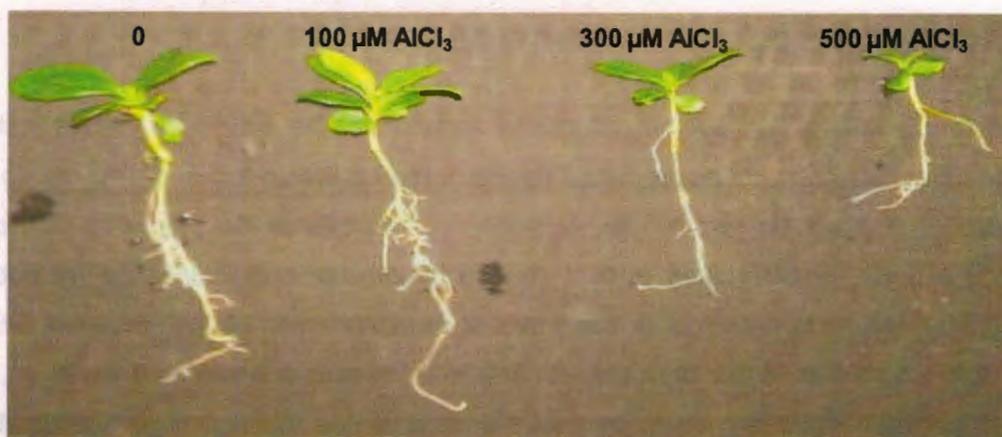


Figura 2.2. Efecto del Al en plántulas de *C. arabica* var. *Typica* al día 60. Plántulas tratadas con 0 y 100 μM de AlCl_3 no se ven afectadas y tienen un tamaño similar, a concentraciones de 300 y 500 μM de AlCl_3 presentaron una menor longitud de raíz principal, menor tamaño y menor número de raíces laterales.

En el experimento al día 60 se midieron los siguientes parámetros: longitud de la raíz, altura de la planta, y el número de hojas, luego se seccionaron los órganos en raíces, los tallos y las hojas para cuantificar el peso fresco, su peso seco luego de 72 h en estufa hasta obtener un peso constante, y los resultados obtenidos de los pesos frescos y pesos secos se pueden observar en el Cuadro 2.2. En todos los tratamientos y tejidos expuestos a Al y sin él no existió diferencia significativa en una prueba de ANOVA realizado, también en las Figuras 2.3, 2.4 y 2.5, se observa que gráficamente no existen diferencias en todos los órganos evaluados.

Cuadro 2.2. Peso fresco (PF) y peso seco (PS) presente en diferentes tejidos de *C. arabica* var. *Typica*

Tratamiento	Raíz		Tallo		Hoja	
	PF (gr)	PS	PF (gr)	PS	PF(gr)	PS
0	2.58a	0.42a	0.44a	0.16a	1.10a	0.34a
100	2.22a	0.35a	0.32a	0.13a	0.92a	0.31a
300	2.09a	0.32a	0.30a	0.12a	0.91a	0.31a
500	2.06a	0.31a	0.28a	0.11a	0.90a	0.30a
C.V.	50.02	48.24	32.76	41.54	40.19	40.75

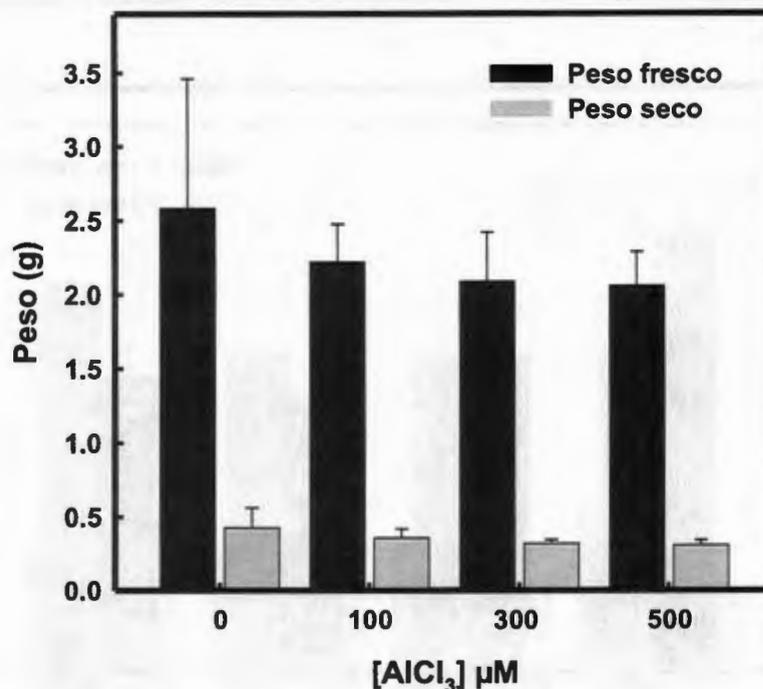


Figura 2.3. Efecto del Al sobre los pesos frescos y secos de raíces de café en presencia de diferentes concentraciones de 0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 . se obtuvo que no hubo diferencia significativa entre tratamientos tanto en peso fresco como en peso fresco en el día 0 y el día 60 de cultivo, Las barras representan las medias de peso fresco y peso seco a diferentes concentraciones de aluminio ($n= 5$ plántulas). Tukey ($P < 0.05$).

En la Figura 2.3 se puede observar que en el peso fresco no hubo diferencia entre el testigo (0 μM) y los tratamientos con AlCl_3 (100 μM , 300 μM y 500 μM), mostrando una disminución en el contenido de biomasa tanto en peso fresco como en peso fresco en las plantas tratadas con Al. Se sugiere que el Al no modifica los pesos frescos y los pesos secos de las raíces de las plántulas estudiadas, lo que no implica que los tratamientos con este metal no estén produciendo un efecto en el desarrollo de éstas.

manera similar a la que se observo en el peso fresco, sin llegar a ser significativa estadisticamente pero posiblemente sí de manera biologica.

De la misma manera, se contó el número de hojas en el día 0 y el día 60, todas las plantas fueron analizadas para conocer si el aluminio es dañino para la parte aérea de las plántulas de cafeto o si dicho metal podria estar modificando la toma de nutrientes asi como su traslocacion hacia la parte aérea. En el análisis realizado se observó que al comenzar el experimento todas las plantas tuvieron un promedio de 17 a 20 hojas, al realizar el análisis al día 60 de tratamiento las plantas que estuvieron expuestas al aluminio tuvieron mayor pérdida de follaje comparadas con las testigo, pero donde se encontró diferencia siginificativa fue en las tratadas con 500 μM de AlCl_3 comparadas con las testigo. Se observó que el grado de defoliacion fue dependiente de la concentracion de AlCl_3 (Figura 2.6).

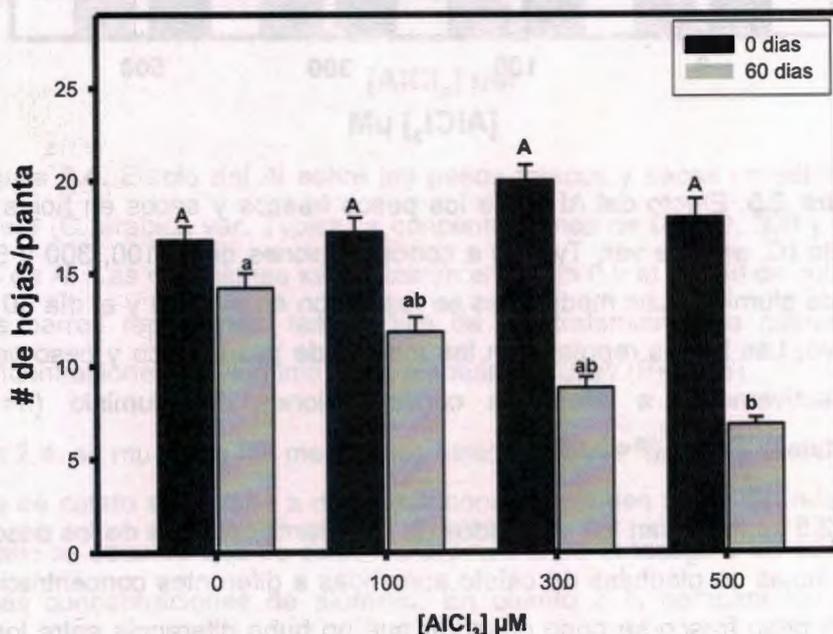


Figura 2.6. Cuantificación de las hojas en el día 0 y el día 60 de tratamiento con AlCl_3 . Las letras mayusculas iguales significan que son comparaciones en el día 0 y las letras minusculas representan comparaciones al día 60, letras diferentes significan que existio diferencia significativa, cada barra representa una media entre tratamientos (n= 5 plántulas). Tukey (P< 0.05).

Otro parámetro evaluado durante todo el experimento (60 días) fue la altura de las plantas y éstas se midieron tanto al día 0 como al día 60, esta se realizó con el fin de observar si el Al podía interferir de igual manera con la toma de agua, así como con la toma de nutrientes que están involucrados en los procesos fisiológicos y metabólicos de la planta.

En el análisis realizado se observó que las plantas en presencia del metal (100, 300 y 500 μM de AlCl_3) tuvieron un menor crecimiento y se encontró una diferencia significativa respecto a las plantas testigo, mientras que en los tratamientos no existió diferencia en presencia de Al ya que el comportamiento fue el mismo en todas las plantas expuestas a el Al (Figura 2.7).

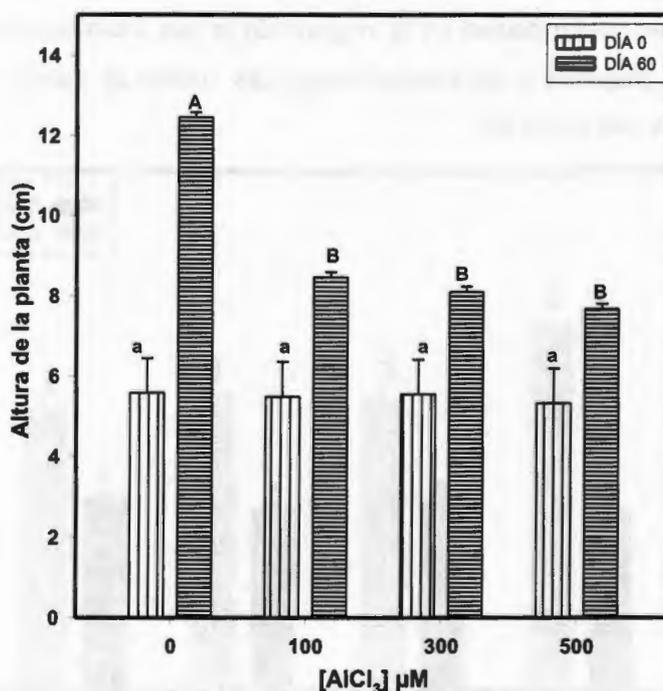


Figura 2.7. Efecto del Al sobre altura de la plántulas de café en los diferentes tratamientos (0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3). Las letras iguales significan que no hubo diferencia significativa y letras diferentes que existió diferencia, cada barra representa una media entre 5 repeticiones por tratamiento ($n=5$ plántulas). Tukey ($P < 0.05$).

En el trabajo también se evaluó la longitud de la raíz principal durante el día 0 y el día 60 en presencia y ausencia del aluminio (Figura 2.8), esto se realizó con el fin de conocer si

el aluminio podía inhibir la longitud de la raíz ya que existen reportes en otras especies en los cuales mencionan que el aluminio inhibe el crecimiento y la elongación de la raíz causando diversos daños principalmente en la zona meristemática y la zona de la diferenciación de las raíces expuestas a este metal (Jan, 1991; Ryan *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 2002)

En nuestros resultados se pudo apreciar que el Al si inhibe el crecimiento de la raíz principal pero que esta inhibición fue la misma en todos los tratamientos en presencia del AlCl_3 , de acuerdo al análisis estadístico realizado corroboró que las plántulas expuestas a concentraciones de 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 no tuvieron diferencia entre éstos los cuales tuvieron una menor elongación en la longitud de la raíz y también fueron diferentes significativamente con respecto a las plantas testigo, las cuales es donde se pudo obtuvo mayor elongación de la raíz al día 60.

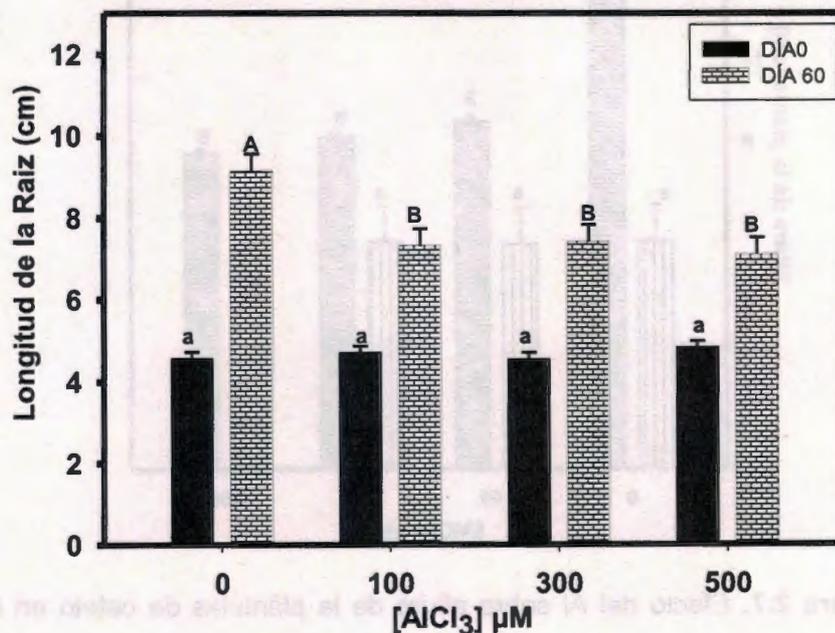


Figura 2.8. Mediciones en relación a la longitud de la raíz en plantas de *C. arabica* var. *Typica*, en el día 0 y el día 60 de tratamiento. Las plántulas fueron expuestas a 0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 , cada barra representa una media entre 5 repeticiones por tratamiento ($n= 5$ plántulas). Tukey ($P < 0.05$) letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

2.3.3. DISCUSIÓN

En estudios realizados por Illes *et al.*, (2006) en *Arabidopsis thaliana* se observó que las plántulas que estuvieron en presencia del metal (200 y 300 μM AlCl_3) tuvieron un menor crecimiento así como una inhibición en la raíz principal lo que coincide con nuestros resultados obtenidos en las figuras 2.1 y 2.2, donde se vio que cuando se aumentó la concentración de aluminio a 300 y 500 μM , las plantas tuvieron un menor crecimiento, y menor número de raíces laterales, también este efecto tóxico del Al sobre el crecimiento radical en café ya había sido demostrado por Pavan y Bingham (1982) y Makau, (2011) quien reporta que en líneas tolerantes de maíz (*Zea mays*) y chícharo (*Pisum sativum*) a partir de concentraciones de 100 μM de Al las plantas mostraron una mayor afectación en la longitud de la raíz y la parte aérea, pero reportan además que en estos cultivos no se afecta la producción de la biomasa determinada tanto en peso fresco como en el peso seco. Además mencionan que cuando las plantas estuvieron en presencia de Al sí observaron una disminución de la biomasa pero que ésta no fue significativa, estos reportes coinciden con nuestros resultados (Cuadro 2.2) el cual el Al no afecta tanto a los pesos frescos como secos en concentraciones de 100, 300 y 500, donde se pudo observar que tienden a disminuir pero no muestran diferencia significativa comparado con el testigo. Estudios recientes en *Capsicum chinense* Jacq., (Medina-Lara, 2011) se observó que el Al aplicado en concentraciones de 100, 250 y 500 μM no afecta el peso fresco ni el seco de la planta y que no existió diferencia significativa comparado con el testigo, lo que nuestros resultados nos estarían sugiriendo es que el café en este estadio del desarrollo de plántulas podría ser considerado como una especie tolerante al Al, en donde el café no es afectado en la producción de biomasa, se sugiere que este metal pudiera estar ingresando a la planta, y estando en el citosol podría quelarse y unirse con algunos ácidos orgánicos, por lo consiguiente se daría un proceso de detoxificación, en donde se almacenaría en vacuola o se traslocaría a órganos menos sensibles en la parte aérea.

Respecto a la cuantificación del número de hojas (Figura 2.6) nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Thornton, (1986) trabajando en plántulas de *Gleditsia triacanthos* L. en el cual observó que a 35 días de cultivo a pH 4.0 y en concentraciones de 150 y 600 μM de AlCl_3 existió una menor producción de hojas nuevas comparadas con las plantas testigo. Por otro lado se sugiere (Kollmeier *et al.*, 2000) que el Al puede verse

involucrado en las vías de señalización del ácido absísico y el flujo de auxinas en las hojas, por ello podría causar un efecto de abscisión puesto que se interrumpe el flujo de auxinas. Por lo que nuestros resultados nos muestran que también cuando las plántulas de café estuvieron en presencia del Al a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 existió una menor producción de hojas por planta comparadas con las testigo, nuestros resultados muestran que el grado de daño en la producción de hojas fue proporcional a la concentración de Al aplicada.

En cuanto a las mediciones de la altura de la plántulas de cafeto (Figura 2.7), nuestros resultados muestran que el Al está afectando el crecimiento de la planta pero que además este menor crecimiento no es dependiente de la concentración del metal aplicado, puesto que en las concentraciones de 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 no existieron diferencias significativas entre ellas pero si fue significativamente diferente con respecto al testigo, estos datos concuerdan con lo reportado por Medina-Lara, (2011) en plantas de *C. chinense* Jacq. En este trabajo se observó que a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 se mostraron diferencias en cuanto a la altura de la planta comparada con la testigo. Otros estudios como el de Foy *et al.*, (1978) y el de Kochian, (1995), reportan que existe una toxicidad provocada por el Al y eventualmente puede existir un pobre crecimiento de la planta. Esto nos sugiere que el Al podría verse involucrado puesto que interfiere en la toma de nutrientes y en específico con el P, en donde puede causar un pobre crecimiento de tallos y también presenta enanismo en la mayoría de las plantas (Liu, 2001).

En nuestros resultados (Figura 2.8) también se obtuvo que el crecimiento de la raíz fue menor en todas las concentraciones de Al, si la comparamos con las testigo, pero dentro de los tratamientos no se encontraron diferencias, estos datos concuerdan con los de Illes *et al.*, (2006) realizados en *Arabidopsis*, el reporta que cuando las plántulas estuvieron en presencia de 100, 200 y 300 μM la longitud de la raíz fue inhibida y tuvo diferencia significativa con respecto al control, otro reporte es el de Bojórquez-Quintal, (2010) hecho con plántulas de *C. arabica* var. *Typica* en condiciones de *in vitro* donde reporta que a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 fue donde observó mayor inhibición en la raíz principal, no así en concentraciones de 100 y 300 μM donde observó que las raíces estimulaban su crecimiento en presencia del metal. El efecto tóxico del Al ya se había demostrado por Pavan y Bingham (1982) en plantas de café en vivero. De igual manera

Martínez-Estévez *et al.*, (2003) reportaron que existían una inhibición en el crecimiento celular a 50 μM de Al esto realizado en suspensiones celulares de *C. arabica*. Sin embargo, se propone que la concentración tóxica del Al depende de las condiciones así como el nivel de complejidad que pueden tener el material vegetal con que se cuente y se realice el trabajo.

2.3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ALUMINIO Y NUTRIMENTOS EN RAÍCES, TALLOS Y HOJAS EN LAS PLÁNTULAS DE CAFETO

Para determinar la distribución de Al, K, Ca y P en los diferentes órganos, las plantas fueron cosechadas al final de todos los tratamientos, posteriormente se seccionaron en hoja, tallo y raíz, se pesaron en una balanza y luego se prosiguió a secarlas en una estufa eléctrica a 60°C durante 72 h, hasta peso constante, luego cada muestra fue pesada de nueva cuenta. Para el análisis de los minerales las muestras fueron digeridas en microondas y se utilizó el método para material vegetal establecido por la Dra. Laura Hernández en UCIA-CICY Unidad Cancún, México. Estas muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

Cuadro 2.3. Contenido de aluminio y nutrientes presentes en los diferentes órganos de *C. arabica* var. *Typica*.

Órgano	Tratamiento Al (μM)	Al ($\mu\text{moles g}^{-1}$ de PS)	K ($\mu\text{moles g}^{-1}$ de PS)	Ca ($\mu\text{moles g}^{-1}$ de PS)	P ($\mu\text{moles g}^{-1}$ de PS)
Raíz	0	0.00c*	685.19a	178.96a	44.52a
	100	18.47bc*	842.32a	144.52a	32.98a
	300	56.13ab*	689.69a	150.73a	43.78a
	500	70.00a*	643.51a	117.36a	46.06a
			C.V 52.43	19.49	43.49
Tallo	0	0.00b	325.16a	185.94a	38.44a
	100	1.64b	317.32a	163.59a	8.05b
	300	5.68ab	394.58a	168.39a	6.02b
	500	10.38a	375.53a	192.10a	20.28ab
			C.V 74.25	17.03	63.71
Hoja	0	0.00b	730.35a	297.3a	42.78a
	100	2.19ab	617.74a	288.6a	19.42a
	300	3.65ab	665.48a	291.1a	31.94a
	500	5.82a	643.50a	299.1a	30.40a
			C.V 92.55	12.54	73.28

*Valores con letras distintas por columna son diferentes de forma altamente significativa (Tukey. $P < 0.05$, * $P < 0.01$)

*C.V: Coeficiente de Variación

2.3.4.1. Cuantificación de Aluminio

Con relación a la cuantificación de la concentración del Al en los órganos vegetales de *C. arabica*, se observó que en la parte radicular se encontró mayor acumulación de dicho metal y también que dicha acumulación fue dependiente de la concentración a la cual estuvieron expuestas las plantas, destacándose la mayor acumulación a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 (Cuadro 2.3) encontrándose diferencia significativa en esta concentración comparada con 100 μM de AlCl_3 , es lógico encontrar que las concentraciones en raíz sean mayores pues es el órgano que está directamente en contacto con el metal y por las características de las paredes celulares el Al tiende por carga a pegarse a dichas paredes; también en el análisis se pudo observar que el Al es traslocado hacia la parte aérea donde se detectó una menor acumulación comparado con

los resultados obtenidos en el sistema radical y esta concentración también fue dependiente del tratamiento al cual fue expuesto, observando que de nueva cuenta a 500 μM de AlCl_3 fue donde hubo una mayor concentración de dicho metal (Cuadro 2.3). Por lo que el análisis estadístico arrojó que existió diferencia significativa a esta concentración (500 μM de AlCl_3) comparado con el testigo y a concentraciones de 100 μM de AlCl_3 , pero comparando 500 μM de AlCl_3 con 300 μM no existió diferencia significativa, en el análisis realizado en hojas, se encontró que dicho metal se pudo detectar en este órgano y se observó que a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 existe diferencia significativa comparado con el testigo, pero no se encontró esta diferencia a concentraciones de 100 y 300 μM de AlCl_3 , con esto se demuestra que este metal sí se está traslocando hacia la parte aérea pero en una menor concentración comparado con tallo y raíz. En estos resultados se puede concluir que el Al efectivamente se puede detectar en una mayor acumulación en raíz y también que la planta de café efectivamente está tomando el Al y es capaz de traslocarlo hacia la parte aérea.

2.3.4.2. Cuantificación de calcio

También mediante ICP-AES se cuantificó el contenido de Ca en órganos vegetales (raíz, tallo y hoja) y a concentraciones de tratamiento de 0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 (Cuadro 2.3). En estos resultados se pudo apreciar que tanto en raíces, tallos como en hojas no existió diferencia significativa en presencia de Al, pero la mayor acumulación de Ca se detectó en hojas y esta acumulación fue menor en tallos y raíces.

2.3.4.3. Cuantificación de potasio

En relación a la cuantificación del contenido de K en órganos vegetales (raíz, tallo y hoja) tanto en tratamientos en presencia como sin Al (Cuadro 2.3), se realizó el análisis de varianza y se observó que existió una mayor acumulación de este nutrimento en la parte radical y en hojas, y en una menor la concentración en tallo, el análisis indica que no hubo diferencia significativa en todos los órganos analizados (raíces, tallos y hojas) así como

también en las diferentes concentraciones de Al y el testigo.

2.3.4.4. Cuantificación de fósforo

Otro nutrimento que se cuantificó fue el P en los mismos órganos vegetales y a las mismas concentraciones de tratamiento de $AlCl_3$ (Cuadro 2.3). En los resultados obtenidos se aprecia que en la raíz, fue donde hubo una mayor acumulación de dicho nutrimento y no existió diferencia entre los tratamientos en presencia y sin Al. Con respecto al análisis en los tallos se encontró que existe una menor concentración del nutrimento en presencia del metal y que en los tratamientos con 100 y 300 μM de $AlCl_3$ se encontró una menor cantidad del nutrimento y éstos fueron los tratamientos donde se detectó diferencia significativa comparados con el testigo. No existió diferencia con los tratamientos en la concentración de 500 μM de $AlCl_3$. Con respecto a la cuantificación de P en hojas se observó que en presencia de Al (100, 300 y 500 μM) las plantas no tuvieron diferencia significativa comparado con el testigo.

2.3.5. DISCUSIÓN

Anteriormente, se ha mencionado que el Al interfiere con la nutrición mineral de plantas expuestas a este metal, ya sea disminuyendo o aumentando la toma o absorción de los nutrientes como K, Ca, P, entre otros. En relación a la cuantificación del Al en órganos (raíces, tallos y hojas) nuestros resultados demuestran que la mayor acumulación del aluminio fue en raíces y la acumulación fue dependiente de la concentración de Al aplicado.

Por otro lado, Watanabe *et al.*, (2005) reportan que en plantas de *Melastoma malabathricum* y *Hordeum vulgare* expuestas a 500 μM de Al, se encontró que la mayor acumulación de este metal fue en raíces de ambas especies y también reportan que este metal es capaz de traslocarse así a la parte aérea y se puede encontrar en hojas en concentraciones diferentes, y esto depende del tipo de hoja, como por ejemplo en hojas jóvenes se acumulo más que en hojas viejas, ellos concluyen que en raíces como ya se

sabe, el Al se acumula en la zona apical y en la zona de elongación, éste se adhiere a la pared celular interactuando con la pectina, y también mencionan que una vez que el Al ingresa a la planta éste puede ser quelado y establecer complejos con ácidos orgánicos, (citrato) y de esta manera pudiera ser traslocado hacia la parte aérea y acumularse en la vacuola de las hojas, estos resultados están correlacionados con nuestros resultados donde en plántulas de café el Al se acumula en grandes concentraciones en raíces y este metal es traslocado hacia la parte aérea en pequeñas cantidades.

Otro reporte que existe es el de Tomioka *et al.*, (2005) realizado en plántulas de *Quercus serrata* expuestas a 2.5 mM de Al, reportan que la mayor acumulación de Al fue en raíces y que estas plantas estimulaban su crecimiento y aumentaban su biomasa tanto en raíces y brotes, así como el desarrollo de raíces laterales.

De igual manera con relación a la cuantificación de K se menciona que no se obtuvieron diferencias en las plantas que estuvieron expuestas a la presencia y la ausencia del metal a un pH de 3.6, esto también ha sido reportado por Watanabe *et al.*, (2005) quienes mencionan que el K no tuvo efecto significativo tanto en presencia como en ausencia del metal a pH ácidos, esto pudiera también estar relacionado con nuestros resultados puesto que también no existió diferencia significativa en los diferentes órganos tanto en presencia como en ausencia del Al. Por otro lado Bojórquez-Quintal (2010), reporta que el K pudiera estar involucrado en prevenir la toxicidad por Al, puesto que a concentraciones de 100 y 300 μ M de Al existió mayor acumulación de K, esto en raíces de plántulas de *C. arabica* var. *Typica* cultivadas *in vitro*. Se propone que el K pudiera estar actuando para disminuir la toxicidad del Al así como pH está jugando un papel importante en cuanto a la disponibilidad y la toma del nutriente, esto puede estar correlacionado con que el Al puede estar favoreciendo la toma de este nutrimento para metabolizarlo.

Anteriormente se ha mencionado que el Al puede desplazar el Ca de la membrana plasmática, dado que la síntesis de callosa depende de la presencia de Ca, se ha sugerido que dicho desplazamiento de Ca puede aumentar en la vía apoplástica y formar una posa que es requerida para estimular la callosa, en situaciones de estrés por Al, la acumulación de callosa puede conducir a un mayor daño celular, esto puede estar dado a que existe una inhibición en el transporte a través de la membrana plasmática a través de conexiones plasmodesmales (Sivaguru *et al.*, 2000). Una serie de estudios han

demostrado que la exposición al Al, inhibe fuertemente los flujos de Ca a través de la membrana plasmática (por canales de Ca) de las células de la raíz (Huang *et al.*, 1992; Rengel y Elliott, 1992). Respecto a los resultados obtenidos en este trabajo (Cuadro 2.3) se puede mencionar que no existió diferencia significativa en la acumulación de Ca en todos los órganos cuantificados (raíces, tallos y hojas) y en todas las concentraciones de Al comparadas con el control. Estos resultados nos podrían sugerir que el Al no está desorganizando la homeostasis citosólica lo cual es un activador primario ante la toxicidad de este metal, por lo que diversos reportes sugieren que el Al produce un aumento en la actividad del Ca citosólica y esto puede perturbar numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos, incluyendo aquellos involucrados en el crecimiento de las raíces así como la señalización de diversas proteínas en donde el Ca funciona como segundo mensajero en el citosól para diversos procesos (Rengel y Zhang, 2003).

Se sabe que el aluminio puede interferir con la toma de P y por lo tanto se puede producir una deficiencia de este nutrimento en plantas crecidas en soluciones nutritivas a pH ácido (Foy *et al.*, 1964; Jan y Pettersson, 1989), la deficiencia de este nutrimento como se sabe presenta síntomas de clorosis en hojas adultas debido a su movilidad, las plantas pueden verse con un menor tamaño, puede verse relacionado con la abscisión de hojas. Con estos antecedentes en nuestros resultados se puede observar que tanto en raíces como en hojas no se determinó diferencias significativas en plantas sometidas al metal y sin él, también se observó que existió diferencia significativa en tallos a concentraciones de 100 y 300 μM de AlCl_3 comparadas con las testigo, esto nos puede proponer que en raíces el Al puede favorecer la distribución de este nutrimento en la parte aérea puesto que se puede encontrar acumulando casi el doble que en raíces.

2.3.6. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE pH DE LAS SOLUCIONES EN UN CURSO TEMPORAL EN PRESENCIA DE Al A DIFERENTES DÍAS DE CULTIVO

En el cultivo se estudiaron los cambios de pH en las soluciones nutritivas con el fin de conocer el comportamiento del pH en presencia y ausencia del Al, esto se realizó a diferentes días de cultivo, y se observó que a concentraciones de 0 μM de AlCl_3 se tuvo

un pequeño aumento en el pH a finales de los experimentos, en relación a los tratamientos de 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 el comportamiento del pH fue el mismo durante todo el experimento (Figura 2.9), se realizó un ANOVA y los resultados fueron los expresados en el cuadro 2.4. el cual nos indica que existen diferencias significativas en todos los días de cultivo tanto en las cultivadas en presencia de Al comparadas con las testigo.

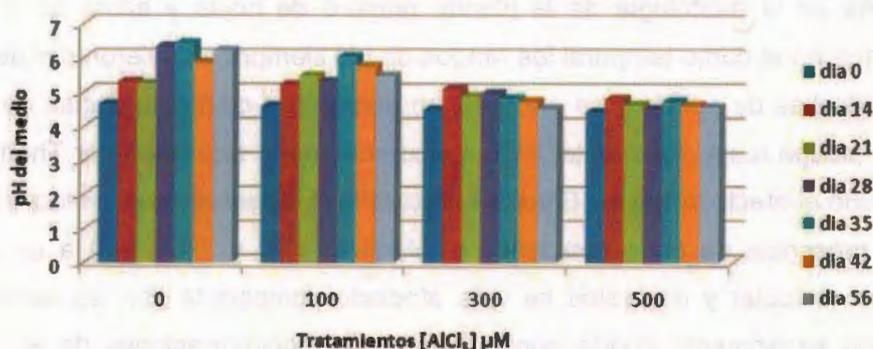


Figura 2.9. Comportamiento del pH a diferentes días de cultivo.

Cuadro 2.4. Diferencias de pH presente en la solución nutritiva a diferentes días de cultivo de *Coffea arabica* var. Typica.

Tratamiento [μM] Al	Curso temporal de pH (días)						
	0	14	21	28	35	42	56
0	4.65a	5.30a	5.25a	6.33a	6.43a	5.87a	6.21a
100	4.59ab	5.22a	5.48a	5.30b	6.03b	5.75a	5.81b
300	4.49bc	5.10ab	4.88b	4.49c	4.81c	4.77b	4.56c
500	4.42c	5.80b	4.63b	4.51c	4.72c	4.61b	4.52c
C.V.	1.89	4.22	3.71	3.46	3.39	3.38	3.87

*Valores con letras distintas por columna son diferentes de forma altamente significativa (Tukey. $P < 0.05$)

*C.V.: Coeficiente de Variación

2.3.7. DISCUSIÓN

El Al está ampliamente distribuido en la corteza terrestre y ocupa cerca del 8% de su composición mineral, sin embargo la disponibilidad del Al va de la mano con los rangos de pH del suelo, se han encontrado diferentes especies de Al en el suelo la mayoría de estos no disponibles y no tóxicos para la plantas, mayormente este metal se encuentra en el

suelo en forma de aluminosilicatos o hidróxidos de aluminio, sin embargo cuando los rangos de pH están por debajo de 5.5, este metal se solubiliza formando un ion trivalente (Al^{3+}) el cual se ha reportado que es el más dañino para las plantas y sus concentraciones en el suelo pueden ser de micromolar a milimolar dependiendo de las condiciones y perfiles de suelo, se ha documentado que el Al es el factor más limitante para la productividad de los cultivos (Haug, 1984; Kinraide, 1991), por tal razón en este trabajo las plántulas tratadas estuvieron en los rangos ácidos deseados para observar si existe algún daño en la morfología de la planta, número de hojas y altura de la planta. Se observó que en el curso temporal los rangos de pH siempre estuvieron por debajo de 5.5 a diferentes días de cultivo y se encontró un aumento a concentraciones de 100 μM de AlCl_3 y el testigo respectivamente. Esto concuerda con lo reportado por Thornton, (1986) quien evaluó el efecto del Al en *Gleditsia triacanthos* y observó que cuando las plantas se puso en presencia de concentraciones de Al (150, 600 y 1500 μM) a un pH de 4 la elongación radicular y de brotes se veía afectado comparada con las control, también realizó otro experimento donde ponía las mismas concentraciones de Al a pH de 5, encontró que las plantas tuvieron un crecimiento mayor de raíces y brotes, así como de la planta completa.

Otro estudio realizado recientemente es el de Xia *et al.*, (2010) donde evaluaron y caracterizaron a un transportador específico para el Al llamado Nr1 (Nramp aluminum transporter), los autores reportan que cuando se apaga esta proteína, disminuye la concentración del Al en la savia estando en rangos de pH de 4 a 5 pero que cuando aumentaron el pH a 5.5 y 6 la concentración de aluminio aumento en la savia, los autores especulan que cuando se aumenta pH, el Al está presente en forma de hidróxidos u otros complejos con el Al, lo que indica es que este transportador podría ser específico para el Al trivalente ya que al evaluar otros iones divalentes como el Fe, Mn, Cd y complejos de citrato con Al estos no tuvieron transporte. Recientemente Yamaji *et al.*, (2009) identificaron a un factor de transcripción (ART1) que está involucrado en la tolerancia al Al, los autores mencionan que este factor de transcripción esta involucrado en múltiples genes participan en la tolerancia a este metal en arroz, uno de estos genes regulados por ART1 es Nr1.

Otro estudio realizado en arroz por Xia *et al.*, (2011) demostraron que en presencia de

una concentración equimolar de Yb o Ga, la absorción de Al en levaduras expresando *Nrat1* fue inhibida al menos la mitad. Los autores proponen que el *Nrat1* también es capaz de transportar otros iones trivalentes (Yb o Ga), pero tomando en cuenta que el Al es el metal más abundante sobre la corteza terrestre, es probable que *Nrat1* funcione como un transportador de Al.

Por otro lado se ha reportado (Degenhardt *et al.*, 1998), donde mencionan que el Al está involucrado en un sistema de resistencia en el cual puede existir una alteración del pH en la rizósfera, esto dado por un incremento en el influjo de H^+ , se puede concluir que el pH del medio es un factor a considerar cuando se trabaja con Al puesto que existen diferentes especies de Al y este puede cambiar su conformación dependiendo del pH.

2.3.8. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALUMINIO EN LAS RAÍCES DE CAFETO POR TINCIÓN CON HEMATOXILINA

Con la finalidad de localizar y observar los sitios de acumulación del Al, en raíces de las plantas tratadas con este metal, las raíces se tiñeron con diferentes concentraciones de aluminio. En la Figura 2.10 se muestra que tanto en los testigos a pH 4.3 como en el de pH 6.8 no se detectó la presencia del Al en la raíz por tinción con hematoxilina. En los tratamientos con 100, 300 y 500 μM se observó que la hematoxilina tiñó las raíces, lo cual indica la presencia del metal en la superficie de la raíz, asimismo, también se observa que en el tratamiento con 100 μM , la presencia del aluminio se encontró en la zona meristemática. La mayor tinción o donde se puede observar que existe una mayor acumulación de este metal es en los tratamientos con concentraciones de 300 y 500 μM respectivamente lo cual nos puede indicar que el aluminio está presente en la zona meristemática y la zona de diferenciación de la raíz.

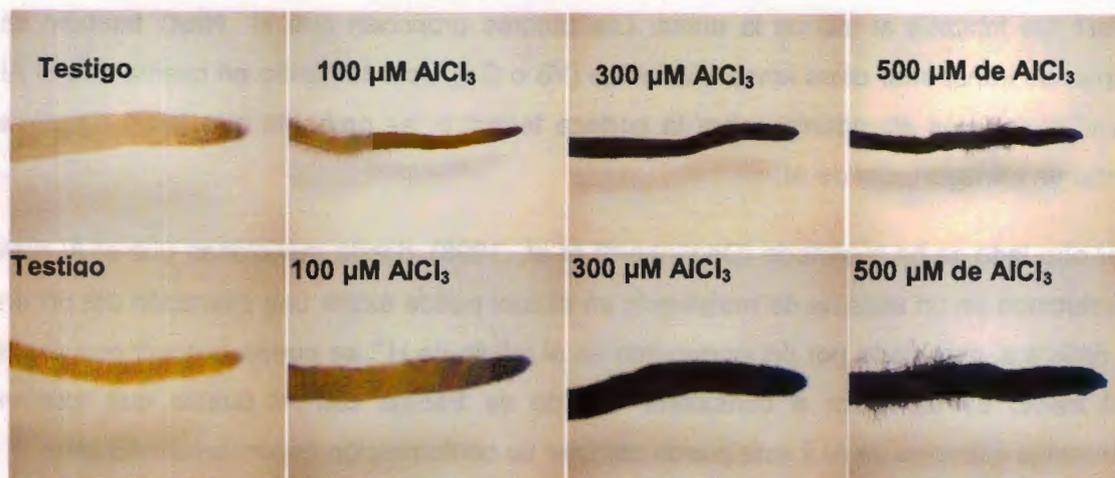


Figura 2.10. Tinción con hematoxilina de raíces de café al día 60 de cultivo. Las raíces previamente fueron expuestas a 0, 100, 300 y 500 μM de AlCl_3 .

2.3.9. DISCUSIÓN

Existen reportes acerca de localización del Al en raíces por tinción con hematoxilina, un reporte es el de Illes *et al.*, (2006), los autores reportan que cuando utilizaron la tinción con hematoxilina en raíces de *A. thaliana* encontraron que a partir de concentraciones de 100 hasta 300 μM el Al se localizó y acumuló el Al principalmente en el ápice radicular y que cuando las concentraciones del metal fueron mayores, se pudo apreciar que la acumulación fue mayor en el ápice y en la zona de elongación. Esto puede indicar que el Al está interactuando con las cargas de la pectina en la pared celular y de esta manera se está uniendo a la pared celular de las células epidérmicas y también se ha encontrado en varias capas de las células del cortex, lo que se sugiere es que puede existir un mecanismo de exclusión en café. González-Santana, (2012) reporta en estudios hechos en *Conostegia xalapensis*, utilizando tinción con hematoxilina en raíces y hojas, puso en presencia de Al plantas a 500 y 1000 μM , se encontró que en raíz la acumulación del aluminio fue en la epidermis y en la parte aérea se encontró en la cutícula y células del mesófilo, así como también en el xilema. Con todos estos reportes se confirma que en las

plántulas cultivadas en hidroponía, la acumulación del Al es en el ápice radicular a concentraciones de 100 μM y esta acumulación fue mayor cuando las concentraciones aumentaron (300 y 500 μM) encontrándose que este metal se está acumulando en ápice y zona de elongación aunque también se propone que se esté acumulando en la zona de maduración y esta acumulación puede encontrarse en células epidermales así como también las del córtex.

2.3.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS EN RAÍCES Y HOJAS DE PLÁNTULAS DE CAFETO EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Al

Se determinó la actividad de peroxidasa en raíz y hoja de plántulas de *C. arabica* expuestas a diferentes concentraciones de Al (0, 100, 300 y 500 μM) a un pH de 4.3 y en un tiempo de experimento de 60 días, se obtuvo que la mayor actividad de esta enzima fue en la raíz comparada con las hojas, estos resultados se muestran en la Figura 2.11, analizando primeramente en raíz se encontró que en los tratamientos donde se tuvo la presencia del metal (100, 300 y 500 μM) tuvieron diferencia significativa comparados con el testigo (0 μM), la mayor actividad específica se alcanzó en el tratamiento a concentración de 300 μM el cual tuvo diferencia significativa con los tratamientos a 500 y 100 μM de AlCl_3 . Se observó que entre los tratamientos de las concentraciones de 100 y 500 μM de AlCl_3 existieron diferencias significativas entre ellos lo que fue interesante es que a 500 μM de AlCl_3 la actividad disminuyó. Por otro lado comparando la actividad en hojas se observó que la menor actividad fue en el tratamiento a 100 μM de AlCl_3 pero que éste no tuvo diferencia con el testigo y el tratamiento a 300 de AlCl_3 , de igual manera el análisis estadístico mostró que entre el tratamiento a 300 μM μM y el testigo no hubo diferencia significativa, pero éstos si fueron diferentes comparados con la concentración a 500 μM donde se encontró que hubo mayor actividad de esta enzima y existió diferencia significativa con el testigo y los tratamientos de 100 y 300 μM de Al.

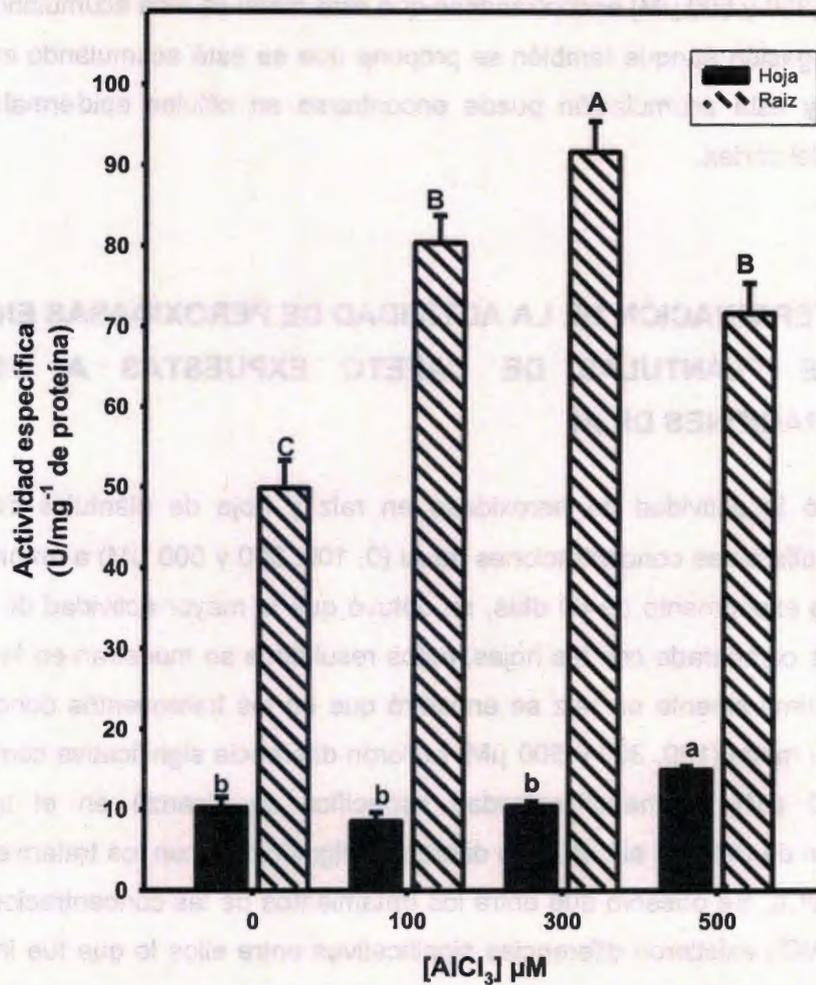


Figura 2.11. Actividad específica de peroxidasa en raíces y hojas de plántulas de *C. arabica*. cada barra representa una media entre 3 repeticiones por tratamiento (n = 3 plántulas). Tukey (P < 0.05) letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

2.3.11. DISCUSIÓN

Diversos tipos de estrés ambiental pueden inducir la formación de ROS en las células vegetales (Vierstra, 1987). Las fuentes de estrés ambiental incluyen los cambios de

temperatura, choque mecánico, luz UV, exposición al ozono, deficiencia de agua y un exceso de iones metálicos. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células producen ROS mediante la reducción de oxígeno molecular. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, la producción de ROS puede verse incrementada. Se sabe que el Al mismo no es un metal de transición y no puede catalizar reacciones redox, sin embargo la implicación del estrés oxidativo en la toxicidad de Al se ha sugerido (Boscolo *et al.*, 2003).

El Al es un constituyente mayoritario del suelo y en consecuencia las plantas crecen en ambientes de suelos en los que las raíces están potencialmente expuestas a altas concentraciones de este metal (Dipierro *et al.*, 2005), de esta manera el Al puede inducir al estrés oxidativo así como cambios en las propiedades de la pared celular, esto sugiere como dos de los mayores factores primarios de la toxicidad por Al (Zheng y Yang, 2005; Yamamoto *et al.*, 2001). El estrés oxidativo puede ocurrir en cualquier condición de desorganización en la homeostasis redox celular.

Por otro lado las ROS tienen la capacidad de oxidar componentes celulares tales como lípidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y también conducir a la muerte celular. Se sabe que los metales actúan como catalizadores de la producción de ROS o también pueden inducir daños oxidativos en plantas (Yamamoto *et al.*, 2001; 2003; Boscolo *et al.*, 2003; Kuo y Kao, 2003; Liu *et al.*, 2008). Sin embargo las células vegetales cuentan con un sistema de defensa compuesto principalmente por enzimas antioxidantes tales como la peroxidasa (POX), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), superóxido dismutasa (SOD), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión-s-transferasa (GST) y la glutatión reductasa (GR) y también los antioxidantes no enzimáticos tales como ascorbato (AsA), glutatión (GSH), α -tocoferol y carotenoides, las cuales están o pueden verse involucradas en la ayuda para la detoxificación de ROS (Yamamoto *et al.*, 2003).

En relación a estudios realizados en girasol (*Helianthus annuus* L.) por Jouili *et al.*, (2010), en su trabajo evaluaron a la guaiacol peroxidasa (GPOX) (EC 1.11.1.7) y encontraron que tanto en raíces, tallos y hojas expuestas a concentraciones de 500 μ M de $AlCl_3$, tuvieron una mayor actividad de esta enzima comparadas con las testigo, estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio a concentraciones de 500 μ M de Al fue mayor la actividad de la enzima en hojas, tanto en raíces como en hojas y fueron

diferentes significativamente comparadas con las testigo, pero la mayor actividad encontrada en raíz fue en el tratamiento a concentraciones de 300 μM de Al y éste tuvo diferencia significativa comparadas con las testigo, a concentraciones de 100 y 500 μM de Al.

Otro reporte que concuerda con nuestros resultados es el de Tahara *et al.*, (2008), este estudio fue hecho en raíces de *Melaleuca bracteata* y los autores encontraron que la mayor actividad de POX, fue mayor en las raíces tratadas con Al y fueron diferentes significativamente comparadas con las testigo, en nuestros resultados se puede ver que en raíces fue donde se encontró la mayor actividad y en todas las concentraciones de Al evaluadas (100, 300 y 500 μM de Al) de igual manera Du *et al.*, (2010) evaluaron el efecto del Al en raíces de soya y encontraron que cuando las raíces estaban en presencia de 50 y 100 μM de Al, se encontró mayor actividad de POX comparadas con las testigo esto a diferentes tiempos de exposición (24, 36 y 48 h), los autores proponen que el Al induce actividades crecientes de peroxidasas lignificadas de la pared celular lo que también se puede correlacionar estrechamente con la acumulación de lignina y producción de H_2O_2 (Xue *et al.*, 2008). También se sugiere que estas enzimas están involucradas y juegan un papel importante en la respuesta al estrés por Al el cual puede causar la generación de radicales de oxígeno y de esta manera provocar la peroxidación lipídica que puede ser dañino para la planta, sin embargo estas enzimas (POX) pueden revertir este efecto negativo y por lo tanto están involucradas en procesos de tolerancia al Al.

2.3.12. CUANTIFICACIÓN DE LA FUGA DE ELECTROLITOS EN RAÍCES, TALLOS Y HOJAS DE PLÁNTULAS DE CAFETO EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Al

Como medida del deterioro de las membranas celulares se cuantifico la fuga de electrolitos en órganos (raíz, tallo y hoja) de las plántulas de *C. arabica* expuestas a diferentes concentraciones de Al a un pH de 4.3, por un periodo de 60 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.12. En relación a la fuga de electrolitos medidos en hoja, se encontró que la menor fuga fue en el testigo e indica que existe una diferencia significativa con el tratamiento a 500 μM de AlCl_3 . Se puede observar que a

concentraciones 100 y 300 μM de AlCl_3 existió una disminución en el porcentaje de fuga pero éste no tuvo diferencia con el testigo. En relación a la cuantificación en tallo, se observa que no existió diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento a 100 μM de AlCl_3 , pero si existió diferencia significativa entre el testigo y concentraciones de 300 y 500 μM de AlCl_3 . En relación a la medición en hoja no se observó diferencia entre el testigo comparado con todos los tratamientos en presencia del Al.

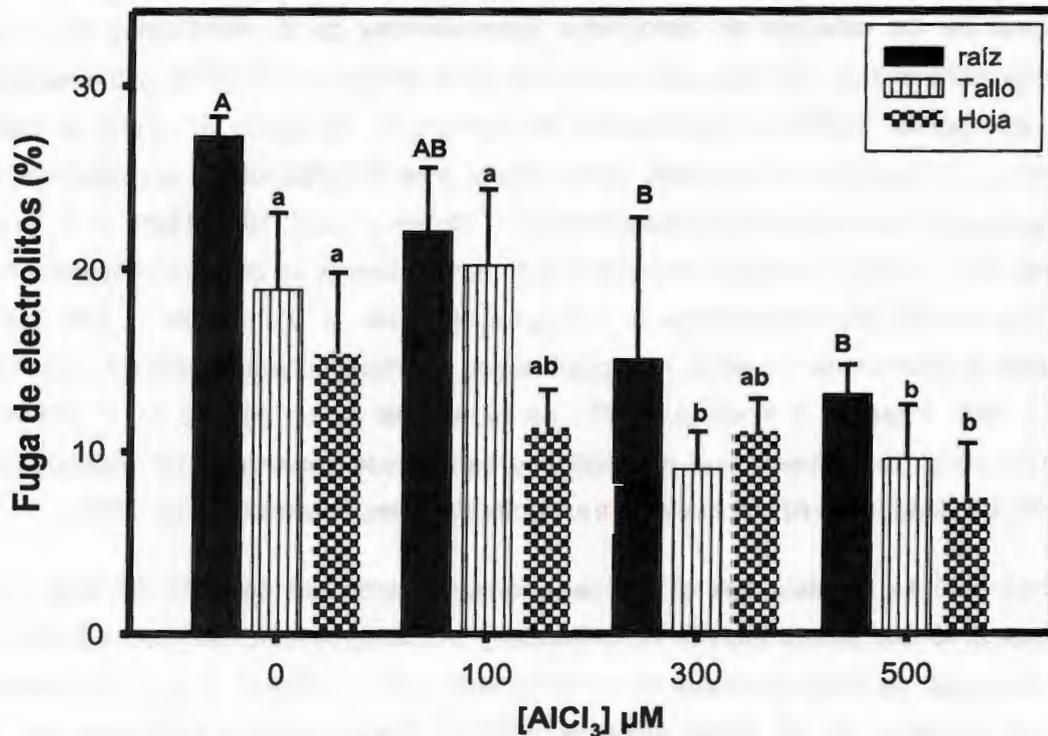


Figura 2.12. Porcentaje de la fuga de electrolitos en órganos (raíces, tallos y hojas) de plántulas de café expuestas a diferentes concentraciones de Al (100, 300 y 500 μM de AlCl_3) y el testigo, cada barra representa una media entre 3 repeticiones por tratamiento ($n = 3$ plántulas). Tukey ($P < 0.05$) letras diferentes indican diferencia entre tratamientos.

2.3.13. DISCUSIÓN

Se sabe que el Al tiene muchos sitios blancos y que cerca del 95% del Al asociado a las raíces de las plantas se encuentra en la pared celular (Rengel, 1996), pero uno de los más importantes blancos es la membrana plasmática, debido a sus propiedades fisicoquímicas, el Al puede interactuar fuertemente con la carga negativa de la superficie de la membrana plasmática, este metal tiene mayor afinidad (500 veces) a las cargas negativas de las cabezas de fosfolípidos (componentes de la membrana) que otros cationes como el (Ca), también está involucrado en la producción de ROS, dicho metal se sabe que puede modificar la estructura de membrana, así como el ambiente iónico cercano a la superficie de la célula, conduciendo a la perturbación de los procesos de transporte de iones y de la homeostasis celular (Cakmak y Horst, 1991; Horst *et al.*, 1997; Massot *et al.*, 1999). Otro punto importante a tomar en cuenta es que el Al despolariza la membrana casi instantáneamente a consecuencias de la exposición a este metal haciendo el potencial de equilibrio más positivo que el potencial de equilibrio a K (Lindberg *et al.*, 1991; Papemik y Kochian, 1997), en el cual se da un cambio en el potencial electroquímico de la membrana plasmática y esto puede deberse a las interacciones directas e indirectas de Al con la vía de transporte de iones (Miyasaka *et al.*, 1989).

Por otro lado se ha visto que el Al puede inhibir la actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana, lo que puede impedir la formación y el mantenimiento del gradiente de H⁺, esta alteración de dicho gradiente se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo*. Como se sabe el gradiente de H⁺ actúa como la principal fuerza impulsora de procesos de transporte secundario de iones, por lo que si se da la interrupción de dicho gradiente por el efecto del Al, podría indirectamente modificar el estado iónico y la homeostasis de los iones en las células de la raíz (Ryan *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2001; 2002).

Para ver el posible daño en membrana en plántulas de *C. arabica*, tanto en raíz como en hojas, se cuantificó la fuga de electrolitos como indicativo de daño. En estudios realizados por Pereira *et al.*, (2010) hechos en plántulas de *Cucumis sativus* y evaluando el estrés oxidativo que puede causar el Al, así como también el crecimiento y desarrollo de esta especie ante diferentes concentraciones de Al, ellos reportan que a partir de concentraciones de 10 µM hasta concentraciones de 2000 µM la fuga de electrolitos fue mayor dependiendo de la concentración a la cual fue aplicada, estos resultados

concuerdan con lo obtenido en nuestros resultados ya que a partir de concentraciones de 100 μM hasta 500 μM evaluando raíz y tallo, se encontró que el daño en membrana fue mayor en raíces a una concentración de 500 μM de AlCl_3 y éste fue diferente comparadas con las testigo, de igual manera se observó en tallos ya que se encontró que el mayor daño en membrana fue a concentraciones de 300 y 500 μM de AlCl_3 y estos fueron diferentes con el tratamiento a 100 μM de AlCl_3 y el testigo. Pereira *et al.*, (2010) proponen que el Al está fuertemente unido e induce una fuerte asociación con los fosfolípidos de la membrana y que se da una mayor densidad de empaquetado de los fosfolípidos, reduciendo la permeabilidad de la membrana.

Otro reporte con respecto a la permeabilidad de la membrana evaluado por fuga de electrolitos es el de Mukhopadyay *et al.*, (2012). En este estudio evaluaron el efecto del Al a diferentes concentraciones (0, 15, 200, 400 y 4000 μM de AlCl_3) en plántulas de té (*Camellia sinensis*), sus resultados mostraron que a partir de 200 μM de AlCl_3 a medida que aumentaba la concentración de Al, la fuga de electrolitos tuvo diferencia significativa comparadas con las testigo y las plántulas que estaban en presencia de 15 μM de AlCl_3 donde no mostraron diferencia significativa entre sí. Concluyen y proponen que al estudiar por igual la peroxidación lipídica es un importante indicador de daño en membrana y que el Al estimula esta peroxidación (Pereira *et al.*, 2011).

El incremento de la peroxidación lipídica al igual que la fuga de electrolitos también fue probablemente debido a los efectos nocivos de los niveles excesivos de H_2O_2 o sus derivados de ROS en los compartimentos celulares (Bowler *et al.*, 1992). Excesivos niveles de ROS pueden resultar en un daño a los organelos celulares incluyendo el aparato fotosintético, lo que puede arrojar un severo daño celular y clorosis en las hojas.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn S.J., Sivaguru M., Osawa H., Chung G.G. y Matsumoto H. (2001). Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiology*, 126: 1381-1390.
- Ahn S.J., Sivaguru M., Chung G.C., Rengel Z. y Matsumoto H. (2002). Aluminium induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *Jornal of Experimental Botany*, 53: 1959-1966.
- Barcelo J. y Poschenrieder C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 75-92.
- Bojórquez-Quintal J. E. de A. (2010). Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Bojórquez-Quintal J. E. de A. (2009). Establecimiento de las condiciones óptimas de germinación de embriones cigóticos de plantas de cafeto (*Coffea arabica* L.). Tesis de licenciatura. Facultad de química (UADY), Mérida Yucatán.
- Boscolo P.R.S., Menossi M. y Jorge R.A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.
- Bowler C., Montagu M.V. y Inze D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83-116
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cancado G.M.A., Loguercio L.L., Martins P.R., Parentony S.N., Paiva E., Borem A. y Lopes M.A. (1999). Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum

-
- tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 747-754.
- Cakmak I. y Horst W.J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- Degenhardt J.E.B., Larsen S.H., Howell y Kochian L.V. (1998). Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *afr-104* is caused by an aluminum induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiology*. 117: 19-27.
- Dipierro N., Mondelli D., Paciolla C., Brunetti G. y Dipierro S. (2005). Changes in the ascorbate system in the response of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) roots to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology*, 162: 529-536.
- Du B., Nian H., Zhang Z. y Yang C. (2010). Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 883-890.
- Fageria N.K., Ballgar V.C. y Wright R.J. (1988). Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, 11: 303-319.
- Foy C.D. y Brown J.C. (1964). Toxic factors in acid soils. II. Differential aluminium tolerance of plant sciences, *Soil Science Society of America Proceedings*, 28: 27-32.
- Foy C.D., Chaney R.L. y White M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 511-566.
- Foy C.D. (1992). Soil chemical factors limiting plant root growth. *Advances in Soil Science* 19: 97-149.
- Gamborg O.L., Miller R.A. y Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
- Gonzalez-Santana I.H., Marquez-Guzman J., Cram-Heydrich S. y Cruz-Ortega R.
-

- (2012). *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): an aluminum accumulator plant. *Physiologia Plantarum*, 144: 134-145.
- Ghanati F., Morita A. y Yokota H. (1995). Effects of aluminium on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant Soil*, 276: 133-141.
- Grabski S., Amoyes E., Bush B. y Schindler M. (1998). Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. *Plant Physiology*, 116: 279-290.
- Haug A. (1984). *Molecular Aspects of Aluminium Toxicity*. CRC Critical Reviews in Plant Sciences, 1: 345-373.
- Huang J.W., Shaff J.E., Grunes D.L. y Kochian L.V. (1992). Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology*, 98: 230-237.
- Horst W.J., Puschel A.K. y Schmohl N. (1997). Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. *Plant Soil*, 192: 23-30.
- Illes P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidi I., Baluska F. y Ovecka M. (2006). Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4201-4213.
- Jan F. y Petterson S. (1989). Varietal diversity of upland rice in sensitivity to aluminium. *Journal of Plant Nutrition*, 12: 973-993.
- Jan F. (1991). Aluminium effects on growth, nutrient net uptake and transport in 3 rice (*Oryza sativa*) cultivars with different sensitivity to aluminium. *Physiologia Plantarum*, 83: 441-448.
- Jones D.L., Kochian L.V. y Gilroy S. (1998). Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiology*, 116: 81-89.
- Jouili H., Bouazizi H. y Ferjani E.E. (2010). Protein and Peroxidase Modulations in

-
- Sunflower Seedlings (*Helianthus annuus* L.) Treated with a Toxic Amount of Aluminium. *Biological Trace Element Research*, 138: 326-336.
- Kinraide T. y Parker D. (1989). Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxyaluminum. *Plant Cell Environment*, 12: 478-87.
- Kinraide T. y Parker D. (1990). Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxyaluminum to four dicotyledonous species. *Physiologia Plantarum*, 79: 283-88.
- Kinraide T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil*, 134: 167-178.
- Kochian L.V. y Jones D.L. (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity?. *Plant Cell* 7: 1913-1922.
- Kollmeier M., Felle H.H. y Horst W.J. (2000). Genotypic differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum?. *Plant Physiology*, 122: 945-956.
- Kuo M.C. y Kao C.H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 149-152.
- Lin C.Y., Chen Y.M. y Key J.L. (1985). Solute leakage in soybean seedlings under various heat shock regimes. *Plant Cell Physiology*, 26: 1493-1498.
- Lindberg S., Szykier K. y Greger M. (1991). Aluminum effects on transmembrane potentials in cells of fibrous roots of sugar beet. *Physiologia Plantarum*, 83: 54-62.
- Liu H. (2001). Soil acidity and aluminum toxicity response in turfgrass. *Research Journal*, 9: 181-187.
- Liu Q., Yang J.L., He L.S., Li Y.Y. y Zheng S.J. (2008). Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum*, 52: 87-92.
- Loyola-Vargas V.M. y Vázquez-Flota F. (2006). *Plant tissue culture protocols*, 2nd edition,
-

- serie: methods in molecular biology vol. 318, Humana Press, Totowa, New Jersey, EEUU.
- Ma Q., Rengel Z. y Kuo J. (2002). Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips. *Annals of Botany*, 89: 241-244.
- Makau M., Masito S.S. y Gweyi-Onyango J.P. (2011). A rapid hydroponic screening of field and horticultural crops for aluminium tolerance. *African Journal of Horticultural Science*, 4: 48-59.
- Martínez-Estévez M., Racagni-Di Palma G., Muñoz-Sánchez A., Brito-Argáez L., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology*, 160:1297-1303.
- Martínez-Juárez V.M. (2004). Formación de 5,5'-dicapsaicina en cultivos de células de *Capsicum* sp. Tesis de Doctorado en Ciencias en la especialidad de Biotecnología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Massot N., Llugany M., Poschenrieder C. y Barcelo J. (1999). Callose production as indicator of aluminium toxicity in bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 22: 1-10.
- Medina-Lara F.M. (2011). Crecimiento radicular de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) sometidas a estrés por Aluminio. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Conkál, Yucatán.
- Miyasaka S.C., Kochian L.V., Shaff J.E. y Foy C.D. (1989). Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K^+ , and H^+ transport and root-cell membrane potentials. *Plant Physiology*, 91: 1188-1196.
- Mukhopadhyay M., Bantawa P., Das A., Sarkar B., Bera B., Ghosh P. y Mondal T.K. (2012). Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defense system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. *Biometals*, DOI 10.1007/s10534-012-9576-0

-
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Papernik L.A. y Kochian L.V. (1997). Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiology*, 115: 657-667.
- Pavan M.A. y Bingham F.T. (1982). Toxicity of aluminium to coffee seedlings grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 46: 993-997.
- Pereira L.B., Mazzanti de A.C.M., Gonçalves J.F., Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Becker A.G., Calgaroto N.S., Gomes Farias J., Battisti V., Bohrer D., Nicoloso F.T., Morsch V.M. y Schetinger M.R.C. (2010). Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 683-689.
- Pereira L.B., Mazzanti de A.C.M., Cargnelutti D., Rossato L.V., Gonçalves J.F., Calgaroto N., Dressler V., Nicoloso F.T., Federizzi L.C., Morsch V.M. y Schetinger M.R.C. (2011). Differential responses of oat genotypes: oxidative stress provoked by aluminum. *Biometals*, 24: 73-83.
- Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M. y Schiavon M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-274.
- Polle E., Konzak C.F. y Littrik J.A. (1978). Visual detection of aluminium tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science*, 18: 823-827.
- Ryan P.R., Shaff J.E. y Kochian L.V. (1992). Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum tolerant wheat cultivars. *Plant Physiology*, 99: 1193-1200.
- Ryan P.R., Ditomaso J.M. y Kochian L.V. (1993). Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *Journal of Experimental Botany*, 44: 437-446.
- Rengel Z. y Elliott D.C. (1992). Mechanism of Al inhibition of net $^{43}\text{Ca}^{2+}$ uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiology*, 98: 632-638.
-

- Rengel Z. (1996). Uptake of aluminium by plants cells. *New Phytologist*, 134: 389-406.
- Rengel Z. y Zhang W.H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159: 295-314.
- Sánchez-Zamorano L. (2009). Caracterización químico-física de la peroxidasa de palma real (*Roystonea regia*), una enzima con elevada estabilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca, Facultad de Ciencias Químicas. Salamanca, España.
- Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluska F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkman D. y Matsumoto H. (2000). Aluminum-induced 1 \rightarrow 3 β -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology*, 124: 991-1006.
- Takabatake R. y Shimmen T. (1997). Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. *Plant and Cell Physiology*, 38: 1264-1271.
- Tahara K., Yamanoshita T., Norisada M., Hasegawa I., Kashima H., Sasaki S. y Kojima K. (2008). Aluminum distribution and reactive oxygen species accumulation in root tips of two *Melaleuca* trees differing in aluminum resistance. *Plant and Soil*, 307: 167-178.
- Tomioka R., Oda A. y Takenaka C. (2005). Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. Seedlings. *Journal of Forest Research*, 10: 319-324.
- Thornton F C, Schaedle M, and Raynal DJ., (1986). Effects of aluminum on growth, development, and nutrient composition of honeylocust (*Gleditsia triacanthos* L.) seedlings, *Tree Physiology* 2:307-316.
- Vierstra R.D. (1987). Ubiquitin, a key component in the degradation of plant proteins. *Physiologia Plantarum*, 70: 103-106.
- Von Uexkull H.R. y Mutert E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. In *Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*, ed. RA Date, NJ Grondon, GE Raymet, ME Probert, pp. 5-19. Dordrecht, The Neth: Kluwer

Academic.

- Watanabe T., Jansen S. y Osaki M. (2005). The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, 165: 773-780.
- Xia J., Yamaji N., Kasai T. y Ma J.F. (2010). Plasma membrane localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of National Academy of Science, USA.*, 107: 18381-18385.
- Xia J., Yamaji N. y Ma J.F. (2011). Further characterization of an aluminum influx transporter in rice. *Plant Signaling and Behavior*, 6: 160-163.
- Xue Y.J., Tao L. y Yang Z.M. (2008). Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9676-9684.
- Yamaji N., Huang C.F., Nagao S., Yano M., Sato Y., Nagamura Y. y Ma J.F. (2009). A Zn-finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, 21: 3339-33349.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y. y Matsumoto H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in Pea roots. *Plant Physiology*, 125: 199-208.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S. y Matsumoto H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255: 239-243.
- Zhang G., Slaski J.J., Archambault D.J. y Taylor G.J. (1997). Alteration of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress. *Physiologia Plantarum*, 99: 302-308.
- Zheng S.J. y Yang J.L. (2005). Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biologia Plantarum*, 49: 321-331.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN GENERAL

El aluminio es el metal más abundante en la corteza terrestre (Tesfaye *et al.*, 2001). Se sabe que bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 5.50$), el Al está relacionado y se presenta como Al^{3+} , la cual es la forma más tóxica para las plantas. La toxicidad por Al es caracterizada por una rápida inhibición en la elongación de la raíz a concentraciones micromolares, aunque los mecanismos exactos sobre la toxicidad por Al no están muy comprendidos, se sabe que el Al interacciona con múltiples sitios en las células de la raíz (Kochian, 1995; Ma, 2007; Poschenrieder *et al.*, 2008), resultando en daños estructurales y funcionales.

Por ejemplo se ha demostrado que el Al reduce la extensibilidad de la pared celular (Ma *et al.*, 2004b), asimismo que puede bloquear canales de Ca en la membrana plasmática en células de raíces de trigo (*Triticum aestivum*) (Huang *et al.*, 1992a). Por otro lado se han realizado estudios en los cuales se menciona que este metal causa daño en la membrana y en la peroxidación de los lípidos de la misma (Cakmak y Horst, 1991; Wagatsuma *et al.*, 1995), afectando las vías de transducción de señales tales como la vía de los fosfoinosítidos en la membrana plasmática, resultando en una desorganización en la homeostasis del Ca citoplasmático, la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática y componentes del citoesqueleto (Jones y Kochian, 1997). En esta ruta de los fosfoinosítidos, la fosfolipasa C desempeña un papel importante, se ha visto que el Al puede inhibir la actividad de esta enzima (Kochian, 1995; Kochian *et al.*, 2005; Jones y Kochian, 1997). Otros reportes mencionan que el Al posee la capacidad de unión a esta enzima muy superior al Ca, afectando su funcionalidad por la unión del Al en los sitios de unión a Ca (Garzón, 2003).

En un estudio realizado por Piña-Chablé y Hernández-Sotomayor, (2001), se determinó que el Al tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PLC en raíces transformadas de *C. roseus*. Por otro lado Martínez-Estévez *et al.*, (2003) observaron que el Al tiene un efecto sobre la actividad de la PLC y los lípidos cinasas. Los autores concluyen que cuando las células estaban en presencia del Al y a periodos cortos (1 min) la actividad de la PLC aumentó así como también la formación de hasta dos veces de IP_3 , sin embargo

cuando las células estuvieron en periodos más largos la actividad de la PLC fue inhibida por más de 50%, esto utilizando como modelo de estudio a células en suspensión de café. Ramos-Díaz *et al.*, (2007), reportan que en células de café, el Al inhibe la actividad de la PLC, así como la formación de ácido fosfatídico (PA) el cual se sabe que es un importante lípido molécula señal y está implicado en varias vías de señalización por estrés en plantas.

En general la fitotoxicidad por Al puede desencadenar una serie de eventos como: estrés oxidativo, que conduce a la peroxidación de la membrana celular, también puede provocar daño estructural de proteínas y enzimas, aberración cromosómica, puede conducir a una muerte celular programada, en conjunto todos estos efectos afectan directamente el vigor de la planta reduciendo su rendimiento y aumentando la sensibilidad a otros factores de estrés como sequía y deficiencia de nutrientes (Hoekenga *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2001).

De igual manera en condiciones ácidas las plantas han desarrollado mecanismos envueltos en la tolerancia y resistencia al Al, se ha visto que las plantas poseen mecanismos de detoxificación externa en la que exudan grandes cantidades de ácidos orgánicos, tales como citrato, malato y oxalato, los cuales quelan al Al e impiden la entrada del mismo y de esta manera decrecen la toma de Al libre en las raíces. Por otro lado las plantas con mecanismos de detoxificación interna que de igual manera, altas concentraciones de ácidos orgánicos participan en la unión con él Al y de esta manera reducen o eliminan la toxicidad por Al (Ma *et al.*, 1998; Ma, 2000).

En este trabajo se tuvo el interés de evaluar el efecto que tiene el Al en el crecimiento de plántulas de café (*Coffea arabica* var. *Typica*) cultivadas en condiciones de hidroponía, ya que se conoce que esta especie se cultiva en suelos con pH ácidos y por lo tanto podría presentar problemas por toxicidad del Al afectando directamente el rendimiento de esta especie ya que es la de mayor área cultivada y mayor precio comercialmente. Antecedentes de estos estudios nos indicaban que en células en suspensión el Al provoca cambios significativos en el crecimiento así como en la actividad de enzimas involucradas en la vía de los fosfolípidos (Martínez-Estévez *et al.*, 2001) y que además tenemos los antecedentes de que en plántulas obtenidas de semillas y cultivadas *in vitro* el Al pudiera estar modificando de manera positiva el crecimiento radicular (Bojórquez-Quintal, 2010).

En el experimento se aplicaron diferentes concentraciones de AlCl_3 (0, 100, 300 y 500 μM a pH 4.3) a plántulas de *Coffea arabica*, cuando se evaluó la morfología (Figuras 2.1 y 2.2) de las plantas se encontró que en concentraciones de 300 y 500 μM de Al las plántulas tuvieron un menor crecimiento y cambios en la arquitectura de la raíz, esto coincide con lo reportado por Illes *et al.*, (2006) y además se ha reportado que el Al puede inhibir el crecimiento de las plantas de café (Pavan y Bingham, 1982), sin embargo se menciona que las plantas tratadas con Al pueden tener problemas por clorosis y deficiencias de nutrientes, así como poca eficiencia en el uso del agua (Pessaraki, 2008), cosa que no se observó en nuestro estudio. Al evaluar la cantidad de biomasa (peso fresco y seco) en raíces, tallos y hojas, se encontró que no fue estadísticamente significativo según la prueba de Tukey ($P < 0.05$) entre todos los tratamientos comparados con el testigo, esto concuerda con los estudios realizados por Medina-Lara (2011) en chile habanero donde reporta que a concentraciones similares (100, 250 y 500 μM de Al) el Al no afectó tanto los pesos frescos como los secos en plántulas. Estos resultados estarían indicando que el café puede sugerirse como una especie tolerante a este metal el cual no afecta la cantidad de biomasa producida.

También, respecto a la cuantificación del número de hojas (Figura 2.6), se observó que a concentraciones de 500 μM de Al fue donde se observó abscisión y no tuvo diferencia significativa entre tratamientos (100 y 300 μM) pero si existió diferencia comparadas con las testigo esto según Tukey ($P < 0.05$), estos resultados concuerdan con los reportado por Thornton, (1986), en plantas de *Gleditsia triacanthos* L. donde se reporta que a 35 días de cultivo encontró que a concentraciones de 150 y 600 μM de Al existió una menor producción de hojas nuevas comparas con las testigo. En este parámetro evaluado se sugiere que el Al puede verse involucrado en vías de señalización de ácido absícico y el flujo de auxinas en las hojas y de esta manera se pudiera estar dando tal abscisión de hojas como resultado de un menor gasto en respiración y energía (Kollmeier *et al.*, 2000).

Respecto a la altura de las plántulas evaluadas (Figura 2.7), se encontró que el Al tiene un efecto negativo ya que en todos los tratamientos (100, 300 y 500 μM) no fueron diferentes significativamente pero si tuvieron significancia comparados con las plántulas testigo esto según una prueba de Tukey ($P < 0.05$), estos resultados concuerdan con Medina-Lara (2011) realizados en chile habanero. Donde a concentraciones de 500 μM de

Al obtuvo una mayor afectación en la altura de la planta. De igual manera nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Osaki *et al.*, (1997), hecho en plantas de *Stylosanthes guianensis* donde obtuvo que a mayores concentraciones de Al la altura de la planta fue menor comparada con las testigo. Se ha reportado que ante la presencia del Al eventualmente puede existir un menor crecimiento de la planta, puesto que se sabe que el Al interfiere en la toma de nutrimentos y de esta manera presentar enanismo en la mayoría de las plantas (Foy *et al.*, 1978; Kochian, 1995; Liu, 2001).

Al evaluar la longitud de la raíz (Figura 2.8), se obtuvo que en presencia del metal las plántulas tuvieron un menor crecimiento radical, pero que no mostraron diferencia entre todos los tratamientos pero si comparadas con las testigo, esto según una prueba de Tukey ($P < 0.05$), estos datos concuerdan con los de Illes *et al.*, (2006) realizados en *Arabidopsis*, donde se reporta que a concentraciones de 100, 200 y 300 μM , la longitud de la raíz fue inhibida y que esta inhibición fue dependiente de la concentración aplicada de Al, de igual manera otro reporte es el de Bojórquez-Quintal, (2010) hecho en *Coffea arabica* en condiciones de *in vitro* donde reporta que a concentraciones de 500 μM de AlCl_3 fue donde observó mayor inhibición en la raíz principal, no así en concentraciones de 100 y 300 μM donde observó que las raíces estimulaban su crecimiento en presencia del metal. Se puede sugerir que la concentración tóxica del Al depende de la especie a la cual se esté evaluando ya que se sabe que existen especies sensibles y tolerantes a este metal.

En nuestro trabajo se evaluó el contenido de Al y nutrimentos (K, Ca y P) (Cuadro 2.3) en los diferentes órganos de la planta (raíces, tallos y hojas). Anteriormente se ha mencionado que el Al puede interferir o ayudar la toma de nutrimentos (Foy, 1988; Mossor-Pietraszewska, 2001; Pilon-Smits *et al.*, 2009), se han reportado varios trabajos los cuales consisten en diversos mecanismos diversos relacionados con la toma de iones y su interacción con el aluminio, por ejemplo la absorción de Ca y Mg se ha demostrado que puede ser inhibida por dos diferentes formas: 1) el Al inhibe de forma competitiva la absorción de Ca (Huang *et al.*, 1992a) y la absorción de Mg (Rengel y Robinson, 1989a), y 2) el Al puede actuar como bloqueador de canales de Ca (Rengel y Elliott, 1992). El efecto del Al en la absorción de P y K no es consistente, por ejemplo, se ha reportado que el Al puede tener un efecto inhibitorio por Gassmann y Schroeder, (1994), mientras que

Jan y Pettersson, (1993), Huang y Bachelard, (1993) y Malkanthi *et al.*, (1995b) reportan que este metal tiene un efecto estimulante para estos iones, lo que sugiere que la absorción de P y K no está directamente inhibida por Al como la de Ca o Mg, pero que puede afectar factores secundarios tales como la destrucción de la estructura de la raíz (Wagatsuma *et al.*, 1987) o la inhibición de la actividad de la H⁺-ATPasa en la membrana plasmática (Matsumoto *et al.*, 1992).

En nuestros resultados se demuestra que la mayor acumulación del Al fue en raíces y la cual esta acumulación fue dependiente de la concentración de Al aplicada, estos resultados concuerdan con lo reportado por Watanabe *et al.*, (2005) en donde a plantas de *Melastoma Malabathricum* y *Hordeum vulgare* expuestas a 500 μ M de Al, se encontró que la mayor acumulación fue en el sistema radical en ambas especies, también se observó que el Al sí se puede traslocar hacia la parte aérea (tallos y hojas) pero en menor concentración comparado con la raíz, estos resultados sugieren que el Al está interactuando con las cargas de la pared celular de las células de la raíz y de esta manera se acumula mayormente en la zona apical y la zona de diferenciación, también se propone que las plántulas de *Coffea arabica* pudieran tener tanto sistemas de exclusión como interiores en donde los ácidos orgánicos pudieran estar participando en la quelación de este metal impidiendo su entrada o ingresando a la célula de igual manera unidos a ácidos orgánicos donde puede ser almacenado en vacuola o también traslocarlo hacia la parte aérea a órganos menos sensibles.

En relación al K cuantificado en nuestro trabajo no se observó diferencia entre las plántulas que estuvieron en presencia y ausencia del Al, esto concuerda con lo reportado por Watanabe *et al.*, (2005). En donde tampoco encontró diferencia entre las plantas evaluadas con y sin Al. También un reporte que pudiera estar involucrando el K en prevenir está el de Bojórquez-Quintal, (2010) reporta que en *Coffea arabica* cultivadas *in vitro* a concentraciones de 100 y 300 μ M de Al, se observó un mayor contenido de K y propone que es posible que este elemento contribuya a prevenir el efecto tóxico del Al y pudiera estar involucrado en estimular el crecimiento de la raíz.

Otro nutrimento evaluado fue el Ca y se obtuvo que no existió diferencia entre todos los tratamientos con o sin Al esto en todos los órganos evaluados (raíces, tallos y hojas), esto nos pudiera estar arrojando que el Al no está desorganizando la homeostasis del Ca

citoplasmático ya que se sabe que este metal puede bloquear los canales específicos para este ion y de esta manera puede desorganizar muchos procesos tanto bioquímicos como fisiológicos, como por ejemplo aquellos involucrados en el crecimiento de las raíces así como también en los que el Ca participa en la señalización de diversas proteínas (Rengel y Zhang, 2003).

Con respecto a la cuantificación de P se sabe que el Al puede interferir en la toma de este nutriente, lo que puede desencadenar síntomas de clorosis en hojas adultas así como plantas de menor tamaño, en muchas plantas la tolerancia al Al parece estar estrechamente asociada con el uso de la eficiencia del fósforo, se sabe que el Al aumenta notablemente el potencial redox en tejidos de la raíz, de esta manera se reduce el contenido de fósforo de alta energía de enlace y aumenta el contenido de fósforo mineral en raíces. También se sabe que el Al al unirse con los ácidos orgánicos evita la formación de complejos con el fósforo, lo que resulta en una mayor disponibilidad de P en las células de la raíz, por lo tanto las plantas tolerantes al Al pueden tener una menor demanda de este nutriente (Slaski *et al.*, 1996). Respecto a nuestros resultados se puede observar que tanto en raíces como en hojas no existió diferencia significativa en las plántulas sometidas a este metal o sin él, donde si se pudo observar diferencia significativa fue en los tallos en donde a 100 y 300 de μM de Al, estos comparados con el testigo.

Como hemos mencionado anteriormente se sabe que el Al es el metal más abundante en la corteza terrestre, en el suelo existen diferentes especies de Al, sin embargo el que se ha reportado más dañino para las plantas es el ion trivalente (Al^{3+}) y su disponibilidad está relacionado cuando el pH del suelo se torna ácido por debajo de 5.5., y éste dependiendo de la especie puede ser dañino o no para las plantas (Kochian *et al.*, 2004). Por esa razón se evaluaron los cambios de pH (Figura 2.9) de las soluciones a diferentes días de cultivo y se encontró que los rangos de pH siempre estuvieron ácidos durante todo el experimento esto a diferentes días de cultivo, esto concuerda con lo reportado por Thornton, (1986) en el cual evaluó a *Gleditsia triacanthos* y observó que cuando a las plantas estuvieron en concentraciones de Al (150, 600 y 1500 μM) a un pH de 4 la elongación radicular y de brotes se veía afectado comparada con las control, aquí se propone que el pH del medio es muy importante para realizar estudios en relación al Al ya que este factor puede tornar o no disponible al metal.

Asimismo, la tinción con hematoxilina nos permitió determinar de una forma rápida y sencilla la presencia y la acumulación del Al en la superficie de la raíz de las plántulas de café evaluadas (Figura 2.10). Se pudo observar a concentraciones de 100 μM de Al donde se observó acumulación fue en la parte apical, ya a concentraciones de 300 y 500 μM de Al la tinción fue en toda la parte radical, se encontró que este metal se está acumulando en ápice y zona de elongación aunque también se propone que se esté acumulando en la zona de maduración, esto concuerda con lo reportado por Illes *et al.*, (2006) donde el tñó con hematoxilina raíces de *Arabidopsis thaliana* y encontró que a partir de concentraciones de 100 μM de Al se encontró principalmente en el ápice radicular hasta 300 μM de Al se encontró en el ápice como en la zona de elongación.

Existen reportes donde se menciona que el Al no es un metal de transición y no se puede catalizar reacciones redox, sin embargo, muchos estudios implican al Al como un inductor del estrés oxidativo (Boscolo *et al.*, 2003). El estrés oxidativo puede ocurrir en cualquier condición de desorganización en la homeostasis redox celular.

Por otro lado ROS oxida componentes celulares tales como lípidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y también conducir a la muerte celular. Los metales son conocidos que actúan como catalizadores de la producción de ROS o también pueden inducir a daños oxidativo en plantas (Yamamoto *et al.*, 2001; 2003; Boscolo *et al.*, 2003; Kuo y Kao, 2003; Liu *et al.*, 2008). Sin embargo las células vegetales están equipadas con un sistema de defensa compuesto principalmente por enzimas antioxidantes como la peroxidasa (POX), las cuales están o pueden verse involucradas en la ayuda para la detoxificación de ROS en la célula vegetal (Yamamoto *et al.*, 2003). En relación a estudios realizados en girasol (*Helianthus annuus* L.) por Jouili *et al.*, (2010), obtuvieron que la actividad de la guaiacol peroxidasa (GPOX) (EC 1.11.1.7) fue mayor tanto en raíces, tallos y hojas expuestas a 500 μM de Al comparadas con las testigo, estos resultados concuerdan con lo obtenido en nuestro estudio (Figura 2.11) ya que en todos los tratamientos con Al (100, 300 y 500 μM de Al) fue donde la actividad enzimática fue mayor. Se puede sugerir que estas enzimas si están involucradas en la reducción de ROS y juegan un rol importante en la respuesta al estrés por Al y por lo tanto pueden estar involucradas en procesos de tolerancia a este metal.

Una manera rápida de saber si existe daño en la membrana por exposición al Al es por

medio de la medición de la fuga de electrolitos (Figura 2.12) donde pudimos encontrar que a partir de concentraciones de 100 μM hasta 500 μM esto evaluando raíz y tallo, se encontró que el daño en membrana fue mayor en raíces a una concentración de 500 μM de Al y el análisis estadístico por medio de una prueba de Tukey ($P < 0.05$), fue diferente comparadas con las testigo, se observó en tallos el mayor daño en membrana fue a concentraciones de 300 y 500 μM de Al y estos fueron diferentes con el tratamiento a 100 μM de Al y el testigo. Pereira *et al.*, (2010) proponen que el Al está fuertemente unido e induce una fuerte asociación con los fosfolípidos de la membrana y que se da una mayor densidad de empaquetado de los fosfolípidos, reduciendo la permeabilidad de la membrana, se sabe que el Al despolariza la membrana casi instantáneamente a consecuencias de la exposición a este metal (Lindberg *et al.*, 1991; Papernik y Kochian, 1997), donde se da un cambio en el potencial electroquímico de la membrana plasmática y esto puede deberse a las interacciones directas e indirectas de Al con la vía de transporte de iones (Miyasaka *et al.*, 1989).

En este trabajo, al comparar el efecto del Al sobre plántulas de café cultivadas en hidroponía se obtuvo que el Al modifica el sistema radical de las plántulas, así como el tamaño de las mismas, también que la producción de biomasa no se ve afectada en raíces, tallos y hojas, se observó que a 500 μM de Al existió abscisión de hojas, se observó también que las plántulas que estuvieron en presencia del metal tuvieron menor altura y longitud de la raíz comparadas con las testigo. Evaluando la acumulación de Al se obtuvo que la raíz es el órgano que más acumula este metal y que este si es capaz de traslocarse hacia la parte aérea en pequeñas cantidades. El pH de igual manera fue medido y se encontró que siempre estuvo en los rangos deseados para el experimento ($\text{pH} < 5.5$). La tinción con hematoxilina nos permitió ver que la mayor acumulación del metal en raíces fue a 300 y 500 μM de Al y a concentraciones de 100 μM se encontró que se acumula en la zona meristemática. También al cuantificar la actividad de peroxidasa (POX) (EC 1.11.1.7) se demostró que la mayor actividad es en raíces y a concentraciones de 300 μM de Al, en hojas se obtuvo que a 300 y 500 μM de Al tuvieron significancia comparadas con las testigo y a 100 μM de Al y por último se pudo observar que el mayor daño en membrana fue raíces a concentraciones de 500 μM de Al y en tallos a concentraciones de 300 y 500 μM de Al.

BIBLIOGRAFIA

- Bojórquez-Quintal J.E. de A. (2010). Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Boscolo P.R.S., Menossi M. y Jorge R.A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.
- Cakmak I. y Horst W.J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83: 463-468.
- Foy C.D., Chaney R.L. y White M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 511-566.
- Foy C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 19: 959-987.
- Garzón T. (2003). Estudio de la compartimentación celular en plantas modelometidas a estrés por aluminio. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Gassmann W. y Schroeder J.I. (1994). Inward-rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat. *Plant Physiology*, 105: 1399-1408.
- Hoekenga O.A., Maron L.G., Piñeros M.A., Cancado G.M.A., Shaff J., Kobayashi Y., Ryan P.R., Dong B., Delhaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H. y Kochian L.V. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.*, 103: 9738-9743.
- Huang J. y Bachelard E.P. (1993). Effects of aluminium on growth and cation uptake in seedlings of *Eucalyptus mannifera* and *Pinus radiata*. *Plant and Soil*, 149: 121-127.
- Huang J.W., Grunes D.L. y Kochian L.V. (1992a). Aluminum effects on the kinetics of

calcium uptake into cells of the wheat root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. *Planta*, 188: 414-421.

Illés P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidl I., Baluska F. y Ovecka M. (2006). Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4201-4213.

Jan F. y Pettersson S. (1993). Effect of low aluminium levels on growth and nutrient relations in three rice cultivars with different tolerances to aluminium. *Journal of Plant Nutrition*, 16: 359-372.

Jones D.L. y Kochian L.V. (1997). Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters*, 400: 51-57.

Jouilli H., Bouazizi H. y Ferjani E.E. (2010). Protein and Peroxidase Modulations in Sunflower Seedlings (*Helianthus annuus* L.) Treated with a Toxic Amount of Aluminium. *Biological Trace Element Research*, 138: 326-336.

Kochian L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 237-260.

Kochian L.V., Hoekenga O.A. y Piñeros M.A. (2004). Growth of plants in acid soils. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 459-493.

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

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

-
- Kuo M.C. y Kao C.H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 149-152.
- Lindberg S., Szykier K. y Greger M. (1991). Aluminum effects on transmembrane potentials in cells of fibrous roots of sugar beet. *Physiologia Plantarum*, 83: 54-62.
- Liu H. (2001). Soil acidity and aluminum toxicity response in turfgrass. *Research Journal*, 9: 181-187.
- Liu Q., Yang J.L., He L.S., Li Y.Y. y Zheng S.J. (2008). Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum*, 52: 87-92.
- Ma J.F., Hiradate S. y Matsumoto H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, 117: 753-759.
- Ma J.F. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiology*, 41: 383-390.
- Ma J.F., Shen R.F., Nagao S. y Tanimoto E. (2004b). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiology*, 45: 583-589.
- Ma J.F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *International Review Cytology*, 264: 225-253.
- Malkanthi D.R.R., Yokoyama K., Yoshida T., Moritsugu M. y Matsushita K. (1995b). Effects of low pH and Al on growth and nutrient uptake of several plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 41: 161-165.
- Martínez-Estévez M., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Aluminum increases phosphorylation of particular proteins in cellular suspension cultures of coffee (*Coffea arabica*). *Journal of Plant Physiology*, 158: 1375-1379.
- Martínez-Estévez M., Racagni-Di Palma G., Muñoz-Sánchez J.A., Brito-Argáez L., Loyola-Vargas V.M. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2003). Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositides pathway in *Coffea arabica*
-

cells. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1297-1303.

Matsumoto H., Yamamoto Y. y Kasai M. (1992). Changes of some properties of the plasma membrane enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: Membrane-associated ATPase, aluminum and calcium. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38: 411-419.

Medina-Lara F.M. (2011). Crecimiento radicular de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) sometidas a estrés por Aluminio, Tesis De Maestría, Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán.

Miyasaka S.C., Kochian L.V., Shaff J.E. y Foy C.D. (1989). Mechanisms of aluminum tolerance in wheat. An investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport and root-cell membrane potentials. *Plant Physiology*, 91: 1188-1196.

Mossor-Pietraszewska T. (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48: 673-686.

Osaki M.T., Watanabe T. y Tadano T. (1997). Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 551-563.

Papernik L.A y Kochian L.V. (1997). Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiology*, 115: 657-667.

Pavan M.A. y Bingham F.T. (1982). Toxicity of aluminium to coffee seedlings grown in nutrient solution. *Soil Science Society of America Journal*, 46: 993-997.

Pereira L.B de A., Mazzanti C.M., Gonçalves J.F., Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Becker A.G., Calgaroto N.S., Gomes Farias J., Battisti V., Bohrer D., Nicoloso F.T., Morsch V.M. y Schetinger M.R.C. (2010). Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 683-689.

Pessaraki M. (2008). Acid Soil and Aluminum Tolerance in Turfgrasses, in: *Handbook of Turfgrass Management and Physiology*, University of Arizona Tucson, Arizona, U.S.A., p. 375-388.

-
- Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M. y Schiavon M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-274.
- Piña-Chable M.L. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2001). Phospholipase C activity from *Catharanthus roseus* transformed roots: aluminum effect. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 65: 45-56.
- Poschenrieder C., Gunse B., Corrales I. y Barcelo J., (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, 400: 356-368.
- Ramos-Díaz A., Brito-Argáez L., Munnik T. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2007). Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta*, 225: 393-401.
- Rengel Z. y Robinson D.L. (1989a). Competitive Al^{3+} inhibition of net Mg^{2+} uptake by intact *Lolium multiflorum* roots kinetics. *Plant Physiology*, 91: 1407-1413.
- Rengel Z. y Elliott D.C. (1992). Mechanism of aluminum inhibition of net $^{45}Ca^{2+}$ uptake by protoplasts. *Plant Physiology*, 98: 632-638.
- Rengel Z. y Zhang W.H. (2003). Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, 159: 295-314.
- Slaski J.J., Zhang G., Basu U., Stephens J.L. y Taylor G.J. (1996). Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. *Physiologia Plantarum*, 98: 477-484.
- Tesfaye M., Temple S.J., Allan D.L., Vance C.P. y Samac D.A. (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiology*, 127: 1836-1844.
- Thornton F.C., Schaedle M. y Raynal D.J. (1986). Effects of aluminum on growth, development, and nutrient composition of honeylocust (*Gleditsia triacanthos* L.) seedlings. *Tree Physiology*, 2: 307-316.
-

- Wagatsuma T. Kaneko M. y Hayasaka Y. (1987). Destruction process of plant root cells by aluminum. *Soil Science and Plant Nutrition*, 33: 161-175.
- Wagatsuma T. Ishikawa S., Obata H., Tawaraya K. y Katohda S. (1995). Plasma-membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminum toxicity in roots source. *Plant and Soil*, 171: 105-112.
- Watanabe T., Jansen S. y Osaki M. (2005). The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, 165: 773-780.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y. y Matsumoto H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology*, 125: 199-208.
- Yamamoto Y., Kobayashi Y., Devi S.R., Rikiishi S. y Matsumoto H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil*, 255: 239-243.
- Yi H.L., Yi M., Li H.H. y Wu L.H. (2010). Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environmental Toxicology*, 25: 124-129.

CAPÍTULO IV**CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS****4.1. CONCLUSIONES GENERALES**

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

- El efecto de el Al en plántulas de *C. arabica* en condiciones de hidroponía tiene un efecto negativo en la morfología de la parte aérea y radical, provocando abscisión de las hojas a 500 μM , probablemente inhibiendo el crecimiento en la parte aérea y radical.
- El Al se acumula mayormente en la raíz y una pequeña cantidad es traslocada hacia la parte aérea (tallos y hojas).
- El pH es un factor importante a considerar para la disponibilidad del metal así como para su estudio sobre la toxicidad o resistencia en plantas.
- En raíces de plántulas de *C. arabica* en condiciones de hidroponía se observó que con un tratamiento de 100 μM de el Al se acumula en el ápice, y a 300 y 500 μM de Al la acumulación fue en la zona meristemática y de diferenciación.
- La actividad de POX es mayor en la raíz donde está presente el Al y esta enzima probablemente estaría actuando como un sistema de tolerancia a este metal, en hoja la mayor actividad fue a concentraciones de 500 μM de Al.
- El mayor daño en membrana fue a concentraciones de 500 μM de Al y en tallos a 300 y 500 μM de Al.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el efecto del Al sobre el crecimiento vegetal depende de la concentración aplicada de dicho metal, los tejidos evaluados y un punto muy importante es la especie ya que existen especies tolerantes y sensibles a este metal.

4.2. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se observó que el Al tiene un efecto negativo en la altura de la planta, la longitud de la raíz así como en la abscisión de las hojas en plántulas de *Coffea arabica* expuestas a Al, por lo que se realizan nuevas interrogaciones acerca de que posibles mecanismos podrían estar involucrados en la tolerancia a este metal en el café, los resultados mostraron que el Al se encontró en mayor cantidad en raíces y que una pequeña cantidad es enviada hacia la parte aérea. Junto se observó que las peroxidasas pueden estar jugando un papel importante en la disminución de ROS en raíces donde está presente el metal. En general, los resultados que se presentan en este proyecto nos permiten realizarnos muchos cuestionamientos, por lo que se plantean nuevas perspectivas para el estudio de este metal.

- Determinar que otras enzimas podrían estar implicadas en la defensa ante el estrés oxidativo que desencadena el Al, se sugiere evaluar la cantidad de especies reactivas de oxígeno que pudieran estar desencadenando el Al, así como también cuantificar espectrofotométricamente el contenido de callosa y lignina en raíces de *Coffea arabica*.
- Evaluar por medio de electrofisiología el intercambio de iones (H^+ y Al^{3+}) en la membrana plasmática de células de la raíz de *C. arabica*.
- Cuantificar el contenido de ácidos orgánicos como son: citrato, malato y oxalato en la parte aérea como en la radical, así como también analizar la exudación de dichos ácidos orgánicos en las raíces tratadas con Al.
- Cuantificar el contenido de clorofila a, b y carotenoides, así como también determinar la tasa fotosintética, transpiración así como la conductancia estomática de plántulas.
- Determinar el contenido de azúcares solubles, almidón, así como los fenoles, en plántulas de *Coffea arabica* para observar si existen cambios en dichos contenidos.
- Realizar estudios de microscopía electrónica para ver los posibles daños en las

raíces, tanto superficialmente, así como realizar cortes histológicos que permitan observar los posibles cambios en la conformación de células epidermales, las del córtex así como las del periciclo.

En este punto superficialmente así como realizar otras histológicas que permitan observar los cambios en la organización de células epiteliales, la del
células así como las del tejido.