



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Mecanismos de tolerancia al
aluminio en la planta acumuladora
Fagopyrum esculentum (Moench) var
Mancan.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
IVAN ALEJANDRO REYNA LLORENS



Tutor: DRA. MARÍA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A Kinné

Mecanismos de tolerancia al aluminio en la planta acumuladora *Fagopyrum esculentum* (Moench) var Mancan.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Cruz Ortega en el laboratorio de Alelopatía, del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. María del Rocío Cruz Ortega	Instituto de Ecología, UNAM
Mtra. María del Carmen Quinto	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Omar Homero Pantoja	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Charlotte Poschenreider, del Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universitat Autònoma de Barcelona, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de microscopía.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra Isabel Corrales en los experimentos de microscopía.

Se reconoce la asesoría técnica de la M en C Georgina Hernandez Chavez en la determinación de ácidos orgánicos por HPLC.

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAPIIT-UNAM. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT.

El Jurado de Examen estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Federico Sánchez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Omar Pantoja	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Patricia Coello	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Adriana Garay	Instituto de Ecología, UNAM

Agradecimientos

A la UNAM, espejo de la vida nacional, por haberme dado un gran conocimiento y experiencias entrañables.

A Rocío Cruz por ser una excelente formadora, una gran maestra y por ser una gran amiga a lo largo de estos años.

A Omar Pantoja y Carmen Quinto por su fuerte compromiso con este proyecto, por sus observaciones, comentarios y correcciones, pero sobretodo, por los valiosos consejos que me han dado a lo largo de toda la maestría.

A Charlotte Poschenrieder y Juan Barceló por permitir que realizara parte de mi proyecto en su laboratorio, muchas gracias por su calidez, por su hospitalidad y por permitirme aprender mucho de ustedes.

A Isabel Corrales moltes gràcies pel suport rebut de la seva part, per totes els seus ensenyaments i per la seva calidesa.

A Georgina Hernández y Laurel Fabila por su paciencia, por su tiempo y por su valiosa cooperación en este proyecto.

A Marina Gavilanes, Federico Sánchez, Patricia Coello y Adriana Garay por haber aceptado ser parte de mi comité sinodal, por haber revisado mi tesis de una manera tan completa y con una visión altamente crítica.

A tots els membres del Laboratori de Fisiologia Vegetal de la UAB gràcies per fer-me sentir a casa, pel Carpaccio dels divendres i per la seva qualitat humana.

A todos los miembros del laboratorio de Aleopatía muchas gracias por su apoyo y por su ayuda durante todos estos años.

A todos mis amigos y mi familia muchas gracias.

Indice

INTRODUCCIÓN	6
Aluminio en el suelo.....	6
Toxicidad del Al y sus blancos moleculares.....	7
Tolerancia al Al.....	10
<i>Otros mecanismos de tolerancia al Al</i>	15
<i>Fagopyrum esculentum</i>	17
Objetivo General	18
Objetivos particulares:	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Determinación del crecimiento radicular e incremento en el peso seco.....	20
Localización del Al dentro de la raíz y evaluación de la viabilidad celular.	21
Concentración de ácidos orgánicos y niveles de ABA.....	23
Cuantificación de los niveles de ABA.....	23
Bioensayo con Ácido Abscísico exógeno.....	24
Caracterización molecular de un transportador del tipo ABC en las raíces de <i>Fagopyrum esculentum</i> var. <i>Mancan</i>	24
RT-PCR	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
<i>Fagopyrum esculentum</i> presenta un periodo de aclimatación para contrarrestar los efectos tóxicos del Al	27
Concentraciones altas de Al provocan un daño celular en la región del ápice radicular	30
El Al se acumula en los ápices radiculares y co-localiza con las zonas más dañadas	33
Las concentraciones de ácidos orgánicos en las raíces no varían entre tratamientos..	37
Altas concentraciones de Al promueven un aumento en las concentraciones de Ácido Abscísico (ABA)	40
<i>FeALS</i> es un gene homólogo a <i>ALS</i> y codifica para una proteína putativa tipo ABC en <i>Fagopyrum</i>	42
<i>FeALS</i> aumenta su expresión en la presencia de Al y ABA	44
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	54

Indice

INTRODUCCIÓN	6
Aluminio en el suelo.....	6
Toxicidad del Al y sus blancos moleculares.....	7
Tolerancia al Al.....	10
<i>Otros mecanismos de tolerancia al Al</i>	15
<i>Fagopyrum esculentum</i>	17
Objetivo General	18
Objetivos particulares:	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Determinación del crecimiento radicular e incremento en el peso seco.....	20
Localización del Al dentro de la raíz y evaluación de la viabilidad celular.	21
Concentración de ácidos orgánicos y niveles de ABA.....	23
Cuantificación de los niveles de ABA.....	23
Bioensayo con Ácido Abscísico exógeno.....	24
Caracterización molecular de un transportador del tipo ABC en las raíces de <i>Fagopyrum esculentum</i> var. <i>Mancan</i>	24
RT-PCR	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
<i>Fagopyrum esculentum</i> presenta un periodo de aclimatación para contrarrestar los efectos tóxicos del Al	27
Concentraciones altas de Al provocan un daño celular en la región del ápice radicular	30
El Al se acumula en los ápices radiculares y co-localiza con las zonas más dañadas	33
Las concentraciones de ácidos orgánicos en las raíces no varían entre tratamientos..	37
Altas concentraciones de Al promueven un aumento en las concentraciones de Ácido Abscísico (ABA)	40
<i>FeALS</i> es un gene homólogo a <i>ALS</i> y codifica para una proteína putativa tipo ABC en <i>Fagopyrum</i>	42
<i>FeALS</i> aumenta su expresión en la presencia de Al y ABA	44
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	54

INTRODUCCIÓN

Aluminio en el suelo

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante en el planeta después del oxígeno y el silicio, y es el más abundante en la corteza terrestre. La mayoría de los compuestos de Al en el suelo existe como óxidos o como aluminosilicatos. Estas formas no son fitotóxicas (Ma *et al.*, 2003), sin embargo en los suelos ácidos (pH menor a 5.5) el Al se solubiliza en un catión trivalente Al^{3+} , el cual es tóxico para la mayoría de las plantas (Ma *et al.*, 2001).

En una escala global, existen dos cinturones geográficos de suelos ácidos: uno corresponde a las zonas templadas húmedas del hemisferio norte cubiertas principalmente por bosques de coníferas. El segundo cinturón se encuentra en los trópicos húmedos (Von Uexkull & Mutert, 1995).

Sin embargo, la acidificación del suelo no se limita sólo a estas zonas. La deforestación de las comunidades vegetales así como la nitrificación del suelo por el uso intensivo de fertilizantes nitrogenados han llevado a que la proporción de suelos ácidos aumente considerablemente (Johnson *et al.*, 1997). Aproximadamente 30-40% de los suelos cultivables son considerados ácidos (Foy *et al.*, 1978; Von Uexkull & Mutert, 1995).

En los suelos ácidos con alto contenido mineral, el Al es el principal causante de la toxicidad en las plantas (Samac & Tesfaye, 2003). El Al se solubiliza de manera dependiente del pH para formar varios complejos con los grupos hidroxilo (**Figura 1**). Las especies trivalentes (Al^{3+}) dominan en condiciones ácidas ($pH < 5$), mientras que las especies $Al(OH)^{2+}$ y $Al(OH)_2^+$ se forman conforme el pH aumenta (Delhaize *et al.*, 1995). Aunque la toxicidad de estas especies solubles varía considerablemente, el Al^{3+} es la forma más fitotóxica (Ma *et al.*, 2003).

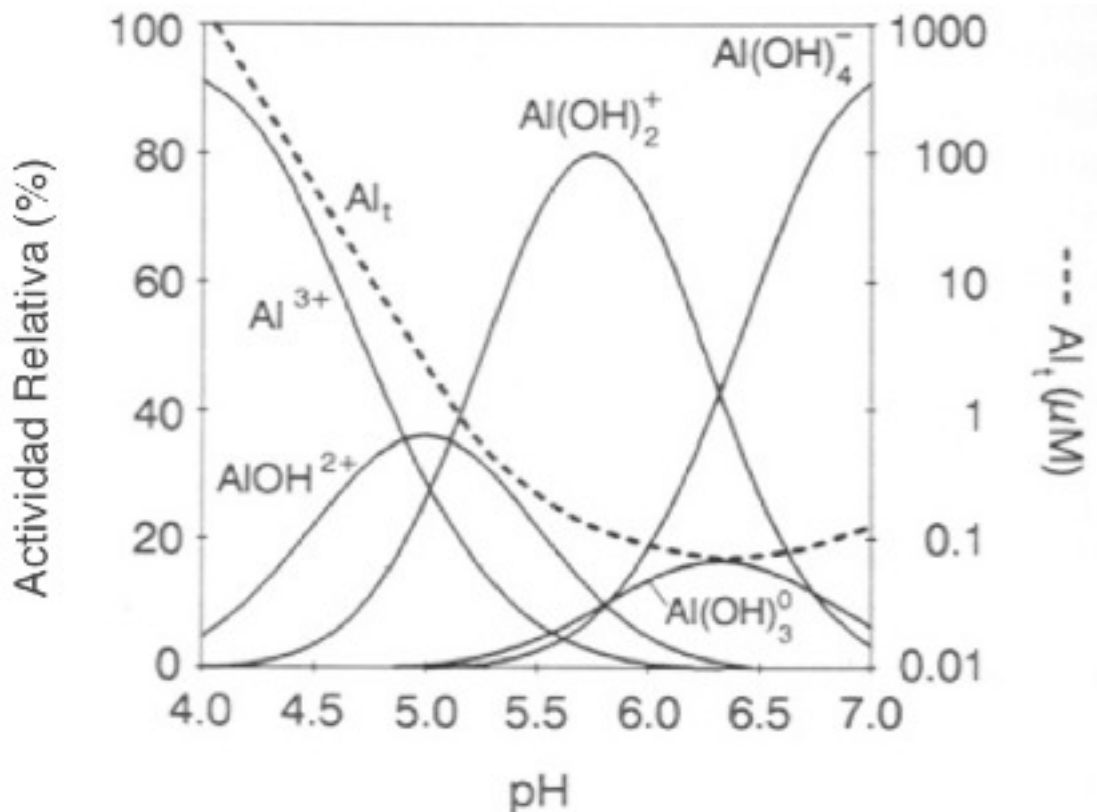


Figura 1.- Curva de solubilidad del Al. Mientras el pH disminuye, la especies solubles de Al aumentan . A un pH = 4.5, la concentración de Al se encuentra principalmente en la especie iónica Al^{3+} (Tomado de Marschner, 1995).

Toxicidad del Al y sus blancos moleculares

El principal síntoma que refleja la toxicidad del Al es la inhibición del crecimiento de la raíz. La región radicular más sensible al Al se encuentra en el ápice de la raíz dentro de la zona de transición, localizada entre el meristemo y la zona de elongación celular (Sivaguru & Horst, 1998). El Al inhibe tanto la expansión como la división celular; esta última tanto a largo plazo (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000; Kochian *et al.*, 2004) como en tiempos cortos (Doncheva *et al.*, 2005). La inhibición del crecimiento de la raíz principal es percibida por la planta que responde al estímulo induciendo la formación de raíces laterales; sin embargo, si estas raíces siguen expuestas al Al, el crecimiento es inhibido rápidamente (Poschenreider *et al.*, 2008). La exposición a soluciones micromolares de Al pueden inhibir la elongación de la raíz en minutos, resultando en un sistema radicular dañado y reducido. Esto limita la absorción de agua y de nutrientes por parte de la raíz (Delhaize *et al.*, 1995).

El Al se une preferentemente a los grupos carboxilo, sulfato y fosfato (Poschenreider *et al.*, 2008) y puede intervenir en el funcionamiento de diversos organelos; incluyendo la pared celular, la superficie de la membrana celular, el citoesqueleto y el núcleo de las células (Kochian *et al.*, 2004).

Efectos del Al en la pared celular

Cuando las raíces están expuestas al Al, la pared celular y los espacios intercelulares son los primeros sitios de contacto (Ma, 2007; Poschenreider *et al.*, 2008). En cultivos celulares de tabaco, alrededor de 90% del Al total se encuentra asociado a las paredes celulares (Chang *et al.*, 1999). La elongación celular está acompañada por un incremento en la extensibilidad de la pared celular que está regulada por dos parámetros físicos: el coeficiente de viscosidad y el módulo de elasticidad (Ma, 2007). Se ha descrito que el Al afecta notablemente estas características haciendo más rígida a la pared celular. Tabuchi & Matsumoto (2001) observaron en raíces de trigo sensibles al Al, que la extensibilidad de la pared celular disminuyó claramente después de exponer estas plantas a 10 μM de AlCl_3 por 6 hr. La exposición al Al resulta en un cambio en los polisacáridos de la pared celular el cual afecta las propiedades antes mencionadas. Se ha observado un aumento en las concentraciones de pectina y hemicelulosa de la pared durante la exposición al Al en *Triticum aestivum* (Tabuchi & Matsumoto, 2001; Eticha, *et al.*, 2005).

Otra de las modificaciones que puede sufrir la pared celular es la deposición de callosa. El Al induce la formación de callosa después de una hora de exposición en *Zea mays* (Sivaguru, *et al.*, 2006). Esta acumulación es más abundante en la zona de elongación de la raíz (Ma, 2007; Sivaguru *et al.*, 2006). La formación de callosa hace a los tejidos impermeables al agua, además bloquea los plasmodesmos, interrumpiendo la comunicación y el transporte a lo largo del simplasto (Ma *et al.*, 2004).

Efectos del Al en el citoesqueleto

El Al afecta de manera indirecta a los microtúbulos y a los filamentos de actina en el citoesqueleto, los cuales están claramente relacionados con la elongación de la raíz (Frantzios *et al.*, 2005). El Al induce la depolimerización de los microtúbulos en la zona de elongación (Sivugaru *et al.*, 2003), y promueve la desorganización de los filamentos de actina en maíz (Amenos *et al.*, 2009). Al estar dañado el citoesqueleto, procesos como el tráfico vesicular se ven afectados (Illés *et al.*, 2006; Amenos *et al.*, 2009). El efecto del Al en el citoesqueleto parece ser una consecuencia de la despolarización de la membrana celular y de la pérdida de homeostasis en las concentraciones de calcio (Frantzios *et al.*, 2005).

Alteraciones en la membrana plasmática

La membrana plasmática, al estar cargada negativamente permite que el Al (cargado positivamente) se adhiera a los fosfolípidos que la componen, generando cambios en las propiedades de fluidez y de desplazamiento lateral de la membrana (Rengel & Zhang, 2003).

Estas perturbaciones pueden generar una disminución en la actividad de los canales de Ca^{2+} y K^+ (Piñeros & Tester, 1995; Piñeros & Kochian, 2001) y que la actividad de la H^+ -ATPasa se inhiba, impidiendo la formación y el mantenimiento del gradiente electroquímico de H^+ transmembranal (Kochian *et al.*, 2005). Todas estas alteraciones influyen en la dinámica de los iones en las células de la raíz causando que el potencial de la superficie membranal se altere y que procesos como la toma de nutrimentos o la propagación de señales se vean afectados (Ma, 2007).

Efectos del Al en la homeostasis del Ca^{2+}

El Calcio actúa como un segundo mensajero en la transducción de señales provocadas por estímulos tanto hormonales como ambientales (Gilroy *et al.*, 1993; Trewavas & Malho, 1997). Estos estímulos pueden promover que se dé un incremento en el calcio citoplasmático a través de la activación de canales membranales y endo-membranales (Gilroy *et al.*, 1993). Dichos cambios en las concentraciones de Ca^{2+} actúan como señales reguladoras en una serie de procesos bioquímicos y fisiológicos (Poovaiah & Yang, 2002; Kim *et al.*, 2007). Como ya se mencionó anteriormente, el Al interfiere en el flujo de iones como el Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, lo cual resulta en

una fuerte interferencia para las vías de transducción de señales (Zhang & Rengel, 1999). Se ha observado que en presencia de Al, los niveles de calcio citoplasmático aumentan considerablemente en raíces de *Triticum aestivum*. (Zhang & Rengel, 1999; Ma *et al.*, 2002). Por otro lado, Jones & Kochian (1997) observaron, también en trigo, que el Al impide la formación de Ins (1,4,5)P₃ al inhibir a la fosfolipasa C alterando la dinámica de flujo del Ca²⁺ y el crecimiento radicular.

Especies reactivas de oxígeno (ROS) y Al

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en el estrés biótico y abiótico (Mittler, 2002). Se ha observado que el Al promueve la generación de ROS en raíces de *Oryza sativa* (Kuo & Kao, 2003). Maltais & Houde (2002) observaron en trigo, utilizando el ensayo de reducción de nitro azul de tetrazolio (NTB), que el Al inhibe reacciones redox asociadas a la superóxido dismutasa dentro del ápice radicular. La perturbación en estas reacciones puede llevar a la acumulación de diferentes ROS (Foyer & Noctor, 2005). Todas estas especies reactivas de oxígeno originan la lipoperoxidación de las membranas lo cual resulta en un daño celular (Yamamoto *et al.*, 2001)

Tolerancia al Al

Algunas plantas pertenecientes a diversas familias (i.e. Polygonaceae, Melastomataceae, Brassicaceae, Poaceae) han evolucionado mecanismos que les confieren tolerancia al estrés por Al, permitiéndoles crecer en suelos ácidos. Las estrategias de tolerancia se pueden clasificar en 2 tipos: 1) La exclusión del Al del ápice de la raíz (Mecanismo de exclusión) y 2) Tolerancia intracelular del Al transportado hacia el simplásto de la planta (Mecanismo de acumulación) (Kochian *et al.*, 2005).

1.-Mecanismos de exclusión: Exudación de ácidos orgánicos

Muchas plantas tolerantes al Al responden a la presencia de este metal liberando ácidos orgánicos al medio, los cuales pueden formar complejos con el Al³⁺ en la interface raíz-suelo (Ma *et al.*, 2001). Existe una fuerte correlación entre la liberación de ácidos orgánicos y la tolerancia al Al (Delhaize *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1995). Citrato, Malato y Oxalato son los principales ácidos orgánicos exudados al medio por las raíces de las

plantas (Ma *et al.*, 2001). En la tabla 1 se muestran las especies en donde se ha detectado la exudación de algún ácido orgánico en relación con la tolerancia al Al.

Tabla 1.- Especies de plantas en las que se ha detectado la exudación de ácidos orgánicos en raíces y en relación con la tolerancia al Al (Tomada de Kochian *et al.*, 2005).

Especie	Ácido orgánico	Referencias
<i>Cassia tora</i>	Citrato	Ma <i>et al.</i> , 1997
<i>Galium saxatile</i>	Citrato	Schottelndreier <i>et al.</i> , 2001
<i>Glycine max</i>	Citrato	Yang <i>et al.</i> , 2001
<i>Miscanthus sinensis</i>	Citrato	Kayama, 2001
<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	Citrato	Kayama, 2001
<i>Nicotiana tabacum</i>	Citrato	Delhaize <i>et al.</i> , 2001
<i>Oryza sativa</i>	Citrato	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000; Ma <i>et al.</i> , 2002
<i>Sorghum bicolor</i>	Citrato	Magalhaes, 2002
<i>Zea mays</i> (Cateto-Colombia)	Citrato	Piñeros <i>et al.</i> , 2002
<i>Avena sativa</i>	Citrato & Malato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
<i>Brassica napus</i>	Citrato & Malato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
<i>Helianthus annuus</i>	Citrato & Malato	Saber <i>et al.</i> , 1999
<i>Raphanus sativus</i>	Citrato & Malato	Zheng <i>et al.</i> , 1998
<i>Secale cereale</i>	Citrato & Malato	Li <i>et al.</i> , 2000
<i>Triticale ssp</i>	Citrato & Malato	Ma <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Malato	Hoekenga <i>et al.</i> , 2003
<i>Triticum aestivum</i> (ET3)	Malato	Ryan <i>et al.</i> , 1995
<i>Colocasia esculenta</i>	Oxalato	Ma & Miyasaka, 1998
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Oxalato	Ma <i>et al.</i> , 1997

Se han identificado dos patrones de exudación de ácidos orgánicos basados en el tiempo de exudación (Ma & Furukawa, 2003). En el **patrón I**, la respuesta de exudación de ácidos orgánicos es inmediata (Ryan *et al.*, 2001), es decir, no se puede hacer una distinción entre el tiempo que lleva la adición de Al y la liberación de ácidos orgánicos. En *Fagopyrum esculentum* la secreción de oxalato se detecta durante los primeros 15 min de haber sido añadido el Al alcanzando su pico en las primeras 3 horas (Ma *et al.*, 1997). En el **patrón II**, la exudación de ácidos orgánicos se retrasa algunas horas después de la exposición al Al (Ryan *et al.*, 2001). *Cassia tora* es una planta donde la exudación de citrato comienza después de las 4 h de exposición y sus picos son alcanzados luego de 12 h (Ma *et al.*, 1997). La velocidad del patrón I sugiere que el Al

activa canales de aniones pre-existentes en la membrana plasmática y que la inducción de genes no es requerida (Ma, 2000). En este caso el Al podría simplemente activar un transportador en la membrana plasmática para iniciar la salida de aniones (Ma *et al.*, 2001). El retraso observado en el patrón II puede obedecer a la necesidad de inducir los genes necesarios tanto para la formación de los transportadores de aniones como para la regulación del metabolismo de los ácidos orgánicos (Ma & Furukawa, 2003).

Transportadores de ácidos orgánicos

Para que los ácidos orgánicos puedan detoxificar al Al de la rizosfera, estos deben de ser transportados del citosol hacia el apoplasto. Este proceso involucra la activación de canales de aniones o transportadores de membrana que regulan la liberación de los ácidos orgánicos en el ápice radicular, sobretodo en la zona de transición entre el meristemo y la zona de elongación (Magalhaes *et al.*, 2007).

Los canales de aniones son proteínas de transporte localizadas en la membrana, las cuales permiten el flujo pasivo de aniones a través de un gradiente electroquímico. En la mayoría de las condiciones, mientras más grandes sean las diferencias en la concentración de solutos (más concentrado en el citoplasma) así como en el potencial eléctrico a través de la membrana de las células vegetales (negativas dentro de la célula), los aniones se desplazan del citoplasma hacia el apoplasto (Ma *et al.*, 2001).

El primer gene relacionado con la tolerancia al Al que fue clonado y caracterizado en plantas fue el *TaALMT1* (*Al³⁺ activated Malate Transporter*) en *Triticum aestivum* (Sasaki *et al.*, 2004). La expresión de este gene en sistemas heterólogos (células en suspensión de *Nicotiana tabacum* o en plantas de *Hordeum vulgare*) indujo la liberación de malato activada por Al^{3+} (Sasaki *et al.*, 2004). Estudios posteriores lograron localizar a la proteína TaALMT1 en la membrana plasmática de esta planta (Yamaguchi *et al.*, 2005).

Proteínas similares a *TaALMT1* se encuentran implicadas en la resistencia al Al en otras especies de plantas. En *Arabidopsis thaliana*, el gene *AtALMT1* (At1g08430) codifica una proteína parecida a TaALMT1 la cual se ha relacionado con el QTL de resistencia al Al en esta planta (Hoekenga *et al.*, 2006). En *Brassica napus* dos genes (*BnALMT1* y

BnALMT2) codifican proteínas con una similitud del 80% en su secuencia de aminoácidos en comparación con *AtALMT1*. La expresión de estos genes confiere tolerancia al Al en células en suspensión de *Nicotiana tabaccum* debido a la capacidad de liberar malato al medio (Ligaba *et al.*, 2006). Otra de las proteínas homologas a *TaALMT1* encontradas en otras especies es la proteína codificada por el gene *ScALMT1* en *Secale cereale*. Esta proteína posee un 86% de identidad comparada con *TaALMT1*, además de que el gene co-segrega con la resistencia al Al^{3+} (Fontecha *et al.*, 2007).

Los genes *TaALMT1*, *AtALMT1*, *BnALMT1* y *BnALMT2* han sido expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* (Sasaki *et al.*, 2004; Hoeckenga *et al.*, 2006; Ligaba *et al.*, 2006), lo cual ha permitido comparar las propiedades de estas proteínas. Las corrientes detectadas para *TaALMT1* y *BnALMT* sólo se dan cuando los ovocitos son pre-inyectados con malato; cuando se inyecta agua o citrato no se generan corrientes, lo cual sugiere cierta especificidad de la proteína por el sustrato (Delhaize *et al.*, 2007). Otra de las características encontradas en estos trabajos fue que la liberación de malato al medio no se da con la presencia de cualquier catión trivalente. La adición al medio de La^{3+} no induce la salida de malato. Esto sugiere que la activación del canal es específica para el Al^{3+} . Sin embargo, en ausencia de Al^{3+} se logró detectar una corriente muy débil en los ovocitos que expresaban *AtALMT1*, lo cual puede indicar un nivel de actividad basal que se estimula por la presencia del Al para activar la liberación de malato (Hoeckenga *et al.*, 2006).

No todos los transportadores del tipo *ALMT1* regulan la exudación de ácidos orgánicos por Al. En *Zea mays* la expresión del gene *ZmALMT1* está implicada en el transporte selectivo de aniones involucrados en la nutrición mineral así como en procesos de homeostasis de iones más que en la exudación de citrato en respuesta al Al (Piñeros *et al.*, 2007).

Además de los transportadores del tipo *ALMT1*, se ha establecido un papel en los mecanismos de resistencia al Al para miembros de otras familias de transportadores, como son los transportadores *MATE* (Multi-drug and toxin extrusion). Los transportadores de la familia *MATE* se han encontrado tanto en procariontes como en eucariontes (Omote *et al.*, 2006), sin embargo no existe una secuencia consenso conservada en todas las proteínas de esta familia (Furukawa *et al.*, 2007). En plantas,

estas proteínas han sido implicadas en la salida de moléculas orgánicas pequeñas (Omote *et al.*, 2006). Magalhaes y colaboradores (2007) lograron identificar a un gene miembro de la familia MATE (*Alt_{SB}*) como un gene involucrado en la resistencia al Al³⁺ en *Sorghum bicolor*. La expresión de este gene en *Arabidopsis* le confiere la capacidad de exudar citrato en presencia de Al³⁺. De manera simultánea, Furukawa y colaboradores (2007) identificaron en *Hordeum vulgare* otro gene de la familia MATE (*HvAACT1*). Al expresar este gene en ovocitos de *Xenopus levis* se observó que, en presencia de Al, se inducía la salida de citrato al medio. Recientemente Liu y colaboradores (2009) identificaron otro miembro de esta familia en *Arabidopsis thaliana* (*AtMATE*) el cual funciona de manera independiente a *AtALMT1* para conferir tolerancia al Al en esta planta.

2.-Mecanismos de Acumulación del Al

El segundo mecanismo de tolerancia al Al involucra la acumulación de éste en el simplasto. Existen especies altamente tolerantes las cuales pueden acumular grandes concentraciones de Al sin mostrar ningún síntoma de toxicidad, a estas plantas se les conoce como hiperacumuladoras. Se considera que una planta es hiperacumuladora si puede almacenar por lo menos 1000 mg Al kg⁻¹ de tejido seco (Jansen *et al.*, 2004). Se han reportado plantas acumuladoras de Al en 55 familias de angiospermas, como las familias Hydrangeaceae, Melastomataceae, Rubiaceae, Theaceae, Symploaceae y Vochysiaceae (Jansen *et al.*, 2004).

Un caso muy conocido es el de *Camellia sinensis* la cual puede acumular Al hasta 30,000 mg kg⁻¹ de peso seco en sus hojas maduras (Matsumoto *et al.*, 1976). *Fagopyrum esculentum* puede acumular > 400 mg Al kg⁻¹ de peso seco después de 5 días de exposición a una solución de Al (Ma *et al.*, 1997) y más de 15000 mg Al kg⁻¹ de peso seco cuando es crecida en un suelo ácido. Las plantas de *Hydrangea* pueden acumular altas concentraciones de Al (> 3000 mg Al kg⁻¹ de peso seco) en sus hojas después de varios meses de crecimiento (Ma *et al.*, 1997). Existen otras plantas como *Melastoma malabathricum* en donde se ha observado que el Al, además de ser acumulado, tiene un efecto estimulador en el crecimiento de esta planta (Watanabe *et al.*, 1998).

Todas estas plantas poseen mecanismos para detoxificar el Al^{3+} internamente. La manera de detoxificar el Al involucra la formación de complejos entre el Al y ácidos orgánicos (Ma *et al.*, 2001). En *Melastoma*, el Al se encuentra sobretodo formando complejos del tipo 1:1, 1:2 y 1:3 con oxalato (Watanabe *et al.*, 1998). A excepción de la forma 1:3, las demás son formas potencialmente tóxicas para las plantas, por lo que estos complejos deben de estar contenidos en la vacuola (Ma *et al.*, 2001). En *Fagopyrum*, los cambios en las formas químicas en las que está acoplado el Al ocurren durante la absorción, traslocación y acumulación de éste. Una vez que el Al ha sido absorbido por la raíz, el Al^{3+} es quelado por el oxalato para formar el complejo Al-oxalato (1:3) en las células de la raíz. Cuando este complejo es cargado al xilema ocurre una reacción de cambio de ligando para formar el complejo Al-citrato (Ma & Hiradate, 2000). Finalmente, el Al es descargado del xilema a las células de las hojas, en este punto otra reacción de intercambio de ligando ocurre para re-establecer al complejo Al-oxalato. Este complejo es entonces almacenado en la vacuola (Ma & Hiradate 2000).

Otros mecanismos de tolerancia al Al

La exudación de ácidos orgánicos ha sido un fenómeno altamente documentado, sin embargo éste no es el único mecanismo relacionado con la exclusión Al (Yang *et al.*, 2007). Zheng y colaboradores (2005) observaron en *Fagopyrum esculentum* que tanto variedades sensibles como tolerantes exudaban las mismas cantidades de oxalato. Por su parte Piñeros y colaboradores (2005) mostraron en *Zea mays* que la tolerancia al Al entre seis genotipos diferentes no se podía explicar solamente por las diferencias en la exudación de citrato al medio.

Algunos de los mecanismos de exclusión propuestos incluyen el incremento en el pH de la superficie de la raíz (Degenhardt *et al.*, 1998), la liberación de fosfato al medio (Pellet *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2005) y modificaciones en los componentes de la pared celular (Yang *et al.*, 2008). Degenhardt y colaboradores (1998) encontraron en una mutante de *Arabidopsis thaliana* resistente al Al (*alr-104*), que la exposición a Al^{3+} inducía un incremento en el influjo neto de H^+ localizado en el ápice de la raíz. Este flujo de H^+ genera un aumento en el pH de la rizósfera el cual disminuye los efectos tóxicos del Al. Por su parte Pellet y colaboradores (1996) reportaron que la liberación

de fosfato en el ápice de la raíz, contribuye a la resistencia al Al en la variedad de *Triticum aestivum* Atlas 66. Por último, en el caso de *Fagopyrum esculentum*, Zheng y colaboradores (2005) observaron un aumento de las concentraciones de fósforo dentro de la raíz en las variedades tolerantes al Al. De acuerdo con estos autores, el fósforo podría inmovilizar al Al de manera interna.

En la variedad tolerante de arroz Nipponbare se ha observado una mayor proporción de pectinas metiladas en comparación con variedades sensibles. Esto se debe a una menor actividad de la pectina metilesterasa de la pared celular (Yang *et al.*, 2008). Las pectinas metiladas causan una reducción en la capacidad del Al para interactuar con la pared celular reduciendo los efectos tóxicos de este ion.

Transportadores ABC y tolerancia al Al

Los transportadores de tipo ABC son proteínas de membrana que acoplan el transporte de diversos sustratos a través de las membranas celulares por medio de la hidrólisis de ATP (Hollenstein *et al.*, 2007). Larsen y colaboradores (2005 y 2007) identificaron dos genes (*ALS1* y *ALS3*) que codifican proteínas de este tipo en *Arabidopsis*. *ALS3* se expresa en los hidátodos de las hojas, el floema y en la corteza de la raíz. Por su parte *ALS1* se expresa principalmente en el ápice de la raíz y en el haz vascular de la planta. De acuerdo a los sitios donde se expresan estas proteínas así como a las constantes de difusión del Al, los autores, sugieren que estas proteínas podrían estar involucradas en la redistribución del Al acumulado en tejidos sensibles para proteger a las raíces del efecto tóxico del Al.

Huang y colaboradores (2009) encontraron en *Oryza sativa* dos proteínas, STAR2 y STAR1 las cuales forman un complejo que funciona como un transportador ABC. *STAR2* codifica una proteína con siete dominios transmembranales y es homóloga a *ALS3*. *STAR1* codifica una proteína con un dominio de unión a ATP. Ambos genes se expresan principalmente en raíces y son inducidas por la exposición a Al. Cuando son expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* presentan una actividad específica para el transporte de UDP-glucosa la cual podría ser utilizada para modificar la composición de la pared celular como un mecanismo de tolerancia.

ABA y toxicidad por Al

El ABA (ácido abscísico) es una hormona involucrada en la respuesta y la adaptación al estrés (hídrico/osmótico) causado por el ambiente, alterando el metabolismo celular de las plantas e induciendo varios mecanismos de defensa (Schroeder *et al.*, 2001).

Durante el estrés hídrico, se sabe que el ABA induce el cierre de los estomas mediado por la reducción de la presión de turgencia en las células guarda (MacRobbie, 1998). Por medio de una cascada de señalización, el ABA promueve un aumento en los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Estas elevaciones a su vez, activan canales de aniones que regulan la salida de éstos de las células guarda. El flujo de aniones causa una despolarización de la membrana la cual activa canales de K^+ salientes. La salida de aniones y de potasio genera una pérdida en la turgencia y por lo tanto el cierre de los estomas (Schroeder *et al.*, 2001).

La relación que existe entre el ABA y el estrés por Al se ha estudiado muy poco. Matsumoto y colaboradores (1996) encontraron que el contenido de ABA en plantas de *Hordeum vulgare* aumentó al doble cuando se trataron a las raíces con $50 \mu\text{M AlCl}_3$ por 24 h. Con este resultado se especuló que el ABA podría estar involucrado en la señalización provocada por la presencia de Al en el medio. Un estudio posterior realizado por Shen y colaboradores (2004) demostró que en *Glycine max* el Al causó un incremento en las concentraciones de ABA endógeno; además, se observó que la adición de ABA exógeno provocó la exudación de citrato en las raíces. Estos resultados sugieren que las respuestas causadas por el Al podrían estar mediadas por la vía de transducción de señales del ABA. Por otra parte, la aplicación de ABA exógeno también provocó un aumento en la actividad de la citrato sintasa (Shen *et al.*, 2004). A pesar de estas evidencias, no se sabe exactamente el papel que tiene el ABA durante el estrés por Al, así como la vía de transducción de señales que participa en la activación de los canales de ácidos orgánicos involucrados en la tolerancia a este metal.

Fagopyrum esculentum

Fagopyrum esculentum Moench (Trigo sarraceno ó alforfón) es una herbácea anual que pertenece a la familia Poligonaceae. Sus hojas son pecioladas de forma ovalada-triangular y pueden medir de 2-8 cm de largo. Generalmente alcanza a crecer hasta 1.3 m de alto. Su centro de origen se cree que se encuentra en el sur de China (Ohnishi,

1993). El cultivo de *Fagopyrum* se considera como un cultivo secundario de subsistencia, que se siembra principalmente en zonas poco productivas. Actualmente, el trigo sarraceno es ampliamente cultivado en países como China, Japón, Rusia, Ucrania, Canadá, India, Corea del Sur, Corea del Norte, Brasil, Sudáfrica, Nepal y EUA entre otros. El grano se utiliza principalmente para consumo humano y como forraje para animales (Campbell, 1997).

Fagopyrum esculentum es considerada como una especie altamente resistente al Al. Como ya se mencionó, se postula que existen dos mecanismos responsables para esta característica, en el caso específico de *F.esculentum* el primero involucra la secreción de oxalato por la raíz. Esta respuesta es muy rápida, comenzando dentro de los primeros 30 min de exposición al Al (Zheng *et al.*, 1998). Y el segundo mecanismo involucra la acumulación de Al en la forma Al:oxalato dentro de las vacuolas en las hojas. *F.esculentum* llega a acumular >400 mg Al kg^{-1} de peso seco en sus hojas (Ma *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2002). La mayoría de los estudios en esta especie se han realizado con la variedad asiática Jianxi y no existen estudios reportados sobre variedades pertenecientes al continente americano como la variedad Mancan.

La importancia que tiene esta planta como un cultivo sustituto, su corto ciclo de vida (4-5 semanas), así como su capacidad de crecer en suelos ácidos, y por consiguiente de tolerar los efectos tóxicos del Al, hacen de *Fagopyrum* una planta idónea para estudiar los mecanismos fisiológicos implicados en la resistencia a este metal.

Con base en estos antecedentes, y si *Fagopyrum esculentum* es una planta tolerante al Al, entonces uno de sus mecanismos de tolerancia sería el expresar proteínas capaces de regular la exudación de oxalato y/o la acumulación del Al en sus hojas. Probablemente, en esta planta existen transportadores homólogos a los previamente reportados en otras especies, relacionados con la tolerancia al Al. Asimismo la regulación de estos transportadores podría estar mediada por alguna hormona involucrada en respuestas al estrés como lo es el Ácido Abscísico.

Objetivo General

Evaluar la respuesta al Al en raíces de plántulas de *Fagopyrum esculentum* var. Mancan, así como el papel del ácido abscísico (ABA) en relación con la expresión de transportadores involucrados en la tolerancia.

Objetivos particulares:

Determinar el efecto del Al en el crecimiento radicular de plántulas de 3-5 días de edad.

Evaluar la acumulación de Al así como el posible daño celular causado por este.

Determinar las concentraciones de ácidos orgánicos exudados así como dentro de las raíces.

Determinar los niveles endógenos de ABA en las raíces en relación con las concentraciones de Al y el tiempo de exposición.

Caracterizar a nivel molecular alguno de los posibles transportadores involucrados en la tolerancia al Al en las raíces de *Fagopyrum esculentum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Todos los experimentos se realizaron con semillas de *Fagopyrum esculentum* cv. Mancan, obtenidas de *Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá*.

Evaluar la respuesta al Al en raíces de plántulas de *Fagopyrum esculentum* var. Mancan, así como el papel del ácido abscísico (ABA) en relación con la expresión de transportadores involucrados en la tolerancia.

Objetivos particulares:

Determinar el efecto del Al en el crecimiento radicular de plántulas de 3-5 días de edad.

Evaluar la acumulación de Al así como el posible daño celular causado por este.

Determinar las concentraciones de ácidos orgánicos exudados así como dentro de las raíces.

Determinar los niveles endógenos de ABA en las raíces en relación con las concentraciones de Al y el tiempo de exposición.

Caracterizar a nivel molecular alguno de los posibles transportadores involucrados en la tolerancia al Al en las raíces de *Fagopyrum esculentum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Todos los experimentos se realizaron con semillas de *Fagopyrum esculentum* cv. Mancan, obtenidas de *Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá*.

Determinación del crecimiento radicular e incremento en el peso seco

Crecimiento Radicular e Incremento en el Peso Seco

Con la finalidad de evaluar el efecto del Al en el crecimiento de *F. esculentum*, se determinó el crecimiento radicular así como el incremento en el peso seco. Para ello, semillas de *F. esculentum* se sumergieron en agua destilada para su imbibición. Después de 2 h las semillas fueron colocadas sobre Agar al 1% en cajas de Petri. Las cajas se colocaron en una cámara de crecimiento (Labline Instruments, Inc. USA) a 26° C en la oscuridad. Una vez germinadas (48 h después de imbibidas), las plántulas fueron transferidas a recipientes de 0.5 L con una solución de CaCl₂ 0.5 mM a pH 4.5, con aireación continua y por 24 h con el fin de aclimatizar a las plántulas al ambiente ácido. Posteriormente, se eligieron 20 plántulas de tamaño similar y se transfirieron a una solución de CaCl₂ 0.5 mM, a pH 4.5 con 0, 25, 50 y 100 µM de AlCl₃. En estas soluciones no se añadió ningún otro nutrimento ya que estos podrían interactuar con el AlCl₃ disminuyendo su actividad. El incremento en la elongación radicular (expresado como Ec para el control y Et para los tratamientos) se registró a las 0, 12, 24, 48 y 72 h. A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa relativa de crecimiento radicular (RRG) con respecto al control (0 µM de AlCl₃) con la siguiente fórmula:

$$RRG (\%) = \Delta E_{c_{t_n}} / \Delta E_{t_{t_n}} * 100$$

En donde $\Delta E_{c_{t_n}} = E_{c_{t_n}} - E_{c_{t_{n-1}}}$ y $\Delta E_{t_{t_n}} = E_{t_{t_n}} - E_{t_{t_{n-1}}}$ (siendo Ec y Et el incremento en la elongación radicular para el control y el tratamiento respectivamente y t_n un tiempo determinado)

Por otro lado, plántulas de todos los tratamientos fueron cosechadas en los tiempos mencionados anteriormente para la determinación del incremento en biomasa. Para este ensayo, las raíces fueron retiradas y guardadas en una bolsa de papel y colocadas en un horno a 45° C por 24 h. El peso seco de la raíz fue registrado por medio de una balanza (OHAUS). Los ensayos de crecimiento radicular y de incremento en el peso seco fueron realizados por triplicado (n = 20). Los datos obtenidos para ambos ensayos fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico JMP 7 (SAS Institute Inc.). En los casos donde

se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

Localización del Al dentro de la raíz y evaluación de la viabilidad celular.

Con el fin de localizar el Al dentro de las raíces se utilizaron las tinciones de Morin, Hematoxilina y Lumogallion.

Tinción con Morin y Hematoxilina

El Morin (2',3',4',5,7-pentahidroxi-flavanona) y la Hematoxilina son indicadores histoquímicos utilizados para detectar la presencia de Al. Para la tinción con Morin, plántulas de *F. esculentum* de 24 h de edad fueron tratadas con 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 . Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento las raíces de las plántulas fueron lavadas en amortiguador MES (pH 5.5) por 10 min y luego teñidas con 100 μM de Morin (SIGMA) en el mismo amortiguador por 1 h. La fluorescencia emitida por el Morin fue observada utilizando un microscopio (Zeiss, Alemania) acoplado a un sistema de epifluorescencia. Las muestras fueron fotografiadas con una cámara digital (Nikon, Japón) acoplada al microscopio.

Para la tinción con hematoxilina plántulas de *F. esculentum* fueron sometidas a los mismos tratamientos antes mencionados y lavadas con agua destilada durante 10 min. Después del lavado, las raíces se colocaron durante 15 min en una solución de hematoxilina (0.2 g de hematoxilina y 0.2 g de NaIO_3 en 100 ml de agua desionizada). Posteriormente, las raíces fueron lavadas con agua desionizada. Las muestras se montaron en portaobjetos y fueron observadas en un microscopio estereoscópico (Zeiss, Alemania) y fotografiadas.

Tinción con Lumogallion

El Lumogallion (ácido sulfónico 3-[2,4 di-hidroxifenilazo]-2-hidroxi-5-clorobenzoico) es un colorante específico que sirve para localizar Al en el simplasto y apoplasto. La tinción fue llevada a cabo basándose en el método previamente descrito por Silva y colaboradores (2000). Plántulas de *F. esculentum* de 24 h de edad fueron tratadas con 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 . Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento las raíces de cada uno de los tratamientos fueron fijadas en formaldehído al 3.7% disuelto en amortiguador PBS (0.14M NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5mM Na_2HPO_4 , 1.5mM KH_2PO_4 ; pH

7.3). Después de la fijación, las muestras se lavaron con el amortiguador MTSB (50mM PIPES, 5mM MgSO₄ 7H₂O, 5mM EGTA; pH 6.9) por 30 min y en PBS por 15 min. Las muestras fueron deshidratadas de forma creciente en una serie de etanol al 30, 50, 70, 90 y 97% disueltos en amortiguador PBS. Luego de ser deshidratadas, las muestras fueron incluidas en una cera a base de PEG 400 (poli-etilen-glicol) al 90% y 1-hexadecanol al 10%. Ya con las muestras incluidas se procedió a realizar cortes transversales y longitudinales a la altura del ápice radicular utilizando un microtomo (Reichert). Las preparaciones fueron rehidratadas con PBS y lavadas en un amortiguador de acetatos (10mM acetato de sodio; pH 5.2) por 15 min. Las preparaciones fueron colocadas en una solución de lumogallion (10µM en 10mM de acetato de sodio; pH 5.2) por 60 min dentro de un horno a 50° C. Después de dos lavados con amortiguador de acetatos se añadió el reactivo de Hoetsch (bis-benzamidina) (90% en glicerol) con la finalidad de teñir los núcleos de las células y contrastar la tinción del lumogallion. Las muestras fueron observadas utilizando microscopía confocal (Leica, Alemania).

Tinción vital

Para visualizar el posible daño en las membranas inducido por el Al, se llevó a cabo una doble tinción utilizando diacetato de fluoresceína (FDA) y Yoduro de propidio (PI) basándose en el método de Jones & Senft (1985). La fluoresceína puede penetrar al interior de las células en forma de diacetato. Las enzimas con actividad de esterasa dentro de la célula rompen el enlace ester del FDA liberándolo en el citosol y provocando la emisión de fluorescencia. Por su parte la membrana plasmática es impermeable al PI. Si las membranas se encuentran dañadas, el PI puede penetrar al citoplasma y reaccionar con los ácidos nucleicos originando una coloración rojiza. Plántulas de *F. esculentum* de 24 h de edad fueron tratadas con 0, 25, 50 y 100 µM de AlCl₃. Después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento las raíces de cada uno de los tratamientos fueron incubadas en FDA (0.04 ml/ 10 ml PBS) durante 3 minutos, lavadas con amortiguador PBS y colocadas en IP (1 mg /50 ml PBS) por 10 minutos. Las muestras fueron montadas en un portaobjetos y observadas en un microscopio de epifluorescencia (Zeiss) utilizando una excitación de 450 nm y un filtro de emisión de 510 nm para la visualización de la fluoresceína.

Concentración de ácidos orgánicos y niveles de ABA

Cuantificación de ácidos orgánicos exudados y dentro de la raíz por HPLC

Para evaluar los niveles de exudación de citrato, malato y oxalato en el medio así como las concentraciones de estos ácidos dentro de la raíz se utilizó la técnica de HPLC. Para ello, plántulas de *F. esculentum* de 24 h de edad fueron tratadas con 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 . Después de 0.5, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento se colectó el medio (1.5 ml) con el fin de recolectar los exudados de la raíz. Para remover el exceso de Cl, las muestras fueron pasadas por una columna de cromatografía OnGuard-AG (Dionex, Sunnyvale, CA, USA.). Posteriormente para eliminar el exceso de Al^{3+} , las muestras fueron colocadas dentro de tubos de 2 ml que contenían 0.5ml de resina de intercambio catiónico (Dowex 50W X8, H^+ ; Fluka, Chemie, Seelze, Alemania). Las muestras fueron incubadas durante 3 h en un agitador rotatorio a temperatura ambiente para luego ser filtradas. Finalmente fueron concentradas con un sistema tipo Speed-vac (Labconco, Corp.) y resuspendidas en 0.5 ml de H_2SO_4 0.5 mM. Por otro lado, las raíces utilizadas en este ensayo fueron molidas con un homogenizador de tejido (Polytron; Capitol Scientific Inc, USA.) en agua ultrapura 18 M (Milli-Q Water System; Millipore, Bedford, MA Millipore). Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g x 10 min a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se colectó el sobrenadante. Las muestras de ambos ensayos (medio y raíces) fueron analizadas por medio de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; Waters ME) con una fase móvil de H_2SO_4 (5 mM). Ambos ensayos fueron realizados por triplicado. Los datos obtenidos para ambos ensayos fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico JMP 7 (SAS Institute Inc.). En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

Cuantificación de los niveles de ABA

Con el fin de determinar una posible correlación entre los niveles de ABA y el patrón de exudación de ácidos orgánicos así como de la concentración de estos dentro de las

raíces en respuesta al Al, se cuantificaron los niveles de ABA endógenos de las raíces en plántulas de *F. esculentum*. Plántulas de *F. esculentum* fueron tratadas con 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 . Se realizaron cosechas después de 0.5, 6, 12, 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Las raíces fueron separadas de la planta, molidas en nitrógeno líquido e incubadas en metanol (Baker analyzed) al 100% durante 24 h. Posteriormente, el contenido de ABA se cuantificó utilizando un kit de detección de ABA por inmunoensayo (SIGMA). Se llevaron a cabo cuatro ensayos independientes y dos repeticiones por inmunoensayo. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un Análisis de Varianza con un nivel de probabilidad de $p \leq 0.05$, utilizando el programa estadístico JMP 7 (SAS Institute Inc.). En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples utilizando el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

Bioensayo con Ácido Abscísico exógeno

Las concentraciones de ABA exógeno utilizadas en estos bioensayos se eligieron en base a lo reportado previamente por Shen y colaboradores (2005). Para demostrar que estas concentraciones tenían algún efecto fisiológico en las raíces de *Fagopyrum* se evaluó el efecto de esta hormona en el crecimiento radicular. Plántulas de *Fagopyrum esculentum* de 48 h de edad fueron colocadas en recipientes de 0.5 L con una solución de CaCl_2 0.5 mM a pH 4.5, con aereación continua durante 24 h. Posteriormente, se eligieron 20 plántulas de tamaño similar y se transfirieron a una solución de CaCl_2 0.5 mM, a pH 4.5 con 0, 1 y 10 μM de Ácido Abscísico (SIGMA) disuelto en Etanol al 100%. El incremento en la elongación radicular (expresado como Ec para el control y Et para los tratamientos) se registró a las 0, 12, 24, 48 y 72 h. A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa relativa de crecimiento radicular (RRG) con respecto al control (0 μM de ABA) (utilizando la misma fórmula descrita para los ensayos con Al).

Caracterización molecular de un transportador del tipo ABC en las raíces de *Fagopyrum esculentum* var. Mancan

Para obtener la clona del posible transportador inducible por Al las secuencias reportadas para los transportadores del tipo ABC en *Arabidopsis thaliana* (NP_181270) y *Oryza sativa* (BAA90494), se alinearon por medio de una matriz de tipo BLOSSUM

80 utilizando el software MacVector 10.5.1 (Symantec Corporation, USA.). Con las secuencias alineadas, se diseñaron oligonucleótidos degenerados de las regiones homologas. Después de obtener los oligos degenerados, se aisló el RNA total proveniente de las raíces de *F.esculentum*, tratadas por 72 h con 100 μ M de AlCl₃ utilizando un kit de extracción (MO-BIO Laboratories Inc, USA). A partir de esta extracción, el mRNA se convirtió a cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y el oligo-dt (Invitrogen) de acuerdo a las especificaciones determinadas por la casa comercial. Después de obtener el cDNA, se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR. Los oligonucleotidos diseñados para el transportador así como el tamaño esperado del producto y el programa de PCR se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Secuencias de los oligonucleotidos utilizados así como el programa de PCR utilizado para las amplificaciones.

Transcrito	Secuencia	Tamaño esperado del producto	Programa de PCR
<i>FeALS</i>	F-5'ATCGGATTT/CGTTCTT/CCAG/A 3' R-5'TTCATG/AGTAACT/GCCG/AGTG 3'	264pb	Un ciclo de desnaturalización inicial (90° C por 3 min); 30 ciclos de 3 pasos (90° C por 30s para la desnaturalización, 57° C por 30 s para la hibridación, y 70° C por 30 s para la extensión); y de un ciclo final de extensión (70° C por 10 min).
<i>Actina</i>	F-5'CTGCCATGTATGTTGCCATC 3' R-5'CAGCTTCCATTCCGATCATT 3'	400pb	Un ciclo de desnaturalización inicial (90° C por 3 min); 30 ciclos de 3 pasos (90° C por 30s para la desnaturalización, 57° C por 30 s para la hibridación, y 70° C por 30 s para la extensión); y de un ciclo final de extensión (70° C por 10 min).

El producto obtenido por PCR fue cargado en un gel de agarosa al 1% y separado por medio de un aparato de electroforesis (Horizon 11-14, Life Technologies). Después de la corrida, la banda del tamaño deseado se cortó y purificó por medio de una columna (Ultrafree-DA; Millipore). Ya purificado, el producto de PCR se ligó a un vector de

clonación por medio del sistema pGEM-T Easy Vector (Promega). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de células competentes de la línea DH5 α por medio de un choque térmico. Después de la transformación, las células se sembraron en cajas Petri con medio LB/ampicilina/X-Gal/IPTG. Las cajas se colocaron en un horno a 37° C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se procedió a seleccionar a las colonias transformadas. Las colonias de color blanco (transformadas) se colectaron y sembraron en tubos con 3 ml de medio LB con ampicilina. Los tubos se colocaron en un horno rotatorio en la oscuridad y a una temperatura de 37° C por 16 h. Después de este tiempo se llevo a cabo la extracción del plásmido de las células. Para ello se utilizó el kit de extracción MiniPrep (Qiagen). Con la finalidad de corroborar que el plásmido contenía el producto de PCR, se tomó una alícuota del mismo y se digirió con la enzima de restricción EcoRI (SIGMA) por 1 h en un baño de agua a 37°C. El plásmido digerido con la enzima de restricción se cargó en un gel de agarosa al 1% y se separó por medio de un sistema de electroforesis (Horizon 11-14, LifeTechnologies). Aquellos vectores donde se observó la banda correspondiente con el inserto fueron mandados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. A partir de la secuencia se realizó un BLAST para determinar la similitud con transportadores de otras especies. La secuencia parcial obtenida se nombró *FeALS* (**F**agopyrum **e**sculentum **A**Luminum **S**ensitive) y su número de acceso para el GenBank es GU327650.1

RT-PCR

Con la finalidad de evaluar si el Al tiene algún efecto en la expresión del transportador *FeALS* así como si este transportador se expresa al aumentar los niveles exógenos de ABA, se llevó a cabo un PCR semicuantitativo. Plántulas de *F. esculentum* de 24 h de edad se trataron con 0, 25, 50, 100 μ M de AlCl₃ y con 1 y 10 μ M de ácido abscísico (SIGMA) por 12, 24, 48 y 72 h. Con cada uno de estos tratamientos se realizó una extracción de RNA total y a partir de este, se obtuvo el cDNA correspondiente utilizando la misma técnica mencionada anteriormente. Se llevaron a cabo amplificaciones por triplicado para cada uno de los tratamientos utilizando oligonucleotidos para el transportador *FeALS* y la *Actina* (como control interno). Las

condiciones utilizadas en estas reacciones fueron las mismas que se muestran en la tabla anterior con excepción del número de ciclos, el cual aumentó a 35. El número de ciclos se eligió de acuerdo a una curva de reacciones de PCR utilizando 30, 33, 36, 39, 42 y 45 ciclos. En este caso, 35 ciclos corresponden a la fase exponencial del proceso de amplificación. Los productos del PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se separaron por electroforesis. Las intensidades de cada una de las bandas obtenidas se analizaron por medio de un sistema de detección de imágenes (Gel logic 100 (KODAK, USA)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

***Fagopyrum esculentum* presenta un periodo de aclimatación para contrarrestar los efectos tóxicos del Al**

Con el objetivo de determinar la respuesta de *F.esculentum* al Al, se llevaron a cabo una serie de experimentos donde se analizó el crecimiento de la raíz en plántulas expuestas a diferentes concentraciones de AlCl₃. Después de exponer las plántulas por 12 h al Al, en cada uno de los tratamientos se presentó una disminución en la tasa relativa de crecimiento de la raíz (RRG) en comparación con las plántulas control (**Figura 2**). A partir de las 24 h de tratamiento, la RRG se recuperó en los tratamientos de 25 y 50 µM de AlCl₃; A las 72 h, las plántulas expuestas a 25µM de AlCl₃ presentaron una RRG igual a las control, mientras que las plántulas expuestas a 50 µM de AlCl₃ se habían recuperado en casi un 80%. En este tiempo, las plántulas expuestas a 100 µM de AlCl₃

no presentaron recuperación alguna y su RRG se mantuvo inhibida en el mismo rango durante todo el bioensayo (~40%). La inhibición en la elongación radicular es el principal síntoma de toxicidad por el Al (Barceló & Poschenreider, 2002). Estos datos sugieren que 100 μM de AlCl_3 es una concentración tóxica para *F.esculentum*. Sin embargo, de acuerdo con Martínez-Rendón (comunicación personal, 2010), en tiempos posteriores a las 72h de exposición a 100 μM de AlCl_3 , se observa una recuperación en la RRG de las raíces la cual alcanza su crecimiento normal a los 15 días de tratamiento. Estos resultados indican que la tolerancia al Al^{3+} en *F.esculentum* es un proceso que requiere de un tiempo de aclimatación para contrarrestar los efectos tóxicos de este ion. Al complementar estos resultados con otras medidas de crecimiento como el incremento en el peso seco, se observó que en este rubro no existen diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos y el control (**Figura 3**). Si bien las plántulas expuestas a 100 μM de AlCl_3 habían perdido en gran medida su capacidad de elongación radicular, la capacidad de acumulación de biomasa no se vio alterada. Probablemente, estas plántulas están generando un mayor número de raíces laterales en comparación con el Control (**Figura A1**). Sería necesario determinar el número de primordios de raíces laterales con el fin de hacer un análisis mas profundo y confirmar esta hipótesis.

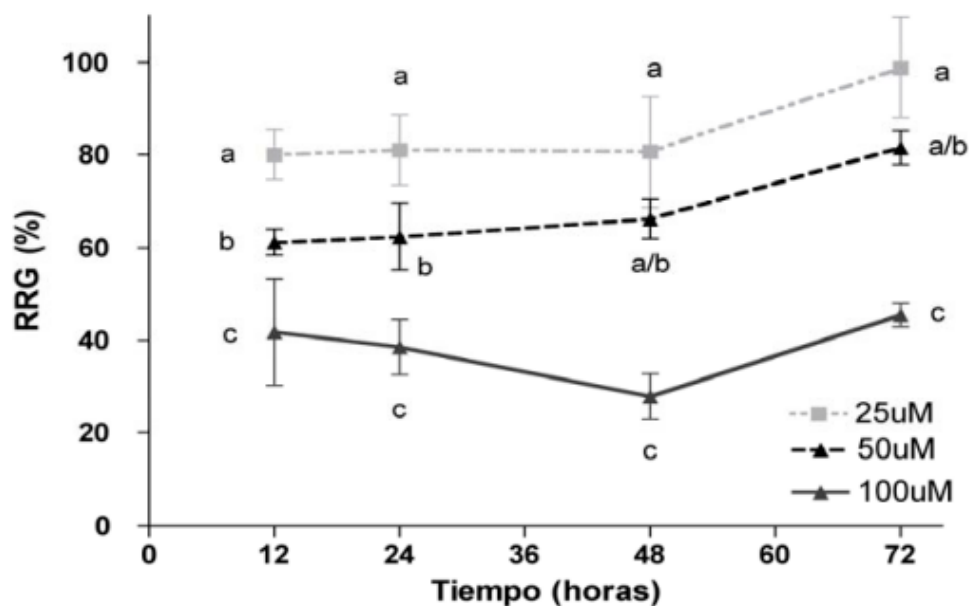


Figura 2.-Tasa relativa de crecimiento de la raíz (%) con respecto al control para todos los tratamientos. En la gráfica se muestra el promedio de 3 ensayos independientes (n= 20), las barras de error denotan el error estándar del ensayo. Las letras muestran diferencias significativas de acuerdo al ANOVA (F= 67.93, $p \leq 0.05$).

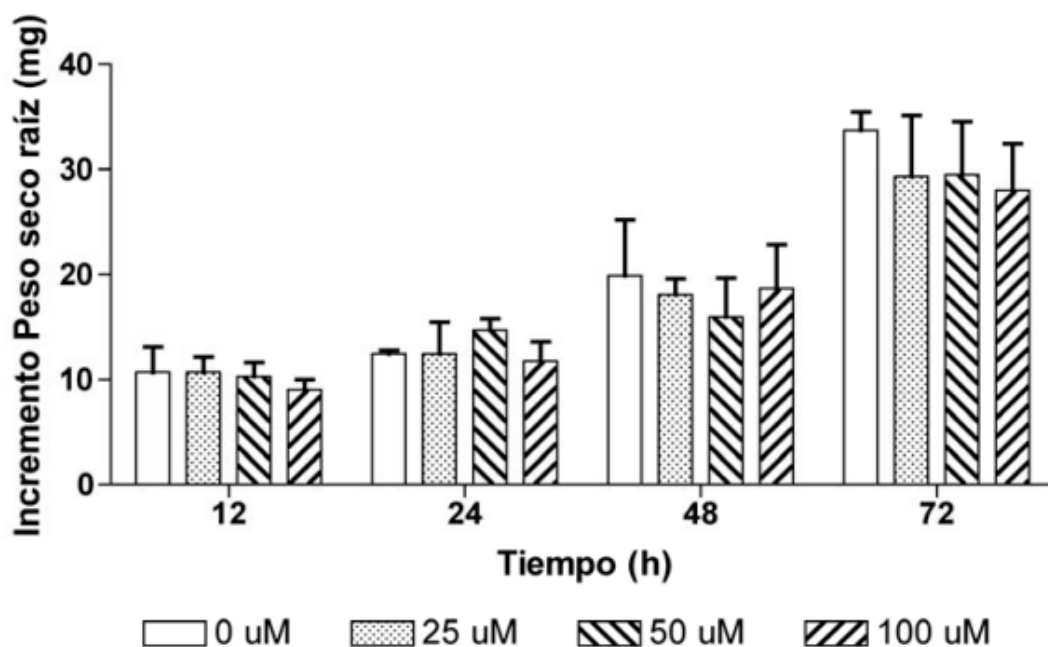


Figura 3.- Incremento en el peso seco para todos los tratamientos. En la gráfica se muestra el promedio de 3 ensayos independientes (n=15), las barras de error denotan el error estándar del ensayo. Después de realizar un ANOVA (F= 0.5; $p \leq 0.75$) se determinó que no existen diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los tiempos.

Concentraciones altas de Al provocan un daño celular en la región del ápice radicular

Los principales efectos tóxicos del Al se localizan en la zona distal de transición dentro del ápice radicular (Sivaguru & Horst, 1998). Esta es una zona en la que las células meristemáticas terminan la fase de división y se preparan para la elongación celular (Baluska *et al.*, 2001). Con la finalidad de evaluar la integridad celular en toda la región del ápice radicular se llevó a cabo una tinción con yoduro de propidio en cada uno de los tratamientos (**Figura 4**). El yoduro de propidio es un colorante que penetra a las células solamente cuando presentan algún daño a nivel de la membrana, provocando una coloración rojiza. Las imágenes muestran que al incrementar la concentración de Al en el medio, aumenta el desprendimiento de las células de la periferia de la cofia (*border cells*) así como el daño celular. Las plántulas expuestas a 25 μM de AlCl_3 no presentan daño en la zona meristemática ni en la zona de transición durante las primeras 24h. A partir de las 48h se observa un daño ligero en las células de la periferia de la cofia, el cual es más evidente a las 72h. Para los tratamientos de 50 y 100 μM de AlCl_3 el daño comienza a partir de las 24h en las células de la periferia de la cofia. A las 48h el desprendimiento de las células de la periferia aumenta. El daño se intensifica en esta zona y se extiende hacia la cofia y la región meristemática, siendo más intenso en las raíces tratadas con 100 μM de AlCl_3 .

Las células periféricas de la cofia se desprenden de manera natural y mantienen su viabilidad a medida que la raíz crece. En la mayoría de las especies, estas células pueden producir paredes secundarias lignificadas y excretar diversos compuestos al medio (Hawes *et al.*, 2003). En *Phaseolus vulgaris* (Miyasaka & Hawes, 2001) y en *Triticum aestivum* (Zhu *et al.*, 2003) el Al induce la muerte de las células de la periferia tanto en variedades tolerantes como sensibles. En las variedades más sensibles de estas especies, el Al también evita el desprendimiento de estas células. Los datos obtenidos para *F. esculentum* concuerdan con lo reportado previamente por estos autores. El Al induce la muerte de las células periféricas de la cofia en *F. esculentum*. Miyasaka & Hawes (2001) plantean que las células de la periferia podrían tener algún papel en la tolerancia al Al; Estas células podrían secretar mucílago para neutralizar al Al o bien, la

muerte de estas células podría generar alguna señal hacia las raíces sobre la presencia de un elemento tóxico en la rizósfera.

Además del daño observado en las células periféricas, también se observó, principalmente en 100 μM de AlCl_3 , que el Al puede causar un daño membranal a la altura de la cofia y el meristemo de las raíces de *F.esculentum* (**Figura 4**). Bennet & Breen (1991) han propuesto que la cofia podría retrasar la entrada del Al hacia los tejidos más sensibles como el meristemo y la zona de transición. Contrario a esta hipótesis, Ryan *et al.*, (1993) observaron que en variedades sensibles de maíz, la remoción de la cofia no alteraba la respuesta de las raíces al Al en cuanto al crecimiento. Sin embargo, en dicho trabajo se observó que al remover la cofia, la región meristemática acumulaba más Al y presentaba un daño celular mayor. La cofia y las células periféricas podrían estar funcionando como una barrera protectora, evitando que el Al dañe la zona del meristemo en *F.esculentum*.

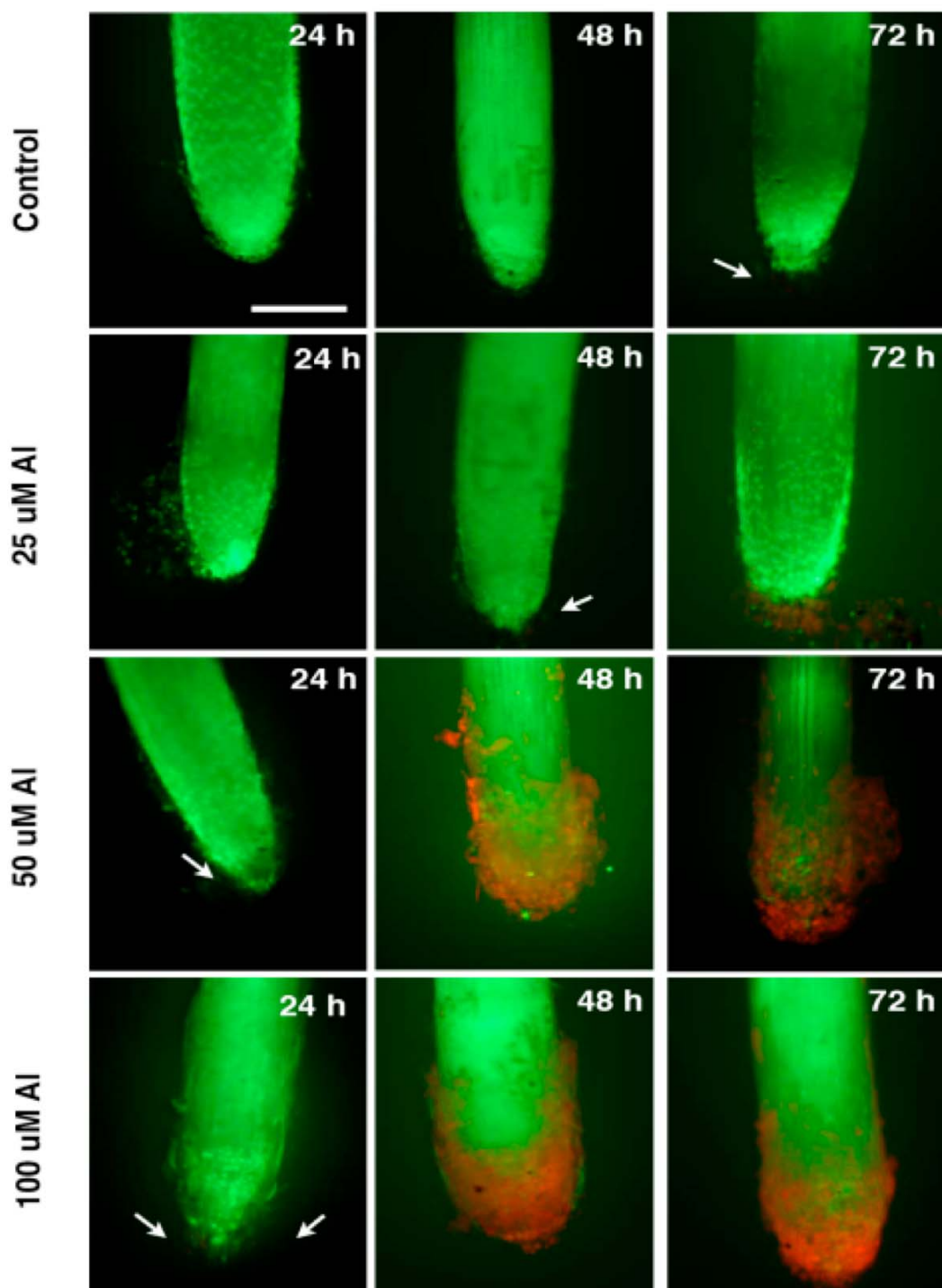


Figura 4.- Tinción con Ioduro de Propidio (Tinción Vital) en plántulas de *Fagopyrum esculentum* expuestas a 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 durante 24, 48 y 72 horas . Las flechas denotan zonas donde se observa daño celular ligero. Barra de escala, 1 mm

El Al se acumula en los ápices radiculares y co-localiza con las zonas más dañadas

Con el fin de localizar al Al dentro de las raíces, se utilizaron las tinciones con Hematoxilina y con Morin (**Figura 5A y 5B**). El color violeta en la tinción con Hematoxilina y el aumento en la fluorescencia en la tinción con Morin son indicadores de la presencia de Al en las raíces. Estas tinciones muestran que al aumentar las concentraciones de Al en el medio, la acumulación de éste también incrementa dentro de la planta. El Al se acumula sobretodo en el ápice radicular durante las primeras horas de exposición, siendo los tratamientos de 50 y 100 μM de AlCl_3 aquellos en donde se observa una mayor intensidad en ambas tinciones.

Esta zona corresponde a la región donde también se observa el mayor daño celular de acuerdo a la tinción con yoduro de propidio (**Figura 4**). En los tratamientos de 50 y 100 μM de AlCl_3 la acumulación del Al ocurre antes que comience el daño celular. Estos datos sugieren que el daño celular causado por el Al es un evento posterior a la inhibición en la elongación celular la cual es inmediata (**Figura 2**),

Con el propósito de observar la localización del Al a nivel subcelular se llevaron a cabo cortes de raíz a la altura de la zona meristemática los cuales fueron teñidos con Lumogallion y con reactivo de Hoetsch (como contraste nuclear) (**Figura 6 y 7**). El Lumogallion permite detectar el Al con una mayor resolución y especificidad en comparación con las tinciones anteriores (Kataoka *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2000). Las imágenes muestran cómo el Al se ubica en todos los tejidos de la raíz. Sin importar la concentración en el medio, el Al se localiza en la epidermis, corteza y hasta la región del cilindro central (**Figura 6**). Un acercamiento a la zona de la corteza (**Figura 7**) muestra que el Al se asocia a las paredes celulares y al citoesqueleto. Al contrastar estas imágenes con el reactivo de Hoetsch el cual tiñe los núcleos celulares de un color azul (**Figura 7**), se observa que el Al co-localiza con los núcleos.

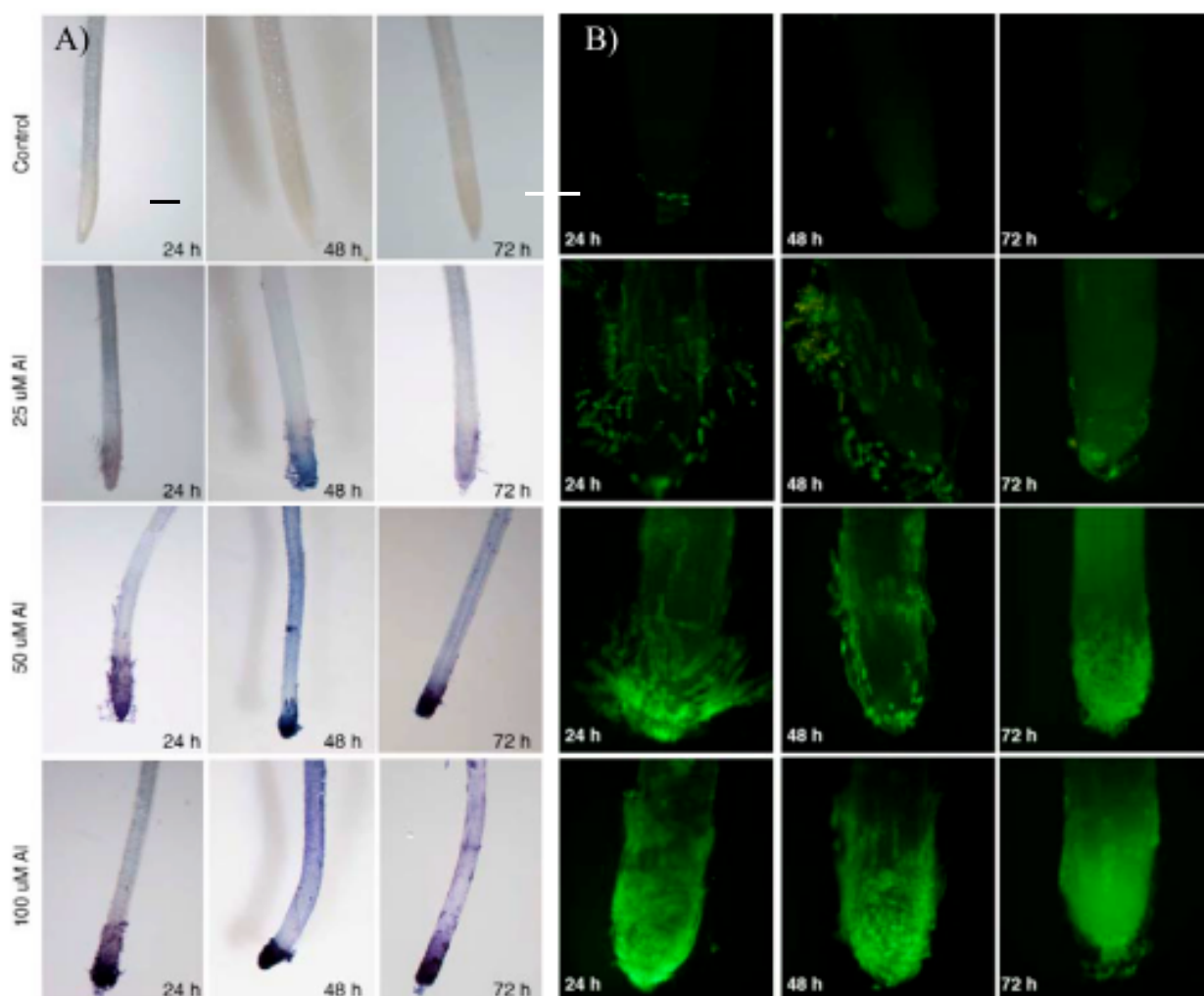


Figura 5.- Acumulación de Al en las raíces de *F. esculentum*. Por medio de la tinciones con Hematoxilina (A) y Morin (B) se identificó la acumulación de aluminio en raíces expuestas a 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 durante 24, 48 y 72 horas. La barra en **A** corresponde a 1mm y en **B** a 0.5 mm.

En estas imágenes (**Figura 6 y 7**) se observa que la intensidad de la tinción varía con el tiempo de exposición y con la concentración de AlCl_3 . Esto puede deberse a fallas experimentales. Las muestras no fueron observadas el mismo día lo cual provocó que en algunos casos la intensidad de la fluorescencia disminuyera. A pesar de ello fue posible localizar al Al a nivel subcelular.

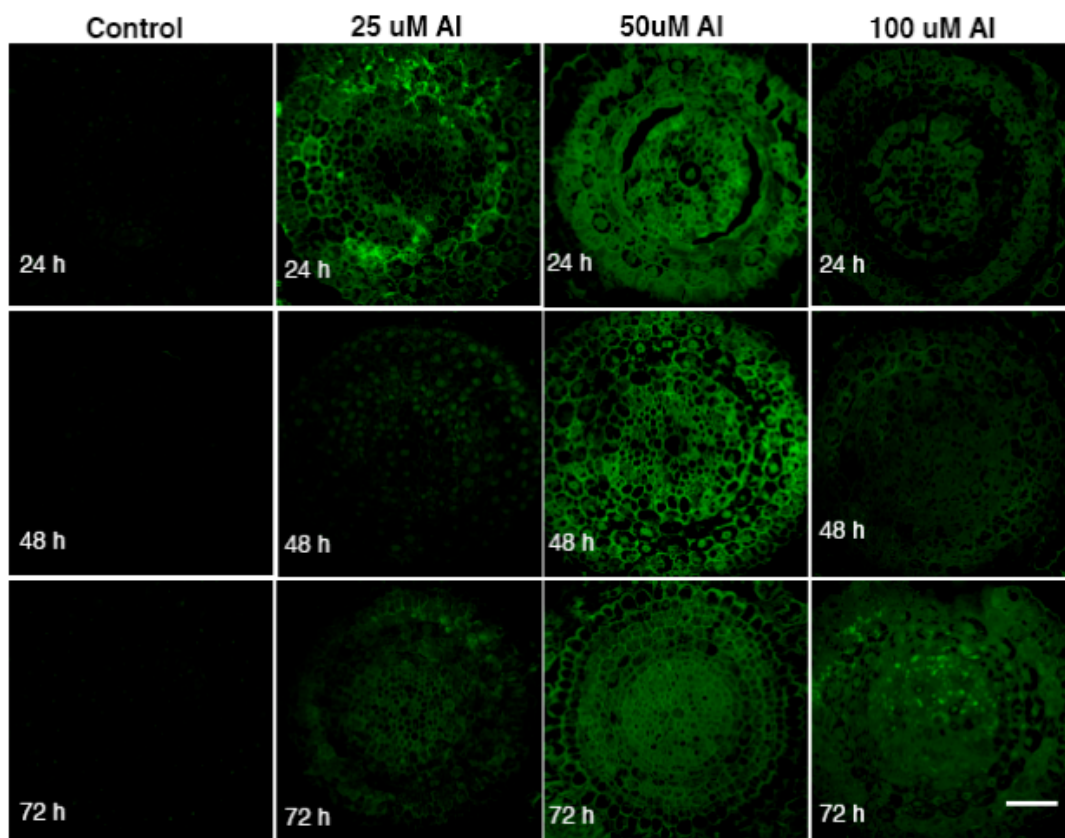


Figura 6.- Localización con Lumogallion en cortes de raíces expuestas a 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 durante 24, 48 y 72. El aluminio se localiza a lo ancho de toda la raíz, desde la epidermis hasta la región de los haces vasculares. Barra de escala, 100 μm .

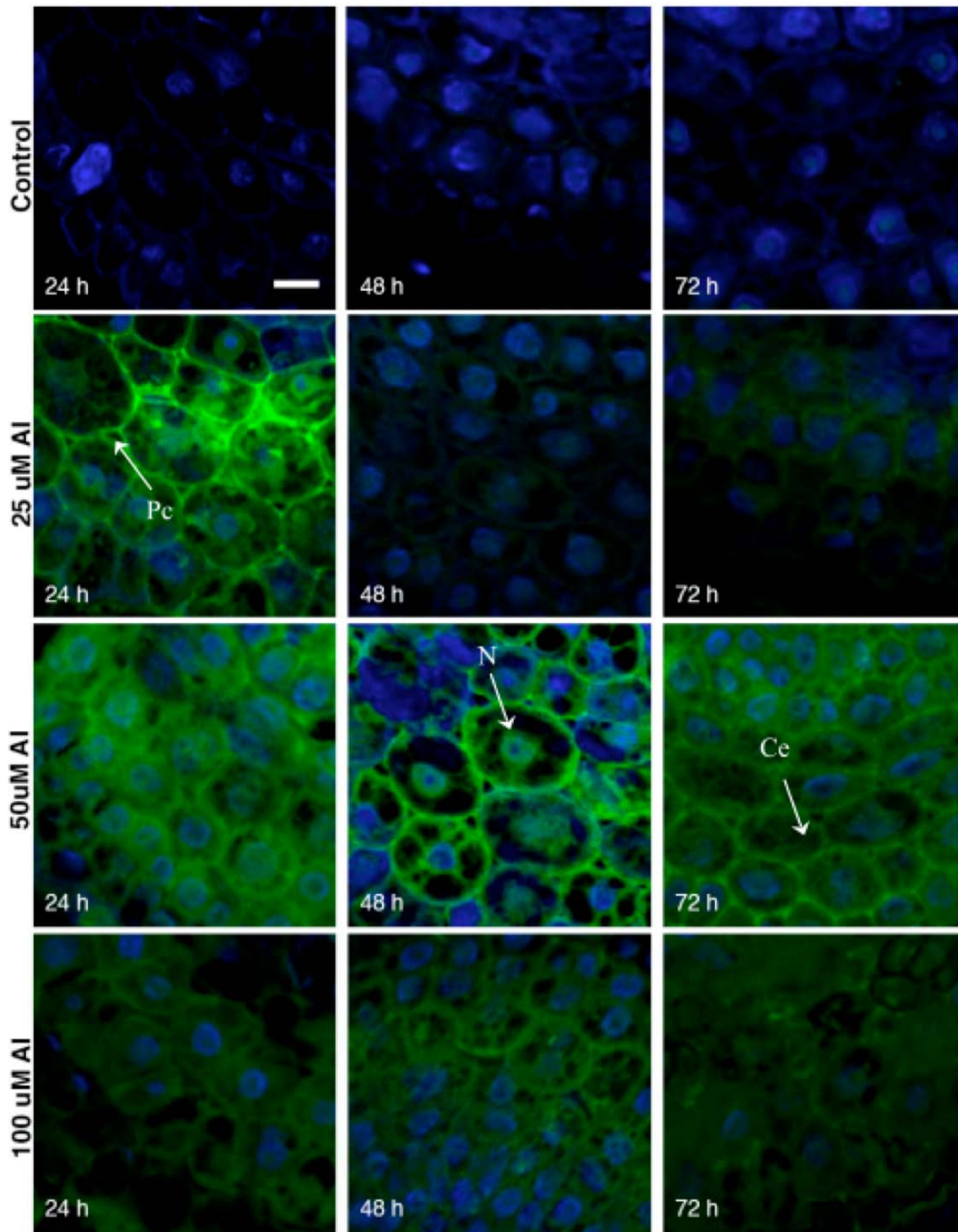


Figura 7.- Localización intracelular del Al. El color verde representa al aluminio acumulado en la célula mientras que el color azul corresponde a los núcleos celulares. El aluminio se encuentra asociado a las paredes celulares (**Pc**), al citoesqueleto (**Ce**) y co-localiza con los núcleos (**N**) celulares en todos los tratamientos. Escala de la barra, 10 μ m.

Estudios comparativos entre variedades tolerantes y sensibles en *Glycine max* (Silva *et al.*, 2000) y en *Zea mays* (Amenós *et al.*, 2009) han mostrado que en las variedades más sensibles, el Al penetra en las células y se localiza en los núcleos. A diferencia de estas especies, se ha reportado que *F. esculentum* tiene la capacidad de acumular el Al y translocarlo hacia las vacuolas de la parte aérea de la planta (Ma *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1998). Altas concentraciones de Al en el medio ($>50 \mu\text{M AlCl}_3$), podrían estar saturando los mecanismos de transporte/acumulación. Esta saturación podría estar provocando que el Al se mantenga más tiempo en esta región y cause un mayor daño a nivel celular el cual puede estar contribuyendo a la disminución en la elongación radicular.

Las concentraciones de ácidos orgánicos en las raíces no varían entre tratamientos

Otro de los mecanismos propuestos en *F. esculentum* para tolerar el Al involucra la exudación de oxalato al medio (Ma *et al.*, 1998). De acuerdo con Klug & Horst (2010), el oxalato es exudado principalmente en la región sub-apical de la raíz, es decir, de 6 a 20 mm por arriba del ápice radicular. *F. esculentum* exuda ácidos orgánicos de una manera dosis dependiente la cual comienza durante los primeros minutos de exposición al Al (Ma *et al.*, 1997). Si bien la exudación de ácidos orgánicos contribuye a la tolerancia al Al en esta especie (Ma *et al.*, 1998), no hay una relación directa entre el patrón de exudación y los grados de tolerancia entre variedades de *F. esculentum* (Zheng *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se buscó cuantificar los niveles de oxalato, citrato y malato; tanto exudados como dentro de la raíz utilizando la técnica de HPLC. Las concentraciones de ácidos orgánicos dentro de las raíces no difieren entre tratamientos (ANOVA; $F_{\text{oxalato}}=0.4784$: $p \leq 0.97$; $F_{\text{citrato}} = 0.428$: $p \leq 0.9881$; $F_{\text{malato}}=0.1539$: $p \leq 0.999$) (**Figura 8**). Estos resultados concuerdan con los reportados previamente en plantas adultas de *F. esculentum* por Klug & Horst (2010) En el caso del malato se observa que los niveles de este aumentan en todos los tratamientos a partir de las 48 h. Sin embargo no hay diferencias estadísticas causadas por el Al.

Estos resultados sugieren que el metabolismo de estos ácidos orgánicos no se altera por el Al. En otras especies con el mismo patrón de exudación de ácidos orgánicos, es decir, con una exudación que comienza minutos después de ser expuestas al Al (Patrón I; ver introducción), se ha observado que las actividades de las enzimas relacionadas con el metabolismo de estos ácidos no se ven afectadas al exponerse al Al (Ryan *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2000). Para poder confirmar esto, sería conveniente evaluar la actividad de estas enzimas en *F. esculentum*.

En el caso de los ácidos orgánicos exudados al medio, éstos no se lograron detectar por medio de la técnica de HPLC. A diferencia de trabajos anteriores, en los que se utilizaron plantas adultas para este tipo de cuantificaciones (Ma *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1998; Klug & Horst, 2010), en el presente trabajo se utilizaron plántulas de 48 horas de edad con pocas raíces laterales de un tamaño pequeño. La falta de un sistema radicular completamente desarrollado pudo contribuir a que los ácidos orgánicos exudados no superaran el límite de detección del método.

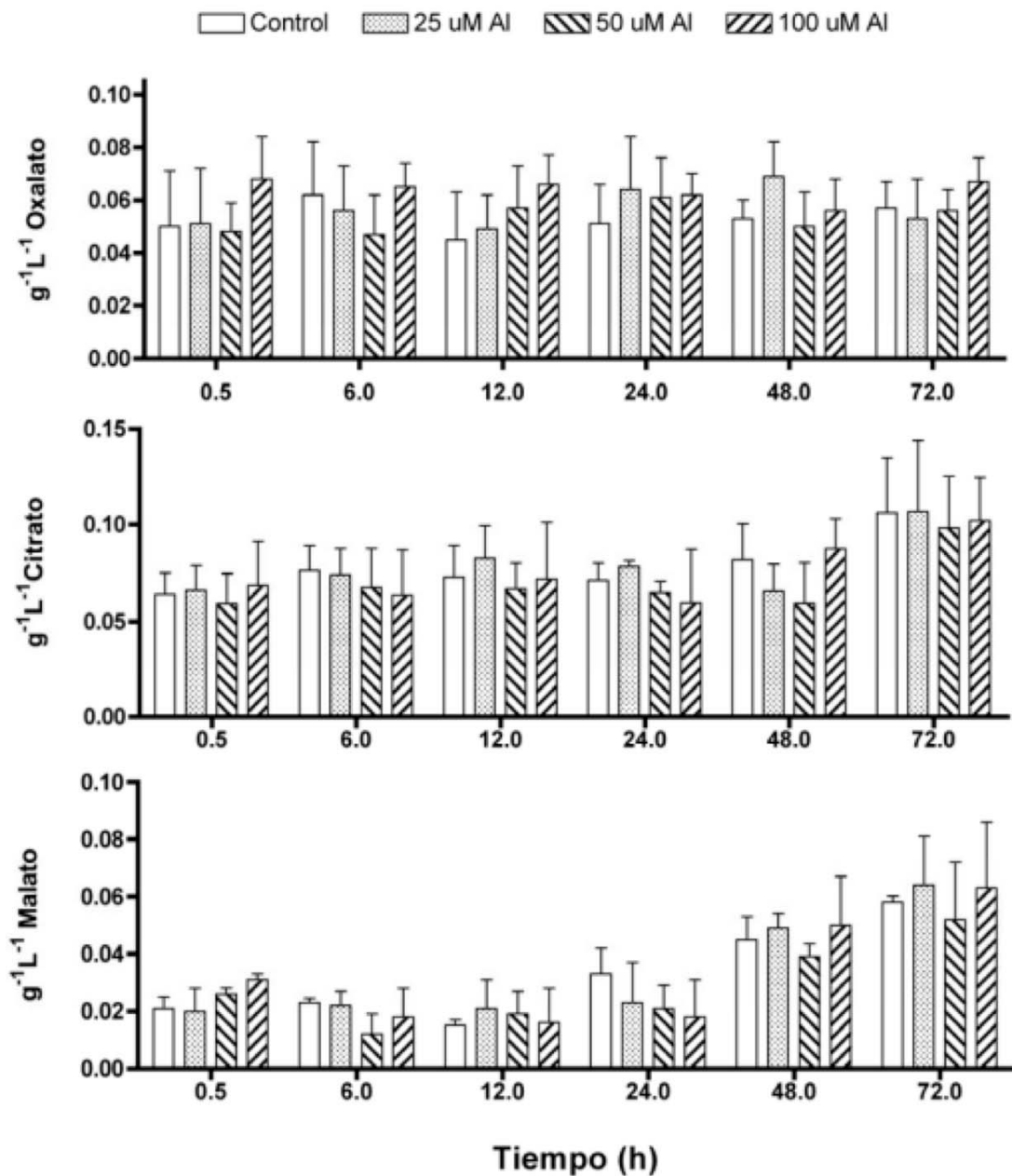


Figura 8.- Concentración de ácidos orgánicos (citrate, malate, oxalate) dentro de las raíces de *F. esculentum* expuestas a 0, 25, 50 y 100 μM de AlCl_3 durante 0.5, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Las gráficas muestran los promedios de 3 repeticiones independientes (n=6). Las barras de error denotan el error estándar del ensayo.

Altas concentraciones de Al promueven un aumento en las concentraciones de Ácido Abscísico (ABA)

El ácido abscísico es una de las hormonas más importantes relacionadas con la respuesta al estrés abiótico (Kuromori *et al.*, 2010). Shen y colaboradores (2004), han propuesto que el ABA está relacionado con la respuesta temprana al Al en *Glycine max*. De acuerdo a estos autores el ABA podría estar regulando las vías de señalización involucradas en la exudación de citrato al medio en raíces de soya. En el caso de *F. esculentum* las plántulas expuestas a 50 y 100 μM de AlCl_3 presentan un aumento en las concentraciones de ABA en comparación con el Control (**Figura 9**). En estos tratamientos las concentraciones de ABA tienen un patrón fluctuante. Media hora después de añadir AlCl_3 en el medio, las plántulas expuestas a 100 μM de AlCl_3 presentan niveles de ABA significativamente altos en comparación con las plántulas Control. Esta respuesta no se mantiene durante todo el tiempo. A partir de las 6 h los niveles de ABA disminuyen y para las 48 h el ABA vuelve a aumentar, manteniendo estos niveles hasta las 72 h.

En 50 μM de AlCl_3 se presenta el mismo aumento a las 48 y 72 horas. A pesar de este patrón, durante todo el ensayo (con excepción de las 24 horas de tratamiento), las plántulas expuestas a 100 μM de AlCl_3 poseen niveles de ABA significativamente mayores en comparación con las Control. Cabe recordar que en 100 μM de AlCl_3 , las raíces de *F. esculentum* presentan la mayor disminución en la elongación radicular (**Figura 2**), también es el tratamiento en el que el daño celular es más severo (**Figura 4**) y donde existe una mayor acumulación de Al (**Figura 5**). Los altos niveles de ABA detectados a la media hora de exposición a 100 μM de AlCl_3 sugieren que esta hormona podría estar involucrada en la respuesta temprana para contrarrestar los efectos negativos del Al. Esta respuesta parece no ser suficiente ya que a partir de las 48 horas, los niveles de ABA vuelven a elevarse considerablemente. Entre estos dos tiempos (30 min y 48 h) los niveles de ABA disminuyen. Esta disminución podría ser necesaria para la formación de raíces laterales capaces de mantener al sistema radicular funcional. La generación de raíces laterales es una de las respuestas relacionadas con la toxicidad del Al (Doncheva *et al.*, 2005). Para que estas puedan desarrollarse, es necesario que los niveles de ABA disminuyan y que la concentración de Auxinas aumente (Himanen *et*

al., 2002; Deak & Malamy, 2005). Por lo tanto, durante este periodo, la disminución en los niveles de ABA podría ser una respuesta para la formación de este tipo de tejido.

El ABA es una hormona que regula la generación de respuestas bioquímicas y moleculares capaces de conferir tolerancia a diversos factores de estrés ambientales como el estrés hídrico y salino permitiendo que las plantas puedan establecerse en ambientes adversos (Kasai et al., 1993; Zeevart & Creelman, 1998; Wasilewska *et al.*, 2008). Bajo condiciones estresantes de Al (a partir de 50 μ M), las plantas como *F.esculentum* deben incrementar la expresión de mecanismos relacionados con la tolerancia. El aumento en las concentraciones de ABA podría ser un mecanismo de respuesta capaz de regular la expresión de elementos involucrados en evitar el daño celular.

Como se mencionó en la introducción, el Al tiene el potencial de generar un estrés oxidativo en las plantas. En *F. esculentum*, el ABA podría actuar sobre el metabolismo del sistema antioxidante. En *Oryza sativa* el ABA regula la expresión de la ascorbato peroxidasa durante el estrés salino (Hong & Kao, 2008). Esta enzima utiliza al ascorbato como donador de electrones para reducir el H₂O₂ a agua. Las reacciones enzimáticas relacionadas con el mantenimiento y regeneración del ascorbato son componentes esenciales para mantener el crecimiento radicular y se ha reportado que están asociadas con la tolerancia a Al (Houde & Diallo, 2008).

Este es solo uno de los posibles blancos en los que el ABA podría actuar en respuesta al Al. En la actualidad, existe muy poca información en la literatura al respecto por lo que es necesario llevar a cabo más experimentos relacionados con el ABA y su relación con el estrés por Al.

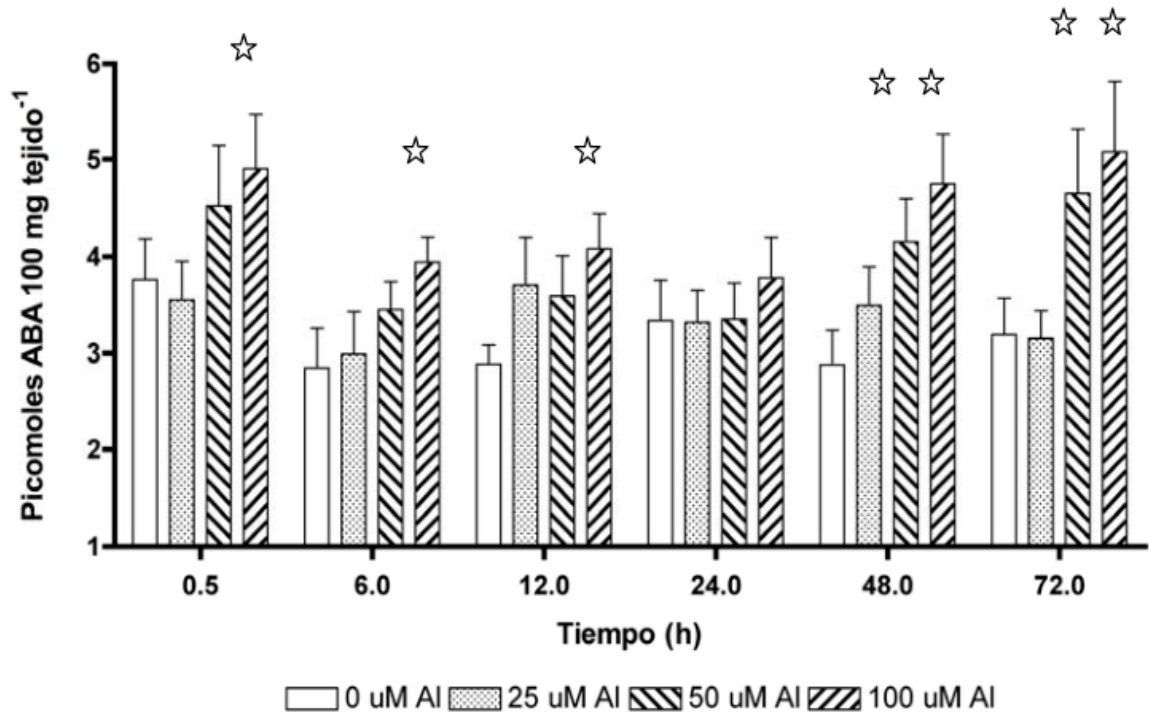


Figura 9.- Cuantificación de los niveles de ABA por Inmunoensayo en raíces de *Fagopyrum* expuestas a $AlCl_3$. La gráfica muestra los promedios de 4 repeticiones independientes. Las barras de error denotan el error estándar del ensayo. Las estrellas muestran aquellos tratamientos donde existen diferencias significativas en comparación con el Control correspondiente de acuerdo al ANOVA ($F= 3.5868$ $p \leq 0.01$)

FeALS* es un gene homólogo a *ALS* y codifica para una proteína putativa tipo ABC en *Fagopyrum

Aunque los transportadores ABC están altamente conservados, sobretodo en su dominio de unión a nucleótido (NBD), el resto de su secuencia es muy variable. Los dominios transmembranales (TMDs) pueden diferir considerablemente en su secuencia y pueden exhibir altas diferencias funcionales (Higgins & Linton, 2004).

(Verrier *et al.*, 2008). Larsen y colaboradores (2005) plantean, basándose en los fenotipos mutantes, que ALS3 podría estar involucrada en el transporte del Al a lo largo de la planta. ALS3 carece del dominio de unión a ATP (NBD) y solo posee el dominio transmembranal (TMD) por lo que es probable que interactúe con otras proteínas para su funcionamiento. En el caso de *FeALS*, esta podría estar también involucrada en la translocación del Al hacia la parte aérea de la planta. Sin embargo, es necesario obtener su secuencia completa con el fin de establecer sus propiedades y filogenia.

***FeALS* aumenta su expresión en la presencia de Al y ABA.**

Con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de *FeALS*, se llevaron a cabo RT-PCRs en raíces expuestas a cada uno de los tratamientos de AlCl₃. Los resultados muestran que la expresión de *FeALS* aumenta significativamente en la presencia de AlCl₃ (**Figura 11B**). A partir de 25 µM de AlCl₃ se observa este aumento el cual se mantiene durante todo el bioensayo. No se observan diferencias entre las concentraciones de Al utilizadas (25, 50 y 100 µM de AlCl₃) (**Figura 11B**). Después de obtener estos resultados se llevó a cabo un ensayo para determinar si el ABA podría estar involucrado en la expresión de *FeALS*. Para ello se realizó un RT-PCR para *FeALS* en raíces expuestas a 1 y 10 µM de ABA. Estas concentraciones fueron elegidas de acuerdo a lo previamente reportado por Shen *et al.* (2004), y en función de una curva de dosis respuesta en donde se evaluó la elongación radicular en plántulas de *F. esculentum* expuestas a diferentes concentraciones de ABA (0, 0.1, 1, 10 y 50 µM ABA) (**Figura A2**). Los resultados muestran que el ABA también induce la expresión de *FeALS* (**Figura 11B**). A diferencia de los tratamientos con Al, el aumento en la expresión de *FeALS* mediado por ABA comienza hasta las 24 h de tratamiento y presenta un patrón cíclico. A las 48 h de tratamiento los niveles de expresión disminuyen, aumentando de nuevo a las 72 h de tratamiento.

El Al causa un aumento en los niveles endógenos de ABA en raíces *F. esculentum* expuestas a 50 y 100 µM de AlCl₃ (**Figura 9**). Sin embargo, los niveles de expresión de *FeALS* aumentan con todas las concentraciones de AlCl₃ (25, 50 y 100 µM de AlCl₃) sin presentar diferencias estadísticas entre ellos (**Figura 11**). Por lo tanto, no se puede establecer una correlación directa entre los niveles de ABA endógeno y la expresión de *FeALS*.

CONCLUSIONES

Si bien se considera a *Fagopyrum esculentum* como una especie tolerante al Al, ésta requiere de un periodo de aclimatación para responder y tolerar este tipo de estrés.

Durante las primeras 72 h de exposición, el Al se localiza en las paredes celulares, el citoesqueleto y en los núcleos de las células del ápice radicular.

Al aumentar las concentraciones de Al en el medio, la tasa relativa de crecimiento radicular disminuye y el daño celular aumenta. Estos son síntomas claros de que la planta se encuentra bajo condiciones de estrés. Como consecuencia se observa un aumento en los niveles endógenos de ABA en plántulas expuestas a 50 y 100 μM de AlCl_3 .

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones endógenas de oxalato, malato y citrato en las raíces expuestas a Al, lo que sugiere que el metabolismo de los ácidos orgánicos parece no verse afectado por el Al.

Se caracterizó parcialmente el gene *FeALS*, el cual es homólogo a *ALS3* que codifica para una proteína tipo ABC en *Arabidopsis* y otras especies. Los niveles de expresión de *FeALS* aumentan en la presencia de Al y de concentraciones exógenas de ABA.

En resumen, el presente, es el primer trabajo en donde se evalúa la relación entre el ácido abscísico (ABA) y la respuesta al estrés por Al en *F.esculentum*. Cuando las concentraciones de Al en el medio son suficientes para causar un daño a nivel celular, los niveles de ABA en las raíces de *F.esculentum* aumentan. El cambio en las concentraciones de esta hormona es una respuesta que podría ser responsable de regular o inducir respuestas capaces de tolerar este tipo de estrés. Por otro lado *FeALS* es una proteína homóloga a un transportador presente en *Arabidopsis* (*ALS3*) el cual le confiere tolerancia al Al. En *F.esculentum* *FeALS* aumenta sus niveles de expresión en presencia de Al y ABA. Por lo tanto, esta proteína es probablemente uno de los elementos relacionados con la tolerancia al Al en *F.esculentum*.

PERSPECTIVAS

Para entender con mayor profundidad el papel de FeALS en la tolerancia al Al de *F. esculentum*, es necesario determinar, entre otras características, si FeALS es un solo gene o si pertenece a una familia de varios genes con funciones distintas. Para ello se podría llevar a cabo la técnica del Southern blot.

Sería importante conocer la interacción de FeALS con otras proteínas que pudieran regular su actividad, o que aporten el dominio de unión a nucleótido capaz de formar un transportador ABC funcional. Al evaluar las propiedades electrofisiológicas de este transportador se podría establecer los sustratos sobre los que actúa.

Sería importante determinar los sitios dónde se expresa *FeALS* para evaluar los posibles sitios de acción de esta proteína.

Con el objetivo de determinar si la ausencia de *FeALS* tiene algún efecto en la tolerancia al Al en *F. esculentum*, sería necesario complementar los datos obtenidos en este trabajo con otros experimentos como el silenciamiento de *FeALS*.

Por otro lado, sería importante estudiar a mayor profundidad los mecanismos sobre los cuales actúa el ABA durante el estrés por Al. Esto con la finalidad de establecer si el ABA tiene algún efecto directo o indirecto en la expresión de proteínas como FeALS. Para ello, se podrían utilizar otros organismos modelo como *Arabidopsis* y evaluar en mutantes insensibles al ABA el efecto del Al.

BIBLIOGRAFÍA

- Amenos, M., Corrales, I., Poschenreider, C., Illés, Baluska, F., Barceló, J.,** 2009, Different effects of aluminum on the actin cytoskeleton and brefeldin A-sensitive vesicle recycling in root apex cells of two maize varieties differing in root elongation rate and aluminum tolerance, *Plant Cell Physiology*, (50) 528-540.
- Baluska, F., Jasik, J., Edelmann, H.G., Salanova, T., Volkmann, D.,** 2001, Latrunculin B-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-actin dependent, *Developmental Biology*, (231) 113-124.
- Barceló, J., Poschenreider, C.,** 2002, Fast root growth responds, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review, *Environmental Experimental Botany*, (48) 75-92.
- Bennet, R.J., Breen, C.M.,** 1991. The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance, *Plant Soil*. (134) 153–166.
- Campbell, C.,** 1997, Buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench, promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, IPGRI, vol 19 pp 95.
- Chang, Y.C., Yamamoto, Y., Matsumoto, H.,** 1999, Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron, *Plant Cell Environment*, (22) 1009-1017.
- Chao, F.H., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., Ma, J.F.,** 2009, A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice, *The Plant Cell*, (21) 655-667.
- Degenhardt, J., Larsen, P.B., Howell, S.H., Kochian, L.V.,** 1998, Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH, *Plant Physiology*, (117) 19-27.
- Delhaize, E., Gruber, B.D., Ryan, P.R.,** 2007, The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition, *FEBS Letters*, (581) 2255-2262.
- Delhaize, E., Hebb, D., Ryan, P.,** 2001, Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux, *Plant Physiology*, (125) 2059-2067.
- Delhaize, E., Ryan, P.R.,** 1993, Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.); II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices, *Plant Physiology*, (103) 695-702.
- Delhaize, E., Ryan, P.R.,** 1995, Aluminum toxicity and tolerance in plants, *Plant Physiology*, (107) 315-321.
- Doncheva, S., Amenos, M., Poschenrieder, C., Barcelo, J.,** 2005, Root cell patterning: A primary target for aluminium toxicity in maize, *Journal of Experimental Botany*, (56) 1213-1220.
- Dudler, R., Sidler, M.,** 1998, Arabidopsis MDR genes: Molecular cloning and protein chemical aspects, *Methods in Enzymology*, (292) 162-173.
- Eticha, D., Stass, A., Horst, W.J.,** 2005, Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance, *Plant Cell Environment*, (11) 1410-1420.
- Eticha, D., Stass, A., Horst, W.J.,** 2005, Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium?, *Journal of Experimental Botany*, (56) 1351-1357.
- Fontecha, G., Silva-Navas, J., Benito, C., Mestres, M.A., Espino, F.J., Hernández-Riquer, M.V., Gallego, F.J.,** 2007, Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.), *Theoretical Applied Genetics*, (114) 249-260.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C.,** 1978, The physiology of metal toxicity in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, (29) 511-576.
- Foyer, C.H., Noctor, G.,** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *The Plant Cell*, (17) 1866-1875.
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P.,** 2005, Aluminium causes variable responses in actin filament cytoskeleton of the root tip cells of *Triticum turgidum*, *Protoplasma*, 225: 129-140.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., Ma, J.F.,** 2007, An aluminum-activated citrate transporter in barley, *Plant Cell Physiology*, (48) 1081-1091.
- Gilroy, S., Bethke, P.C., Bethke, Jones, R.L.,** 1993, Calcium homeostasis in plants, *Journal of Cell Science*, (106) 453-462.
- Hawes, M.C., Bengough, G., Cassab, G., Ponce, G.,** 2003, Root caps and rhizosphere, *Journal of Plant Growth Regulation*, (21) 352-367.
- Hawes, M.C., Brigham, L.A., Wen, F., Woo, H.H., Zhu, Y.,** 1998, Function of root border cells in

- plant health: pioneers in the rhizosphere, *Annual Review of Phytopathology*, (36) 311-327.
- Higgins, C.F. and Linton, K.J.**, 2004, The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural Molecular Biology*, (11) 918-926.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida, J., Inze, D., Beeckman, T.**, 2002, Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation, *The Plant Cell*, (14) 2339-2351.
- Hirayama, T., Shinozaki, K.**, 2007, Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA, *Trends in Plant Science*, (12) 343-351.
- Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Piñeros, M.A., Cançado, G.M., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Koyama, H., 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*, (103) 9738-9743.
- Hoekenga, O.A., Vision, T.J., Shaff, J.E., Monforte, A.J., Lee, G.P., Howell, S.H., Kochian, L.V.**, 2003, Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by Quantitative Trait Locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait, *Plant Physiology*, (132) 936-948.
- Hollenstein, K., Dawson, R., Locher, K.**, 2007, Structure and mechanism of ABC transporter proteins, *Current Opinion in Structural Biology*, (17) 412-418.
- Huang, C.F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., Ma, J.F.**, 2009, A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminium tolerance in Rice, *The Plant Cell*, (21) 655-667.
- Illés, P., Schlicht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluska, F., 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 membrana potencial, endosomal behaviour, and nitric oxide production, *Journal of Experimental Botany*, (57) 4201-4213.
- Ishikawa, S., Wagatsuma, T., Sasaki, R., Ofei-Manu, P.**, 2000, Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species, *Soil Science and Plant Nutrition*, (46) 751-758.
- Jansen, S., Watanabe, T., Dessein, S., Robbrecht, E., Smets, E.**, 2004, The evolution of aluminium accumulation in angiosperms, en: *The evolution of plant physiology: From whole plants to ecosystems*, 2004, Hemsley, A., Poole, I., eds, Elsevier, New York., pp 492.
- Johnson Jr, J.P., Carver, B.F., Baligar, V.C.**, 1997, Productivity in great plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminium tolerance, *Plant and Soil*. (188) 101-106.
- Jones, D.L., Kochian, L.V.**, 1995, Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: A role in aluminum toxicity?, *The Plant Cell*, (7) 1913-1922.
- Jones, K.H., Senft, J.A.**, 1985, An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide, *The Journal of Histochemistry and Cytology*, (33) 77-79.
- Kataoka, T., Mori, M., Nakanishi, T., Matsumoto, S., Uchiyumi, A.**, 1997, Highly sensitive analytical method for aluminum movement in soybean root through lumogallion staining, *Journal of Plant Research*, (110) 305-309.
- Kayama, M.**, 2001, Comparison of the aluminum tolerance of *Miscanthus sinensis* (Anderss) and *Miscanthus sacchariflorus* (Bentham) in hydroculture, *International Journal of Plant Science*, (162) 1025-1031.
- Kim, B.G., Waadt, R., Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Dominquez-Solis, J.R., Schultke, S., Lee, S.C., Kudla, J., Luan, S.**, 2007, The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, (52) 473-484.
- Klug, B., Horst, W.**, 2010, Spatial characteristics of aluminium uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), *Physiologia Plantarum*, (139) 181-191.
- Kochian, L.V.**, 1995, Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants, *Annual Review of Plant Physiology*, (46) 237-260.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A.**, 2004, How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency, *Annual Review of Plant Biology*, (55) 459-493.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A.**, 2005, The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity, *Plant Soil*, (274) 175-195.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G., Sonnhammer, L.**, 2001, Prediction transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, (305) 567-580.
- Kuo, M.C., Kao, C.H.**, 2003, Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves, *Biologia Plantarum*, (46) 149-152.
- Larsen, P.B., Cancel, J., Rounds, M., 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

- Larsen, P.B., Geisler, M., Jones, C., Williams, K., Cancel, J., 2005, ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis, The Plant Journal, (41) 353-363.**
- Larsson, C., Widell, S., Kjellboom, P., 1987, Preparation of high purity plasma membranes, Methods in Enzymology, (148) 558-568.**
- Li, X., Ma, J., Matsumoto, H., 2000, Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat, Plant Physiology, 123, 1537-1544.**
- Ligaba, A., Katsuhara, M., Ryan, P., Shibusaka, M., Matsumoto, H., 2006, The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells, Plant Physiology, (142) 1294-1303.**
- Liu, J., Magalhaes, J.V., Shaff, J., Kochian, L.V., 2009, Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance, The Plant Journal, (57) 389-399.**
- Ma, J.F., 2000, Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants, Plant Cell Physiology, (41) 383-390.**
- Ma, J.F., 2007, Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants, International Review of Cytology, (264) 225-247.**
- Ma, J.F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H., 1997, Internal detoxification mechanism of Al in Hydrangea, Plant Physiology, (113) 1033-1039.**
- Ma, J.F., Hiradate, S., 2000, Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.), Planta, (211) 355-360.**
- Ma, J.F., Furukawa, J., 2003, Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview, Journal of Inorganic, Chemistry, (97) 45-51.**
- Ma, J.F., Ryan, P.R., Delhaize, E., 2001, Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids, Trends in Plant Science, (6) 273-278.**
- Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., Tanimoto, E., 2004, Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots, Plant Cell Physiology, (5) 583-589.**
- Ma, J.F., Taketa, S., Yang, Z.M., 2000, Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. Plant Physiology, (122) 687-694.**
- Ma, J., Zheng, S., Matsumoto, H., 1997, Detoxifying aluminum with buckwheat, Nature, (390) 569-570.**
- Ma, J., Zheng, S., Matsumoto, H., 1997, Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* (L), Plant Cell Physiology, (38) 1019-1025.**
- Ma, J., Zheng, S., Matsumoto, H., 1998, High aluminum resistance in buckwheat: Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips, Plant Physiology, (117) 745-751.**
- Ma, Q.F., Rengel, Z., Kuo, J., 2002, Aluminum toxicity in rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in intact root tips, Annals of Botany, (89) 241-244.**
- Ma, Z., Miyasaka, S., 1998, Oxalate exudation by taro in response to Al, Plant Physiology, (118) 861-865.**
- MacRobbie, E.A., 1998, Signal transduction and ion channels in guard cells. Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B), (353) 1475-1488.**
- Magalhaes, J., Garvin, D., Sorrels, M., Klein, P., Shaffert, R., Wang, Y., Li, L., Kochian, L., 2003, Comparative mapping of *AltSb*, a novel aluminum tolerance gene in sorghum *bicolor* (L.) Moench, reveals inter-tribe synteny among Al tolerance genes in the Poaceae, Genetics, (167) 1905-1914.**
- Magalhaes, J., Liu, J., Guimaraes, T.C., Lana, G.P., Alves, M.C., Wang, Y.H., Shaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Klein, P.E., Carneiro, N.P., Coelho, C.M., Trick, H.N., 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.**
- Maltais, K., Houde, M., 2002, A new biochemical marker for aluminium tolerance in plants. Physiologia Plantarum, (115) 81-86.**
- Marshcner H., 1995, Mineral nutrition of higher plants. Academic press, London, 889 pp.**
- Matsumoto, H., 2000, Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants, International Review of Cytology, (200)1-46.**
- Matsumoto, H., Hirsawa, E., Morimura, S., Takahashi, E., 1976, Localization of aluminium in tea leaves, Plant and Cell Physiology, (17) 627-631.**
- Matsumoto, H., Senoo, Y., Kasai, Maeshima, M., 1996, Response of the plant root to aluminum stress: Analysis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function, Journal of Plant Research, (109) 99-105.**
- Mitra, S., Gantt, J., Rubye, J., Clouse, S., Goshe, M., 2007, Membrana proteomic análisis of *Arabidopsis thaliana* using alternative solubilization techniques, Journal of Proteome Research, (6) 1933-1950.**

- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, (7) 405-410.
- Miyasaka, S.C., Hawes, M.C.**, 2001, Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminium toxicity, *Plant Physiology*, (125) 1978-1987.
- Mori, I.C., Uozumi, N., Muto, S.**, 2000, Phosphorylation of the inward-rectifying potassium channel KAT1 by ABR kinase in *Vicia* guard cells. *Plant Cell Physiology*, (41) 850-856.
- Ohnishi, O.**, 1993, Population genetics of cultivated common buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. VIII. Local differentiation of land races in Europe and the silk road, *Japan Journal of Genetics*, (68) 303-316.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama, Y.**, 2006, The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations, *Trends in Pharmacological Science*, (27) 587-593.
- Pellet, D.M., Papernik, L.A., Kochian, L.V.**, 1996, Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat, *Plant Physiology*, (112) 591-597.
- Piñeros, M.A., Kochian, L.V.**, 2001, A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels, *Plant Physiology*, (125) 292-305.
- Piñeros, M.A., Magalhaes, J.V., Carvalho, V.M., Kochian, L.V.**, 2002, The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize, *Plant Physiology*, (129) 1194-1206.
- Piñeros, M.A., Cançado, G.M., Maron, L.G., Lyi, S.M., Menossi, M., Kochian, L.V.**, 2008, Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1- an anion-selective transporter, *The Plant Journal*, (53) 352-367.
- Piñeros, M.A., Tester, M.**, 1995, Characterization of a voltage-dependent Ca^{2+} -selective channel from wheat roots. *Planta*, (195) 478-488.
- Poschenreider, C., Gunsé, B., Corrales, I., Barceló, J.**, 2008, A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, (400) 356-368.
- Raven, J.A., Edwards, D.**, 2001, Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance, *Journal of Experimental Botany*, (52) 381-401.
- Reid, R., Tester, M.A., Smith, F.A.**, 1995, Calcium/aluminium interactions in the cell wall and plasma membrane of *Chara*, *Planta* (195) 362-368.
- Rengel, Z., Zhang, W.H.**, 2003, Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome, *New Phytologist*, (159) 295-314.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L.**, 2001, Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (52) 527-560.
- Ryan, P., Delhaize, F., Jones, D.L.**, 1995, Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*. (196) 103-110.
- Ryan, P., DiTomasso, J., Kochian, L.**, 1993, Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap, *Journal of Experimental Botany*, (44) 437-446.
- Saber, N., Abdel-Moneim, A., Barakat, S.**, 1999, Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metals, *Biologia Plantarum*, (42) 65-73.
- Samac, D.A., Tesfaye, M.**, 2003, Plant improvement for tolerance to aluminium in acid soils- a review, *Journal of Plant Biotechnology* (75) 189-207.
- Sánchez-Nieto, S., Tuena de Gómez-Puyou, M., Rodríguez-Sotres, R., Carballo, A., Gavilanes-Ruiz, M.**, 1998, Comparison of plasma membrane H^{+} -ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos, *Biochimica et Biophysica Acta*, (77475) 1-13.
- Sasaki, T., Mori, I., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y., Yamamoto, Y.**, 2010, Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter, *Plant Cell Physiology*, (51) 354-365.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., Matsumoto, H.**, 2004, A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter, *The Plant Journal*, (37) 645-653.
- Schottelndreier, M., Norddahl, M., Strom, L., Falkengren-Grerup, U.**, 2001, Organic acid exudation by wild herbs in response to elevated Al concentrations, *Annals of Botany*, (87) 769-775.
- Schroedes, J.I., Kwak, J.M., Allen, G.**, 2001, Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardness in plants, *Nature*, (410) 327-330.
- Schulz, B. and Kolukisaoglu, H.**, 2006, Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes?, *FEBS Letters*, (580) 1010-1016.
- Shen, H., Ligaba, A., Yamaguchi, M., Osawa, H., Shibata, K., Yan, X., Matsumoto, H.**, 2004, Effect of K-252a and abscisic acid on the efflux of citrate from soybean roots, *Journal of Experimental Botany*, (55) 663-671.

- Sherma, J., Fried, B., 2000, Thin-Layer Chromatography en: Enciclopedia of analytical chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation, Meyers R., (ed), Wiley Ltd, London, pp 14344.**
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Moxley, D.F., Carter, T.E., Allen, N.S., Rufty, T.W., 2000, Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy, *Plant Physiology*, (123) 543-552.**
- Sivaguru, M., Horst, W.J., 1998, The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize, *Plant Physiology*, (116) 155-163**
- Sivaguru, M., Horst, W.J., Eticha, D., Matsumoto, H., 2006, Aluminum inhibits apoplastic flow of high-molecular weight solutes in root apices of *Zea mays* L., *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, (169) 679-690.**
- Sivaguru, M., Pike, S., Gassmann, W., Baskin, T.B., 2003, Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor, *Plant Cell Physiology*, (44) 667-675.**
- Tabuchi, A., Matsumoto, H., 2001, Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminum-induced growth inhibition, *Physiologia Plantarum*, (112) 353-358.**
- Theodolou, F.L., 2000, Plant ABC transporters, *Biochimica et Biophysica Acta*, (1465) 79-103.**
- Trewavas, A.J., Malho, R., 1997, Signal perception and transduction: the origin of the phenotype, *The Plant Cell*, (9) 1181-1195.**
- Verrier, P., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolikisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E., Yazaki, K., Theodoulou, F., 2008, Plant ABC proteins- a unified nomenclature and updated inventory, *Trends in Plant Science*, (13) 151-159.**
- Von Uexkull, H.R., Mutert, E., 1995, Global extent, development and economic impact of acid soils, *Plant and Soil*, (171) 1-15.**
- Wasilewska, A., Vlada, F., Sirichandraa, C., Redkob, Y., Jammesc, F., Valona, C., Frei, N., dit Freya, Leunga, J., 2008, An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant*, (1) 198-217.**
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshihara, T., Tadano, T., 1998, Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L., *Plant and Soil*, (201) 165-173.**
- Westermeier, R., Naven, T., 2002, Proteomics in practice: A laboratory manual of proteome analysis, Wiley Int, New York, pp 342.**
- Yamaguchi, M., Sasaki, T., Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Osawa, H., Ahn, S.J., Matsumoto, H., 2005, Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1), *Plant Cell Physiology*, (46) 812-816.**
- Yamamoto, Y., Kobayashi, 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., Matsumoto, H., 2003, Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots, *Plant and Soil*, (255) 239-243.**
- Yang, J.L., Li, Y.Y., Zhang, Y.J., Zhang, S.S., Wu, Y.R., Wu, P., Zheng, S.J., 2008 Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminium from the rice root apex, *Plant Physiology*, (146) 602-611.**
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002, Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin, *Proceedings of the National Academy of Science*, (99) 4097-4102.**
- Yang, Z., Sivaguru, M., Horst, W., Matsumoto, H., 2000, Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, (110) 72-77.**
- Zhang, W.H., Rengel, Z., 1999, Aluminum induces an increase in cytoplasmic calcium intact wheat root apical cells, *Australian Journal of Plant Physiology*, (26) 401-409.**
- Zhao, Z., Ma, J.F., Sato, K., Takeda, K., 2003, Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Planta*, (217) 794-800.**
- Zheng, S., Ma, J., Matsumoto, H., 1998, Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress, *Physiologia Plantarum*, (103) 209-214.**
- Zheng, S., Yang, J., He, Y.F., Yu, X.H., Zhang, L., You, J.F., Shen, R.F., Matsumoto, H., 2005, Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat, *Plant Physiology*, (138) 297-303.**
- Zhu, M., Ahn, S., Matsumoto, H., 2003, Inhibition and growth development of root border cells in wheat by Al, *Physiologia Plantarum*, (117) 359-367.**

ANEXOS

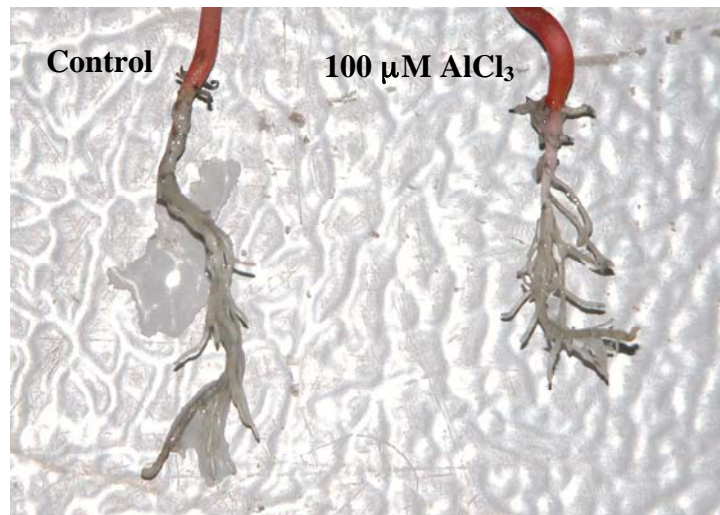


Figura A1.- Raíces de *F. esculentum* expuestas a 0 y 100 μM AlCl_3 durante 48 horas. En la imagen se observa que las raíces expuestas a aluminio presentan una disminución en la elongación de la raíz central así como un mayor número de raíces laterales.

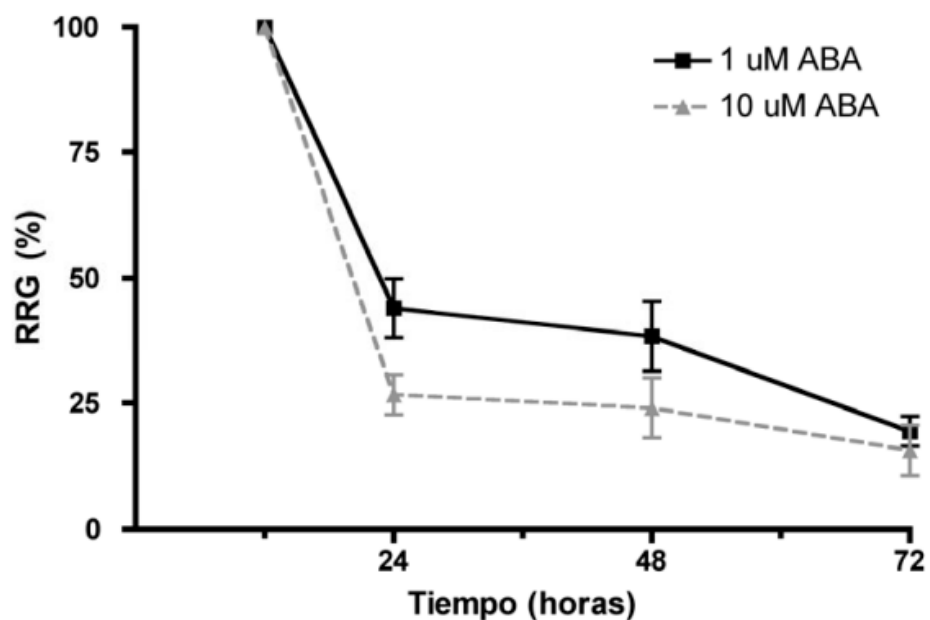


Figura A2.- Tasa relativa de crecimiento (RRG %) de las raíces de *Fagopyrum* expuestas a dos concentraciones de ABA. En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes. Las barras de error denotan el error estándar del ensayo. A las 12 h de tratamiento no se observa efecto del ABA sobre el crecimiento radicular.

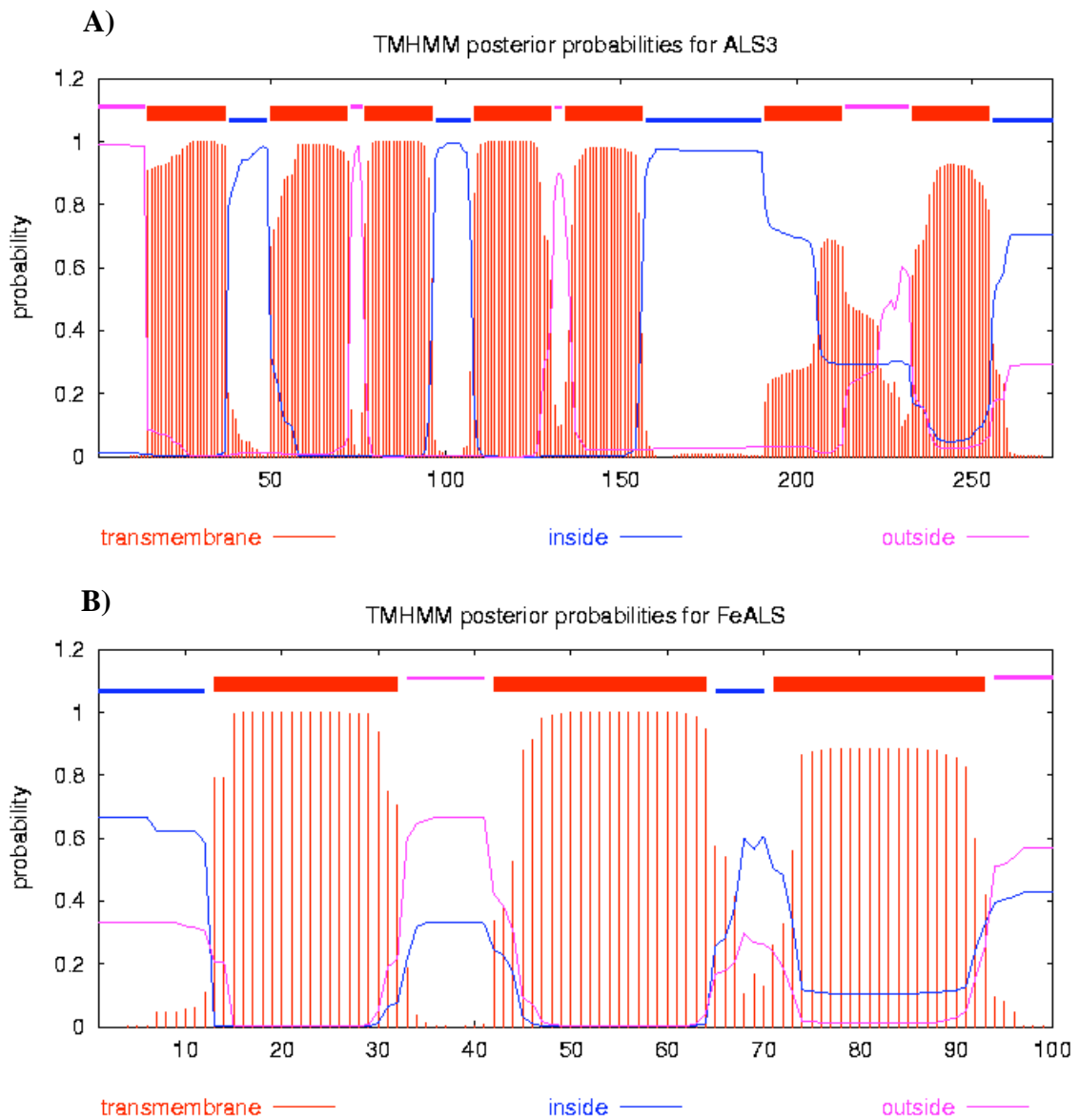


Figura A3.- Curvas de hidrofobicidad para ALS3 (A) y FeALS (B) utilizando el software TMHMM (Krogh *et al.*, 2001). De acuerdo a esta curva, ALS3 posee 7 regiones hidrofobicas mientras que la secuencia parcial obtenida para *F.esculentum* (FeALS) abarca 3 cruces transmembranales.