



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DEL ALUMINIO EN EL CRECIMIENTO RELATIVO, TASA FOTOSINTÉTICA Y
ASOCIACIÓN CON CRISTALES DE OXALATO DURANTE EL CICLO DE VIDA DE
Fagopyrum esculentum MOENCH (POLYGONACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

ALMA YADIRA MARTÍNEZ RENDÓN

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María del Rocío Cruz Ortega
Instituto de Ecología, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Facultad de Ciencias, UNAM**

**Dra. Clara Leonor Tinoco Ojanguren
Instituto de Ecología, UNAM**

MÉXICO, D.F. JULIO DE 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su reunión ordinaria celebrada el día 22 de abril de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del la alumna **MARTÍNEZ RENDÓN ALMA YADIRA** con número de cuenta **99214689** con la tesis titulada **“Efecto del aluminio en el crecimiento relativo, tasa fotosintética y asociación con cristales de oxalato durante el ciclo de vida de *Fagopyrum esculentum* Moench. (Polygonaceae).”**, realizada bajo la dirección de la: **DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Secretario: ESP. MARGARITA COLLAZO ORTEGA
Suplente: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
Suplente: DRA. CLARA LEONOR TINOCO OJANGUREN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de junio de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por acreditarme como estudiante y ahora Maestra en Ciencias Biológicas.
- A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca proporcionada durante la realización de este trabajo.
- Al Proyecto PAPIIT IN227709 titulado “Respuesta a la toxicidad de aluminio en plantas. Mecanismos de tolerancia en la especie acumuladora *Fagopyrum esculentum* Moench: aspectos fisiológicos y moleculares.” Por el apoyo económico proporcionado para la realización de este trabajo.
- A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por su apoyo incondicional como tutora principal de este proyecto.
- A las Dras. Guadalupe Judith Márquez Guzmán y Clara Leonor Tinoco Ojanguren, por sus importantes aportaciones como miembros del Comité Tutor de este proyecto. Además de su apoyo facilitando equipos e instalaciones.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. José Luis Ruvalcaba Sil, del Departamento de Física Experimental del Instituto de Física de la UNAM, por su valiosa asesoría y por facilitar el uso de equipos e instalaciones para la realización de la técnica PIXE, que forma parte de este trabajo.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco, Técnica Académica Auxiliar B del Laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por su importante apoyo técnico en la realización de las técnicas histológicas que forman parte de este trabajo.

Gracias mi familia, por toda su paciencia y por los ánimos que me dan para seguir siempre adelante.

Mil gracias a las personas con las que cuento para todo momento, en las buenas y en las malas, como hermanos más que como amigos: Daniel, Aurora, Claudia, y Eduardo.

A mi querida Mague, que siempre tiene toda su confianza puesta en mí, me alienta a seguir creciendo académicamente y que me apoya en cualquier momento con su cariño y su comprensión.

A todas aquellas personas que me han acompañado durante esta etapa llena de momentos felices y no tan felices, pero siempre presentes: Mónica, Ricardo, la “combinación ganadora” (Ros, Isa, Dian, Alfred), Alde, Eli, Ulises, Tere, Gaby, Dafne, Emma, Yadira, Anuar y Luis B.

“Recuerda bien lo que voy a decirte: lo que puedan enseñarte los demás acaba en sí mismo, lo que aprendes por tu propia cuenta forma parte de ti. Y te será de gran ayuda. Abre los ojos, aguza el oído, haz trabajar la cabeza, descifra el significado de las cosas que te muestra la ciudad. Ya que tienes corazón, sítete de él mientras puedas. Es lo único que puedo enseñarte.”

Haruki Murakami (El fin del mundo y un despiadado país de las maravillas)

Para Aurora, por su amistad y su sabiduría.

ÍNDICE

	PÁG.
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
• Acidificación de los suelos y Aluminio	13
• Toxicidad del Aluminio	15
• Tolerancia al Aluminio	18
• <i>Fagopyrum esculentum</i>	21
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
RESULTADOS	40
• Efecto del aluminio en el crecimiento de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida.	40
• Efecto del aluminio en la tasa fotosintética de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida.	46
• Efecto del aluminio en los niveles endógenos de ABA en hojas, tallos y raíces de <i>F. esculentum</i> .	53
• Asociación de cristales de oxalato y Al en el tejido foliar de <i>F. esculentum</i> .	56
• Proporción de aluminio y elementos esenciales en hojas, tallos y raíces de <i>F. esculentum</i> .	58
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	62
PERSPECTIVAS	74
ANEXO I. TABLAS ESTADÍSTICAS	76
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA	TÍTULO	PÁG.
1	Formas iónicas del Al soluble dependiendo del pH del medio.	14
2	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench, descripción botánica.	21
3	Plantas de <i>F. esculentum</i> en el sistema hidropónico experimental.	27
4	Duración del ciclo de vida de <i>F. esculentum</i> en un sistema hidropónico.	28
5	Criterios de selección de hojas para localización de cristales de oxalato.	37
6	Biomasa total y AGR de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	40
7	RGR de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	41
8	Componentes de la RGR durante el ciclo de vida de <i>F. esculentum</i> con diferentes concentraciones de Al.	43
9	Asignación de biomasa a raíz, tallos, hojas e inflorescencias de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	45
10	Número de inflorescencias producidas en dos etapas del ciclo de vida de <i>F. esculentum</i> con diferentes concentraciones de Al.	46
11	Curvas de respuesta a luz y CO ₂ registradas en diferentes etapas del ciclo de vida de <i>F. esculentum</i> con diferentes concentraciones de Al.	47
12	A _{max} y V _{cmax} de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	48
13	Tasa de asimilación de CO ₂ y Conductancia estomática de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	53
14	Concentración de ABA endógeno en hojas, tallos y raíces de <i>F. esculentum</i> durante su ciclo de vida con diferentes concentraciones de Al.	55
15	Corte transversal de hoja de <i>F. esculentum</i> , localización de drusas.	56
16	Análisis MEB-EDS en cortes transversales de hojas de <i>F. esculentum</i> .	58
17	Proporción relativa de Al en hojas, tallos y raíces de <i>F. esculentum</i> .	60
18	Proporción relativa de macro y microelementos en hojas, tallos y raíces de <i>F. esculentum</i> con diferentes concentraciones de Al.	61
TABLA	TÍTULO	PÁG.
1	Componentes de la solución nutritiva Hoagland con 1/5 de fuerza iónica.	26
2	Parámetros fotosintéticos evaluados en <i>F. esculentum</i> .	34
3	Curva estándar de ABA para la cuantificación de niveles endógenos.	36
4	Parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de respuesta a luz.	50
5	Parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de respuesta a CO ₂ .	51

ABREVIATURAS

Al = AlCl₃, Al³⁺ ó aluminio

AGR = Absolute Growth Rate (Tasa Absoluta de Crecimiento)

AQE = Apparent Quantum Efficiency (Eficiencia Fotoquímica Aparente)

FWR = Flower Weight Ratio (Proporción de Peso en Flores)

LAR = Leaf Area Ratio (Proporción de Área Foliar)

LCP = Light Compensation Point (Punto de Compensación de Luz)

LSP = Light Saturation Point (Punto de Saturación de Luz)

LWR = Leaf Weight Ratio (Proporción de Peso Foliar)

NAR = Net Assimilation Rate (Tasa de Asimilación Neta)

R / S = Root / Shoot Allometry (Coeficiente Alométrico)

RGR = Relative Growth Rate (Tasa Relativa de Crecimiento)

RWR = Root Weight Ratio (Proporción de Peso en Raíz)

SLA = Specific Leaf Area (Área Foliar Específica)

SWR = Stem Weight Ratio (Proporción de Peso en Tallo)

TPU = Triose Phosphate Utilization (Utilización de Triosa Fosfatos)

NOTA: La mayoría de abreviaturas que se utilizan en el texto se refieren a las siglas en inglés. Por convención, no se utilizaron las abreviaturas de los términos en español, aunque si se indica el significado de cada uno.

RESUMEN

La acidificación de los suelos ocurre debido a diversos factores naturales o antropogénicos. Se da por la disminución del pH hasta valores de 5.5 o más bajos. Una característica importante de los suelos ácidos es la presencia de aluminio solubilizado en forma de catión trivalente (Al^{3+}), el cual llega a ser muy tóxico para las plantas. Sin embargo, *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) tolera naturalmente la presencia de Al^{3+} a través de dos mecanismos: la exclusión y la acumulación. En este trabajo se evaluaron los efectos del aluminio en procesos fisiológicos de *F. esculentum* durante su ciclo de vida, tales como el crecimiento relativo, tasa fotosintética, niveles endógenos de ABA y acumulación de Al y otros nutrientes minerales en toda la planta, así como la posible asociación del Al en cristales de oxalato dentro del tejido foliar. Se establecieron plantas obtenidas de la germinación de semillas en un sistema hidropónico bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento. El diseño experimental consistió en plantas tratadas con tres diferentes concentraciones de AlCl_3 (25, 50 ó 100 μM) y plantas establecidas en solución nutritiva sin aluminio como grupo control. No se registraron diferencias significativas en el crecimiento y tasa fotosintética de *F. esculentum* con las diferentes concentraciones de aluminio, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de tolerancia que consiste en evitar la entrada del Al a órganos aéreos y mantener a este elemento en raíces sin que se produzca alguna respuesta inhibitoria. La asimilación y asignación de otros nutrientes minerales en raíces, tallos y hojas no se vieron modificadas significativamente por la presencia del Al, que indica un ajuste metabólico muy eficiente bajo condiciones experimentales hidropónicas. Los niveles endógenos de ABA no presentaron diferencias significativas entre plantas tratadas con aluminio y el control, lo que sugiere que no existe una respuesta específica de esta fitohormona a la presencia de Al. Finalmente, debido a que el Al se mantuvo todo el tiempo en las raíces de *F. esculentum* y no fue

traslocado a los órganos aéreos, no existió ninguna relación entre la formación de cristales de oxalato y la acumulación de Al. Es importante recalcar que este trabajo es el primero hasta hoy que ha estudiado la respuesta al Al en el ciclo de vida completo de *F. esculentum* de una manera integral, considerando parámetros de respuesta morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

ABSTRACT

Soil acidification occurs due to natural and anthropogenic factors. It's given by the decrease of soil pH to 5.5 or lower. An important feature of acid soils is the presence of solubilized aluminum as trivalent cation (Al^{3+}), which becomes very toxic to plants. However, *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) naturally tolerate Al^{3+} through two mechanisms: exclusion and accumulation. This study evaluated the effects of aluminum on physiological processes of *F. esculentum* during its life cycle, such as relative growth, photosynthetic rate, endogenous ABA levels, accumulation of Al and other mineral nutrients in the whole plant, as well as the possible association of Al-oxalate crystals within the leaf tissue. Plants obtained from seed germination were established in a hydroponic system under controlled conditions in a growth chamber. The experimental design consisted of plants treated with three different concentrations of AlCl_3 (25, 50 or 100 μM), and plants established in nutrient solution without aluminum. Results showed that there were no significant differences in growth and photosynthetic rate of *F. esculentum* with the different aluminum concentrations, suggesting the presence of a tolerance mechanism to avoid the entrance of Al into the shoot, maintaining the Al only in roots without triggering any inhibitory response. Nutrients and mineral uptake and allocation into roots, stems and leaves were not significantly modified by Al, indicating a very efficient metabolic adjustment under hydroponic experimental conditions. Endogenous ABA levels showed no significant differences between plants treated with or without aluminum, suggesting that there is not a specific response of this phytohormone to Al. Finally, because Al was kept in *F. esculentum*'s roots and it was not translocated to shoot, there was no relationship between oxalate crystals formation and accumulation of Al. It's important to emphasize that this work is at present the first one that has

studied the response to Al in the *F. esculentum*'s life cycle in an integrative way, considering morphological, physiological and biochemical parameters.

INTRODUCCIÓN

- **Acidificación de los suelos y Aluminio**

Los suelos ácidos naturales cubren cerca del 30% del total de la superficie terrestre, estos se distribuyen en dos principales regiones geográficas: una templada – húmeda en el hemisferio norte, cuya cubierta vegetal es principalmente bosque de coníferas; y hacia el sur, una tropical – húmeda cubierta principalmente por selvas tropicales (von Uexküll y Mutert 1995). En estos ecosistemas naturales los suelos se vuelven gradualmente más ácidos con el tiempo debido a factores tales como la lixiviación de componentes químicos provocados por las lluvias, los procesos de formación del suelo, los ciclos biogeoquímicos y las condiciones climáticas. Sin embargo, existen otros factores importantes que contribuyen al incremento de la acidificación, los cuales incluyen actividades humanas como la deforestación de comunidades vegetales, la agricultura, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, la minería y la industria (Kochian *et al.* 2004; Miyasaka *et al.* 2007; Ramírez-Rodríguez *et al.* 2005). Además, la lluvia ácida, que contiene altos niveles de ácido nítrico y sulfúrico, es una consecuencia de la contaminación ambiental que incrementa la formación de suelos ácidos a escala mundial (Samac y Tesfaye 2003).

Por estas razones, aproximadamente el 50% del total de tierras potencialmente cultivables en el mundo están en proceso de acidificación, lo que a su vez afecta gravemente la producción agrícola mundial (von Uexküll y Mutert 1995).

La acidificación del suelo implica la disminución del pH hasta valores de 5.5 o menos. Un suelo ácido generalmente es poco fértil debido a la alta concentración de iones H^+ , la deficiencia de nutrientes esenciales (P, Ca, Mg y K) y la solubilidad de otros elementos como Mn, Fe ó Al en

concentraciones que provocan efectos tóxicos para los organismos (Samac y Tesfaye 2003; von Uexküll y Mutert 1995).

El Al es el tercer elemento más abundante de la corteza terrestre, por ello es uno de los minerales más comunes del suelo (en promedio 7%)

(Pilon-Smits *et al.* 2009). Generalmente se encuentra ligado a minerales primarios y secundarios, especialmente óxidos y aluminosilicatos (Delhaize y Ryan 1995). Sin embargo, bajo condiciones de alta precipitación, climas cálidos y acidez, este tipo de minerales son solubilizados y el aluminio es liberado en forma de iones que se vuelven más disponibles en el suelo. El aluminio soluble puede encontrarse en diferentes especies iónicas, dependiendo principalmente del pH del suelo (Pilon-Smits *et al.* 2009). La especie iónica más fitotóxica del aluminio es el catión trivalente Al^{3+} , el cuál predomina en suelos con un pH menor a 4.5 y más del 60% de saturación de aluminio con una alta capacidad de intercambio catiónico (Figura 1; Miyasaka *et al.* 2007; Panda *et al.* 2009; Ramírez-Rodríguez *et al.* 2005). Otras especies iónicas que también pueden ser tóxicas en menor grado son los complejos de aluminio con grupos hidroxilo (AlOH^{2+} y Al(OH)_2^+) (Miyasaka *et al.* 2007; Panda *et al.* 2009). Complejos más estables como el hidróxido de aluminio Al(OH)_3 o el ion aluminato Al(OH)_4^- ya no causan ningún efecto tóxico y predominan en suelos más alcalinos (Delhaize y Ryan 1995; Miyasaka *et al.* 2007).

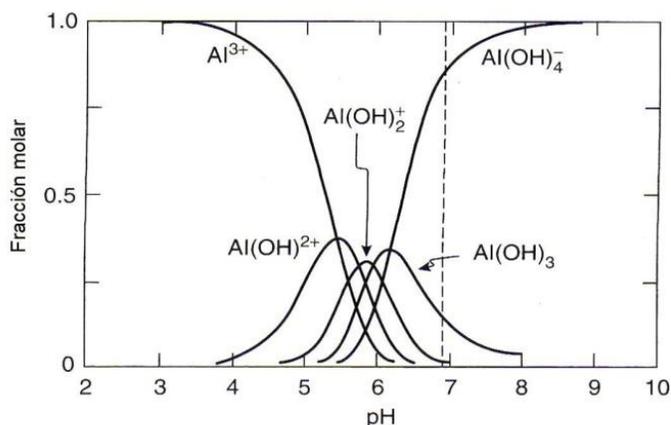


Figura 1. Diferentes formas iónicas del Al soluble, cuya conformación depende del pH del medio. La forma Al^{3+} se considera la más fitotóxica. (Tomado de Miyasaka *et al.*, 2006).

- **Toxicidad del Aluminio**

En concentraciones altas, el aluminio en su forma soluble es tóxico tanto para plantas como para animales (Pilon-Smits *et al.* 2009). La mayoría de las plantas que se enfrentan a condiciones de acidez en el suelo, presentan una gran variedad de síntomas de toxicidad y deficiencia de nutrientes que finalmente se ve reflejado en su productividad. Las respuestas fitotóxicas que induce el Al en su forma trivalente (Al^{3+}) pueden presentarse de manera casi inmediata a la exposición del catión, o a largo plazo durante el desarrollo de las plantas (Miyasaka *et al.* 2007). Concentraciones micromolares de Al^{3+} (desde 1 hasta 100 μM) pueden inducir un primer síntoma de toxicidad generalmente durante las primeras horas, o incluso minutos. A través de diferentes métodos de medición se ha logrado establecer que una planta sensible puede presentar una inhibición significativa de su elongación radicular en un lapso de 30 minutos a 2 horas (Barceló y Poschenrieder 2002).

El primer síntoma de toxicidad por Al^{3+} en plantas es la inhibición de la elongación radicular, ya que la raíz es el primer órgano que entra en contacto con el Al, y por lo tanto es la que genera la respuesta primaria de inhibición (Panda *et al.* 2009; Pilon-Smits *et al.* 2009). La zona del ápice radicular (los primeros 5 – 10 mm) es la más sensible a los efectos tóxicos provocados por el Al, específicamente la zona de transición, dónde los procesos de división y elongación celular son menos activos. La aplicación del catión en cualquier otra porción de la raíz no afecta su crecimiento (Delhaize y Ryan 1995; Ma y Furukawa 2003; Panda *et al.* 2009; Reyna-Llorens 2010; Sivaguru y Horst 1998). La toxicidad por Al está asociada a alteraciones en un cierto número de procesos fisiológicos, celulares y bioquímicos después de la inhibición de la elongación celular. A continuación se describen los más comunes.

Efectos moleculares: El Al es un elemento muy reactivo y tiene una afinidad muy alta por proteínas, fosfato inorgánico, nucleótidos, RNA, DNA, ácidos carboxílicos, fosfolípidos, flavonoides y antocianinas (Samac y Tesfaye 2003).

Inhibe rápidamente el flujo de auxinas en las células distales de la zona de transición de la raíz en plantas de maíz (*Zea mays*) sensibles al aluminio, dicha respuesta se encuentra asociada a la inhibición del crecimiento radicular (Kollmeier *et al.* 2000; Samac y Tesfaye 2003). La participación de auxinas y citocininas en la respuesta de toxicidad por Al parece estar relacionada con la interacción Al-Ca que altera el patrón de transporte de las auxinas, así como la biosíntesis y el transporte de citocininas (Mossor-Pietraszewska 2001; Rengel 1992).

La actividad mitocondrial se ha visto suprimida en cultivos celulares de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y raíces de chícharo (*Pisum sativum*) tratados con 50, 75 y 100 μM de Al, seguido por la inhibición de la respiración, disminución de moléculas de ATP y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Yamamoto *et al.* 2002).

Por otra parte, el Al reduce la replicación del DNA por el incremento en la rigidez de la doble hélice, disminuye la disponibilidad de P en la superficie de la raíz, induce la formación de calosa y la deposición de lignina (Ma y Furukawa 2003; Miyasaka *et al.* 2007; Mossor-Pietraszewska 2001).

Efectos celulares: La membrana plasmática y la pared celular representan el blanco celular primario de toxicidad por Al, esto debido a la alta afinidad del Al^{3+} por los grupos carboxilo de las pectinas de la pared celular y a los fosfolípidos de la membrana. Estas interacciones incrementan la rigidez de ambas estructuras celulares, interfiriendo con la división celular en

células epidérmicas y corticales de la raíz (Delhaize y Ryan 1995; Mossor-Pietraszewska 2001; Panda *et al.* 2009).

La inhibición de la elongación celular en la raíz se debe principalmente al desplazamiento del Ca^{2+} por el Al^{3+} en los puentes pectínicos de la pared celular, haciéndola más rígida, ya que la extensibilidad ácida no se puede realizar correctamente (Miyasaka *et al.* 2007; Rengel 1992). También se han observado alteraciones en el metabolismo de polisacáridos de la pared celular (pectina, hemicelulosa y celulosa) de plántulas de chayote (*Sechium edule*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Le Van *et al.* 1994; Miyasaka *et al.* 2007; Tabuchi y Matsumoto 2001).

La interrupción de procesos celulares tales como la actividad del aparato de golgi y la secreción de mucílago en el ápice radicular también es un efecto a corto plazo provocado por el Al en maíz y trigo (Miyasaka *et al.* 2007). Se ha observado además, que las células periféricas del ápice radicular pueden presentar daño e incluso muerte celular durante las primeras horas de exposición al Al en *Phaseolus vulgaris*, *Triticum aestivum* y *Fagopyrum esculentum* (Miyasaka y Hawes 2001; Reyna-Llorens 2010; Zhu *et al.* 2003).

El aluminio soluble también interfiere con proteínas involucradas en el transporte y la transducción de señales. Una vez en el simplasto, puede provocar la desorganización del citoesqueleto, la despolarización de la membrana plasmática, la interrupción de la homeostasis del Ca, estrés oxidativo, la unión a las membranas internas de los cloroplastos y la entrada al núcleo celular (Miyasaka *et al.* 2007; Panda *et al.* 2009; Rengel 1992). El aluminio induce un rápido incremento en la rigidez de la red de actina en células de raíz de soya (*Glycine max*), lo que puede estar relacionado directamente con la inhibición del crecimiento. Interfiere con la

formación de los complejos $[Mg^{2+}\text{-ATP}]$ y $[Mg^{2+}\text{-GTP}]$, los cuales regulan la estabilidad/inestabilidad de los microtúbulos y microfilamentos (Grabski y Schindler 1995).

El aumento en la síntesis de calosa, inducido principalmente por la lipoperoxidación de la membrana plasmática, propicia su deposición en los plasmodesmos bloqueando el movimiento de moléculas de célula a célula, por lo tanto, el Al interfiere con la comunicación celular en el ápice de la raíz (Delhaize y Ryan 1995; Sivaguru *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2001).

Efectos fisiológicos: Estos se pueden considerar como efectos tóxicos a largo plazo que se reflejan varios días o semanas después de la primera exposición a Al^{3+} , y los principales efectos observados son: disminución en la biomasa de raíces y parte aérea, morfología anormal de la raíz, restricción en la asimilación y transporte de agua y nutrientes, así como inhibición de la fotosíntesis (Miyasaka *et al.* 2007; Mossor-Pietraszewska 2001). Las plantas sensibles a la toxicidad por Al presentan generalmente un escaso rendimiento y mala calidad en cultivos.

Se ha demostrado que el Al induce una disminución en el contenido de clorofila y la tasa fotosintética. Este impacto del Al en la fotosíntesis es indirecto debido a daños estructurales de los cloroplastos o una alteración en el transporte de electrones en el fotosistema II (PSII) (Jiang *et al.* 2009; Peixoto *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2007).

- **Tolerancia al Aluminio**

Aunque el aluminio soluble produce toxicidad en altas concentraciones, se ha observado que en varias especies vegetales parece tener efectos benéficos, especialmente aquellas que crecen de manera natural en suelos ácidos, por ejemplo: *Miscanthus sinensis*, *Camellia sinensis*, *Melastoma malabathricum*, *Conostegia xalapensis* y *F. esculentum* (Ghanati *et al.* 2005; González-Santana 2009; Ma y Furukawa 2003; Ma y Hiradate 2000; Osaki *et al.* 1997; Watanabe *et al.* 2005; 2006;

Watanabe *et al.* 2008). También existen genotipos de plantas resistentes a condiciones de acidez y altas concentraciones de Al que no necesariamente son nativas en este tipo de suelos, es el caso del trigo, maíz, girasol, soya y frijol (López-Bucio *et al.* 2000; Ma 2000; Ryan y Delhaize 2001; Watanabe y Osaki 2002).

Estas plantas tolerantes que pueden vivir bajo condiciones de acidez en el suelo, han desarrollado mecanismos de tolerancia a través de vías apoplásticas o simplásticas (Pilon-Smits *et al.* 2009). Los mecanismos apoplásticos o mecanismos de exclusión, incluyen la unión del Al a la pared celular, de tal manera que se impide la entrada del elemento al simplasto, secreciones de la raíz que aumentan el pH del suelo haciendo menos soluble el Al, y la exudación de ácidos orgánicos o mucílago que se unen al aluminio y reducen su movilidad (Kochian *et al.* 2004; Ma *et al.* 2001). Mientras que los mecanismos simplásticos o de acumulación, implican el almacenamiento y acumulación de Al en formas no tóxicas dentro de las vacuolas, formando complejos químicos con ácidos orgánicos (Ma *et al.* 2001).

La exudación de ácidos orgánicos es el mecanismo de exclusión más común en plantas tolerantes. El citrato, oxalato y malato son algunos de los ácidos orgánicos que las raíces liberan de manera frecuente y que forman complejos suficientemente estables con el catión Al^{3+} para neutralizarlo (Ma *et al.* 2001). Un incremento en la tolerancia al Al está relacionado con un aumento en las tasas de exudación de ácidos orgánicos (Ramírez-Rodríguez *et al.* 2005b).

De acuerdo con varios autores (Li *et al.* 2000; Ma 2000; Ma *et al.* 2001), se han identificado dos mecanismos de secreción de ácidos orgánicos en plantas tolerantes al Al. El primero es un mecanismo de “respuesta inmediata”, en el que no pasan más de 30 minutos entre la aplicación del Al a las raíces y la liberación de ácidos orgánicos por parte de éstas; esto sugiere que el Al

activa proteínas ya existentes (receptores y transportadores transmembranales) que desencadenan la liberación de los ácidos orgánicos, sin necesidad de inducir la síntesis de nuevas proteínas.

Un segundo mecanismo de exudación consiste en un retraso en la respuesta de varias horas después de la aplicación del Al. Este tipo de respuesta indica que es inminente la inducción de síntesis de nuevas proteínas, que pueden estar involucradas en el metabolismo de los ácidos orgánicos o en el transporte de los mismos intra y extracelularmente (Ramírez-Rodríguez *et al.* 2005).

Finalmente, hay especies que toleran al Al por medio de mecanismos de acumulación, pueden almacenarlo en sus hojas en concentraciones que llegan a superar los 30 g Al kg⁻¹ de peso seco (como en *Camellia sinensis*). Esto depende de diferentes procesos de formación de complejos químicos, detoxificación y transporte dentro de la planta (Zhou *et al.* 2011). Se consideran especies acumuladoras aquellas que contienen 1g Al kg⁻¹ o más en sus hojas. Algunas de estas especies son: *Camellia sinensis* (Ghanati *et al.* 2005), *Hydrangea sp.* (Ma *et al.* 1997) y *F. esculentum*, que particularmente puede acumular hasta 15 g Al kg⁻¹ de aluminio en sus hojas cuando crece en suelos ácidos (Ma y Hiradate 2000).

La acumulación de Al en órganos aéreos implica que el aluminio soluble sea transportado a través del xilema y después sea almacenado en vacuolas o en el apoplasto dentro de las hojas. Para proteger a las células de cualquier daño, el Al se une a ligandos orgánicos cuando es transportado a través de la planta (Zhou *et al.* 2011).

- *Fagopyrum esculentum*

Aquellas plantas que presentan una tolerancia natural a las altas concentraciones de Al^{3+} en suelos ácidos pueden desarrollar cualquiera de los dos mecanismos de tolerancia antes mencionados, incluso, existen casos en los que una especie desarrolla ambos mecanismos de manera conjunta, por lo que su nivel de resistencia es muy alto. El mejor ejemplo de esto es *F. esculentum*, una planta de importancia agrícola secundaria que utiliza como mecanismo de exclusión la secreción de oxalato a través de sus raíces, pero también puede acumular el Al en sus hojas en forma de un complejo no tóxico Al-oxalato en una proporción 1:3 respectivamente. En este mecanismo, el complejo Al-oxalato entra a las células radiculares y es traslocado hacia las hojas a través del xilema pero formando complejos con el citrato (Al-citrato 1:1), una vez que éstos llegan a las hojas, el Al vuelve a ligarse al oxalato para almacenarse en las vacuolas en la forma Al-oxalato (1:3) (Ma y Hiradate 2000; Ma *et al.* 1998; Shen *et al.* 2004; Shen y Ma 2001; Shen *et al.* 2002; Shen *et al.* 2006).

Fagopyrum esculentum Moench (Figura 2), comúnmente llamada “trigo sarraceno” es una planta de origen asiático, distribuida ampliamente junto con otras especies del género en el Centro y

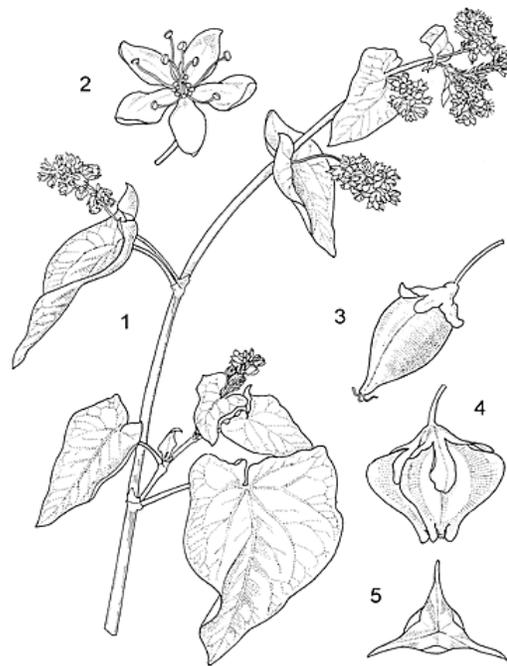


Figura 2. *Fagopyrum esculentum* Moench. 1) Rama con inflorescencia, 2) Flor, 3) Fruto sin alas, 4) Fruto alado y 5) Vista superior de un fruto alado. (Tomada de PROTA Database, <http://www.prota.org/>).

Sureste de Asia, en regiones montañosas con suelos ácidos y pobres en nutrientes.

Taxonómicamente pertenece a la Familia Polygonaceae. Es una herbácea anual con un ciclo de

vida muy corto (6 – 8 semanas) que alcanza una altura máxima de 1 m; sus hojas son pecioladas o sésiles (las más jóvenes) con láminas ovado-triangules a triangulares de 2 a 8 cm de longitud, puntas acuminadas y bases cordiformes; presenta inflorescencias terminales en forma de panículas con flores blancas o rosas pediceladas de 6 mm de diámetro; los frutos son aquenios triangulares generalmente alados (Figura 2) (Campbell 1997).

Es una planta de importancia agrícola secundaria, es decir, que puede ser utilizada como cultivo alternativo a otro tipo de cereales como el trigo y el arroz. Se utiliza como abono verde para enriquecer suelos pobres en nutrientes o como cultivo de reemplazo para desplazar malezas (Campbell 1997). Su semilla es utilizada como harina para la elaboración de panes ó como alimento para aves. Las hojas y los tallos son comúnmente consumidos en la India como hortaliza y también se puede producir miel de muy alta calidad a partir de esta especie, ya que los apicultores de diferentes países utilizan el trigo sarraceno como fuente de néctar, principalmente en temporadas en las que otras fuentes de néctar son escasas (Campbell 1997).

Por otro lado, el trigo sarraceno tiene propiedades adicionales a las agrícolas y alimenticias; las hojas, tallos, flores y frutos se utilizan para extraer un flavonoide diglucosilado llamado rutina (quercetin-3-rutinosina) cuya propiedad medicinal se aprovecha para el tratamiento de desórdenes vasculares caracterizados por la anormalidad, fragilidad y permeabilidad de los vasos capilares (Campbell 1997; Kreft *et al.* 2006). En Japón ha sido utilizada para incrementar la elasticidad de los vasos sanguíneos y prevenir la arterioesclerosis. De acuerdo a Oomah y Mazza (1996), las concentraciones más altas de rutina se encuentran en la semilla y en su testa con 47 y 77 mg 100 g⁻¹, respectivamente.

ANTECEDENTES

Todos los estudios que ya se han realizado con respecto a la tolerancia de *F. esculentum* al aluminio se han enfocado en las respuestas fisiológicas y bioquímicas generadas por la raíz, o las respuestas de acumulación en hojas de plántulas que no superan los 15 días de edad (Klug y Horst 2010a; b; Klug *et al.* 2011; Ma y Hiradate 2000; Ma *et al.* 1998; Reyna-Llorens 2010; Shen *et al.* 2004; Shen y Ma 2001; Zheng *et al.* 1998; Zheng *et al.* 2005). Sólo existe un trabajo en el que se reporta la acumulación de Al en hojas, pero no en semillas, por lo que se cultivaron plantas de *F. esculentum* durante 12 semanas, sin embargo, las cuantificaciones se hicieron al finalizar el experimento durante la producción de semillas, y utilizando como sustrato un suelo ácido (Shen *et al.* 2006).

Por esta razón no hay suficiente información sobre la respuesta fisiológica del efecto del aluminio en procesos importantes como la fotosíntesis y el crecimiento a lo largo del ciclo de vida de especies acumuladoras como *F. esculentum*. Únicamente en *Camellia sinensis* (Ghanati *et al.* 2005), *Conostegia xalapensis* (González-Santana 2009) y *Melastoma malabathricum* (Watanabe *et al.* 2005) se ha reportado que el crecimiento radicular se estimula significativamente por el aluminio.

En otro aspecto, se ha propuesto que el ácido abscísico (ABA) puede estar involucrado en el proceso de señalización para la secreción de oxalato en *F. esculentum* (Ma y Furukawa 2003). Ya que el ABA juega un papel muy importante en la regulación de la apertura de los estomas, influye también en la tasa fotosintética de la planta completa. Es por ello que en este trabajo se probó la hipótesis de si los niveles de ABA endógeno aumentaban en respuesta a la presencia de aluminio, y si este aumento funcionaba como señal para el cierre estomático, y por lo tanto, había

una influencia en la tasa fotosintética y una alteración en la ganancia de carbono, así como una mayor asignación de recursos para la formación de biomasa en la raíz.

En el caso de *F. esculentum*, el ácido orgánico directamente asociado con los mecanismos de tolerancia al aluminio (tanto exclusión como tolerancia interna) es el oxalato. Sin embargo, este ácido también está involucrado en la detoxificación de otros metales tóxicos como el plomo (Yang *et al.* 2000), estroncio, cobre (Mazen y Maghraby 1997/98) y cadmio (Choi *et al.* 2001; Mazen y Maghraby 1997/98), donde dichos metales son incorporados en una forma no tóxica dentro de cristales de oxalato. De hecho, el Al también se ha encontrado asociado a cristales de oxalato en hojas de la planta del yute, *Corchorus olitorius* (Mazen 2004). Por lo tanto, fue de gran interés determinar si el aluminio acumulado en el tejido de *F. esculentum*, además de almacenarse en las vacuolas, se encuentra asociado a cristales de oxalato dentro del tejido foliar. Esto nos permitirá conocer si existe una nueva estrategia de tolerancia que hasta el momento no ha sido encontrada en esta especie.

HIPÓTESIS

Si *F. esculentum* es una planta tolerante al aluminio, realizará ajustes en su tasa fotosintética a través de cambios en los niveles endógenos de ABA, y por lo tanto, habrá una alteración en la ganancia y asignación de recursos, manteniendo un crecimiento óptimo en un medio con aluminio. Asimismo, *F. esculentum* acumulará una mayor proporción de aluminio en su tejido foliar a través de asociaciones con cristales de oxalato, como una estrategia más dentro de sus mecanismos de tolerancia.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Evaluar los efectos del aluminio en el crecimiento y fotosíntesis de *Fagopyrum esculentum* Moench, así como su relación con los niveles endógenos de ABA y su acumulación en los diferentes tejidos.

- **Objetivos particulares**

Realizar el análisis del crecimiento durante el ciclo de vida de *F. esculentum*, con diferentes concentraciones de aluminio.

Evaluar la tasa fotosintética de *F. esculentum* en plantas expuestas a diferentes concentraciones de aluminio.

Evaluar los niveles endógenos de ABA en el tejido de *F. esculentum* de las plantas tratadas con aluminio.

Determinar la presencia de Al en hojas y raíces de *F. esculentum* en plantas en fructificación y determinar si el Al se encuentra asociado a cristales de oxalato en el tejido foliar.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Material Vegetal

Todos los bioensayos se realizaron con semillas de *Fagopyrum esculentum* var. Mancan, las cuales se obtuvieron de Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá.

Para cada bioensayo se germinaron semillas en un medio sólido de agar/agua destilada 1% (m/v) a 25°C y en la oscuridad dentro de una cámara de ambiente controlado (CONVIRON® PGR15, Canadá). Después de 48 horas de la siembra, las plántulas fueron transferidas a recipientes de 0.5 L con una solución de CaCl₂ 0.5 mM (pH 4.5) y se mantuvieron con aireación continua por un período de 24 – 48 horas para su aclimatación a un medio ácido. Posteriormente, se transfirieron a una solución nutritiva de Hoagland con 1/5 de su fuerza iónica, ajustada a pH 4.5 (Tabla 1; Ma *et al.*, 1998; Zheng *et al.*, 1998; Shen y Ma, 2001; Shen *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005). Los tratamientos con aluminio se aplicaron adicionando a la solución nutritiva 25, 50 y 100 µM de AlCl₃ (Zheng *et al.*, 1998; 2005). El control consistió en plantas establecidas en la solución nutritiva a pH 4.5, sin aluminio. Las plantas se mantuvieron con aireación continua en la cámara de ambiente controlado, con un fotoperiodo de 12/12 h, 25°/20°C (día/noche), intensidad luminosa de 200-250 µmol m⁻² s⁻¹ y una concentración de CO₂ atmosférico de aproximadamente 390 ppm. Cada semana la solución nutritiva se cambió por solución fresca para evitar modificaciones del pH y deficiencia de nutrientes (Figura 3).

Tabla 1. Componentes de la solución nutritiva Hoagland 1/5 de fuerza iónica

Macronutrientes	Concentración final / L
Nitrato de potasio, KNO ₃	1 mM
Nitrato de calcio, Ca(NO ₃) ₂	1 mM
Sulfato de magnesio, MgSO ₄	0.4 mM
Fosfato de amonio, NH ₄ H ₂ PO ₄	0.2 mM
Micronutrientes	Concentración final / L
Sulfato ferroso, FeSO ₄ -EDTA	20 µM
Ácido bórico, H ₃ BO ₃	3 µM
Cloruro manganoso, MnCl ₂	0.5 µM
Sulfato de cobre, CuSO ₄	0.2 µM
Sulfato de zinc, ZnSO ₄	0.4 µM
Molibdato de amonio, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1 µM



Figura 3. Plantas de *F. esculentum* en un sistema hidropónico con diferentes concentraciones de aluminio en el medio nutritivo. Se establecieron hasta 10 plantas por tratamiento, cada una en un recipiente de 1L con aireación continua. Las plantas de todos los tratamientos se distribuyeron al azar dentro de la cámara de crecimiento.

El número de plantas que se estableció en cada bioensayo dependió del material vegetal requerido para las evaluaciones fisiológicas. Para el análisis de crecimiento relativo y la evaluación de la tasa fotosintética se utilizaron las mismas plantas de un solo bioensayo, mientras que para las cuantificaciones de ABA y de aluminio, así como para la localización de cristales de oxalato, se cosecharon plantas de otros dos bioensayos independientes. Los tiempos de cosecha para las distintas evaluaciones y las condiciones del sistema hidropónico con el que se mantuvieron las plantas se definieron con experimentos prospectivos previos que permitieron monitorear la duración del ciclo de vida completo de la especie y establecer las condiciones experimentales del sistema hidropónico. En la Figura 4 se esquematiza el ciclo de vida de *F. esculentum* y los tiempos de cosecha elegidos para las evaluaciones fisiológicas.

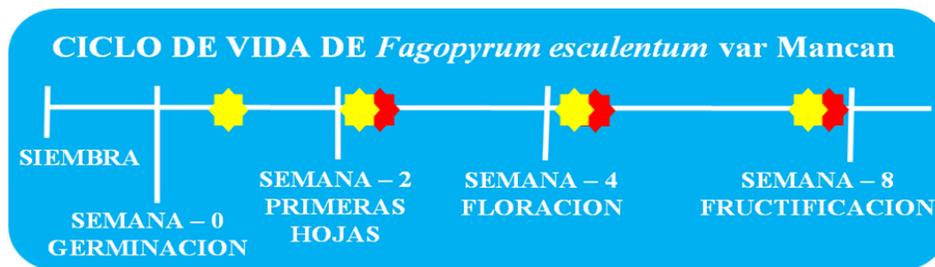


Figura 4. Ciclo de vida de *F. esculentum* en un sistema hidropónico. Los símbolos amarillos indican los tiempos de cosecha programados para el análisis de crecimiento relativo. Los símbolos rojos indican los tiempos de cosecha para la cuantificación de ácido abscísico (ABA), cuantificación de aluminio en el tejido y la localización de cristales de oxalato de aluminio en las hojas. Las mediciones de fotosíntesis se realizaron un día antes de cada cosecha para medir el crecimiento relativo a partir de la formación de las primeras hojas verdaderas.

- **Análisis del crecimiento relativo de *F. esculentum* durante su ciclo de vida.**

Para evaluar el efecto del Al en el crecimiento de *F. esculentum* durante su ciclo de vida, se realizó un análisis clásico con base en los parámetros propuestos por Hunt (1990) y Evans (1972). Este análisis nos permite evaluar los aspectos fisiológicos del crecimiento a través de la tasa neta de asimilación (NAR) y los aspectos morfológicos representados por la proporción del área foliar (LAR), la cual tiene dos componentes: el índice de peso foliar (LWR) y el área foliar específica (SLA). Estos parámetros se correlacionan a su vez con la tasa relativa de crecimiento (RGR), definida como el incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total de la planta por unidad de tiempo, de esta forma: $RGR = NAR + LAR$ (Evans, 1972).

Se realizaron cuatro cosechas en diferentes etapas del ciclo de vida de *F. esculentum*, las cuales se indican en la Figura 4. En cada cosecha se tomaron 9 - 10 plantas por tratamiento, cada planta se fraccionó en tallo, raíz y hojas en cada etapa de desarrollo (en la etapa adulta también se separaron las flores y los frutos). De cada una de las partes se registró el peso fresco y peso seco, se midió el área foliar con un medidor láser de área foliar portátil (CID Bio-Science® CI-202) y se contó el número de hojas, inflorescencias y frutos. Los datos colectados se procesaron y se

calcularon los parámetros para el análisis clásico de crecimiento de acuerdo con Hunt (1990) y Evans (1972). Los parámetros de crecimiento relativo se describen a continuación:

BIOMASA TOTAL.- Representa el peso seco total expresado en mg. Los datos de este parámetro se transformaron a logaritmo natural para homogeneizar la variabilidad de los mismos (Marques 2004).

TASA ABSOLUTA DE CRECIMIENTO (AGR).- Implica una tasa de cambio ó un incremento en tamaño por unidad de tiempo. Se aplica comúnmente al peso seco total o al área foliar total por planta. En este caso, la AGR se calculó con base en el incremento en peso seco total por día (mg día^{-1}) con la siguiente fórmula:

$$AGR = \frac{(W_2 - W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

donde W_1 y t_1 se refieren al peso seco inicial (cosecha inicial), y W_2 y t_2 al peso seco final (cosecha final). Los datos de este parámetro también fueron transformados a logaritmo natural para homogeneizar la variabilidad de los mismos.

TASA RELATIVA DE CRECIMIENTO (RGR).- Se define como el incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total de la planta, por unidad de tiempo ($\text{mg mg}^{-1} \text{ día}^{-1}$). La fórmula para calcularla es la siguiente:

$$RGR = \frac{(\ln W_2 - \ln W_1)}{(t_2 - t_1)}$$

donde $\ln W_{1, 2}$ indican el logaritmo natural del peso seco total inicial, al tiempo de cosecha t_1 , ó final, al tiempo de cosecha t_2 .

TASA DE ASIMILACIÓN NETA (NAR).- Componente fisiológico de la RGR que indica la tasa de producción de biomasa seca por unidad de área foliar por unidad de tiempo ($\text{mg cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$). Este índice de eficiencia productiva de las plantas se calcula como una relación del peso seco total y el área foliar total. Para calcular este parámetro se utilizó la siguiente fórmula:

$$NAR = \frac{(W_2 - W_1)}{(t_2 - t_1)} * \frac{(\ln LA_2 - \ln LA_1)}{(LA_2 - LA_1)}$$

donde $LA_{1,2}$ indica el área foliar total inicial y final, y $W_{1,2}$ el peso seco total determinado a t_1 y t_2 .

PROPORCIÓN DEL ÁREA FOLIAR (LAR).- Es un índice morfológico que describe la producción foliar, el componente potencialmente fotosintético y de respiración de la planta. Este parámetro indica la relación entre el área foliar total en dos diferentes tiempos (t_1 y t_2) y la biomasa seca total de la planta determinada en esos tiempos (W_1 y W_2) (Evans, 1972). Se expresa en cm^2 de área foliar por mg de peso seco de la planta. Para calcularlo se utilizó la siguiente fórmula:

$$LAR = \left[\left(\frac{LA_1}{W_1} \right) + \left(\frac{LA_2}{W_2} \right) \right] \div 2$$

ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA (SLA).- Componente de LAR, es una medida que estima la densidad o el grosor relativo de las hojas. Este parámetro expresa la relación entre el área foliar total y el peso seco total de las hojas ($\text{cm}^2 \text{ mg}^{-1}$). Para calcular este índice se utilizó la siguiente fórmula:

$$SLA = \left[\left(\frac{LA_1}{LW_1} \right) + \left(\frac{LA_2}{LW_2} \right) \right] \div 2$$

donde LA_1 y LA_2 son el área foliar total inicial y final respectivamente, LW_1 y LW_2 indican el peso seco total inicial ó final de las hojas.

PROPORCIÓN DE PESO FOLIAR (LWR).- Es un componente de LAR y un índice que relaciona el peso seco total de las hojas con el peso seco total de la planta (mg mg^{-1}). Se refiere a la proporción de biomasa que la planta asigna a los órganos fotosintéticos y el promedio entre dos periodos de tiempo, éste parámetro se calculó con la siguiente fórmula:

$$LWR = \left[\left(\frac{LW1}{W1} \right) + \left(\frac{LW2}{W2} \right) \right] \div 2$$

donde $LW_{1,2}$ equivale al peso seco total de las hojas en un intervalo de tiempo y $W_{1,2}$ indica el peso seco total de la planta en ese intervalo.

COEFICIENTE ALOMÉTRICO (R/S).- Es un índice del balance de crecimiento entre la raíz y los componentes de la parte aérea (hojas y tallos) de la planta, integrado en un periodo de tiempo. El crecimiento balanceado entre ambas partes genera un valor igual a 1, por lo tanto, si el valor calculado es <1 significa que el crecimiento es mayor hacia la parte aérea, pero si el valor es >1 , entonces, es la raíz la que crece en una mayor proporción. Este parámetro se calculó de la siguiente manera:

$$R/S = \frac{RW}{(SW + LW)}$$

donde RW equivale al peso seco total de la raíz, SW al peso seco total del tallo y LW al peso seco total de las hojas.

ASIGNACIÓN DE BIOMASA.- Se refiere a la proporción de biomasa destinada a cada una de las partes u órganos que conforman a la planta completa. Para calcular las proporciones instantáneas de biomasa en cada órgano se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$RWR = RW/W$$

$$SWR = SW/W$$

$$LWR = LW/W$$

$$FWR = FW/W$$

donde RW , SW , LW y FW indican el peso seco total de raíz, tallo, hojas y flores respectivamente, mientras que W equivale al peso seco total de la planta. Este parámetro no tiene unidades debido a que se trata de una proporción o porcentaje de biomasa.

- **Evaluación de la tasa fotosintética de *F. esculentum* durante su ciclo de vida.**

Las mediciones de fotosíntesis se realizaron con un sistema de intercambio de gases (LI-COR® Portable Photosynthesis System LI-6400). Se midieron curvas de respuesta de fotosíntesis a la luz y al CO₂. El análisis de estas curvas permitió la determinación de parámetros fotosintéticos como: tasa máxima de fotosíntesis, eficiencia fotoquímica, tasa de transporte de electrones y otros que se indican en la Tabla 2. Se realizaron curvas de respuesta a luz y CO₂ en plantas control y en plantas tratadas con Al a partir de la aparición y maduración de las primeras hojas verdaderas, al inicio de la floración y al inicio del desarrollo de frutos (Figura 4). Asimismo, en un bioensayo independiente se realizaron mediciones puntuales de conductancia estomática y asimilación de CO₂ en las mismas tres etapas del ciclo de vida de *F. esculentum* para conocer la tasa fotosintética de las plantas en un momento determinado. Se midieron tres plantas por tratamiento en el caso de las curvas de respuesta y 5 plantas por tratamiento en las mediciones puntuales.

⊗ **Curvas de respuesta a luz:** Se evaluaron plantas de 11, 22 y 52 días de edad, en condiciones de CO₂ y temperatura constante (360 ppm y 25°C), variando la intensidad de luz, de 0 hasta 2000 μmol m⁻² s⁻¹. NOTA: En el caso de las plantas de 11 días de edad, éstas solo se expusieron a una intensidad de luz máxima de 700 μmol m⁻² s⁻¹ debido a que a mayores intensidades las hojas perdían turgencia y presentaban registros inestables.

⊗ **Curvas de respuesta a CO₂:** Se evaluaron plantas de 12, 23 y 50 días de edad, en condiciones de saturación de luz y temperatura constante (1000 μmol m⁻² s⁻¹ y 25 °C), variando la concentración de CO₂ circundante de 100 hasta 1000 ppm.

☼ **Mediciones puntuales:** Se midieron plantas de 16, 31 y 43 días de edad, en condiciones de saturación de luz, CO₂ y temperatura constante (1000 μmol m⁻² s⁻¹, 360 ppm y 25 °C, respectivamente).

Tabla 2. Parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de respuesta obtenidas en tres etapas del ciclo de vida de <i>Fagopyrum esculentum</i>	
Curvas de respuesta a Luz	Curvas de respuesta a CO ₂
Máxima tasa fotosintética (A _{max})	Máxima tasa de carboxilación (V _{cmax})
Punto de saturación de Luz (LSP)	Punto de compensación de CO ₂ (Γ*)
Punto de compensación de Luz (LCP)	Máxima tasa de transporte de electrones (J _{max})
Eficiencia fotoquímica (AQE)	Utilización de triosa-fosfatos (TPU)
Tasa de respiración	Tasa de respiración

Cada una de las curvas de respuesta a luz y CO₂ se analizaron con el software Photosynthesis LI-COR[®] versión 1.0.0.770, y a partir de éstas se calcularon los diferentes parámetros fotosintéticos (Tabla 2).

- **Cuantificación de los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) en hojas, raíces y tallos de *F. esculentum*.**

Se cuantificaron los niveles endógenos de ABA en raíces, tallos y hojas de plantas control y de plantas tratadas con 50 y 100 μM de AlCl₃. En este análisis ya no fueron incluidas las plantas tratadas con 25 μM de Al debido a que en los análisis previos de crecimiento y fotosíntesis, mostraron una respuesta muy similar a las plantas control. La cosecha de tejido se llevó a cabo en tres diferentes etapas del ciclo de vida de *F. esculentum* a partir de la aparición de las primeras hojas verdaderas (Figura 4). Las raíces, tallos y hojas de 9 – 10 plantas por tratamiento se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -75°C para su posterior análisis. La cuantificación se realizó utilizando el kit de detección de ABA por inmunoensayo Phytodetek[®] Adgia (Mertens *et al.*, 1983; Shen *et al.*, 2004) siguiendo la metodología descrita en el mismo kit.

Se pesaron 100 mg de tejido por muestra y se colocaron en tubos Eppendorf[®] cubiertos con papel aluminio, se les añadió 1 mL de metanol absoluto a cada una y se incubaron en agitación constante durante 24 horas a 4°C. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 1500 g (~4500 rpm) durante 10 minutos a 4°C y posteriormente se colectó el sobrenadante en tubos Eppendorf nuevos. Para la cuantificación se realizó una curva estándar a partir de un stock inicial de ABA, el cual se preparó disolviendo 10.57 mg del enantiómero ABA +/- en 2 mL de metanol absoluto. Se preparó un segundo stock (SS) diluyendo 100 µL del stock inicial en 9.9 mL de metanol absoluto, y a partir de este se realizaron las diluciones subsecuentes que conformaron la curva estándar completa que se muestra en la Tabla 3. En una placa para inmunoensayo se agregaron 100 µL de cada solución de la curva estándar por duplicado y del sobrenadante colectado de cada una de las muestras (estas por triplicado). Posteriormente se siguió el protocolo del kit de inmunodetección para determinar por espectrofotometría el porcentaje de unión al anticuerpo del ABA presente en cada muestra. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, en un espectrofotómetro para microplacas (ELISA, BioTek[®] ELx808, Estados Unidos). Para conocer la concentración de ABA en las muestras se hicieron cálculos por interpolación de la curva estándar, cuyas concentraciones eran conocidas (Tabla 3).

Tabla 3. Curva estándar de ABA realizada para la cuantificación de ABA endógeno en el tejido de *F. esculentum*.

Etiquetas de cada dilución	Solución de ABA	Amortiguador TBS	Picomoles ABA/mL	Dilución
A1 = NSB	50 µl de SS	4.95 ml	1000	1:100
B1	200 µl de A1	1.80 ml	100	1:10
C1	500 µl de B1	2.00 ml	20	1:5
D1	500 µl de C1	2.00 ml	4	1:5
E1	500 µl de D1	2.00 ml	0.8	1:5
F1	500 µl de E1	2.00 ml	0.16	1:5
G1	500 µl de F1	2.00 ml	0.032	1:5
H1 = B₀	100 µl de TBS			

- **Localización de Al en cristales de oxalato en las hojas de *F. esculentum*.**

Se cosecharon hojas de *F. esculentum* en las mismas tres etapas del ciclo de vida elegidas para el resto de las evaluaciones (Figura 4). Al momento de cada cosecha, el tejido foliar se fijó en una solución de FAA, compuesta por 10 % (v/v) de formaldehído, 5 % (v/v) de ácido acético glacial, 50% (v/v) de alcohol etílico y 35 % (v/v) de agua destilada. Se seleccionaron aquellas hojas totalmente expandidas de plantas tratadas con y sin Al, el criterio de selección se muestra en la Figura 5.

Para determinar de manera prospectiva la presencia de cristales de oxalato en el tejido foliar, se realizaron preparaciones semifijas de fracciones de hojas aclaradas con KOH al 10% (m/v) durante 24 horas. Las fracciones aclaradas se montaron con gelatina glicerizada en portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico Zeiss® Axioscop 40.

Una vez comprobada la presencia de los cristales, se tomaron pequeñas muestras de hojas maduras de los tratamientos (0, 50 y 100 µM de AlCl₃) en la última etapa de crecimiento (fructificación). Estas muestras consistieron en círculos de 3 mm de diámetro obtenidos de las láminas foliares con un sacabocados. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con una serie

de alcoholes y fueron infiltradas con resina LR White. Finalmente, se incluyeron en cápsulas de gelatina y se polimerizaron a 56°C durante 24 horas. La descripción del procedimiento de deshidratación e infiltración se muestra en el Anexo 1 (López-Curto *et al.*, 2005).

Se realizaron cortes histológicos de hoja de 6 µm de grosor en un ultramicrotomo RMC[®] MT990. Algunos cortes se tiñeron con azul de toluidina para observar la anatomía foliar en microscopio óptico y otros se dejaron sin teñir para realizar el microanálisis de detección de elementos en un microscopio electrónico de barrido acoplado a un espectrofotómetro de dispersión de rayos X (MEB-EDS) (Mazen, 2004; González-Santana, 2009). El microanálisis fue realizado con apoyo del Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física de la UNAM y del Laboratorio de Microscopía (Conjunto E) de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

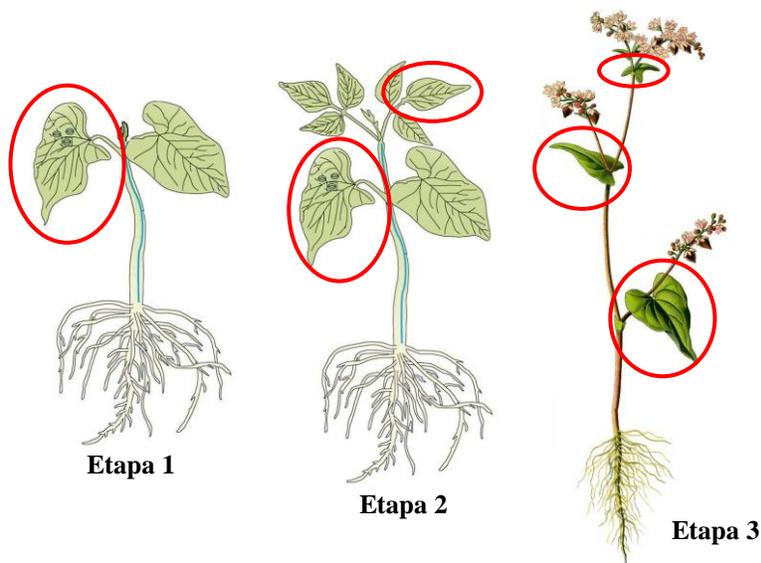


Figura 5. Criterios de selección de hojas para la localización de cristales de oxalato y Al. Los círculos rojos indican la posición de las hojas que fueron seleccionadas para la cosecha. Etapa 1: Plántulas con hojas verdaderas iniciales. Cosecha de al menos una hoja totalmente expandida. Etapa 2: Plantas en inicio de floración. Cosecha de una hoja vieja (basal) y una hoja joven (apical). Etapa 3: Plantas en inicio de fructificación. Cosecha de una hoja por ramificación. De la más vieja a la más joven.

- **Determinación de la proporción de aluminio y elementos esenciales en hojas, tallos y raíces de *F. esculentum*.**

La espectroscopia de emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada de manera eficiente para medir las distribuciones de elementos químicos en materiales de diferente origen, incluyendo tejidos biológicos. Comparada con otras técnicas de uso más común, como la dispersión de rayos X, la fluorescencia de rayos X ó la espectrofotometría de absorción atómica, la técnica PIXE tiene la gran ventaja de ser altamente sensible y contar con límites de detección del orden de partes por millón ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco) (Grime 2005; Ruvalcaba 2008).

El fundamento general de esta técnica consiste en incidir un haz de protones sobre una muestra determinada para producir la ionización de los átomos que están conformando dicha muestra. Estos átomos excitados vuelven a su estado basal produciendo una emisión de energía en forma de luz (ondas electromagnéticas) de longitud de onda correspondiente a rayos X. El conjunto de rayos X característicos y sus intensidades es captado por un detector sensible a los rayos X, de esta manera es posible identificar qué átomos están presentes en el material analizado y determinar su concentración (Ruvalcaba 2008).

Para este análisis se utilizó tejido vegetal seco, obtenido de plantas maduras en etapa de fructificación (53 días de edad). Las raíces, los tallos y las hojas de las plantas tratadas con y sin Al, se trituraron por separado en un mortero de ágata y se incineraron en una mufla (Thermolyne Type 1400[®]) a 700°C para eliminar la materia orgánica. La temperatura de incineración se determinó a partir de un análisis termogravimétrico realizado a muestras de raíz, tallo y hoja en un calorímetro de escaneo diferencial (DSC SDT Q600 V20.9 Build 20), en el Laboratorio de Metalurgia del Instituto de Física de la UNAM.

Las muestras incineradas se comprimieron para formar pastillas, cada pastilla se analizó con un acelerador de partículas de haz externo de 3 MeV 9SDH NEC Pelletron del Instituto de Física de la UNAM. Se incidió el haz de protones sobre cada muestra durante 10 minutos y los datos de emisión de rayos X para elementos pesados fueron registrados por un sensor de germanio de baja energía (LEGe) colocado en un ángulo de 135° con respecto a la dirección del haz. Mientras que los rayos X emitidos por elementos ligeros fueron registrados por un sensor Si-pin colocado en el mismo ángulo junto con un flujo de helio (He) y un emisor láser de tantalio (Ta) de 0.5 mm de diámetro que permitió dirigir de manera más precisa el haz de protones (Cervantes et al. 2008).

Se analizaron los espectros registrados de emisión de rayos X con ayuda del software WinAxil X-ray Analysis. Se registró el peso seco total de cada muestra y éste se multiplicó por las emisiones de rayos X registradas de cada elemento para determinar la proporción relativa de aluminio y otros elementos esenciales en cada órgano de *F. esculentum*.

- **Análisis estadístico**

La comparación de los resultados en todas las evaluaciones, excepto la localización de aluminio en cristales de oxalato, se realizó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de factores múltiples y la prueba de comparación de medias de Tukey con el software Statistica versión 7.0[®]. Todas las tablas estadísticas obtenidas para cada evaluación se presentan en el Anexo I para su consulta.

RESULTADOS

- Efecto del aluminio en el crecimiento de *F. esculentum* durante su ciclo de vida.

Los resultados del análisis de crecimiento relativo indican que, tanto la biomasa total como la tasa absoluta de crecimiento (AGR) se mantuvieron sin cambios significativos en las plantas tratadas con 25, 50 y 100 μM de Al con respecto a las plantas control (Figura 6A, B). En la Figura 6A se observa que la mayor acumulación de biomasa se dio a partir de los primeros 3 hasta los 24 días de edad de todas las plantas; mientras que la tasa absoluta de crecimiento fue mayor de los 15 hasta los 24 días de edad (Figura 6B). Este periodo corresponde a la fase de crecimiento vegetativo del ciclo de vida de *F. esculentum*, por lo que las plantas acumularon una gran cantidad de biomasa antes de comenzar a florecer. Después de los 24 días, cuando comenzó la fase de floración, ambos parámetros disminuyeron.

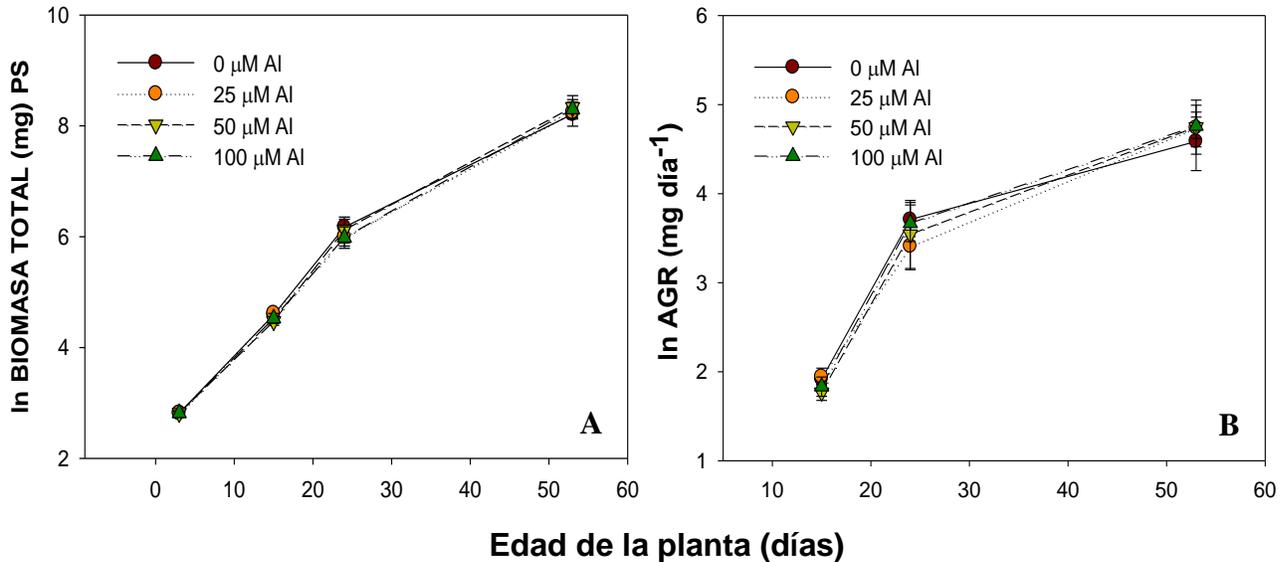


Figura 6. Biomasa total, Peso Seco (A) y AGR (B) durante el ciclo de vida de *Fagopyrum esculentum*. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. N = 9, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tablas 1 y 2).

Por otro lado, la tasa relativa de crecimiento (RGR, por sus siglas en inglés), no se vio afectada significativamente por los tratamientos con aluminio (Figura 7). De la misma forma que en los parámetros descritos anteriormente, los resultados de la RGR mostraron en todos los tratamientos una disminución significativa hacia las últimas fases del ciclo de vida (fructificación y senescencia).

Respecto a los componentes de la RGR, la tasa de asimilación neta (NAR) no presentó cambios significativos en plantas tratadas con aluminio (Figura 8A). Sólo cabe mencionar que el tratamiento con 50 μM de Al presentó la menor variación de NAR durante todo el ciclo de vida comparado con las variaciones de la misma tasa en los otros tratamientos y el control.

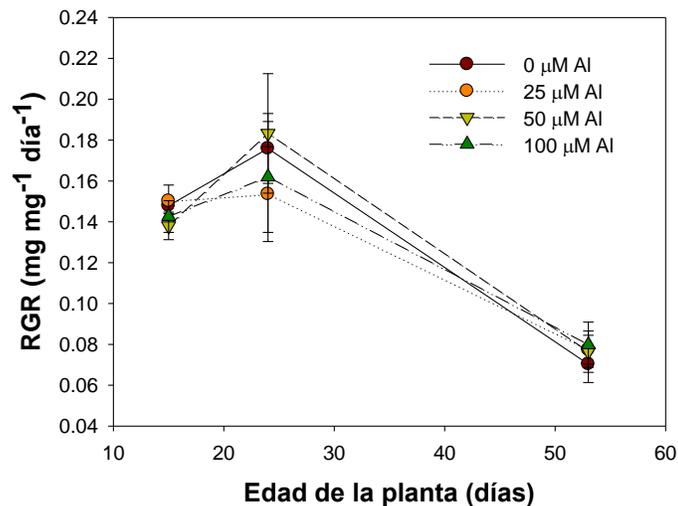


Figura 7. Tasa relativa de crecimiento (RGR) de *F. esculentum* durante su ciclo de vida. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. N = 9, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tabla 3).

Los resultados indican que la biomasa destinada a los órganos fotosintéticos fue prácticamente la misma durante todo el ciclo de vida, independientemente de los tratamientos con Al. La proporción de área foliar (LAR), el área foliar específica (SLA) y la proporción de biomasa foliar (LWR) concordaron con lo observado en el componente fisiológico de la RGR, ya que ninguno de estos parámetros presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con Al (Figura 8B, 8C y 8D).

De manera general, LAR y SLA indican que, tanto la superficie fotosintética como la densidad de las hojas, alcanzaron su mayor proporción al momento de la floración en todos los tratamientos (plantas de 24 días de edad, Figura 8B y 8C). Mientras que, al final del ciclo de vida, ambos parámetros junto con la LWR se redujeron significativamente en todos los tratamientos. Particularmente, la LWR indica que la producción de hojas se redujo significativamente en las últimas etapas del ciclo de vida (Figura 8D).

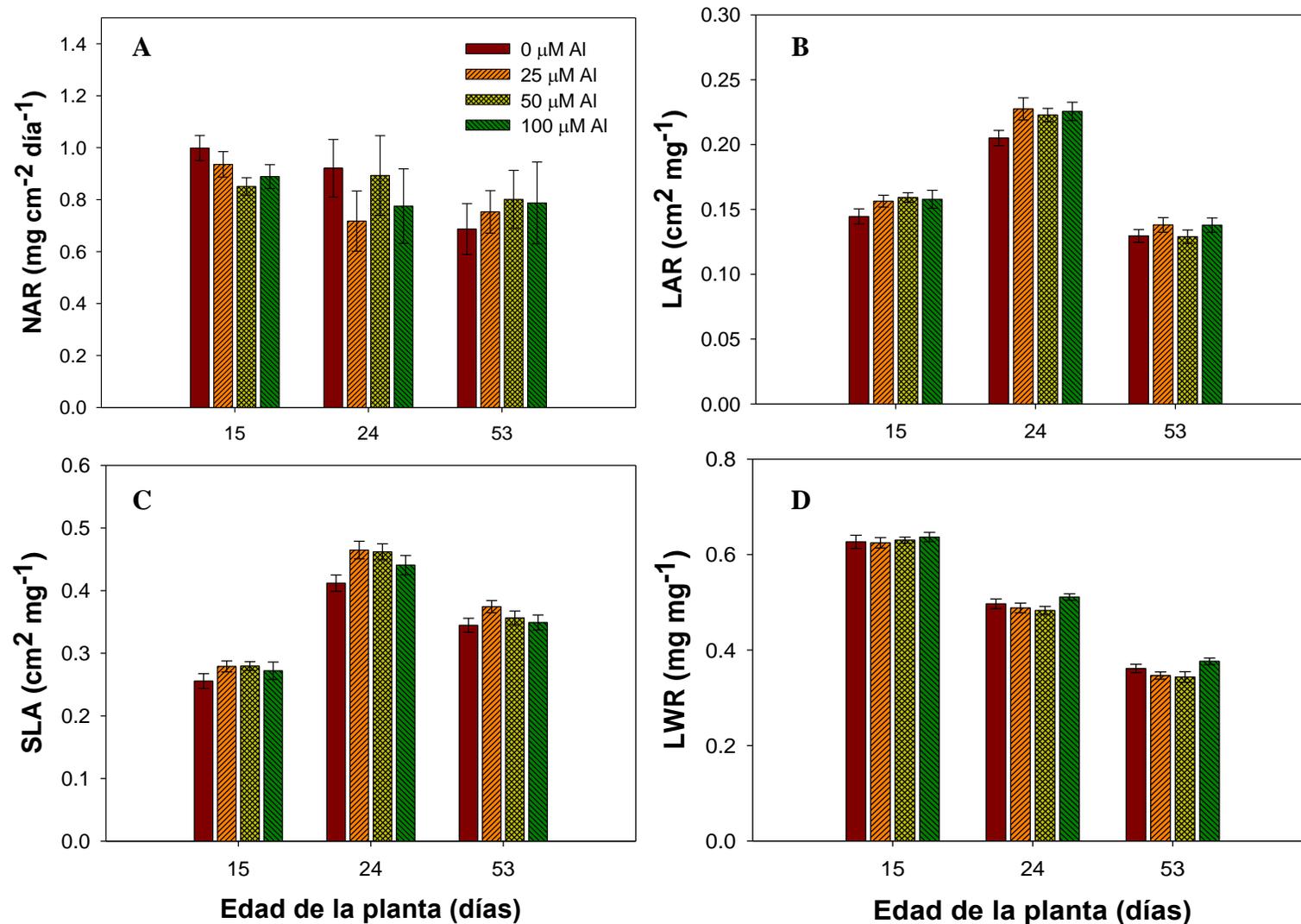


Figura 8. Componentes de la tasa relativa de crecimiento durante el ciclo de vida de *F. esculentum*: Tasa de asimilación neta –NAR– (A), Proporción de área foliar –LAR– (B), Área foliar específica –SLA– (C) y Proporción de biomasa foliar –LWR– (D). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. N = 9, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tabla 4)

En cuanto a la asignación de biomasa a cada órgano de la planta, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con aluminio (Figura 9). El coeficiente alométrico en todos los tratamientos y a lo largo del ciclo de vida de *F. esculentum*, tuvo valores menores a 1, lo que indica que el crecimiento de las plantas fue mayor hacia la parte aérea que a la raíz (estos valores se presentan sobre cada columna de asignación de biomasa en la Figura 9).

Debido a que se observó la tendencia a una mayor asignación de biomasa hacia estructuras reproductoras en las plantas tratadas con aluminio, se analizó estadísticamente la producción floral en número de inflorescencias. Sin embargo, el número de inflorescencias (Figura 10), al igual que la asignación de biomasa a este órgano reproductor (Figura 9C y 9D), no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con aluminio y el control.

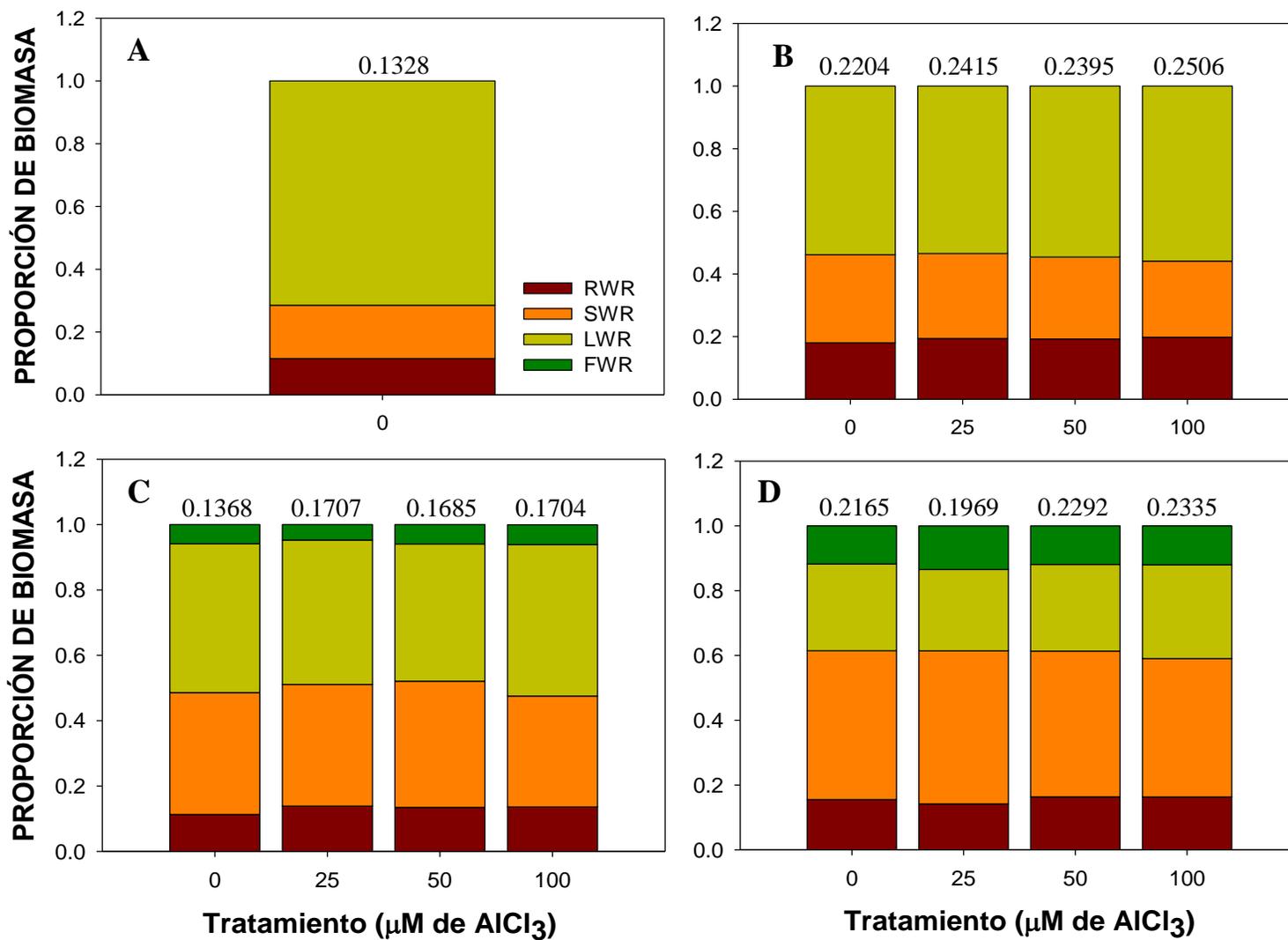


Figura 9. Asignación de biomasa a raíz (RWR), tallo (SWR), hojas (LWR) e inflorescencias (FWR) durante el ciclo de vida de *F. esculentum*. El análisis se realizó en plantas de 3 (A), 15 (B), 24 (C) y 53 (D) días de edad, tratadas con diferentes concentraciones de Al. El valor numérico sobre cada barra corresponde al coeficiente alométrico R/S. N = 9, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tabla 5)

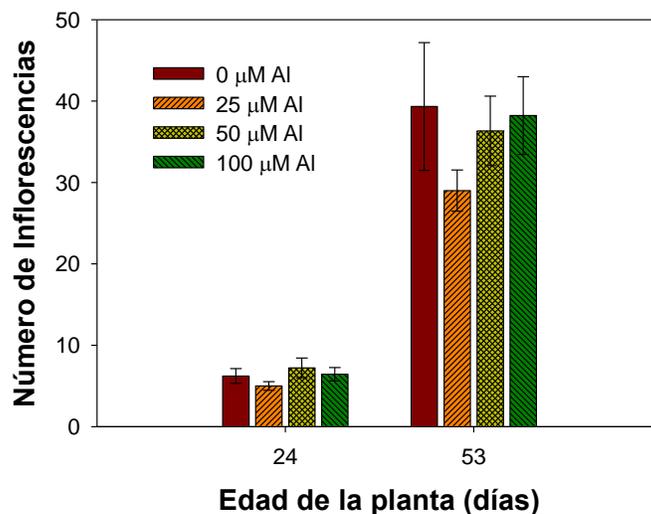


Figura 10. Número de Inflorescencias en dos etapas del ciclo de vida de *F. esculentum*. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos. N = 9, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tabla 6)

- **Efecto del aluminio en la tasa fotosintética de *F. esculentum* durante su ciclo de vida.**

En la Figura 11 se presentan las curvas de respuesta a luz y las curvas de respuesta a CO_2 en tres diferentes etapas del ciclo de vida de *F. esculentum*. Esta evaluación fotosintética se realizó en plantas control y en plantas tratadas con 25, 50 y 100 μM de Al. Todas las curvas fueron analizadas estadísticamente y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con aluminio y las plantas control.

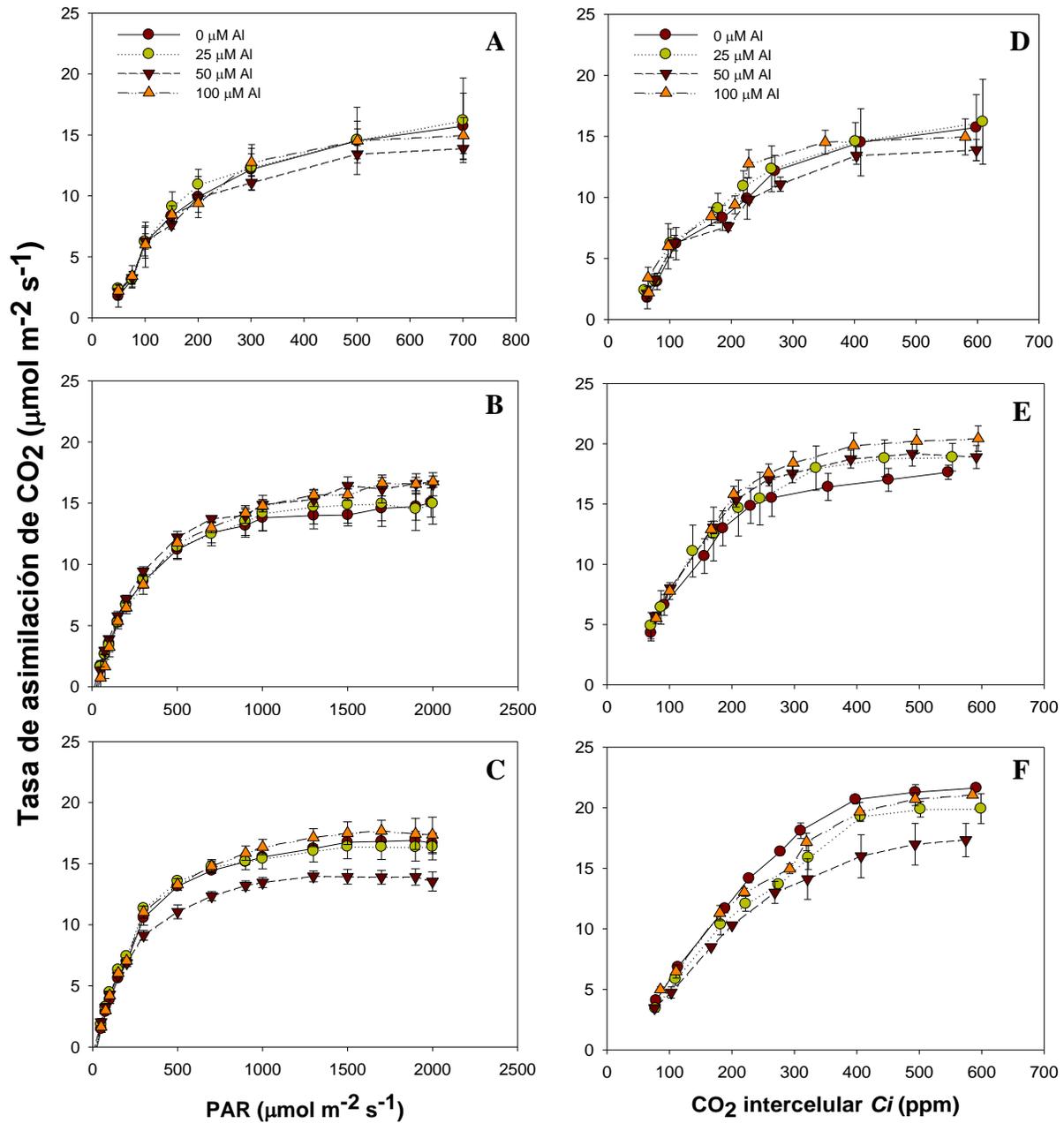


Figura 11. Curvas de respuesta a la Luz (izquierda) registradas a los 11 (A), 22 (B) y 52 (C) días de edad; y Curvas de respuesta a CO₂ (derecha) registradas a los 12 (D), 23 (E) y 50 (F) días de edad en *Fagopyrum esculentum*. N = 3, las barras representan el error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Tukey HSD, p>0.05

Los parámetros calculados a partir de las curvas de respuesta indican que hasta la etapa de floración, la máxima tasa fotosintética (A_{\max}) y la máxima tasa de carboxilación ($V_{c_{\max}}$) no se afectaron significativamente por la aplicación de las diferentes concentraciones de aluminio (Figura 12). Sin embargo, la A_{\max} se observó con una tendencia a incrementar en plantas expuestas a 50 y 100 μM en comparación con los tratamientos control y 25 μM a los 22 días de edad (Figura 12A).

Particularmente, las plantas tratadas con 50 μM de Al mostraron un posible efecto negativo al final de su ciclo de vida, observándose que la A_{\max} y la $V_{c_{\max}}$ disminuyeron con respecto al resto de los tratamientos y el control (Figura 12A y B).

Además de A_{\max} y $V_{c_{\max}}$, se calcularon otros parámetros a partir de las curvas de respuesta a luz y CO_2 , los cuales se resumen en las Tablas 4 y 5, respectivamente. El análisis estadístico de dichos parámetros mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Sin embargo, se observaron algunas tendencias particulares dentro de algunos parámetros evaluados en las plantas en periodo de floración. Tal es el caso de la eficiencia fotoquímica

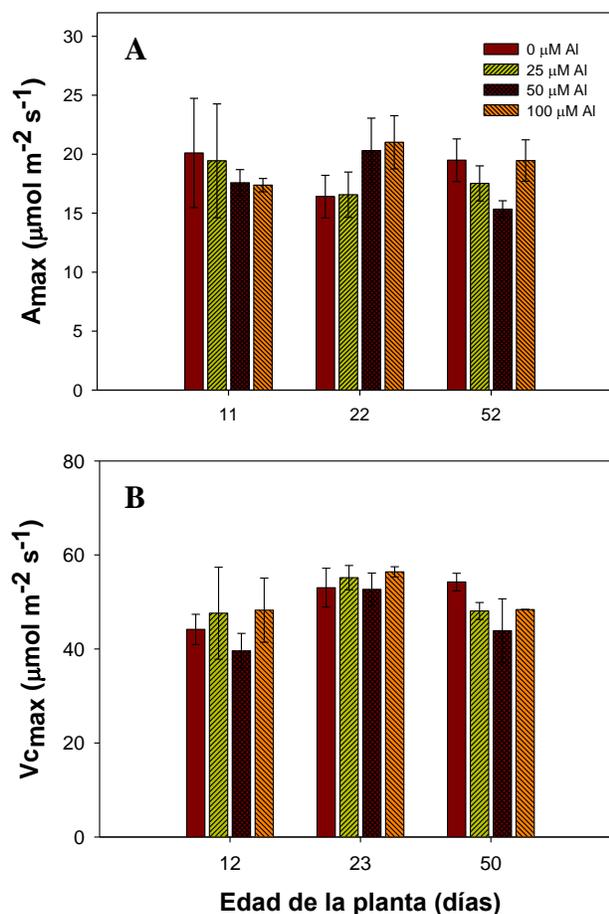


Figura 12. Máxima tasa fotosintética (A) y máxima tasa de carboxilación (B) calculadas a partir de las curvas de respuesta a luz y de respuesta a CO_2 , respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos con AlCl_3 . $N = 3$, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tablas 7 y 8)

aparente (AQE), que describe la eficiencia con la cual la luz se convierte en carbono fijado - típicamente cerca de 0.06 moles de CO₂ por mol de luz que incide bajo condiciones favorables de CO₂ atmosférico (Lambers *et al.*, 2008), los puntos de saturación y compensación de luz (LSP y LCP) y la máxima tasa de transporte de electrones (J_{max}) (Tablas 4 y 5). Todas las tendencias observadas en estos casos implican un efecto favorable de los tratamientos con 50 y 100 μ M de Al, sin embargo, sería necesario aumentar el número de muestras y complementar con un análisis de fluorescencia para confirmar si estos parámetros se mantienen sin cambios entre los tratamientos de aluminio.

Tabla 4. Parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de respuesta a la luz. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD, $p > 0.05$. Anexo I, Tabla 9). N = 3, cada valor se presenta con \pm desviación estándar.

		TRATAMIENTO [AlCl₃]			
PARÁMETROS	EDAD (días)	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM
LSP (μmol m⁻² s⁻¹)	11	1118.264 \pm 660.788	979.533 \pm 572.111	969.025 \pm 520.498	606.406 \pm 107.932
	22	1431.843 \pm 449.890	1337.954 \pm 280.224	1822.415 \pm 795.438	2036.049 \pm 571.148
	52	1483.656 \pm 632.448	1146.175 \pm 310.007	1252.781 \pm 300.538	1472.558 \pm 376.633
LCP (μmol m⁻² s⁻¹)	11	21.487 \pm 11.327	16.808 \pm 4.202	19.614 \pm 8.406	21.958 \pm 7.969
	22	11.719 \pm 11.066	14.659 \pm 6.107	19.048 \pm 6.718	23.434 \pm 24.218
	52	19.995 \pm 4.004	10.662 \pm 6.107	7.997 \pm 7.997	13.326 \pm 2.308
AQE (moles mol⁻¹)	11	0.107 \pm 0.035	0.109 \pm 0.042	0.112 \pm 0.034	0.106 \pm 0.055
	22	0.056 \pm 0.005	0.058 \pm 0.018	0.085 \pm 0.035	0.066 \pm 0.010
	52	0.068 \pm 0.012	0.062 \pm 0.005	0.063 \pm 0.009	0.062 \pm 0.010
Respiración en la oscuridad	11	-2.217 \pm 1.162	-1.933 \pm 1.136	-2.050 \pm 0.910	-2.250 \pm 1.117
	22	-0.617 \pm 0.679	-0.833 \pm 0.153	-1.450 \pm 0.520	-1.567 \pm 1.528
	52	-1.367 \pm 0.333	-0.717 \pm 0.333	-0.517 \pm 0.401	-0.867 \pm 0.340

LSP: Punto de saturación de luz; LCP: Punto de compensación de luz; AQE: Eficiencia fotoquímica

Tabla 5. Parámetros fotosintéticos calculados a partir de las curvas de respuesta a CO₂. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD, p> 0.05. Anexo I, Tabla 10). N = 3, cada valor se presenta con ± desviación estándar.

		TRATAMIENTO [AlCl ₃]			
PARÁMETROS	EDAD (días)	0 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Γ* (μmol mol ⁻¹)	12	30.229±0.091	30.593±0.113	30.719±1.021	31.903±0.539
	23	29.098±1.675	29.486±1.548	27.559±0.707	27.479±0.576
	50	26.643±0.563	27.047±0.527	28.572±0.749	27.205±0.856
J _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	12	85.452±10.317	87.659±32.870	74.593±15.821	84.799±22.271
	23	120.478±21.378	120.823±25.808	140.040±14.256	154.021±19.788
	50	171.884±17.810	140.099±19.525	118.529±40.020	147.929±17.361
TPU	12	5.125±1.339	5.261±2.098	4.323±0.541	4.683±1.279
	23	5.240±0.434	5.639±0.465	5.651±0.658	6.250±0.696
	50	7.389±0.461	7.244±1.250	6.023±1.261	7.153±0.286
Respiración en la oscuridad	12	-0.346±1.051	-0.801±0.891	-0.986±1.089	-1.151±2.472
	23	-1.920±0.721	-2.257±1.214	-2.246±0.540	-1.682±0.417
	50	0.315±0.840	0.212±0.974	-0.343±2.367	-0.701±0.579

Γ*: Punto de compensación de CO₂; J_{max}: Tasa máxima de transporte de electrones; TPU: Utilización de triosa-fosfatos

Por otro lado, en un bioensayo independiente (ver Materiales y Métodos) se realizaron mediciones puntuales de la tasa de asimilación de CO₂ y de la conductancia estomática con el fin de confirmar que no existía un efecto significativo de los tratamientos con Al sobre la fotosíntesis de *F. esculentum* a lo largo de su ciclo de vida. Los resultados de este bioensayo mostraron que la tasa de asimilación de CO₂ fue aumentando con respecto al tiempo en todos los tratamientos, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas expuestas a las tres concentraciones de aluminio y las plantas control (Figura 13A). Tampoco se observaron diferencias significativas en la conductancia estomática (Figura 13B).

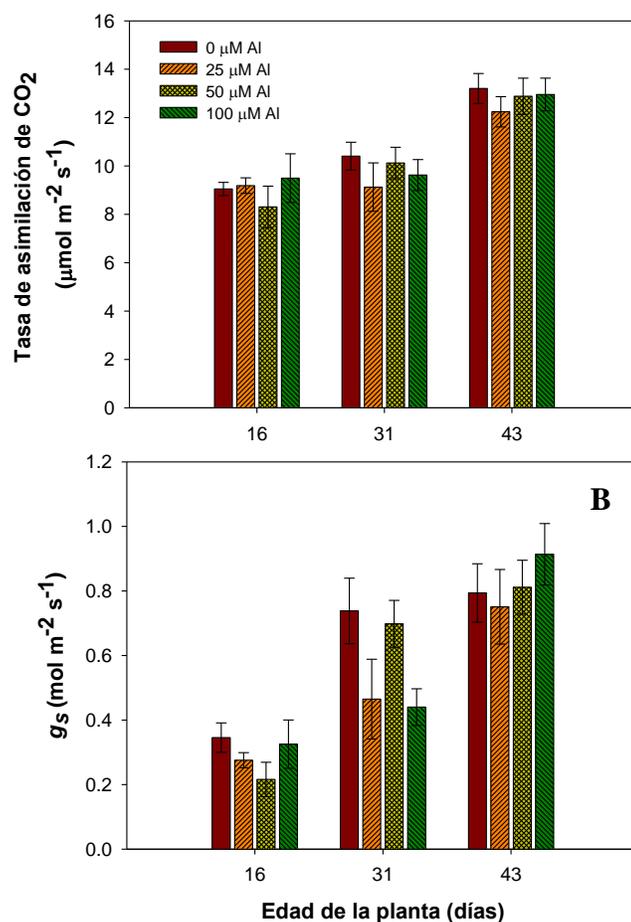


Figura 13. Tasa de asimilación de CO₂ (A) y Conductancia estomática *g_s* (B) de *Fagopyrum esculentum* en tres etapas de su ciclo de vida. Las mediciones fueron realizadas de manera puntual en plantas de 16, 31 y 43 días de edad. No existieron diferencias significativas entre tratamientos. N = 5, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, p>0.05 (Anexo I, Tablas 11 y 12)

- **Efecto del aluminio en los niveles endógenos de ABA en hojas, tallos y raíces de *F. esculentum*.**

Como se muestra en la Figura 14, la concentración endógena de ácido abscísico (ABA) en hojas de *F. esculentum* fue similar en ambos tratamientos con respecto al control. Solamente el tratamiento con 50 μM de Al indujo un discreto aumento en la concentración de la fitohormona

en hojas de 54 días de edad, sin embargo, el análisis estadístico indicó que la diferencia no es significativa.

Con respecto al tallo (Figura 14), las plantas control y las que se trataron con 100 μM de Al mostraron una concentración de ABA endógeno muy similar a lo largo del ciclo de vida, aumentando gradualmente conforme avanzaba la edad de las plantas. En cambio, el tratamiento de 50 μM de Al provocó una ligera disminución de ABA endógeno en plantas de 54 días de edad con respecto al tratamiento de 100 μM de Al y el control. Dicha disminución no fue estadísticamente significativa.

Finalmente, la raíz presentó cambios más marcados en la concentración endógena de ABA dependiendo del tratamiento aplicado a las plantas (Figura 14). Aunque estas tendencias no son muy marcadas, debido a la alta variabilidad de los datos, y el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas. Sin embargo, las tendencias muestran que las raíces de las plantas tratadas con 50 μM de Al presentaron una mayor concentración de ABA endógeno que el control durante las tres etapas del ciclo de vida, lo que indica un efecto del tratamiento en la respuesta del ABA a nivel de raíz. Por otro lado, el tratamiento con 100 μM de Al provocó el mismo efecto descrito anteriormente con respecto al control en plantas de 15 y 23 días de edad, sin embargo, en las raíces de plantas maduras de 54 días, la concentración de ABA endógeno fue menor que el control y el tratamiento de 50 μM de Al.

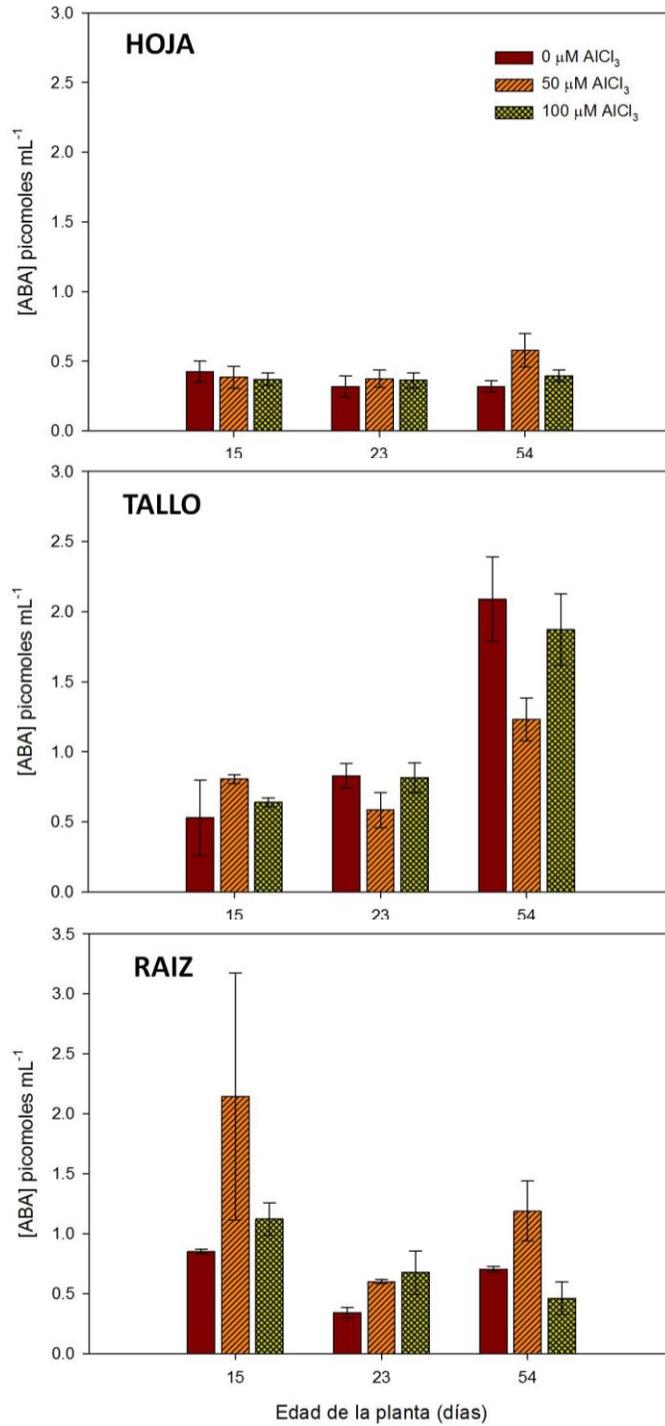


Figura 14. Concentración de ABA endógeno en hojas, tallos y raíces de *Fagopyrum esculentum* en tres etapas de su ciclo de vida. Las muestras de tejido fueron colectadas en plantas de 15, 23 y 54 días de edad. No existieron diferencias significativas entre tratamientos. N = 3, las barras representan el error estándar. Tukey HSD, $p > 0.05$ (Anexo I, Tabla 13)

- **Asociación de cristales de oxalato y Al en el tejido foliar de *F. esculentum*.**

Se determinó la presencia de cristales de oxalato de calcio en forma de drusas. Para localizar con mayor detalle la posición de las drusas en el tejido foliar, se tomaron fotografías de los cortes semifinos realizados en ultramicrotomo. En la Figura 15 se observa que estas drusas se localizaron generalmente cerca de las venas medias y en la zona del mesófilo esponjoso, hacia la región abaxial de cada hoja.

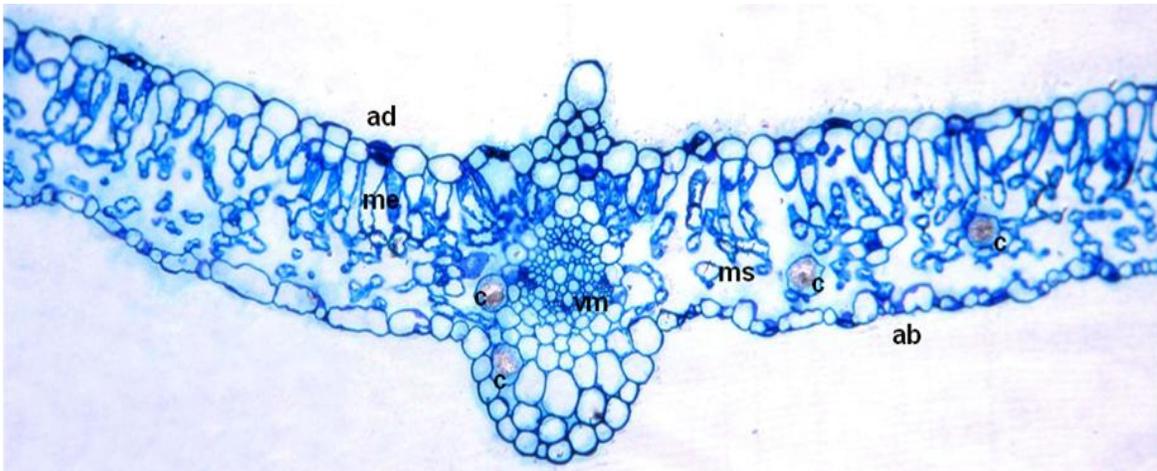


Figura 15. Corte transversal de hoja de *Fagopyrum esculentum* realizado en ultramicrotomo y teñido con azul de toluidina. La hoja se colectó de una planta madura tratada con 100 μ M de Al. En la imagen se observan: las superficies adaxial (**ad**) y abaxial (**ab**), el mesófilo en empalizada (**me**) y mesófilo esponjoso (**ms**), el tejido vascular de la vena media (**vm**) y algunos cristales de oxalato de calcio (**c**), localizados en la zona del mesófilo esponjoso y cerca de la vena media. El microanálisis de detección de elementos en MEB-EDS no detectó Al asociado a las drusas. Aumento de la imagen 10X.

Por medio del microanálisis de detección de elementos MEB-EDS en los cortes semifinos de las hojas (Figura 16A y 16B) se comprobó que la composición química de las drusas era principalmente de oxalato de calcio, y no se detectó Al, por lo que se descartó la acumulación del elemento en estas zonas del tejido foliar.

El MEB-EDS también se aplicó en otras regiones del tejido foliar, encontrándose que los elementos con mayor porcentaje de acumulación en un corte transversal de hoja fueron el carbono, el oxígeno y el calcio (Figura 16C y 16D). La detección de silicio no se consideró dentro del análisis debido a que los cortes fueron montados en pequeños portaobjetos de vidrio.

El aluminio presentó porcentajes de acumulación muy bajos con respecto a los elementos mencionados anteriormente (0.06% en el control y 0.09% en el tratamiento de 100 μ M de Al). Estos resultados indican que las hojas de las plantas tratadas no presentaron una acumulación significativa de Al con respecto al control (Figuras 16C y 16D).

Finalmente, se realizaron mediciones puntuales en los cortes del tratamiento con 100 μ M de Al para corroborar los porcentajes de acumulación de Al en el tejido. Los resultados que se muestran en la Figura 16B indican que el Al detectado solamente presentó niveles traza, siendo no representativos para considerarse una acumulación.

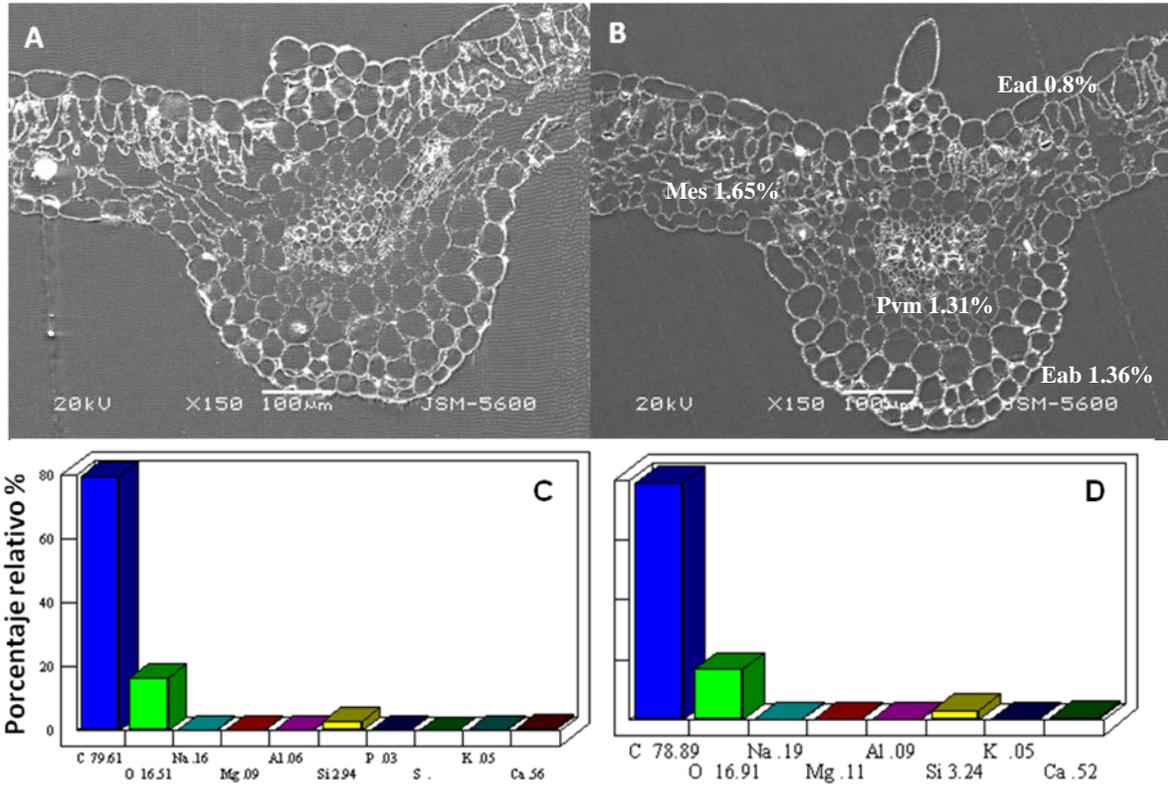


Figura 16. Imagen de los cortes transversales de hojas maduras de *Fagopyrum esculentum* obtenidos con un microscopio electrónico de barrido acoplado a un espectrofotómetro de dispersión de rayos X (MEB-EDS). (A) Hoja madura de plantas control, (B) Hoja madura de plantas tratadas con 100 μM de Al. Los porcentajes de acumulación detectados para cada imagen corresponden a las figuras C y D respectivamente. En la figura B, los porcentajes indicados en blanco corresponden a los niveles de acumulación de Al en las zonas específicas: Ead, epidermis adaxial; Eab, epidermis abaxial; Mes, mesófilo esponjoso; Pvm, parénquima de la vena media. Imágenes representativas de dos experimentos biológicos.

- **Proporción de aluminio y elementos esenciales en hojas, tallos y raíces de *F. esculentum*.**

Las proporciones relativas calculadas a partir de la emisión de rayos X en las muestras correspondieron a los siguientes elementos: K, Ca, Mg, P y S (agrupados para fines prácticos como macroelementos), así como Mn, Fe, Cu, Zn y Mo (agrupados en microelementos). Finalmente, el Al también fue detectado en los tres tejidos de *F. esculentum* con sus proporciones relativas correspondientes.

En la Figura 17 se observa que la proporción relativa de Al en hojas no mostró diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 50 y 100 μM de Al.

Con respecto a lo observado en tallos, se encontró que las plantas control presentaron niveles endógenos de Al mayores que en las plantas de los tratamientos. Debido a que este resultado no tiene una explicación evidente, se considera que probablemente existió un error experimental al momento de medir en el acelerador de partículas, es decir, que se pudo haber intercambiado la pastilla correspondiente a cualquiera de los tratamientos con la pastilla del grupo control. Debido a que esta evaluación se realizó en una sola réplica experimental es necesario procesar muestras de una segunda réplica para corroborar lo obtenido en este experimento.

Finalmente, las raíces que fueron expuestas a la solución nutritiva con AlCl_3 tuvieron una mayor proporción significativa del elemento con respecto a las plantas mantenidas en solución nutritiva sin aluminio.

Estos resultados indican que el aluminio disuelto en las soluciones nutritivas de ambos tratamientos sí fue asimilado por las plantas, sin embargo, éste no fue traslocado significativamente hasta las hojas. Se observa también que a mayor concentración de AlCl_3 en los tratamientos, hay una acumulación más acentuada en las raíces.

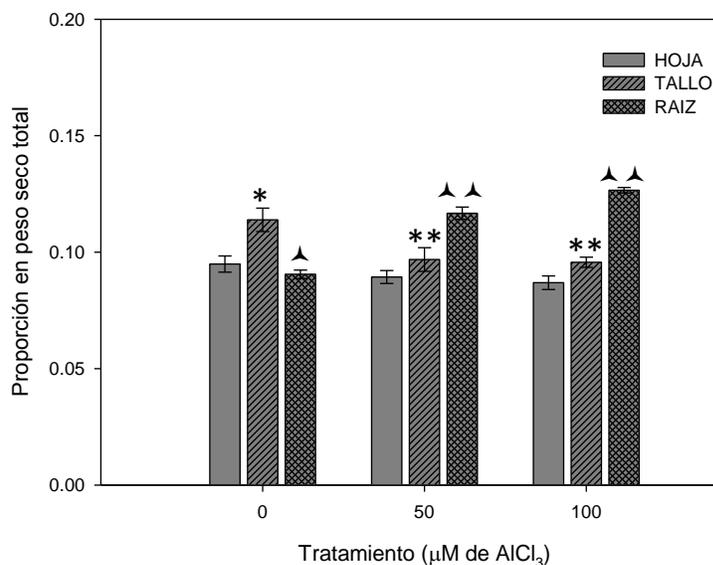


Figura 17. Proporción relativa de Al en hojas, tallos y raíces de *Fagopyrum esculentum* de 53 días de edad. Las plantas fueron tratadas con 50 y 100 μM de AlCl_3 y el control corresponde a 0 μM de Al. Las barras representan el error estándar, asteriscos y triángulos indican diferencias significativas (Tukey UN HSD, $p < 0.05$) $N = 8$. (Anexo I, Tabla 14)

Por otro lado, la proporción de macroelementos y microelementos presentó patrones de distribución relativa muy semejantes en cada órgano analizado (Figura 18), sin ser significativas las diferencias entre plantas tratadas con Al y las plantas control. Únicamente la proporción de K en tallo sí se vio afectada significativamente por ambos tratamientos de Al con respecto al control, las hojas y las raíces no mostraron ningún cambio significativo en la proporción del mismo elemento.

En el caso de los microelementos, no existieron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, la proporción de Fe localizado en raíces sí fue significativamente mayor en los tres tratamientos con respecto a la proporción del mismo elemento en hojas y tallos.

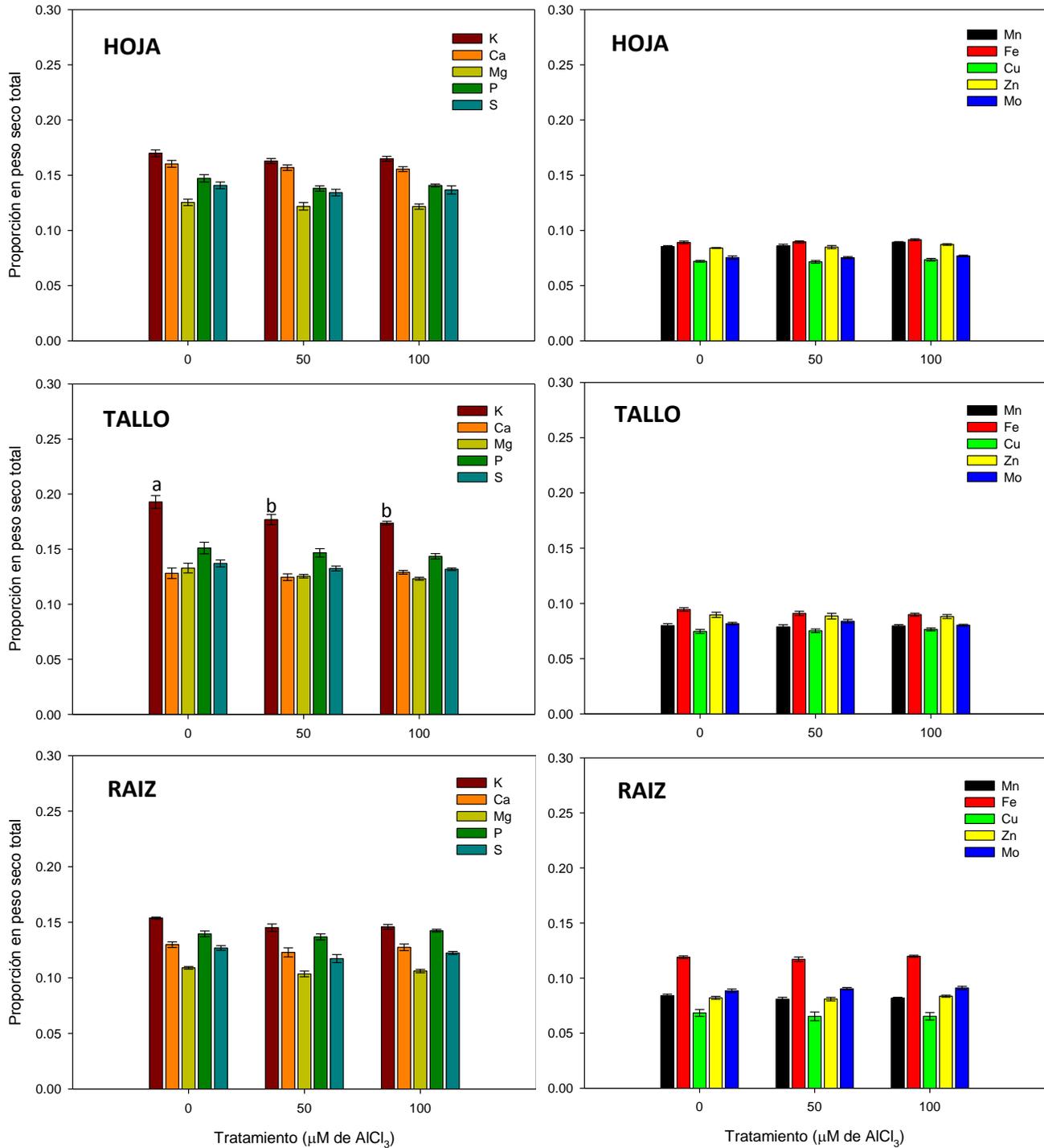


Figura 18. Proporción relativa de macroelementos (izquierda) y microelementos (derecha) en tejido de hojas, tallos y raíces de *Fagopyrum esculentum* calculada a partir de las emisiones de rayos X obtenidas mediante la técnica PIXE (Ruvalcaba, 2008). Se utilizaron plantas control y plantas tratadas con 50 y 100 μM de AlCl₃, cosechadas a los 53 días de edad. Las barras representan en error estándar y las letras indican diferencias significativas (Tukey HSD, p<0.05) N = 8. (Anexo I, Tabla 15)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los análisis de crecimiento y fotosíntesis indican que *Fagopyrum esculentum* tolera eficientemente la presencia del Al en el medio nutritivo a lo largo de todo su ciclo de vida, ya que no se observaron diferencias significativas que indicaran algún efecto negativo del elemento en los procesos de desarrollo y fotosintéticos de las plantas.

De acuerdo a la hipótesis propuesta inicialmente, la presencia del Al modificaría los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) en las plantas, y este cambio provocaría efectos en el crecimiento y fotosíntesis. Sin embargo, la cuantificación de ABA endógeno en hojas, tallos y raíces de plantas maduras en fructificación indicó que la concentración de ABA en los tres órganos no se modificó significativamente en respuesta a los tratamientos con aluminio, lo que se corresponde con los efectos observados en crecimiento y fotosíntesis. Aunque este análisis se realizó solamente en plantas maduras en fructificación, los resultados de crecimiento y fotosíntesis indican que, muy probablemente, los niveles endógenos de ABA tampoco fueron modificados en etapas más tempranas del desarrollo (crecimiento vegetativo y floración).

Por otro lado, los cristales que se localizaron en el tejido foliar, en forma de drusas, no tuvieron ninguna asociación con Al, debido a que el elemento adicionado a las soluciones nutritivas no fue traslocado por las plantas hacia las hojas. Este resultado fue confirmado con el análisis multielemental PIXE que reveló que el aluminio únicamente se acumuló de manera significativa en las raíces (Figura 17), las cuales se mantuvieron en contacto directo con dichas soluciones nutritivas. Por lo tanto, los resultados de ambos análisis se relacionan con el hecho de que las plantas no fueron afectadas en procesos como fotosíntesis y crecimiento, ajustándose positivamente a los diferentes tratamientos con Al a través de los mecanismos de tolerancia que

ya han sido reportados anteriormente en otros trabajos (Klug y Horst 2010a; Reyna-Llorens 2010; Yang *et al.* 2011; Zheng *et al.* 1998).

- **Efecto del aluminio en el crecimiento.**

De acuerdo con Mossor-Pietraszewska (2001), en general, la mayoría de las plantas en etapas tempranas de desarrollo son más susceptibles a presentar síntomas de toxicidad por Al. En el caso de *F. esculentum*, Reyna-Llorens (2010) observó que durante las primeras 48 horas de exposición a una solución de CaCl_2 0.5 mM + AlCl_3 100 μM , las plántulas mostraron una inhibición significativa en el crecimiento radicular, sin embargo, posteriormente, dichas plántulas se aclimataron a la presencia de Al a través del aumento de su biomasa radicular y la formación de un mayor número de raíces laterales. Estas respuestas de tolerancia, aunado a los mecanismos moleculares de tolerancia al Al que ya se han reportado para esta especie, se mantienen durante todo el ciclo de vida de la planta como lo indica el análisis de crecimiento relativo realizado en este trabajo, ya que no hubo diferencias significativas entre los parámetros de crecimiento evaluados en plantas tratadas con Al y las plantas control.

En algunas especies, como las pertenecientes a la familia Melastomataceae, el aluminio puede resultar benéfico, dependiendo de la concentración, y estimular la acumulación de biomasa en raíces, tallos y hojas. Este efecto positivo se presenta acompañado de un aumento en la acumulación de P en el caso de *Melastoma malabathricum*, un arbusto tolerante a suelos ácidos y aluminio (González-Santana 2009; Watanabe *et al.* 2005; Watanabe y Osaki 2002). *F. esculentum* no mostró cambios en sus niveles de P endógeno y no se detectó Al acumulado en los tejidos aéreos, lo que indica que, aunque se ha reportado como una especie acumuladora de Al, bajo las condiciones experimentales aplicadas en este trabajo, las plantas mantuvieron el Al únicamente

en las raíces, lo que significa que utilizó otros mecanismos de tolerancia diferentes al de la acumulación.

Por otro lado, se ha encontrado que la activación significativa de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX), induce un estímulo en el crecimiento de raíz y células en suspensión de *Camellia sinensis* en respuesta al aluminio; esto como resultado de un incremento en la estabilidad de la membrana y la pared celular (Ghanati *et al.* 2005). Esta misma respuesta del sistema antioxidante fue encontrada por González-Santana (2009), favoreciendo el aumento en la biomasa de raíces de *Conostegia xalapensis*. Un análisis del sistema antioxidante en *F. esculentum* (Martínez-Rendón *et al.* 2010), mostró que la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) disminuyó significativamente y la actividad de la APX aumentó de la misma manera en respuesta a la aplicación de 25, 50 y 100 μM de $AlCl_3$. Por lo tanto, es probable que la estabilidad en el crecimiento de *F. esculentum* observada en este trabajo se deba a una respuesta específica de su sistema antioxidante.

Las modificaciones morfológicas que se observaron en la proporción de área foliar (LAR) y en el área foliar específica (SLA) de plantas tratadas con aluminio con respecto a las plantas control podrían representar un mecanismo de equilibrio para mantener una tasa fotosintética adecuada aún con la presencia de aluminio en el medio nutritivo.

Los resultados de este trabajo indican que existe cierta respuesta de las plantas tratadas con aluminio al aumentar el área foliar y el grosor de sus hojas, sin embargo, además de que estas diferencias no son estadísticamente representativas, los resultados obtenidos en la evaluación de la tasa fotosintética muestran que tampoco existe una variación significativa en la fotosíntesis.

Para poder dilucidar algún mecanismo específico que estuviera participando en este ajuste de crecimiento, sería necesario realizar mediciones o un análisis de crecimiento en periodos de tiempo más cortos durante el ciclo de vida de *F. esculentum*.

- **Efecto del aluminio en la tasa fotosintética.**

Los resultados que se observaron a nivel morfológico concuerdan con el análisis de las evaluaciones de fotosíntesis realizadas durante el periodo de mayor crecimiento de las plantas, y hasta la etapa de floración. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los tratamientos debido a una gran variabilidad de los datos.

Silva y colaboradores (2012) mencionan que especies tolerantes al aluminio como el centeno (*Secale cereale*) tienen un umbral de tolerancia con respecto a la concentración de Al y a la duración de la exposición al elemento. Estos autores mencionan que una concentración de Al de hasta 1mM, y un período de exposición de hasta 3 semanas, pueden provocar la reducción significativa del número de hojas y su biomasa, lo que se refleja directamente en una disminución de la tasa fotosintética. Los análisis fotosintéticos que realizaron los autores mostraron que la principal causa de la reducción en la tasa fotosintética fue el daño a nivel de PSII. Sin embargo, con concentraciones de Al menores a 1mM estas especies tolerantes mantienen un balance entre el nivel de absorción de energía luminosa y la utilización de dicha energía en la síntesis de carbohidratos, de tal forma que la tasa de asimilación de CO₂ no se ve afectada significativamente. Es muy probable que los resultados obtenidos en la evaluación fotosintética de *F. esculentum* refleje este mismo mecanismo de ajuste metabólico, ya que las concentraciones de Al aplicadas en los tratamientos no superaron el posible umbral de tolerancia de esta especie (100 μM).

Todos los trabajos que se han realizado acerca del efecto del Al en la eficiencia fotosintética de plantas tolerantes y sensibles coinciden en que los efectos de inhibición fotosintética en respuesta a altas concentraciones de Al ocurren a nivel del funcionamiento de los fotosistemas, de los complejos antena y de la cadena de transporte de electrones durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Chen *et al.* 2010; Chen *et al.* 2005a; Jiang *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2007). Se ha reportado que el Al induce fotoinhibición en plantas de pomelo (*Citrus grandis*) y mandarina ‘Cleopatra’ (*Citrus reshni*), causada principalmente por un daño en la cadena transportadora de electrones en la fase luminosa, una afectación en el rendimiento fotoquímico del PSII y un aumento en la fotorrespiración, y esto a su vez se asoció con una disminución en la tasa de asimilación de CO₂, y por lo tanto en una inhibición del crecimiento (Chen *et al.* 2005b; Jiang *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2009). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, los resultados obtenidos en este trabajo, en los valores de AQE y de J_{max} sugieren que puede existir algún mecanismo inducido por los tratamientos con Al que regulan el funcionamiento del sistema fotoquímico para impedir que se reduzca la asimilación de carbono en presencia del elemento. Tomando en cuenta que la fase luminosa de la fotosíntesis proporciona el poder reductor (NADPH) y la energía necesaria (ATP) para la síntesis de carbohidratos en el ciclo de Calvin, un aumento en la eficiencia fotoquímica y transporte de electrones en plantas tratadas con aluminio permitiría mantener una tasa de carboxilación adecuada sin que se vea afectada por el desvío de energía que se pueda estar destinando a los mecanismos de tolerancia al aluminio que ya han sido reportados para *F. esculentum*.

Anteriormente, Pexioto y colaboradores (2002), analizaron diferentes respuestas fotosintéticas en dos variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*), una tolerante y una sensible. Encontraron que al aplicar una concentración de 185 mmol m⁻³ de Al₂(SO₄)₃ ambas variedades presentaron efectos

perjudiciales en su tasa de asimilación de CO₂ y en la eficiencia fotoquímica del aparato fotosintético. Sin embargo, después de un periodo de 16 días de exposición al Al, las plantas tolerantes fueron contrarrestando los efectos tóxicos y se adaptaron a las condiciones del medio, aumentando sus tasas de asimilación de carbono y su eficiencia fotoquímica. Esto no ocurrió con la variedad sensible, que mantuvo los mismos efectos de daño durante el mismo periodo de tiempo del experimento. En el caso de *F. esculentum*, se observó esta misma tendencia de recuperación en plántulas de 3 días de edad, a nivel de raíz (Reyna-Llorens 2010). Por lo tanto, es muy probable que las primeras etapas de desarrollo sean el momento clave para que esta especie tolerante se ajuste a las condiciones de Al en su medio y no presente ningún daño en su crecimiento y eficiencia fotosintética en etapas más avanzadas de crecimiento vegetativo y reproducción.

Por otro lado, se ha reportado también que la activación del sistema antioxidante (enzimas SOD, APX, CAT, GR, etc.) al igual que con el crecimiento, juega un papel muy importante en la protección contra daños foto-oxidativos del aparato fotosintético de *Citrus reshni* y en variedades de soya (*Glycine max*) (Chen *et al.* 2010; Chen *et al.* 2005a; Zhang *et al.* 2007). Esto confirma la importante participación de enzimas antioxidantes en el ajuste fotosintético de *F. esculentum* con los diferentes tratamientos aplicados de aluminio (Martínez-Rendón *et al.* 2010).

- **Efecto del aluminio en los niveles endógenos de ABA.**

La evaluación de los niveles endógenos de ABA se realizó tomando como referencia lo que ya se conoce acerca de la participación de esta fitohormona en procesos de señalización en respuesta a estrés hídrico, lo cual induce ajustes metabólicos reflejados en la tasa fotosintética. Sin embargo, debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles endógenos de ABA en hojas, ni en la tasa fotosintética con respecto a los tratamientos de Al, no es posible que exista alguna relación entre los niveles endógenos de ABA y una respuesta a nivel de la tasa de asimilación de CO₂.

Shen y colaboradores (2004) observaron que los niveles endógenos de ABA en raíces de soya aumentaban significativamente en respuesta a diferentes tratamientos con aluminio, lo cual se veía reflejado de manera significativa en el eflujo de citrato como un mecanismo de tolerancia al Al. Una respuesta similar fue observada por Reyna-Llorens (2010) en raíces jóvenes de *F. esculentum*, cuyos niveles endógenos de ABA aumentaron al ser expuestas a 50 y 100 μM de Al en solución. El trabajo de Reyna-Llorens *et al.* (En revisión), también mostró que el aumento en los niveles de ABA durante las primeras 24 horas de exposición a Al, se vio relacionado con un aumento en la expresión relativa del gen *FeALS* que codifica para un transportador de la familia ABC que participa en la tolerancia al Al a través de la liberación de ácidos orgánicos.

Es importante recalcar el papel de los transportadores transmembranales que participan en el mecanismo de tolerancia que consiste en la exudación de ácidos orgánicos a la rizósfera. En *F. esculentum*, estos canales aniónicos regulan la liberación de oxalato en el ápice radicular, principalmente en la zona de transición entre la región meristemática y la zona de elongación celular (Klug y Horst 2010a; b). Otros transportadores importantes que participan en este

mecanismo de exudación en otras especies son: ALMT (Al^{3+} activated Malate Transporter) y MATE (Multi-drug and Toxin Extrusion). Por otra parte, la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) podría estar involucrada en la re-distribución del Al en diferentes tejidos radiculares para proteger a las raíces del efecto tóxico (Reyna-Llorens 2010).

Con respecto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, habrá que confirmar si la tendencia de mayores niveles endógenos de ABA en raíz en las plantas tratadas con Al efectivamente es significativa, si es así, implica que probablemente el mecanismo de tolerancia propuesto por Reyna-Llorens *et al.* (2012) para esta misma especie, se mantenga activo durante todo su ciclo de vida. Para comprobar si efectivamente las raíces de *F. esculentum* liberan continuamente ácidos orgánicos en respuesta al Al durante su ciclo de vida, es necesario analizar la presencia y concentración de dichos ácidos en el medio nutritivo.

- **Asociación de cristales de oxalato y Al en tejido foliar.**

F. esculentum puede tolerar altas concentraciones de Al en el medio a través de dos mecanismos: la acumulación en blancos celulares y tejidos específicos y la exudación de ácidos orgánicos al medio, evitando la entrada de Al a través de las raíces (Ma *et al.* 1998; Zheng *et al.* 1998). Debido a que en el presente trabajo se observó que el Al no fue traslocado desde las raíces hacia la parte aérea de las plantas, es muy probable que, bajo las condiciones experimentales en las que se mantuvieron las plantas, estas hayan utilizado más el mecanismo de exudación de ácidos orgánicos y la acumulación únicamente en raíces para evitar cambios en su metabolismo durante todo su ciclo de vida. De acuerdo con esto, se tienen reportes que mencionan que algunas plantas resistentes a Al, en algunas condiciones, prefieren utilizar con mayor eficacia la estrategia de liberación de ácidos orgánicos para prevenir la pérdida excesiva de carbono, ya que este tipo de

respuestas, como en el caso de *F. esculentum*, son altamente específicas a la presencia de aluminio (Mossor-Pietraszewska 2001; Osawa y Matsumoto 2001).

Aunque los resultados observados en este estudio indican que el Al no fue traslocado a las hojas de *F. esculentum*, probablemente si se analiza la abundancia de drusas en el tejido foliar, se pueda evaluar el posible efecto a larga distancia del Al con respecto a la homeostasis del calcio.

- **Proporción de Aluminio y elementos esenciales en hojas, tallos y raíces.**

La acumulación del Al en las raíces puede estar relacionado con los mecanismos de tolerancia ya reportados para *F. esculentum* (Ma *et al.* 1998; Zheng *et al.* 1998), que consisten en la liberación de ácidos orgánicos a la rizósfera y en la acumulación del Al en las paredes celulares y vacuolas de las células de la raíz. La razón por la que el Al no fue traslocado a las hojas fue quizá por las condiciones ambientales de los bioensayos, ya que las plantas estuvieron expuestas durante todo su ciclo de vida a un ambiente con alta humedad relativa, la transpiración no ocurre de manera normal, y por lo tanto, la movilización de elementos minerales se vio reducida. Es muy probable, que los niveles significativamente altos de Al en raíces se deba a la fijación de este elemento en las paredes celulares radiculares, como se ha reportado para *Fagopyrum tataricum*, en donde se observó que las pectinas de las paredes celulares en raíces juegan un papel muy importante en la exclusión del Al como mecanismo de resistencia (Yang *et al.* 2011).

El hecho de que las distribuciones relativas de nutrientes minerales se mantuvieran constantes, independientemente de la presencia de aluminio en el medio y la acumulación de este en las raíces (Figuras 17 y 18), sugiere un mecanismo de tolerancia bastante elaborado que mantiene la estabilidad fisiológica de las plantas en dichas condiciones experimentales. Ghanati y colaboradores (2005) mencionan que debido a la respuesta que encontraron a nivel radicular en

presencia de Al en plantas de *C. sinensis*, es posible que el efecto positivo del Al o la resistencia de las plantas tolerantes, no siempre se deba a la interacción del Al con otros nutrientes minerales en la rizósfera, sino a la activación de un sistema antioxidante muy eficiente que anula las posibilidades de daño celular.

Esto difiere con lo que se ha observado en otras plantas y bajo condiciones experimentales diferentes, por ejemplo, se ha observado que la presencia de Al altera significativamente los niveles de calcio tanto en raíces como en tejidos aéreos de trigo, centeno y tabaco (Jones *et al.* 1998; Ma *et al.* 2002; Mossor-Pietraszewska 2001). También se han reportado aumentos significativos en la concentración de nutrientes como P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B y Mo en presencia de aluminio, en tallos y hojas de plantas tolerantes de soya, aplicando un tratamiento de 150 μM de AlCl_3 (Shamsi *et al.* 2007). Por otro lado, Fung y colaboradores (2008) encontraron que las concentraciones de K en savia xilemática de *C. sinensis* expuesta a concentraciones de 0.25-1 mM de Al aumentan significativamente, mientras que las concentraciones de Fe disminuyen con respecto a su control. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo con *F. esculentum*, únicamente la concentración de K en tallo disminuyó significativamente en plantas tratadas con Al. Taiz y Zeiger (2010) mencionan que el K forma parte del grupo de nutrientes cuya principal función es constituir co-factores enzimáticos y regular los potenciales osmóticos en las plantas, es probable entonces, que los resultados obtenidos indiquen algún tipo de respuesta relacionada con la distribución de K en plantas tratadas con Al.

Por otro lado, Mossor-Pietraszewska (2001) también menciona que las plantas tolerantes a Al tienen un uso muy eficiente del fósforo disponible en su medio, debido principalmente a que al

liberar ácidos orgánicos a la rizósfera, éstos forman complejos con Al y la disponibilidad química del P es mayor. Probablemente la estabilidad en los niveles endógenos de P también haya sido un efecto de la interacción del mineral con Al en el medio nutritivo, como lo observado por Tomioka y colaboradores (2005) en raíces de *Quercus serrata*.

- **Conclusiones finales**

- ⊗ Este trabajo es el único que hasta hoy ha estudiado la respuesta al aluminio durante el ciclo de vida completo de *Fagopyrum esculentum* de una manera integral, considerando parámetros de respuesta morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.
- ⊗ *F. esculentum* no mostró diferencias significativas en su crecimiento y tasa fotosintética en presencia de diferentes concentraciones de aluminio. Lo que sugiere un mecanismo muy elaborado de adaptación a las condiciones de su medio, utilizando de manera eficiente el mecanismo de tolerancia que consiste en evitar la entrada del Al a órganos aéreos y mantener a este elemento en raíces sin que se produzca alguna respuesta inhibitoria.
- ⊗ La asimilación y asignación de otros nutrientes minerales en raíces, tallos y hojas de *F. esculentum* no se vieron modificadas significativamente por la presencia del Al, lo que indica un ajuste metabólico muy eficiente que desarrolla esta especie tolerante, bajo condiciones experimentales hidropónicas. Estos resultados se reflejan directamente en el correcto funcionamiento fotosintético y el desarrollo normal de las plantas expuestas a aluminio.
- ⊗ Los niveles endógenos de ABA no presentaron diferencias significativas entre plantas tratadas con y sin aluminio, lo que indica que no hay una respuesta específica de esta fitohormona a la presencia de aluminio. Estos resultados se confirman con lo obtenido en el análisis de crecimiento y las evaluaciones fotosintéticas.

- ⊗ El aluminio presente en el medio nutritivo únicamente fue acumulado en las raíces de las plantas tratadas. Esto indica que el mecanismo de exclusión utilizado por esta especie se mantiene activo durante todo su ciclo de vida en estas condiciones experimentales, evitando la traslocación a órganos aéreos. Otra probable explicación es la alteración en las tasas de transpiración de las plantas debido a la alta humedad relativa predominante en las cámaras de crecimiento.
- ⊗ Debido a que el aluminio se mantuvo todo el tiempo en las raíces de *F. esculentum* y no fue traslocado a los órganos aéreos, no existió ninguna relación entre la formación de cristales de oxalato y la acumulación de Al. Aunque sería interesante realizar un estudio que analice la homeostasis del calcio y el número de cristales de oxalato formados con respecto a la concentración de aluminio aplicada.

PERSPECTIVAS

- ⊗ Debido a que los análisis de crecimiento y fotosíntesis se realizaron entre periodos de tiempo largos durante el ciclo de vida de *F. esculentum*, es importante considerar la realización de un análisis de crecimiento y fotosíntesis funcional, con un mayor número de cosechas y mediciones entre periodos de tiempo más cortos, principalmente durante la etapa de crecimiento vegetativo (primeras 3 semanas después de la germinación), con la finalidad de determinar el mecanismo de ajuste metabólico que las plantas realizan durante esta etapa previa a la floración.
- ⊗ Para determinar si efectivamente no existen diferencias significativas en los parámetros fotosintéticos que implican la funcionalidad del PSII y la eficiencia fotoquímica, es

importante complementar estos resultados con evaluaciones de fluorescencia y contenido de pigmentos fotosintéticos en plantas tratadas con aluminio.

- ☼ Debido a que se observó una mayor tendencia de cambio en los niveles endógenos de ABA en raíces pero no en órganos aéreos, es importante determinar si *F. esculentum* mantiene activo durante todo su ciclo de vida el mecanismo de tolerancia que consiste en regular la actividad de canales aniónicos que participan en la exudación de ácidos orgánicos, a través de la cuantificación de oxalato en la rizósfera de plantas adultas. Además, como los resultados presentados en este trabajo solo corresponden a plantas adultas en etapa de fructificación, es necesario complementar con la cuantificación de ABA en etapas más jóvenes (de crecimiento vegetativo y floración).
- ☼ De la misma manera, al realizar una determinación de elementos minerales en los tejidos vegetales de plantas jóvenes y en floración, se complementarían los resultados de asignación de nutrientes durante todo el ciclo de vida de *F. esculentum* en presencia de aluminio.

ANEXO I

TABLAS ESTADÍSTICAS DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS EVALUADOS EN *Fagopyrum esculentum*

ANOVA = Análisis de Varianza

SC = Sumas de Cuadrados

CM = Cuadrados Medios

GL = Grados de Libertad

Tabla 1. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la BIOMASA TOTAL

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	579.560	3	193.187	1132.29	0.000000
Tratamiento	0.036	3	0.012	0.07	0.975373
Tiempo*Tratamiento	0.394	9	0.044	0.26	0.984660
Error	21.839	128	0.171		

Tabla 2. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la TASA ABSOLUTA DE CRECIMIENTO (AGR)

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	147.498	2	73.749	165.862	0.000000
Tratamiento	0.082	3	0.027	0.061	0.979988
Tiempo*Tratamiento	0.762	6	0.127	0.286	0.942529
Error	42.241	95	0.445		

Tabla 3. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la TASA RELATIVA DE CRECIMIENTO (RGR)

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.166653	2	0.083327	37.4764	0.000000
Tratamiento	0.000551	3	0.000184	0.0826	0.969344
Tiempo*Tratamiento	0.005541	6	0.000923	0.4153	0.867243
Error	0.213450	96	0.002223		

Tabla 4. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a los COMPONENTES DE LA RGR

NAR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.47164	2	0.23582	2.3965	0.096465
Tratamiento	0.07319	3	0.02440	0.2479	0.862640
Tiempo*Tratamiento	0.35721	6	0.05954	0.6050	0.725704
Error	9.44661	96	0.09840		
LAR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.146997	2	0.073499	237.53	0.000000
Tratamiento	0.003619	3	0.001206	3.90	0.011232
Tiempo*Tratamiento	0.001144	6	0.000191	0.62	0.716967
Error	0.029705	96	0.000309		
SLA	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.54091	2	0.27046	211.18	0.000000

Tratamiento	0.01938	3	0.00646	5.04	0.002742
Tiempo*Tratamiento	0.00469	6	0.00078	0.61	0.721306
Error	0.12295	96	0.00128		
LWR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	1.33768	2	0.66884	823.60	0.000000
Tratamiento	0.00879	3	0.00293	3.61	0.016110
Tiempo*Tratamiento	0.00223	6	0.00037	0.46	0.838329
Error	0.07796	96	0.00081		

Tabla 5. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la ASIGNACIÓN DE BIOMASA EN RAÍCES, TALLOS Y FLORES

RWR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.118376	3	0.039459	32.612	0.000000
Tratamiento	0.003245	3	0.001082	0.894	0.446324
Tiempo*Tratamiento	0.004980	9	0.000553	0.457	0.900539
Error	0.154874	128	0.001210		
SWR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	1.62803	3	0.54268	289.890	0.000000
Tratamiento	0.01712	3	0.00571	3.048	0.031119
Tiempo*Tratamiento	0.01049	9	0.00117	0.623	0.775997
Error	0.23962	128	0.00187		
FWR	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.078659	1	0.078659	91.7547	0.000000
Tratamiento	0.000072	3	0.000024	0.0279	0.993667
Tiempo*Tratamiento	0.002577	3	0.000859	1.0020	0.397786
Error	0.054866	64	0.000857		
R / S	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.259497	3	0.086499	31.676	0.000000
Tratamiento	0.008379	3	0.002793	1.023	0.384875
Tiempo*Tratamiento	0.010594	9	0.001177	0.431	0.916250
Error	0.349535	128	0.002731		

Tabla 6. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación al NÚMERO DE INFLORESCENCIAS

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	15664.50	1	15664.50	126.3308	0.000000
Tratamiento	387.72	3	129.24	1.0423	0.379649
Error	8307.72	67	124.00		

Tabla 7. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la MÁXIMA TASA FOTOSINTÉTICA (A_{max})

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	3.33	2	1.67	0.0889	0.915243
Tratamiento	14.32	3	4.77	0.2544	0.857412
Tiempo*Tratamiento	90.17	6	15.03	0.8012	0.578613
Error	450.17	24	18.76		

Tabla 8. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la MÁXIMA TASA DE CARBOXILACIÓN ($V_{c_{max}}$)

	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	539.49	2	269.75	4.217	0.026947
Tratamiento	184.82	3	61.61	0.963	0.426213
Tiempo*Tratamiento	147.49	6	24.58	0.384	0.881763
Error	1535.17	24	63.97		

Tabla 9. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a los PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS DE RESPUESTA A LA LUZ

LSP	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	3295476	2	1647738	6.5589	0.005340
Tratamiento	274511	3	91504	0.3642	0.779400
Tiempo*Tratamiento	1376958	6	229493	0.9135	0.502182
Error	6029296	24	251221		
LCP	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	295.95	2	147.97	1.4870	0.246151
Tratamiento	159.25	3	53.08	0.5334	0.663771
Tiempo*Tratamiento	364.80	6	60.80	0.6110	0.719204
Error	2388.31	24	99.51		
AQE	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.015361	2	0.007680	10.0106	0.000690
Tratamiento	0.000651	3	0.000217	0.2828	0.837261
Tiempo*Tratamiento	0.001066	6	0.000178	0.2316	0.962118
Error	0.018413	24	0.000767		

Tabla 10. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a los PARÁMETROS FOTOSINTÉTICOS DE RESPUESTA A CO_2

Γ^*	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	77.27	2	38.63	49.97	0.000000
Tratamiento	0.73	3	0.24	0.32	0.813870
Tiempo*Tratamiento	19.98	6	3.33	4.31	0.004384
Error	18.56	24	0.77		
J_{max}	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	25873.4	2	12936.7	24.828	0.000001
Tratamiento	1873.6	3	624.5	1.199	0.331483
Tiempo*Tratamiento	5178.5	6	863.1	1.656	0.175201
Error	12505.1	24	521.0		
TPU	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	26.910	2	13.455	12.522	0.000189
Tratamiento	3.078	3	1.026	0.955	0.429879
Tiempo*Tratamiento	3.670	6	0.612	0.569	0.750613
Error	25.787	24	1.074		

Tabla 11. ANOVA para un diseño completamente aleatorizado ($Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$) con relación a la TASA DE ASIMILACIÓN DE CO₂ EN TIEMPOS ESPECÍFICOS

16 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	3.822	3	1.274	0.5280	0.669367
Error	38.605	16	2.413		
31 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	4.778	3	1.593	0.5894	0.630798
Error	43.238	16	2.702		
43 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	2.531	3	0.844	0.377	0.770948
Error	35.829	16	2.239		

Tabla 12. ANOVA para un diseño completamente aleatorizado ($Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$) con relación a la CONDUCTANCIA ESTOMÁTICA (gs) EN TIEMPOS ESPECÍFICOS

16 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.050153	3	0.016718	1.2072	0.339060
Error	0.221575	16	0.013848		
31 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.358248	3	0.119416	2.8003	0.073483
Error	0.682306	16	0.042644		
43 días de edad	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.07131	3	0.02377	0.5058	0.683756
Error	0.75190	16	0.04699		

Tabla 13. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la CONCENTRACIÓN DE ABA ENDÓGENO

HOJA	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	0.027685	2	0.013843	0.9511	0.404910
Tratamiento	0.041641	2	0.020821	1.4305	0.265123
Tiempo*Tratamiento	0.075653	4	0.018913	1.2994	0.307580
Error	0.261990	18	0.014555		
TALLO	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	6.40175	2	3.20088	33.2492	0.000001
Tratamiento	0.39653	2	0.19827	2.0595	0.156517
Tiempo*Tratamiento	1.01733	4	0.25433	2.6419	0.067765
Error	1.73285	18	0.09627		
RAIZ	SC	GL	CM	F	p
Tiempo	3.29804	2	1.64902	4.13204	0.033357
Tratamiento	2.35691	2	1.17846	2.95292	0.077788
Tiempo*Tratamiento	1.44632	4	0.36158	0.90603	0.481279
Error	7.18346	18	0.39908		

Tabla 14. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la PROPORCIÓN RELATIVA DE ALUMINIO EN TEJIDOS

	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000118	2	0.000059	0.728	0.487474
Órgano	0.004492	2	0.002246	27.638	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.007238	4	0.001810	22.267	0.000000
Error	0.004632	57	0.000081		

Tabla 15. ANOVA para un diseño en bloques aleatorizados completos ($Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$) con relación a la PROPORCIÓN RELATIVA DE MACROELEMENTOS Y HIERRO (Fe) EN TEJIDOS

K (potasio)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.001802	2	0.000901	10.76	0.000095
Órgano	0.012949	2	0.006475	77.36	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.000463	4	0.000116	1.38	0.250063
Error	0.005273	63	0.000084		
Ca (calcio)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000259	2	0.000130	1.67	0.197348
Órgano	0.014959	2	0.007480	96.16	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.000124	4	0.000031	0.40	0.809357
Error	0.004900	63	0.000078		
Mg (magnesio)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000476	2	0.000238	4.42	0.016031
Órgano	0.005878	2	0.002939	54.57	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.000123	4	0.000031	0.57	0.684311
Error	0.003393	63	0.000054		
P (fósforo)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000368	2	0.000184	2.54	0.086657
Órgano	0.000687	2	0.000344	4.76	0.011922
Tratamiento*Órgano	0.000344	4	0.000086	1.19	0.323413
Error	0.004552	63	0.000072		
S (azufre)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000597	2	0.000299	5.00	0.009690
Órgano	0.002973	2	0.001487	24.86	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.000080	4	0.000020	0.34	0.853302
Error	0.003768	63	0.000060		
Fe (hierro)	SC	GL	CM	F	p
Tratamiento	0.000035	2	0.000018	1.13	0.329537
Órgano	0.012325	2	0.006162	397.77	0.000000
Tratamiento*Órgano	0.000120	4	0.000030	1.93	0.116401
Error	0.000976	63	0.000015		

BIBLIOGRAFÍA

- Barceló J, Poschenrieder C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48: 75-92
- Campbell CG. (1997). Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Roma, Italia.
- Cervantes L, Ávila O, Ruvalcaba JL, Miranda J, Muñoz R. (2008). The use of biomonitors and PIXE analysis in the study of air pollution in Mexico City. *X-ray Spectrometry*, 37: 156-162
- Chen LS, Qi YP, Jiang HX, Yang LT, Yang GH. (2010). Photosynthesis and photoprotective systems of plants in response to aluminum toxicity. *African Journal of Biotechnology*, 9: 9237-9247
- Chen LS, Qi YP, Liu XH. (2005a). Effects of aluminum on light energy utilization and photoprotective systems in citrus leaves. *Annals of Botany*, 96: 35-41
- Chen LS, Qi YP, Smith BR, Liu XH. (2005b). Aluminum-induced decrease in CO₂ assimilation in citrus seedlings is unaccompanied by decreased activities of key enzymes involved in CO₂ assimilation. *Tree Physiology*, 25: 317-324
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H. (2001). Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta*, 213: 45-50
- Delhaize E, Ryan PR. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology*, 107: 315-321
- Evans, GC. (1972). *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Fung KF, Carr HP, Zhang J, Wong MH. (2008). Growth and nutrient uptake of tea under different aluminium concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 1582-1591
- Ghanati F, Morita A, Yokota H. (2005). Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system. *Plant and Soil*, 276: 133-141

- González-Santana, IH. (2009). Efecto del Aluminio en el crecimiento y sistema antioxidante de *Conostegia xalapensis* (Bonpl.) (Melastomataceae). Maestría en Ciencias (Biología Experimental). Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Grabski S, Schindler M. (1995). Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiology*, 108: 897-901
- Grime GW. (2005). A perspective on the tenth international conference on particle induced x-ray emission and its applications. *X-ray Spectrometry*, 34: 265-268
- Hunt, R. (1990). Basic Growth Analysis. *Plant Growth Analysis for Beginners*. Unwin Hyman, London.
- Jiang HX, Chen LS, Zheng JG, Han S, Tang N, Smith BR. (2008). Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll a fluorescence transient. *Tree Physiology*, 28: 1863-1871
- Jiang HX, Tang N, Zheng JG, Chen LS. (2009). Antagonistic actions of boron against inhibitory effects of aluminum toxicity on growth, CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of *Citrus grandis* seedlings. *BMC Plant Biology*, 9 (102).
- Jones DL, Kochian LV, Gilroy S. (1998). Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. *Plant Physiology*, 116: 81-89
- Klug B, Horst WJ. (2010a). Oxalate exudation into the root-tip water free space confers protection from aluminum toxicity and allows aluminum accumulation in the symplast in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *New Phytologist*, 187: 380-391
- Klug B, Horst WJ. (2010b). Spatial characteristics of aluminum uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 139: 181-191
- Klug B, Specht A, Horst WJ. (2011). Aluminium localization in root tips of the aluminium-accumulating plant species buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Experimental Botany*, 62: 5453-5462
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeros MA. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of Aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Reviews of Plant Biology*, 55: 459-493
- Kollmeier M, Felle H, Horst WJ. (2000). Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone: is reduced basipetal auxin

flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiology*, 122: 945-956

- Kreft I, Fabjan N, Yasumoto K. (2006). Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry* 98: 508-512
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. (2008). *Plant Physiological Ecology*. New York, U. S. A., Springer.
- Le Van H, Kuraishi S, Sakurai N. (1994). Aluminum-induced rapid root inhibition and changes in cell-wall components of Squash seedlings. *Plant Physiology*, 106: 971-976
- Li XF, Ma JF, Matsumoto H. (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between Rye and Wheat. *Plant Physiology*, 123: 1537-1543
- López-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Science*, 160: 1-13
- López-Curto ML, Márquez-Guzmán J, Murguía-Sánchez G. (2005). *Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas: Libro de Laboratorio*. 2 ed. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Ma JF. (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41: 383-390
- Ma JF, Furukawa J. (2003). Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97: 46-51
- Ma JF, Hiradate S. (2000). Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta*, 211: 355-360
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H. (1998). High aluminum resistance in Buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, 117: 753-759
- Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H. (1997). Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*. *Plant Physiology*, 113: 1033-1039
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*, 6: 273-278
- Ma Q, Rengel Z, Kuo J. (2002). Aluminium toxicity in rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic Ca²⁺ in intact root tips. *Annals of Botany*, 89: 241-244

- Marques MJ. (2004). Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM., México, D.F.
- Martínez-Rendón AY, Romero-Romero MT, Tinoco-Ojanguren C, Cruz-Ortega R. (2010). Tasa fotosintética y respuestas oxidativas de *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) bajo diferentes concentraciones de Al. XVIII Congreso Mexicano de Botánica, Guadalajara, Jal. México.
- Mazen AMA. (2004). Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. Russian Journal of Plant Physiology, 51: 281-285
- Mazen AMA, Maghraby OMO. (1997/98). Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. Biologia Plantarum, 40: 411-417
- Mertens R, Deus-Neumann B, Weiler EW. (1983). Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. FEBS Letters, 160:269-272.
- Miyasaka SC, Hawes MC. (2001). Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. Plant Physiology, 125: 1978-1987
- Miyasaka SC, Hue NV, Dunn MA. (2007). Aluminum. En: Barker AV, Pilbeam DJ. (Eds.) Handbook of Plant Nutrition. Taylor & Francis Group CRC Press, U.S.A., pp 439-497
- Mossor-Pietraszewska T. (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. Acta Biochimica Polonica, 48: 673-686
- Oomah BD, Mazza G. (1996). Flavonoids and antioxidative activities in Buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 1746-1750
- Osaki M, Watanabe T, Tadano T. (1997). Beneficial effect of aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. Soil Science and Plant Nutrition, 43: 551-563
- Osawa H, Matsumoto H. (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. Plant Physiology, 126: 411-420
- Panda SK, Baluska F, Matsumoto H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. Plant Signaling & Behavior, 4: 592-597

- Peixoto PHP, Da Matta FM, Cambraia J. (2002). Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 25: 821-832
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 267-274
- Ramírez-Rodríguez V, López-Bucio J, Herrera-Estrella L. (2005). Adaptive responses in plants to nonoptimal soil pH. En: Jenks MA, Hasegawa PM. (Eds.) *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Publishing, Oxford, UK., pp 145-170
- Rengel Z. (1992). Role of Calcium in Aluminium toxicity. *New Phytologist*, 121: 499-513
- Reyna-Llorens I. (2010). Mecanismos de tolerancia al aluminio en la planta acumuladora *Fagopyrum esculentum* (Moench) var Mancan. Maestría en Ciencias (Bioquímicas). Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Reyna-Llorens I, Corrales I, Poschenrieder C, Cruz-Ortega R, Barceló J. (En revisión) Both aluminum and ABA activate transcription of an ABC-like transporter gene (*FeALS*) in *Fagopyrum esculentum*. *Plant, Cell and Environment*.
- Ruvalcaba JL. (2008). Las técnicas de origen nuclear: PIXE y RBS. En: Español IdPH (Ed.) *La Ciencia y el Arte. Ciencias experimentales y conservación del Patrimonio Histórico.*, Madrid, pp 151-172
- Ryan PR, Delhaize E. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 527-560
- Samac DA, Tesfaye M. (2003). Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils - a review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 75: 189-207
- Shamsi IH, Wei K, Jilani G, Zhang G. (2007). Interactions of cadmium and aluminum toxicity in their effect on growth and physiological parameters in soybean. *Journal of Zhejiang University, SCIENCE B* 8: 181-188
- 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.
- Shen R, Iwashita T, Ma JF. (2004). Form of Al changes with Al concentration in leaves of buckwheat. *Journal of Experimental Botany*, 55: 131-136

- Shen R, Ma JF. (2001). Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1683-1687
- Shen R, Ma JF, Kyo M, Iwashita T. (2002). Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, 215: 394-398
- Shen RF, Chen RF, Ma JF. (2006). Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds. *Plant Soil*, 284: 265-271
- Sivaguru M, Fujiwara T, Samaj J, Baluska F, Yang Z, Osawa H, Maeda T, Mori T, Volkmann D, Matsumoto H. (2000). Aluminum-induced 1-3-b-D-Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiology*, 124: 991-1005
- Sivaguru M, Horst WJ. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, 116: 155-163
- Silva S, Pinto G, Dias MC, Correia CM, Moutinho-Pereira J, Pinto-Carnide O, Santos C. (2012). Aluminium long-term stress differently affects photosynthesis in rye genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 54: 105-112
- 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
- Taiz L, Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Incorporated, California, USA.
- Tomioka R, Oda A, Takenaka C. (2005). Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb. seedlings. *Journal of Forest Research*, 10: 319-324
- von Uexküll HR, Mutert E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171: 1-15
- Watanabe T, Jansen S, Osaki M. (2005). The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, 165: 773-780
- Watanabe T, Jansen S, Osaki M. (2006). Al-Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Miscanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment*, 29: 2124-2132

- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M. (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, 178: 581-589
- Watanabe T, Osaki M. (2002). Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: A review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 33: 1247-1260
- Watanabe T, Osaki M. (2002). Role of organic acids in aluminum accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiology*, 22: 785-792
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H. (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of Reactive Oxygen Species in plants cells. *Plant Physiology*, 128: 63-72
- 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
- Yang YY, Jung JY, Song WY, Suh HS, Lee Y. (2000). Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiology*, 124: 1019-1026
- Yang JL, Zhu XF, Zheng C, Zhang YJ, Zheng SJ. (2011). Genotypic differences in Al resistance and the role of cell-wall pectin in Al exclusion from the root apex in *Fagopyrum tataricum*. *Annals of Botany*, 107: 371-378
- Zhang XB, Liu P, Yang YS, Xu GD. (2007). Effect of Al in soil on photosynthesis and related morphological and physiological characteristics of two soybean genotypes. *Botanical Studies*, 48: 435-444
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. (1998). High aluminum resistance in Buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiology*, 117: 745-751
- Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF, Matsumoto H. (2005). Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in Buckwheat. *Plant Physiology*, 138: 297-303
- Zhou G, Delhaize E, Zhou M, Ryan PR. (2011). Biotechnological solutions for enhancing the aluminium resistance of crop plants. En: Shanker A, Venkateswarlu B. (Eds.) *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech Journals, U. S. A.

- Zhu M, Ahn S, Matsumoto H. (2003). Inhibition of growth and development of root border cells in wheat by Al. *Physiologia Plantarum*, 117: 359-367