



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Fagopyrum esculentum*  
MOENCH. AL ESTRÉS POR ALUMINIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Ana Violeta Salazar Chavarría

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María del Rocío  
Cruz Ortega

ASESORA INTERNA: Dra. Esther Matiana García  
Amador



México, D.F. septiembre de 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que la alumna **SALAZAR CHAVARRÍA ANA VIOLETA**, con número de cuenta **305141976**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **08 de septiembre de 2015** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Biól. ELVIA GARCÍA SANTOS  
**VOCAL** Dra. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA\*  
**SECRETARIO** Dra. ESTHER MATIANA GARCÍA AMADOR  
**SUPLENTE** Dr. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ  
**SUPLENTE** Dra. ANA MARÍA SORIANO MARTÍNEZ

El título de la tesis que presenta es: **Respuesta fisiológica de *Fagopyrum esculentum* Moench. al estrés por aluminio.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABERÁ EL ESPÍRITU"  
México, D. F., a 13 de agosto de 2015

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR  
ZARAGOZA  
DIRECCIÓN

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ésta máxima casa de estudios, por dejarme aprender en sus aulas y por darme la mejor formación profesional.

Al proyecto PAPIIT con clave IN205912 titulado: “Estudio comparativo a nivel molecular y fisiológico de la tolerancia a metales de *Fagopyrum esculentum*, Moench. (Polygonaceae)” por el financiamiento y la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por todo el apoyo brindado durante la realización de la tesis, por permitirme trabajar bajo su dirección, por dejarme aprender de ella y por ser siempre un ejemplo para mí.

A la Dra. Esther Matiana García Amador y a la Biól. Elvia García Santos por sus valiosas aportaciones, por ser parte fundamental en mi formación académica y un ejemplo para mí.

A la Dra. Ana María Soriano por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Carlos Castillejos Cruz por sus enseñanzas, su paciencia y su tiempo, por acompañarme durante mi formación académica y por estar conmigo en todos mis triunfos y derrotas.

## **DEDICATORIAS**

Al hombre de mi vida Antonio Rodríguez, quien ha decidido recorrer este camino junto a mí, a quien le debo momentos inolvidables y quien me ha brindado el apoyo necesario para conseguir este objetivo.

A mi madre Ana María Chavarría por permitirme cumplir este sueño, por apoyarme con amor y paciencia y por ser uno de los pilares de mi vida.

A mi padre Honorio Salazar quien me enseñó la determinación y la disciplina con la que se cumplen los objetivos.

A mi hermana Susana Salazar quien es parte de mi inspiración y de quien he aprendido constancia y dedicación.

A mi hermana Jessica Salazar quien me ha acompañado en esta travesía y quien con amor, me ha ayudado a superar los obstáculos.

A mi hermana Joana Salazar a quien le agradezco todo su cariño y comprensión.

A mi abuelo Refugio Chavarría a quien le agradezco todo su apoyo y amor incondicional, quien siempre se preocupó por enseñarme la importancia del desarrollo profesional y por quien daría todo para que pudiera ver y disfrutar de este logro conmigo.

A mi abuela Angelina Bravo por estar siempre junto a mí, por enseñarme con amor sus experiencias y por ayudarme a elegir con prudencia y sabiduría.

A mis estimados tíos Simón, Angelina y Jorge Chavarría de quienes valoro su cariño y apoyo incondicional, quienes forman parte fundamental de mi formación y quienes me han guiado siempre con amor y sabiduría.

## CONTENIDO

	PÁG.
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS .....	6
I. RESUMEN .....	8
II. INTRODUCCIÓN .....	9
III. MARCO TEÓRICO .....	10
III.1 Toxicidad por aluminio.....	10
III.2 Estrés oxidativo y sistema antioxidante .....	12
III.3 Estrés y tolerancia al aluminio .....	17
III.4 <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....	20
III.5 Antecedentes.....	23
IV. JUSTIFICACIÓN .....	27
V. HIPÓTESIS .....	27
VI. OBJETIVOS .....	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
VIII. RESULTADOS .....	34
VIII.1 Crecimiento, longitud radicular y tasa de crecimiento radicular relativo ...	34
VIII.2 Penetración y acumulación de Al .....	38
VIII.3 Localización de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en las puntas de las raíces .....	39
VIII.4 Actividad enzimática de la catalasa en las puntas de las raíces .....	45
IX. DISCUSIÓN .....	47
X. CONCLUSIONES .....	55
XI. PERSPECTIVAS .....	56
XII. REFERENCIAS .....	57

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>FIGURAS</b>	<b>PÁG.</b>
<b>No.</b>	
1 Formas iónicas del Al soluble dependiendo del pH del medio .....	10
2 Crecimiento radical en plántulas de tabaco con y sin aluminio .....	11
3 Peroxidación lipídica .....	13
4 Monómero de la catalasa-1 de <i>Neurospora crassa</i> (CAT-1) .....	16
5 Mecanismos internos de detoxificación de aluminio .....	19
6 <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench. ....	21
7 Captación y distribución del aluminio en una planta acumuladora; <i>Fagopyrum esculentum</i> .....	22
8 Longitud de las raíces expuestas a los diferentes tratamientos .....	35
9 Crecimiento relativo de las raíces de <i>F. esculentum</i> en las primeras 96 h .....	36
10 Peso seco o biomasa de las raíces de <i>F. esculentum</i> a las 96 h de exposición a los distintos tratamientos con AlCl <sub>3</sub> .....	37
11 Tinción con hematoxilina de las raíces de <i>F. esculentum</i> en los diferentes tratamientos durante las primeras 96 h .....	39
12 Eliminación de la fluorescencia .....	40
13 Tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de las puntas de las raíces de <i>F. esculentum</i> en los diferentes tratamientos con AlCl <sub>3</sub> .....	41
14 Tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de la zona de elongación de las raíces en los diferentes tratamientos con Al .....	42
15 Imágenes de la tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de las puntas de las raíces en los diferentes tratamientos con AlCl <sub>3</sub> durante 24 y 48 h .....	43
16 Imágenes de la tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de las puntas de las raíces en los diferentes tratamientos con AlCl <sub>3</sub> durante 72 y 96 h .....	43

<b>17</b> Imágenes de la tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de la zona de elongación en los diferentes tratamientos con AlCl <sub>3</sub> durante 24 y 48 h de exposición .....	<b>44</b>
<b>18</b> Imágenes de la tinción con H <sub>2</sub> DCFDA de la zona de elongación en los diferentes tratamientos con AlCl <sub>3</sub> durante 72 y 96 h de exposición .....	<b>44</b>
<b>19</b> Actividad de CAT en las puntas de las raíces de <i>F. esculentum</i> expuestas durante 48 y 72 h a AlCl <sub>3</sub> .....	<b>46</b>

## **CUADROS**

### **No.**

<b>1</b> Valores de la actividad enzimática de catalasa en las raíces de <i>F. esculentum</i> .....	<b>45</b>
---	-----------



## I. Resumen

La respuesta morfológica y fisiológica inicial de plántulas de *Fagopyrum esculentum* Moench. fue evaluada a elevadas concentraciones de aluminio (Al), para esto, en plántulas de 3 días expuestas a 0, 25, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 96h, se realizó: 1) un análisis de la longitud y del crecimiento radicular relativo (RRG por sus siglas en inglés; Relative Root Growth) así como del peso seco, 2) se determinó la acumulación de aluminio por la tinción con hematoxilina, 3) se evaluó la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las raíces utilizando una técnica fluorescente, y 4) se midió la actividad enzimática de la catalasa por espectrofotometría. Los resultados mostraron una disminución en la longitud de las raíces de las plántulas expuestas a todos los tratamientos con  $\text{AlCl}_3$ , sin embargo los resultados de la tasa de crecimiento radicular (RRG) mostraron una recuperación del crecimiento cercana al 100% en las raíces expuestas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  a las 48h de tratamiento. Las plántulas con la concentración más alta (500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ) fueron las únicas que no presentaron una recuperación del crecimiento radicular. La tinción con hematoxilina reveló que la penetración y acumulación de aluminio no se incrementa con el aumento de la concentración de aluminio, ni a través del tiempo de exposición (con excepción de las plántulas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ), lo que sugiere la existencia de un mecanismo que controla la entrada del metal a las plántulas. De igual forma, la tinción con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  mostró que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las raíces no sobrepasó los límites normales por la exposición a las diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$ , ni a través del tiempo. Finalmente, los resultados de la actividad enzimática de la catalasa mostraron que esta enzima no aumenta su actividad en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos con aluminio, por lo que se sugiere que otra enzima del sistema antioxidante debe estar involucrada en la remoción del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados muestran que a pesar que *F. esculentum* es una especie tolerante a la toxicidad por aluminio, en su etapa inicial es sensible y la concentración de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  ya es una concentración tóxica para la plántula.

## II. Introducción

Los suelos ácidos constituyen el 40% del suelo arable mundial (Lenoble *et al.*, 1996; Matsumoto, 2000; Ma *et al.*, 2001) y debido al aumento en la intensidad del uso de los mismos, se ha acelerado el proceso natural de acidificación (Jungjohann *et al.*, 1997) y con ello la proporción de este tipo de suelos, los cuáles presentan altos contenidos de aluminio, manganeso e hidrógeno, elementos que son fitotóxicos. El aluminio en su forma trivalente ( $Al^{3+}$ ) ha sido reconocido como el principal limitante para el crecimiento de los vegetales en suelos ácidos. Éste produce una disminución del desarrollo y crecimiento de las plantas, lo que sumado a las deficiencias nutricionales, debidas a una serie de reacciones entre los distintos elementos, especialmente calcio, magnesio, fósforo y molibdeno hacen de este tipo de suelo un medio con serias limitaciones para la productividad vegetal (Toneatti y Rivera, 2005). Una característica de la fitotoxicidad del aluminio ( $Al^{3+}$ ) es la rápida inhibición de la elongación de la raíz (Ma y Hiradate, 2000). Además, la presencia de este metal es una fuente potencial de estrés oxidativo porque genera la producción de especies reactivas de  $O_2$  (ROS) que causan inactivación de enzimas, peroxidación de lípidos y degradación de proteínas, entre otras alteraciones del metabolismo (González *et al.*, 2008).

Algunas plantas han desarrollado estrategias para tolerar altas concentraciones de aluminio, entre éstas está *Fagopyrum esculentum* Moench. (Polygonaceae), en ésta planta se ha reportado la exudación de ácido oxálico a partir de sus raíces como mecanismo de tolerancia al aluminio, además de presentar la capacidad de acumularlo en las células de las hojas en un complejo no tóxico Al-oxalato en una relación 1:3 (Ma *et al.*, 1997). Así mismo, esta planta puede ser expuesta a altas concentraciones de cobre y zinc sin presentar efectos tóxicos que interfieran en el desarrollo de la misma (Tani y Barrington, 2005), también se ha documentado que puede crecer en suelos contaminados con plomo acumulándolo en raíces, tallo y hojas (Tamura *et al.*, 2005). Además se caracteriza por cultivarse en suelos infértiles y con problemas de acidez (Campbell, 1997).

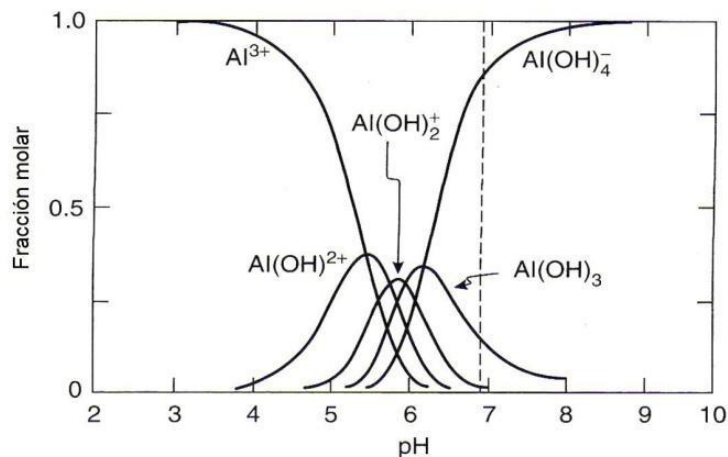
Estas características particulares de *F. esculentum* la hacen objeto de estudio para poder profundizar en el conocimiento de sus respuestas y adaptaciones en condiciones de

estrés por aluminio. La mayoría de los trabajos se han enfocado en plantas adultas y se desconocen muchos de sus mecanismos de tolerancia en la etapa de plántula, cuando la radícula tiene apenas unos centímetros, es por ello que este trabajo tuvo como objetivo el evaluar la respuesta fisiológica y morfológica de *F. esculentum* en la etapa inicial de su desarrollo ante diferentes concentraciones de aluminio.

### III. Marco Teórico

#### III.1 Toxicidad por Aluminio

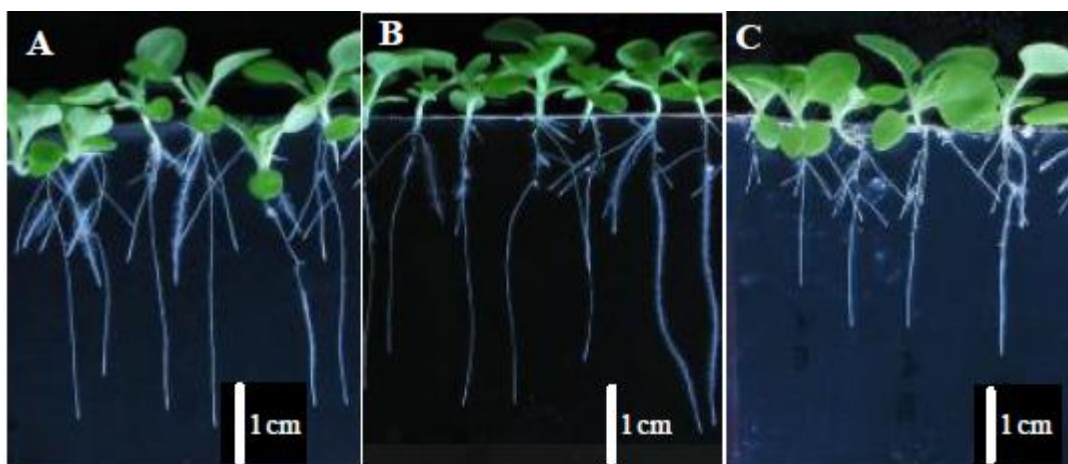
El aluminio (Al) es un metal ligero que constituye el 7% de la corteza terrestre (Dong *et al.*, 2002; Matsumoto, 2000) y es el tercer elemento más abundante después del oxígeno y el silicio, la mayoría de este elemento se encuentra en forma de óxidos y aluminosilicatos. Sin embargo cuando los suelos se vuelven ácidos como resultado de los procesos naturales o de las actividades humanas (Ma *et al.*, 2001), como el uso excesivo de fertilizantes acidificantes y las altas tasas de extracción de nutrientes, producto del aumento en la intensidad de uso de suelos (Jungjohann *et al.*, 1997; Tabaldi *et al.*, 2009), el aluminio se solubiliza en el catión trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ), el cual es sumamente tóxico para las plantas (Ma *et al.*, 2001). Al incrementar su solubilidad el  $\text{Al}^{3+}$ , puede llegar a ocupar más de la mitad de los sitios de intercambio iónico en el suelo (Casierra y Aguilar, 2007) (Fig. 1).



**Fig. 1** Diferentes formas iónicas del Al soluble, cuya conformación depende del pH del medio. La forma  $\text{Al}^{3+}$  se considera la más fitotóxica. (Tomado de Miyasaka *et al.*, 2007).

La disminución en el pH del suelo provoca niveles elevados de aluminio y manganeso, la reducción de la concentración de macronutrientes en forma catiónica, así como la reducción de la solubilidad del fósforo y del molibdeno, y por último, causa inhibición del crecimiento radical, la cual tiene como consecuencia una reducción en la absorción de agua y de nutrimentos para las plantas (Casierra y Aguilar, 2007). La toxicidad por aluminio ha sido considerada como el principal limitante en la productividad de los suelos ácidos (Inostroza *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2014), los cuales representan aproximadamente el 40% de la superficie arable de la tierra (Lenoble *et al.*, 1996; Matsumoto, 2000; Ma *et al.*, 2001).

La acentuada reducción del crecimiento de las raíces por la absorción de iones de  $\text{Al}^{3+}$  (Fig. 2) aún no está totalmente clara, ya que muchos estudios indican que la toxicidad inhibe principalmente la elongación celular, mientras que otros aseguran que los iones de  $\text{Al}^{3+}$  afectan la división celular en la raíz (Zhou *et al.*, 2014).



**Fig. 2** Crecimiento radical en plántulas de tabaco con y sin aluminio en el medio nutritivo sólido después de 10 días de exposición. A) Sin  $\text{AlCl}_3$ , B)  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , C)  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . (Tomado de Trejo y Gómez, 2007).

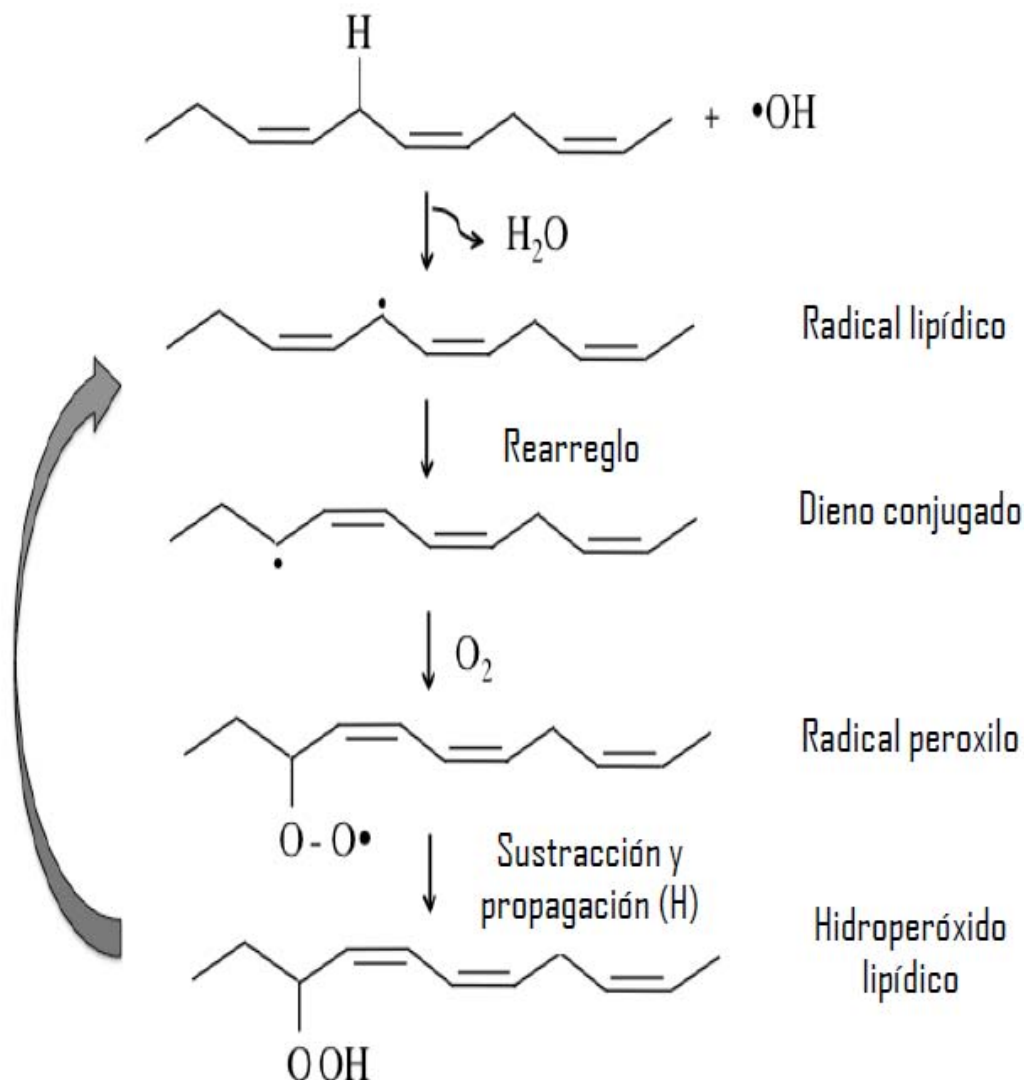
El sitio crítico dónde el aluminio se percibe y se produce la toxicidad, es la punta de la raíz (Zhou *et al.*, 2014). Sivaguru *et al.* (2000) resume en tres aspectos el papel del ápice radicular en la respuesta al estrés por aluminio: (1) La acumulación de aluminio es un indicador de que la sensibilidad al elemento se ubica en el ápice radicular. (2) Los

mecanismos de tolerancia a aluminio, como la exudación de ácidos orgánicos para formar complejos con el elemento, están confinados principalmente al ápice radicular. (3) La formación de calosa como indicador de la sensibilidad a aluminio, se induce en primer lugar en las células apicales de la corteza externa de la raíz.

El aluminio no sólo afecta el tamaño de la raíz, también causa un profundo cambio en la arquitectura de la misma. La toxicidad temprana en las puntas de las raíces tiene como resultado un sistema radicular atrofiado con abundantes raíces laterales, cortas, gruesas y quebradizas. Estudios sobre la toxicidad del  $\text{Al}^{3+}$  en el ápice de la raíz del maíz revelaron que la zona de transición es la parte más sensible a este metal. Esta zona se encuentra entre la región de división celular activa y la de elongación celular. La interacción del aluminio con esta zona de la parte apical de la raíz, no sólo causa una rápida inhibición de la elongación celular sino que también inhibe la división celular en el meristemo apical en cuestión de minutos (Poschenrieder *et al.*, 2008).

### **III.2 Estrés Oxidativo y Sistema Antioxidante**

Los metales son una fuente potencial de estrés oxidativo porque generan la producción de especies reactivas de  $\text{O}_2$  (ROS por sus siglas en inglés; Reactive Oxygen Species) y radicales hidroxilo que causan inactivación de enzimas, peroxidación de lípidos (Fig. 3) y degradación de proteínas (González *et al.*, 2008). El incremento de la peroxidación y/o la alteración de los lípidos de la membrana tiene como consecuencia, una notoria modificación en la permeabilidad de la misma, el incremento del transporte de iones y también la actividad de un gran número de enzimas asociadas a las funciones de la membrana, especialmente la  $\text{H}^+$ -ATPasa (Casierra, 2001). Así mismo, uno de los primeros efectos de los iones de Al en la estructura de la membrana es la alta peroxidación de lípidos (Fig. 3) por la producción elevada de ROS (Matsumoto, 2000).



**Fig. 3** Peroxidación lipídica. El proceso de lipoperoxidación puede ser dividido en tres pasos: Iniciación, propagación y terminación. Sólo se muestra el doble enlace que contiene un segmento de ácido graso. (Modificado de Vikram *et al.*, 2012).

El ión aluminio causa disfunción mitocondrial, inhibe la respiración celular, inhibe la síntesis del adenosín trifosfato (ATP) y favorece la producción de ROS. En células fotosintéticas, los cloroplastos son de los principales organelos en dónde se generan ROS por las alteraciones en el proceso de fotosíntesis; mientras que en células no fotosintéticas como las células de la raíz y en cultivos celulares no clorofílicos, se ha evidenciado que la cadena transportadora de electrones de la mitocondria es el principal sitio donde se generan las ROS. El incremento instantáneo y sostenido de ROS en la raíz, parece ser un factor determinante en el endurecimiento de la pared celular y la inhibición

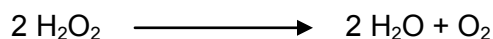
del crecimiento de la raíz por el aluminio (Carreño y Chaparro, 2013). Por esto se plantea una asociación entre el estrés oxidativo con la inhibición del crecimiento y cambios estructurales de la raíz. Esto ocurre en las raíces tratadas con aluminio, se observa un incremento en el anión radical de superóxido ( $O_2^-$ ), que es la mayor fuente de ROS, formada principalmente en la membrana plasmática por la acción de la NADPH oxidasa (Benavides *et al.*, 2009). Posteriormente ocurre un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y de lignina, por lo que se presenta un aumento en la rigidez de las paredes celulares. En la recuperación de las raíces es evidente la disminución de radicales  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , y en el contenido de lignina; observándose finalmente la elongación del cilindro central en raíces recuperadas (Carreño y Chaparro, 2013).

Pese a la importancia de las ROS como segundos mensajeros en diferentes vías de señalización de respuesta a factores de estrés, se sabe también, que el desbalance entre la producción de ROS y los mecanismos de detoxificación, favorecen la interacción de éstas con diferentes macromoléculas tales como el DNA, lípidos y proteínas causando daños que conllevan a la muerte celular (Carreño y Chaparro, 2013).

Debido a esto, las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes que contribuyen a la disminución del estrés oxidativo mediante la síntesis de enzimas tales como catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa (Tabaldi *et al.*, 2009), entre otras y otros mecanismos antioxidantes no enzimáticos como los tocoferoles, el ácido ascórbico, el glutatión (GSH), taninos, flavonoides, carotenoides y precursores de lignina (Matsumoto y Motoda, 2012; Peralta y Volke, 2012) que intervienen en la protección y, en consecuencia, en el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante (González *et al.*, 2008). Por ejemplo, las superóxido dismutasas (SODs) actúan como la primera línea de defensa contra las ROS, dismutando el superóxido a  $H_2O_2$ . La catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR) subsecuentemente eliminan al  $H_2O_2$ , estas dos últimas enzimas, entran en un sistema importante de detoxificación; el ciclo del ascorbato-glutatión el cual, juega un papel central en la integración de la señalización redox y se considera la principal ruta de eliminación del  $H_2O_2$  producido a partir del  $O_2^-$  (ión óxido) a través de una serie de reacciones redox, que incluyen la oxidación de glutatión (GSH) y del ascorbato (ASC) por  $H_2O_2$  (Peralta y Volke, 2012).

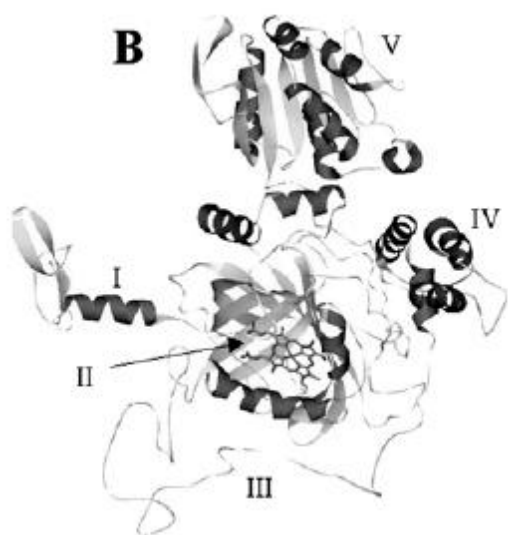
La función química de los antioxidantes es ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar a los componentes celulares. Los productos finales de esta reacción de disipación energética antioxidante-oxidante son comúnmente el O<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O, acompañados de liberación de calor (Benavides *et al.*, 2009). El balance de la actividad de las tres enzimas: SOD, APX y CAT es crucial para determinar la concentración relativa estacionaria de radicales superóxido y de peróxido de hidrógeno, lo cual, a su vez, controla la producción de radicales hidroxilo. Tal parece que las diferencias en la afinidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las enzimas APX (afinidad en concentración de μM) y CAT (afinidad en concentración de mM), son resultado de que las diferentes enzimas pertenecen a dos clases de sistemas de eliminación de ROS: uno de control fino y otro de eliminación de exceso en condiciones de estrés (Benavides *et al.*, 2009).

Dentro de las enzimas antioxidantes más importantes, se encuentra la catalasa (CAT), ésta es una enzima con grupo prostético hemo que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno:



La enzima se encuentra en todos los eucariotas aerobios y es importante en la remoción del peróxido de hidrógeno generado durante el ciclo del glioxilato en la fotorespiración, la β-oxidación de lípidos en los peroxisomas y el catabolismo de la purina. Las catalasas son tetrámeros de peso molecular mayor a 220, 000 KDa. Se han descrito varias formas de catalasa en las plantas. En el maíz se conocen tres isoformas denominadas CAT-1 (Fig. 4), CAT-2 y CAT-3 con expresión y regulación independientes. Las isoformas CAT-1 y CAT-2 se localizan en los peroxisomas y el citosol, mientras que CAT-3 es mitocondrial. La catalasa es muy sensible a la luz y presenta una alta tasa de recambio, al parecer esto es resultado de la absorción de radiación por el grupo hemo o bien por inactivación por peróxido de hidrógeno (Benavides, 2002).





**Fig. 4** El monómero de la catalasa-1 de *Neurospora crassa* (CAT-1). El dominio I corresponde al N-terminal, II es el barril  $\beta$  que contiene el hemo, III es el asa envolvente, IV es el dominio de hélices y V es el C-terminal con topología semejante a la flavodoxina. (Tomado de Díaz, 2003).

En plántulas de pepino se ha observado que la actividad de la catalasa aumenta en los brotes en un 18 y 20% si estas son expuestas a concentraciones de 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  en el sustrato por 10 días (Pereira *et al.*, 2010). Igualmente se observó que la actividad de CAT aumenta en las raíces de plántulas de clones de papa (tolerantes a Al) a las 72 y 168 h de exposición a 100 y 200  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Tabaldi *et al.*, 2009), este comportamiento es similar en las plantas de avena, donde, la actividad de esta misma enzima aumenta desde las 12 h de exposición a 370  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  en las raíces de genotipos de avena tolerantes a aluminio (Pereira *et al.*, 2013). Así mismo, se ha documentado que variedades de arroz resistentes a aluminio presentan incremento en la expresión de enzimas detoxificadoras como SOD y POD a diferencia de las no tolerantes. De igual forma, la diferencia en tolerancia entre líneas de maíz ha sido asociada significativamente con la producción y el aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD y POD (Carreño y Chaparro, 2013).

### III.3 Estrés y Tolerancia al Aluminio

La presencia de aluminio en el suelo constituye un factor causante de estrés para la planta, dado que altera muchos de sus procesos metabólicos, lo cual provoca una reducción del crecimiento y por lo tanto una disminución en el rendimiento de los cultivos (Casierra, 2001). Cuando una planta está sometida a unas condiciones significativamente diferentes de las óptimas para su desarrollo se dice que está sometida a estrés, si bien las diferentes especies o variedades difieren en sus requerimientos óptimos y por tanto en su susceptibilidad a un determinado factor de estrés. Además, hay períodos o etapas del desarrollo, como el estadio de plántula, donde las especies pueden ser particularmente sensibles a un factor de estrés determinado. El conocimiento de los mecanismos de resistencia al estrés puede ser aplicado para mejorar las características de las plantas tanto en su fase de cultivo como en la selección de variedades que se ajusten a requerimientos ambientales determinados o, simplemente, en mejorar la productividad de una especie (Valladares *et al.*, 2004).

La tolerancia a elementos potencialmente tóxicos (metales esenciales y no esenciales) en los organismos vegetales puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies de plantas la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos potencialmente tóxicos (González y Zapata, 2008). Schat *et al.* (2000) clasificaron a la tolerancia en dos tipos de acuerdo con el conjunto de mecanismos moleculares o bioquímicos que la conforman: (1) co-tolerancia, la cual puede ser el resultado de un mecanismo específico que confiere una tolerancia a diversos metales; y (2) tolerancia múltiple, en la que la tolerancia es generada por una serie de mecanismos independientes para cada metal o metales que interactúan de manera conjunta para evitar el daño a la planta. De estos dos conceptos, las evidencias sugieren que la tolerancia múltiple es el tipo que se presenta en la mayoría de las plantas.

La presencia de tolerancia múltiple ha permitido que las plantas desarrollen tres estrategias básicas para establecerse en suelos con niveles tóxicos de metales: (1) exclusión: esta estrategia consiste en una limitada acumulación de metales en las partes aéreas de las plantas e involucra una acumulación preferente en el sistema radical; (2)

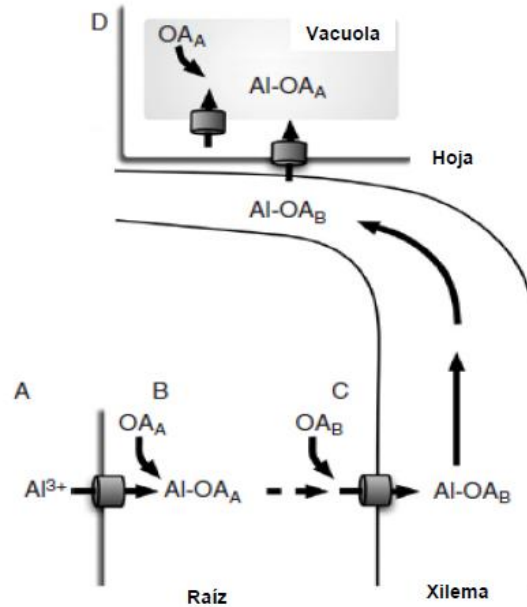
indicadoras: esta estrategia se caracteriza porque las plantas acumulan metales en sus tejidos que generalmente reflejan los niveles de metales presentes en el suelo; y (3) hiperacumulación: esta estrategia se caracteriza por la capacidad de la planta de bioacumular altas concentraciones de metales en sus tejidos, principalmente en las partes aéreas (González y Zapata, 2008).

Considerando el criterio de la presencia de tolerancia múltiple en las plantas, Hall (2002) divide los posibles mecanismos de tolerancia en las siguientes formas: (1) mecanismos externos de tolerancia: hongos micorrizógenos; y (2) mecanismos internos de tolerancia, los cuales involucran: (a) enlace a la pared celular y exudados radicales, (b) quelación de los metales por diversos ligandos en el citosol (fitoquelatinas, metalotioneinas y aminoácidos), (c) presencia de proteínas de estrés térmico, y (d) acumulación en la vacuola (González y Zapata, 2008).

Dentro de las barreras físicas que evitan la entrada del aluminio en las plantas se destaca la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática frente al flujo de aluminio, la formación de una barrera de pH en la rizósfera o en el apoplasto de la raíz, e inmovilización del aluminio en la pared celular gracias a la producción de calosa (Carreño y Chaparro, 2009). Como ejemplo de plantas que aumentan el pH de la solución del suelo y con ello precipitan el aluminio están: *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* y un híbrido de *Zea mays* (Salas, 1996).

Por otra parte, la secreción de ácidos orgánicos en plantas expuestas a  $Al^{3+}$  se considera un mecanismo de vital importancia para desarrollar tolerancia a este metal (Dai *et al.*, 2014). La naturaleza de los ácidos orgánicos presentes en la rizósfera, difiere con el tipo de planta expuesta a aluminio; en *Phleum pratense* normalmente se encuentra ácido oxálico, fórmico, acético y láctico, pero no se ha detectado ácido málico ni cítrico, muy comunes en la rizósfera de otras plantas como: *T. aestivum*, *Phaseolus vulgaris*, *Z. mays*, *Lupinus* sp. entre otras (Peñaloza *et al.*, 2004). Tanto el citrato como el malato tienen un papel muy importante en la tolerancia al aluminio; por tanto, la activación de genes, que decodifican el transporte de estos ácidos, es vital en la exudación inducida por este metal (Casierra y Niño, 2007).

Conjuntamente, la detoxificación interna del aluminio sucede cuando éste ya ha penetrado al simplasto de las células, entonces es quelado por aniones de carboxilatos que son secuestrados en la vacuola (Fig. 5). La capacidad de detoxificación difiere en relación con el tipo de ácido orgánico de acuerdo a la estabilidad del complejo que forma con el aluminio; siendo los más comunes citrato, malato y oxalato (Kochian, 1995).



**Fig.5** Mecanismos internos de detoxificación. El aluminio penetra en forma iónica a través de un transportador que aún no se identifica A) y a continuación es quelado con aniones orgánicos (OA) incluyendo al ión oxalato y algunos compuestos fenólicos B). El intercambio de ligandos de Al-OA a Al-citrato ocurre cuando el Al es liberado al xilema, posteriormente el Al-citrato es translocado a los brotes u hojas C). Por último, el aluminio quelado es secuestrado en las vacuolas. (Modificado de Ma, 2007).

Las plantas tolerantes se pueden agrupar de acuerdo al lugar donde acumulan el aluminio. Un primer grupo, aparentemente presenta un fenómeno de exclusión que consiste en la polimerización o precipitación del aluminio en la superficie radical, como el caso de algunas variedades de *T. aestivum*, *H. vulgare* y *Glycine max*. Un segundo grupo presenta altas concentraciones de aluminio en los espacios intercelulares de la raíz, como en el caso de *Rhododendron simsii*, *O. sativa*, *Medicago sativa*, *T. aestivum* y *Solanum*

*tuberosum*. En el tercer grupo, la tolerancia es interna y está dada por la acumulación de Al en la parte aérea como se produce en *Camellia sinensis*, *Melastoma malabathricum*, *Vochysia guatemalensis*, *V. ferruginea* y *Richeria grandis* (Pérez *et al.*, 1993; Toneatti, 2006). En este grupo de plantas, el aluminio es fijado en la pared celular de las células de la epidermis y en las del mesófilo y con ello previenen que el Al<sup>3+</sup> alcance sitios metabólicos dentro de la célula (Salas, 1996).

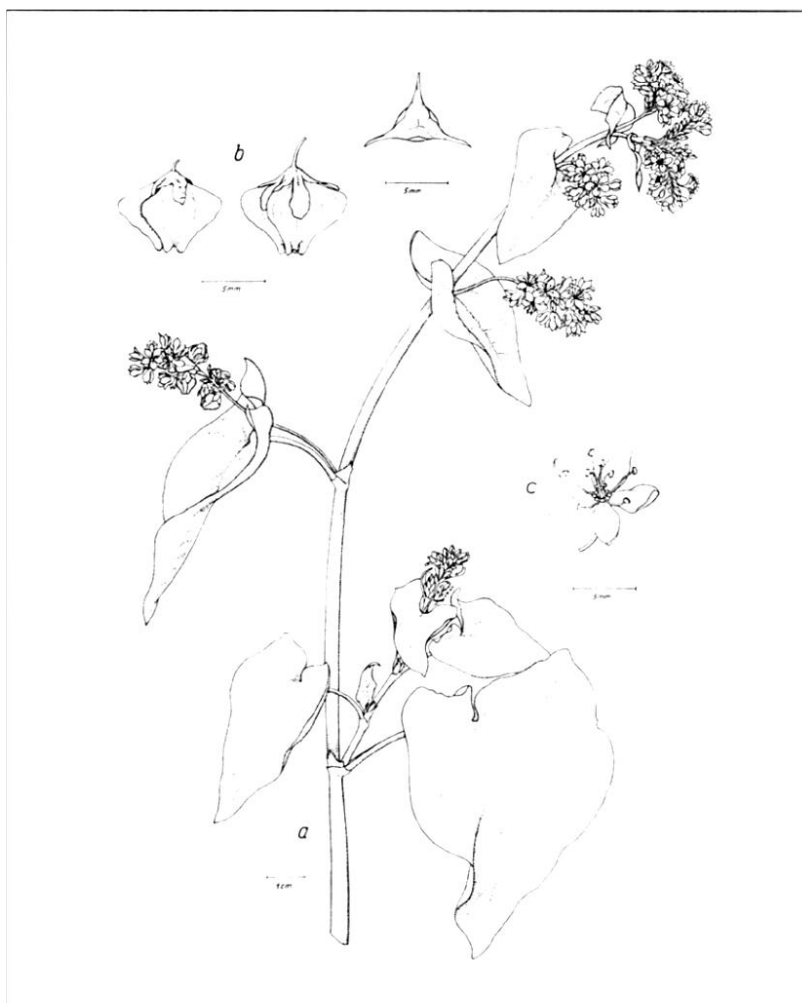
#### **III.4 *Fagopyrum esculentum* Moench.**

*Fagopyrum esculentum* pertenece a la familia Polygonaceae, es una herbácea anual, alcanza hasta un metro de altura, es ramificada y glabra. Tiene hojas pecioladas de forma ovado- triangular a triangular, miden de 2-8 cm de largo, con puntas acuminadas y bases cordadas, las hojas superiores son más pequeñas y sésiles. Tiene inflorescencias terminales en corimbos densos o cimas paniculadas. Las flores son de color blanco o rosado, con 6 mm de diámetro, el pedicelo es articulado de 2-3 mm de largo, con un perianto de 3 mm de largo, 8 nectarios de color amarillo, alternando con los estambres y presentan un estigma capitado. El fruto es un aquenio, de ángulo agudo, de una longitud superior a 5 mm, de color marrón o negro-marrón brillante, algunos de ellos son alados (Fig. 6) (Campbell, 1997).

Se conoce comúnmente como trigo sarraceno o alforfón, es originario de Asia y ha sido utilizado como un cultivo de importancia secundaria en muchos países, sin embargo, es sembrado en casi todas las regiones donde se cultivan los cereales (Campbell, 1997). Su nombre en inglés “buckwheat” proviene de la palabra anglosajona *boc* (haya) y *whoet* (trigo) ya que la semilla se asemeja a una pequeña nuez de haya (Ratan y Kothiyal, 2011).

Esta planta tiene la capacidad de crecer en suelos pobres en nutrientes, por lo que probablemente se ha extendido su uso, aunado a que es un cultivo multipropósito, ya que los brotes y las hojas pequeñas se consumen como verdura, se extrae miel de excelente calidad y de las flores y las hojas se extrae la rutina (quercetin-3-O-rutinoside) para uso medicinal (Campbell, 1997). La rutina es el glucósido flavonoide más abundante en el

alforfón común, y en él se han encontrado propiedades como antioxidante, antihemorrágico y protector de vasos sanguíneos (Baumgertel *et al.*, 2010).

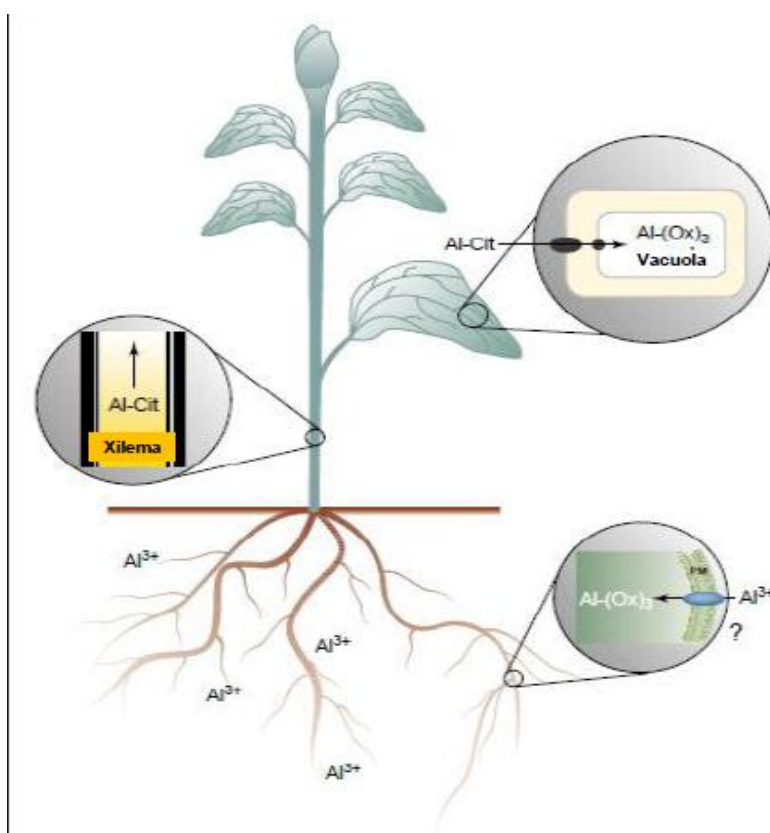


**Fig. 6** *Fagopyrum esculentum* Moench. a) Rama con inflorescencias, b) frutos y c) flores. (Tomado de Campbell, 1997).

El trigo sarraceno no es un cereal, sin embargo sus semillas se clasifican entre los granos de cereales debido a la similitud en el uso. El grano se utiliza generalmente para la ingesta humana y como alimento para los animales y aves de corral, con la harina obtenida de estas semillas se elaboran, galletas, fideos, panes, entre otros productos. La proteína contenida en el trigo sarraceno es de excelente calidad y tiene un alto contenido en lisina un aminoácido esencial, lo que lo diferencia de los cereales comunes (Campbell, 1997).

Así mismo, *F. esculentum* es una de las plantas que ha desarrollado estrategias para tolerar altas concentraciones de aluminio, se ha documentado en ésta planta la exudación de ácido oxálico de sus raíces como mecanismo de tolerancia al aluminio, además de su acumulación en las células de las hojas como un complejo no tóxico Al-oxalato (Ma *et al.*, 1997).

El Al entra en la raíz por un mecanismo desconocido probablemente como  $\text{Al}^{3+}$ , una vez que cruza la membrana plasmática, el  $\text{Al}^{3+}$  es quelado con oxalato para formar un complejo Al-oxalato en relación 1:3 de aluminio y ácido oxálico. Cuando el aluminio se traslada desde las raíces a los brotes, se produce en el xilema una reacción de intercambio de ligando para formar Al-citrato. Una vez transportado del xilema a las células de las hojas, se produce otro intercambio de ligandos para formar el complejo Al-oxalato, que luego se almacena en la vacuola. (Ma *et al.*, 2001) (Fig. 7).



**Fig. 7** Captación y distribución del Al en la planta acumuladora de aluminio; *Fagopyrum esculentum*. Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; PM, membrana plasmática. (Tomado de Ma *et al.*, 2001).

### III.5 Antecedentes

A continuación se mencionan algunos de los estudios que se han realizado con *F. esculentum* y su tolerancia al aluminio.

Watanabe (1998) aisló cuatro catequinas y el compuesto rutina a partir de extractos etanólicos de trigo sarraceno y monitoreó la actividad antioxidante de las mismas, así como la determinación de sus estructuras químicas con técnicas de resonancia magnética en dos dimensiones, bombardeo rápido de átomos y espectrometría de masas. Las estructuras se establecieron como: (-)-epicatequina, (+)-catequina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, (-)-epicatequina 3-O-p-hidroxibenzoato y (-)-epicatequina 3-O-(3,4-di-O-metil)galato, encontrando que la actividad antioxidante de las catequinas fue mayor que la de la rutina y que ambas se encuentran en altas concentraciones en esta planta.

En el mismo año (1998) Ma y colaboradores, estudiaron el mecanismo interno de desintoxicación por aluminio, mediante la purificación e identificación de complejos con este metal en hojas y raíces de *F. esculentum*, encontrando que alrededor del 90% del aluminio acumulado estaba dentro de la célula, y que el ácido orgánico en mayor concentración era el ácido oxálico. La purificación del complejo dentro de las células foliares se realizó por el método de cromatografía con tamiz molecular, lo que reveló el complejo Al-oxalato en relación (1:3). Así mismo se realizó una prueba de fitotoxicidad con plantas de maíz (*Zea mays*), donde se encontró que el purificado de la savia celular, no afectaba la elongación de las raíces, concluyendo que la tolerancia en las hojas y raíces del trigo sarraceno se obtiene por la formación del complejo Al-oxalato (1:3), el cual no presenta fitotoxicidad.

En 2000 Ma y Hiradate investigaron las formas de captación del aluminio por las raíces y el almacenamiento del mismo en las hojas de *F. esculentum* encontrando que la concentración de aluminio en el xilema era 15 veces más alta en las plantas expuestas a  $AlCl_3$  que en las expuestas al complejo Al-oxalato, sugiriendo que las raíces toman aluminio en su forma iónica. La concentración de aluminio en el xilema fue cuatro veces más alta después de 1 hora de exposición a una solución de  $AlCl_3$  y diez veces más alta después de dos horas. Los resultados sugieren que la absorción de aluminio se da por



medio de un proceso pasivo. La forma en la que se encontraba el aluminio dentro del xilema fue identificada mediante un análisis de resonancia magnética nuclear, mostrando que el ácido orgánico dominante en la savia era ácido cítrico, por lo que se concluye que la translocación del aluminio se da por medio del complejo Al-citrato. Debido a que en la raíz el aluminio se encuentra en el complejo Al-oxalato (1:3) se encontró que el cambio de ligandos; de oxalato a citrato, se da antes de que sea liberado el aluminio al xilema.

Shen y Ma (2001) investigaron los mecanismos de acumulación del aluminio en *F. esculentum* así como la distribución y movilidad del mismo en la planta, encontrando que con una exposición a largo plazo (28 d) se da una disminución en la concentración de las hojas maduras a las jóvenes, en contraste con una exposición a corto plazo (1 d) en donde la acumulación es uniforme en todas las hojas. Estos autores sugieren que la distribución del aluminio en las hojas depende de la tasa de transpiración y duración de la misma, y que después de una exposición al aluminio las hojas jóvenes presentan bajo contenido de éste metal a diferencia de las maduras en las que sigue aumentando la concentración. Lo que los autores concluyeron fue que el aluminio no es móvil una vez acumulado en las hojas.

En 2002 Shen y colaboradores investigaron la localización subcelular del aluminio en las hojas de *F. esculentum* aislando protoplastos y vacuolas, sus resultados mostraron que más del 80% de aluminio en las hojas se encontraba en los protoplastos, además, se identificó el complejo Al-oxalato (1:3) por resonancia magnética, revelando asimismo que se encontraba en las vacuolas, concluyendo así que la desintoxicación por aluminio en las hojas de trigo sarraceno depende de la formación de complejos con oxalato y del secuestro en las vacuolas.

Posteriormente, en 2004 Shen y colaboradores, investigaron el proceso que conduce a la acumulación de aluminio en las hojas, el experimento se llevo a cabo mediante resonancia magnética. Se observó que cuando la concentración de aluminio en las hojas era menor sólo se encontraba el complejo Al-oxalato en relación (1:3), mientras que cuando ésta aumentaba el Al también se encontraba en complejo Al-citrato en relación (1:1). En las hojas con mayores concentraciones, se encontraron en los márgenes las dos formas, Al-citrato y Al-oxalato, mientras que en la parte media de la hoja y en la basal sólo se encontraba el complejo Al-oxalato. Los autores sugieren que cuando existe una baja

concentración de Al, el complejo Al-citrato se transforma en Al-oxalato, y cuando se tiene una alta concentración de aluminio, no se puede dar esa conversión, dando lugar a la coexistencia de los dos complejos.

Por otro lado, Zheng y colaboradores (2005), investigaron la importancia de la exudación de ácido oxálico en dos variedades de trigo sarraceno (Jiangxi una variedad tolerante al aluminio y Shanxi sensible al aluminio) para tolerar altas concentraciones de aluminio mostrando diferencias significativas en la resistencia a éste metal. La variedad sensible presentó una mayor inhibición de la elongación de la raíz y la variedad más tolerante tuvo un menor contenido de aluminio en el ápice de la raíz, sin embargo, la secreción de ácido oxálico con respecto a la concentración externa de aluminio y el tiempo de exposición fue similar en ambas variedades. Estos resultados mostraron que las dos variedades presentan la misma capacidad de secreción de ácido oxálico, sin embargo, la concentración de P y de Al en las raíces de la variedad resistente fue más alta que en la sensible, mostrando que la mayor resistencia se debe a la inmovilización y desintoxicación de Al por P.

Shen y colaboradores en 2006 llevaron a cabo un experimento en invernadero para investigar la acumulación de aluminio en hojas y semillas de trigo sarraceno, las plantas se cultivaron por 12 días en un suelo con y sin CaCO<sub>3</sub>, encontrando que la concentración de aluminio en las hojas, semillas y cubiertas de las semillas de las plantas cultivadas en suelos ácidos sin CaCO<sub>3</sub> fue la siguiente: 4516, 41.2 y 7.7 mg Kg<sup>-1</sup> de peso seco respectivamente y en el suelo con CaCO<sub>3</sub> fue en promedio: 1586, 21.3 y 3.1 mg Kg<sup>-1</sup> de peso seco, demostrando con estos resultados que la acumulación de aluminio en las hojas disminuyó cuando las plantas fueron sembradas en un suelo con CaCO<sub>3</sub> al igual que en semillas, dónde se encontró la menor acumulación de este metal.

En 2006 Yang *et al.*, estudiaron el efecto de la cicloheximida (CHM) en la síntesis de ácidos orgánicos para la resistencia al aluminio en *F. esculentum* y *Cassia tora*, encontrando que la secreción de oxalato por el trigo sarraceno no se vio afectada por la CHM a ninguna concentración a diferencia de la secreción de citrato que fue completamente inhibida a una concentración de 30 µM de CHM en *C. tora*. Los autores concluyeron que para la secreción de citrato en *C. tora* es necesaria la activación y

síntesis de un canal de aniones, y que en el trigo sarraceno no es necesaria la síntesis de la proteína de la membrana plasmática responsable de la secreción de oxalato.

Así mismo, Samardzic y colaboradores (2010) estudiaron la expresión de la metalotioneína tipo 3 (FeMT3) en hojas de *F. esculentum* expuestas a tratamientos de estrés hídrico por retención de riego y estrés oxidativo mediante la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, encontrando, la localización de la transcripción de la proteína en los elementos vasculares, mesófilo y células guarda en hojas, tejido vascular de las raíces y en todo el embrión de *F. esculentum*, teniendo como resultado cambios en los niveles del mRNA de FeMT3 en respuesta a la sequía y al estrés oxidativo, indicando la posible participación de FeMT3 en la defensa al estrés y a las especies reactivas de oxígeno.

Reyna-Llorens (2010) evaluó la acumulación de aluminio en las raíces de *F. esculentum* por medio de la tinción con hematoxilina, además de realizar la determinación de los niveles endógenos de ABA (ácido abscísico) en relación a la concentración y el tiempo de exposición a este metal, encontrando, que el aluminio se concentra mayormente en el ápice radicular durante las primeras horas de exposición, y que los tratamientos con 50 y 100 µM de AlCl<sub>3</sub> presentan mayor intensidad y un aumento significativo en los niveles endógenos de ABA.

Klug *et al.*, en 2011 investigaron la captación y el transporte de aluminio en las puntas de las raíces de *F. esculentum*, para esto se utilizaron colorantes fluorescentes (morin) y LA-ICP-MS (Ablación por láser acoplada a la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo). La tinción de Al con morin resultó útil para analizar cualitativamente la distribución del metal en complejo con oxalato o citrato a lo largo de las puntas de las raíces, mostrando resultados comparables al análisis con LA-ICP-MS. Las secciones transversales a lo largo de la punta de la raíz, mostraron que el aluminio es muy móvil en dirección radial y que en el ápice es acumulado en el córtex. Los resultados revelan que la zona apical (los primeros 10 mm de la punta) es el sitio principal de absorción de aluminio en el simplasto del córtex y que la zona subapical (10-20 mm) es el sitio principal de transporte hacia el xilema.

Martínez-Rendón (2013) evaluó los efectos de diferentes concentraciones de 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 aluminio y otros nutrientes minerales en toda la planta, así como la posible asociación del Al en cristales

de oxalato dentro del tejido foliar. Los resultados mostraron un crecimiento y tasa fotosintética similar entre los tratamientos con  $AlCl_3$ , lo que sugiere la existencia de un mecanismo de tolerancia que evita la entrada del metal a órganos aéreos, así mismo la asimilación y asignación de nutrientes minerales en raíces, tallos y hojas no se vieron modificadas significativamente por la presencia del Al, al igual que los niveles endógenos de ABA.

#### **IV. Justificación**

Aunado a la superficie de suelos ácidos de origen natural, el uso cada vez más frecuente de fertilizantes nitrogenados y las altas tasas de extracción de nutrimentos, producto del aumento en la intensidad de uso de suelos, han acelerado el proceso natural de acidificación lo que provoca una mayor área de suelos infértiles y con problemas de toxicidad debido a la alta disponibilidad del aluminio, disminuyendo el crecimiento de las plantas y por lo tanto la producción agrícola. Este problema de acidificación del suelo hace necesario profundizar en el estudio de los mecanismos de tolerancia en plantas como *Fagopyrum esculentum*, una planta en la que se ha reportado tolerancia al aluminio y en la que se desconoce el papel de la respuesta antioxidante, la acumulación de ROS, así como la penetración y acumulación del Al en la etapa inicial de su desarrollo ante este tipo de estrés. Aunado a esto, la capacidad de esta planta para ser cultivada en suelos infértiles y su frecuente uso como cultivo alternativo, hacen de estos estudios relevantes para programas de restauración, o bien, para proponer cultivos alternos en zonas o suelos con problemas de acidez o toxicidad por aluminio.

#### **V. Hipótesis**

Si *Fagopyrum esculentum* es una planta tolerante al aluminio, incrementará sus mecanismos de tolerancia en las primeras etapas de desarrollo para controlar la entrada y

acumulación de Al, la producción de ROS y así permitir un desarrollo normal de las raíces y por consiguiente del crecimiento de la planta.

## **VI. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la respuesta de *Fagopyrum esculentum* Moench. ante diferentes concentraciones de aluminio en la etapa inicial de su desarrollo.

### **Objetivos particulares**

- Determinar el efecto en la longitud y en la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) de *F. esculentum* durante las primeras 96 h ante diferentes concentraciones de aluminio.
- Determinar la localización de aluminio en las puntas de las raíces de *F. esculentum* durante las primeras 96 h.
- Realizar la determinación del peróxido de hidrógeno en las puntas de las raíces de *F. esculentum* durante las primeras 96 h de exposición en un medio con diferentes concentraciones de aluminio.
- Medir la actividad enzimática de la Catalasa (CAT) en las puntas de las raíces de *F. esculentum* durante 48 y 72 h de exposición en un medio con diferentes concentraciones de aluminio.

## VII. Materiales y Métodos

Las semillas de *F. esculentum* Moench. var. *mancan* se obtuvieron de Wildlife Management Solutions, Inc. Eutaw, Alberta, Canadá.

Para la obtención de las plántulas para cada bioensayo se germinaron las semillas en cajas Petri con un medio de agar/agua (1%) durante 48 h en total oscuridad en una cámara de germinación Biotronette (Lab-line) con una temperatura de 27 °C.

### VII.1 Determinación de la tasa de crecimiento radicular relativo y biomasa de *F. esculentum* durante 96 h de tratamiento después de la germinación.

Después de obtener las plántulas, éstas se colocaron durante dos horas en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM pH 4.5 para su adaptación a un medio ácido. Posteriormente, se colocaron en tubos de 50 mL con solución de CaCl<sub>2</sub> y las diferentes concentraciones de AlCl<sub>3</sub> (Sigma) (25, 50, 100 y 500 µM) a excepción del control el cual no contenía AlCl<sub>3</sub>, cada tratamiento contó con 12 repeticiones. Antes de colocar las plántulas en los tubos se midió el largo de las raíces en mm (tiempo inicial), la medición se repitió a las 24, 48, 72 y 96 h, durante este período se mantuvieron en una cámara de germinación Biotronette a 27 °C, con un fotoperíodo de 12/12 h.

El incremento en la elongación radicular (expresado como Ec para el control y Et para los tratamientos) se registró a las 0, 24, 48, 72 y 96 h. A partir de los datos obtenidos se calculó la tasa relativa de crecimiento radicular (RRG) con respecto al control (sin AlCl<sub>3</sub>) con la siguiente fórmula:

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

En dónde  $\Delta Et_{tn} = Et_{tn} - Et_{tn-1}$  y  $\Delta Ec_{tn} = Ec_{tn} - Ec_{tn-1}$  (siendo  $Ec$  y  $Et$  el incremento en la elongación radicular para el control y el tratamiento respectivamente y  $t_{tn}$  un tiempo determinado) (Chandran *et al.*, 2008).

A las 96 h de iniciados los tratamientos, se cosecharon todas las raíces de las plántulas de cada uno de los tratamientos, se pesaron en un balanza analítica y se mantuvieron en una estufa Hybaid a 40 °C durante 10 días, pasado ese tiempo las raíces se pesaron nuevamente para determinar el peso seco de cada tratamiento.

## **VII.2 Determinación de la penetración de aluminio en las puntas de las raíces de *F. esculentum*.**

Las plántulas se obtuvieron siguiendo la misma metodología de germinación y crecimiento descrita anteriormente. Cada tratamiento contó con 16 repeticiones, después de 24 horas se eligieron 4 plántulas de cada tratamiento y se tiñeron con una solución de hematoxilina (MCB) 0.1% p/v disuelta en  $KIO_3$  0.01% p/v durante 30 min. para posteriormente ser lavadas en agua destilada por 30 min (Mukhopadyay *et al.*, 2012), este proceso se repitió a las 48, 72 y 96 horas, durante este período las plántulas permanecieron en una cámara de germinación Biotronette a 27 °C, con un fotoperíodo de 12/12 h.

Todas las raíces de cada uno de los tiempos se observaron en un Estereomicroscopio Discovery V8 marca ZEISS. De cada tiempo y tratamiento se tomaron 3 raíces y en los resultados se muestra la fotografía representativa.

## **VII.3 Visualización del peróxido de hidrógeno en las raíces de *F. esculentum* durante 96 h de exposición**

Después de la obtención de las plántulas, éstas se colocaron durante dos horas en una solución de  $CaCl_2$  0.5 mM pH 4.5 para su adaptación a un medio ácido. Posteriormente se

colocaron en una solución de  $\text{CaCl}_2$  y las diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$  (25, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ) a excepción del control el cual no contenía  $\text{AlCl}_3$ , cada tratamiento contó con 20 repeticiones después de 24 horas se seleccionaron 5 plántulas de cada tratamiento, se cortaron las puntas de las raíces ( $\approx 2$  cm) y éstas se tiñeron con una solución de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (diacetato de 2', 7' diclorofluoresceína) 25  $\mu\text{M}$  disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) durante 15-20 min para finalmente ser observadas en un microscopio Confocal Olympus FV1000, excitando un 30% con el láser de 488 nm y con un pico de emisión en 525 nm (Realizado en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Química, UNAM). Este proceso se repitió a las 48, 72 y 96 h, durante este período las plántulas se mantuvieron con aireación continua en una cámara de ambiente controlado (CONVIRON PGR15, Canadá) con un fotoperiodo de 12/12 h, 25/20 °C (día/noche), intensidad luminosa de 200-250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico de aproximadamente 390 ppm.

#### **VII.4 Cuantificación de la actividad enzimática de la Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)**

Después de la obtención de las plántulas estas se colocaron en una solución de  $\text{CaCl}_2$  con las diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$  (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) a excepción del testigo el cual no contenía aluminio, todas las soluciones fueron llevadas a pH 4.5. El tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  no fue incluido debido a que la concentración de proteína extraída era insuficiente para realizar las mediciones de actividad enzimática, confirmando el daño observado en los experimentos anteriores.

Las plántulas se mantuvieron con aireación continua en una cámara de ambiente controlado (CONVIRON PGR15, Canadá) con un fotoperiodo de 12/12 h, 25/20 °C (día/noche), intensidad luminosa de 200-250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una concentración de  $\text{CO}_2$  atmosférico de aproximadamente 390 ppm. Después de 48 y 72 h de exposición a los diferentes tratamientos, las raíces fueron cosechadas ( $\approx 2$  cm), congeladas y molidas en nitrógeno líquido y guardadas en un ultracongelador (REVCO) a -70 °C para posteriormente medir la actividad enzimática.



### Extracción de proteína total y medición de la actividad de la Catalasa

Se colocaron 0.05 g de raíces de cada tratamiento (previamente molido en nitrógeno líquido) en un tubo eppendorf y se le añadieron 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 (con 1 mM de EDTA y 0.1% de polivinilpirrolidona (PVP)). El tejido se molió con un homogenizador de tejido (Tissue Master 125 homogenizer Omni International) por 30 s, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf limpio. Con la finalidad de concentrar más la proteína se realizó una segunda extracción añadiendo 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 al botón, se repitió el mismo proceso de homogenización y centrifugación para finalmente juntar los dos sobrenadantes. La proteína se cuantificó por el método de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50).

Para medir la reacción se añadieron 800 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, 100 µL de extracto proteico y 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM (preparado en fresco) en una cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. La lectura de reacción se tomó cada 30 segundos hasta completar 3 minutos (Hernández-Pérez, 2014).

La actividad de la catalasa se determinó mediante la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 25 °C, medida por la disminución de la absorbancia a 240 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno  $\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Castillos *et al.*, 2011).

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = m (\text{abs/min}) * \text{Vol. Reacción (mL)} / \epsilon (\text{L/mmol*cm}) * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}$$

Dónde:

m= pendiente

$\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno)

(Hernández-Pérez, 2014).

## VII.5 Análisis estadístico

Los resultados del crecimiento y el peso seco de las raíces se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y una prueba de comparación de medias de Tukey HSD ( $p < 0.05$ ) con el software Statistica versión 7.0. Los resultados de la actividad enzimática de la catalasa fueron analizados por medio de la prueba no paramétrica de Wilcoxon ( $p < 0.05$ ) con el software JMP 10.

## VIII. Resultados

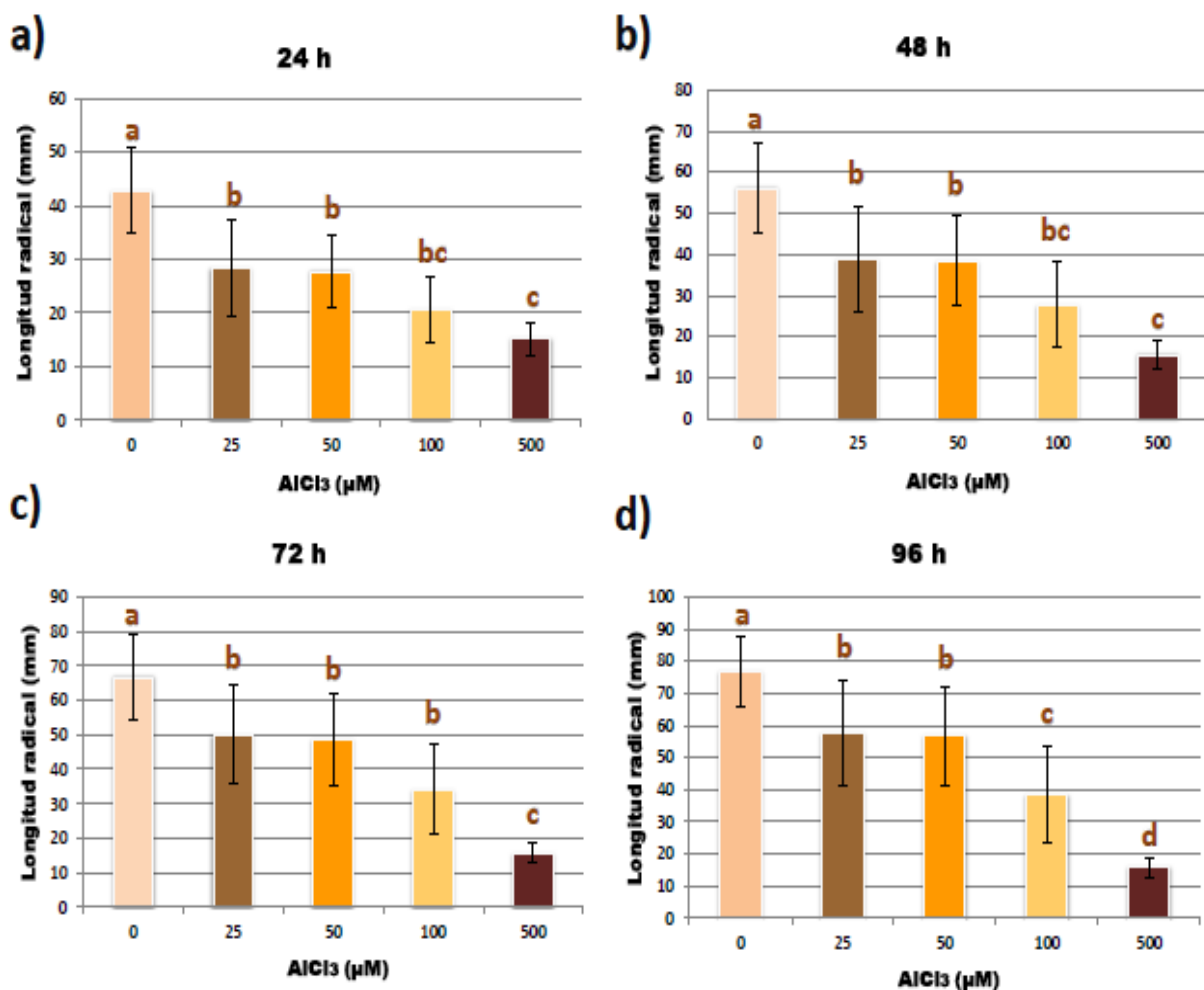
### VIII.1 Crecimiento, longitud radicular y tasa de crecimiento radicular relativo (RRG)

Desde las primeras 24 h de exposición al aluminio se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la longitud radicular del control y los tratamientos. Las longitudes de las raíces expuestas a los tratamientos con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  mostraron medias y porcentajes de inhibición similares (34, 35 y 52% respectivamente) (Fig. 8a).

A las 48 h se presentó el mismo comportamiento, se encontraron diferencias significativas entre las longitudes de las raíces expuestas a los mismos tratamientos, el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radicular (72%) se presentó con el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Fig. 8b).

Posteriormente a las 72 h de exposición al metal se observó el mismo comportamiento, las longitudes de las raíces del control fueron estadísticamente distintas a las de los tratamientos con aluminio. Las raíces de los tratamientos con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  mostraron medias y porcentajes de inhibición similares (25, 27 y 49% respectivamente), sin embargo, estos son menores en comparación a los porcentajes encontrados a las 24 h de exposición (Fig. 8a). A las 72 h ya existen diferencias significativas entre el tamaño de las raíces con el tratamiento de 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Fig. 8c).

Finalmente a las 96 h también se observó una reducción en el crecimiento de las raíces principales en los distintos tratamientos con  $\text{AlCl}_3$ . Se presentaron diferencias significativas entre las longitudes de las raíces de todos los tratamientos a excepción de las raíces expuestas a 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , las cuales presentaron medias y porcentajes de inhibición similares (24 y 26% respectivamente) (Fig. 8d).



**Fig. 8** Longitud radical (mm) de las raíces expuestas a los diferentes tratamientos a las a) 24 h, b) 48h, c) 72 h y d) 96 h. Las distintas letras representan las diferencias significativas que se encontraron mediante la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.05$ ). Promedio de  $n= 12$ . Las barras representan la desviación estándar.

El crecimiento radicular relativo (RRG) a diferencia de los valores de la longitud total de la raíz, muestra el incremento longitudinal en 24 h sin tomar en cuenta el tamaño inicial de las raíces, por lo que es útil para observar la recuperación del crecimiento en las mismas. En las raíces de *F. esculentum* tratadas con Al se obtuvieron los siguientes resultados:

A las 24 h de tratamiento, se observó un RRG cercano al 50% para las plántulas expuestas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (55 y 54% respectivamente) y un porcentaje menor en

las plantas expuestas a las concentraciones más altas (33 y 16% para 100  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  respectivamente), a las 48 h de tratamiento aumentó el crecimiento relativo de la raíz de las plántulas en todos los tratamientos exceptuando el grupo con la concentración más alta (500  $\mu\text{M}$ ), en dónde se obtuvo un RRG de 3%.

A las 72 h se pudo apreciar que las plantas tratadas con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  tuvieron un desarrollo radicular semejante a las del control con un RRG de 107 y 96% respectivamente, el crecimiento relativo de las raíces de las plantas tratadas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  también aumentó (60%), pero sin llegar a aproximarse al RRG del control, y el único porcentaje que tuvo una disminución fue el de las plántulas expuestas a 500  $\mu\text{M}$  (2%).

A las 96 h todas las plántulas expuestas a los tratamientos con  $\text{AlCl}_3$  presentaron un descenso en el porcentaje del RRG, siendo más evidente en el grupo con 500  $\mu\text{M}$ , en el cuál disminuyó hasta cero, las plántulas tratadas con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  tienen un RRG similar, de 78 y 84% respectivamente (Fig. 9).

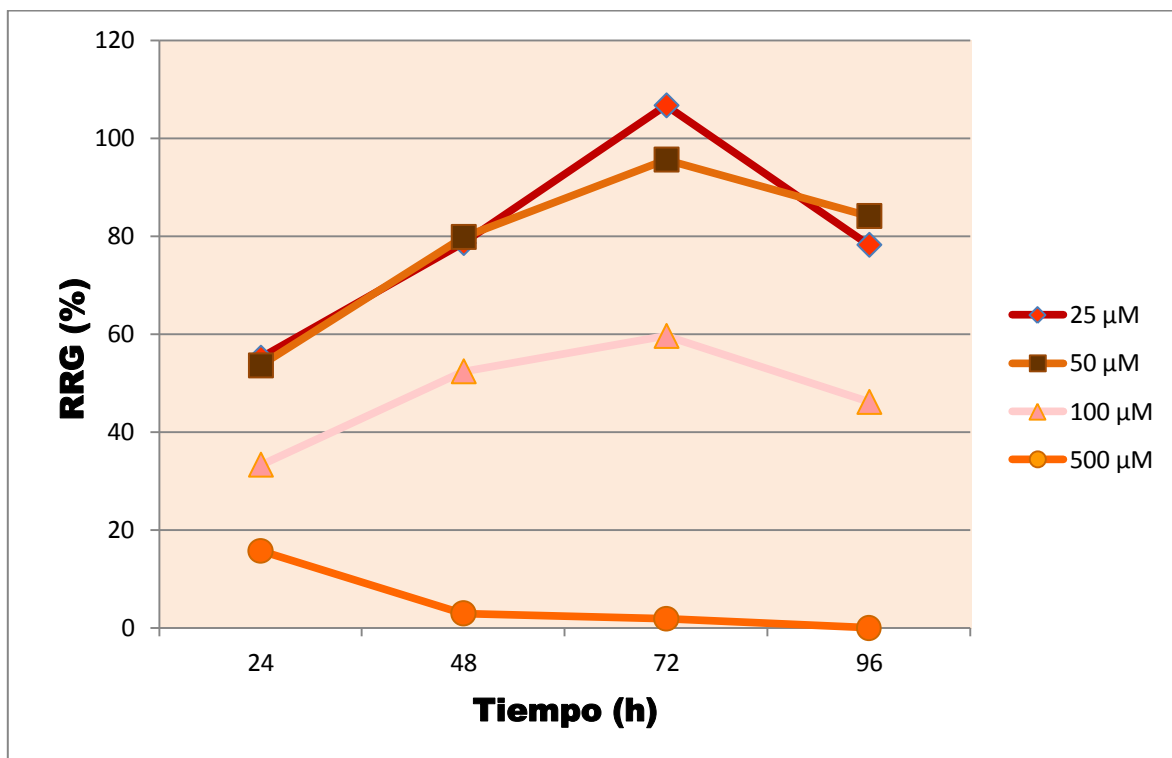
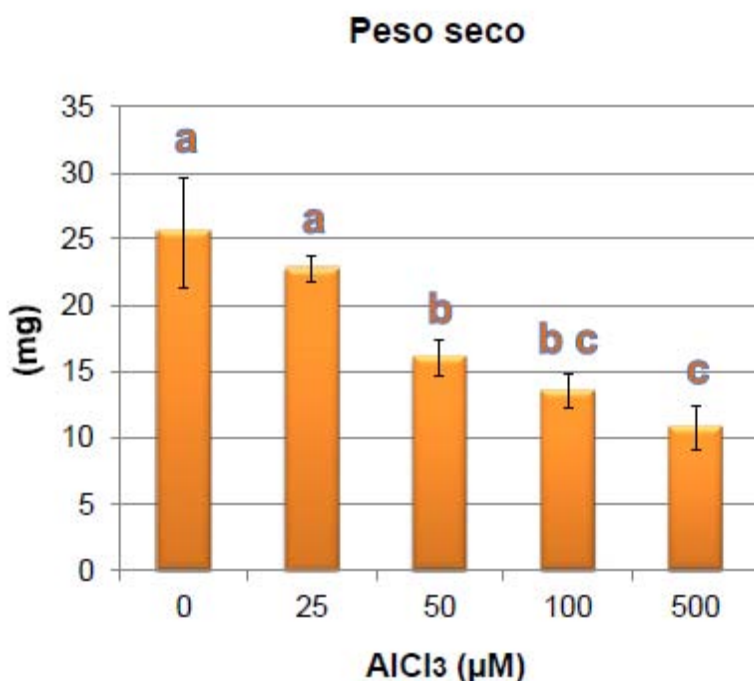


Fig. 9 Crecimiento relativo de las raíces de *F. esculentum* en las primeras 96 h (n=12).

A las 96 h de exposición se determinó el peso seco (mg) de las raíces, en el cual se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos con las diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$ , teniendo el peso del control (25.5 mg) una media similar al de las raíces con el tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  (22.75 mg), el cual sólo presentó una disminución de biomasa de 11%.

El peso seco de las raíces expuestas a 50  $\mu\text{M}$  (16.0 mg) tuvo una media similar al peso del grupo con 100  $\mu\text{M}$  (13.5 mg) y este mismo una media similar al peso de las raíces tratadas con 500  $\mu\text{M}$  (10.7 mg), en el cual se observó una disminución de biomasa de 58% (Fig. 10).

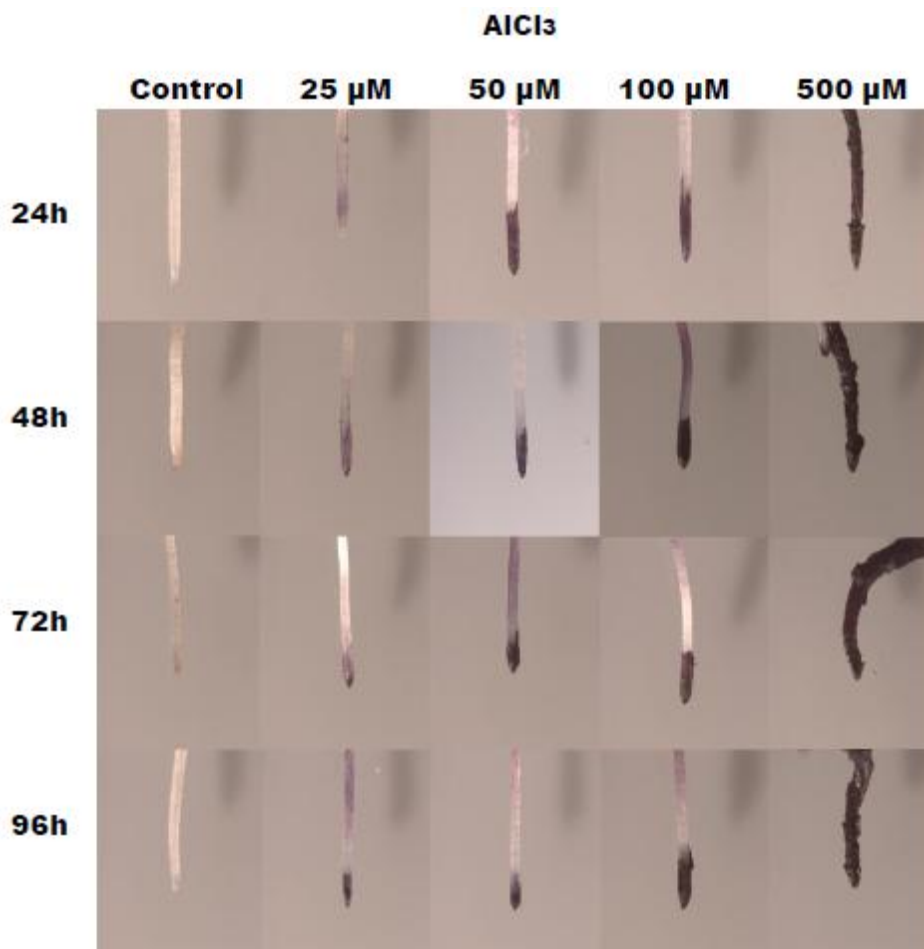


**Fig. 10** Peso seco o biomasa (mg) de las raíces de *F. esculentum* a las 96 h de exposición a los distintos tratamientos con  $\text{AlCl}_3$ . Las diferencias significativas se encontraron mediante la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.05$ ). Promedio de  $n = 48$  de cuatro experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

## VIII.2 Penetración y acumulación de Al

Para observar la penetración de aluminio a las raíces se utilizó la tinción con hematoxilina, éste colorante tiene la propiedad de tornarse azul-violeta cuando forma un complejo específico con el ión  $\text{Al}^{3+}$ , facilitando este mismo, la penetración y retención del colorante en la raíz. La intensidad del color en los ápices radicales teñidos es una medida cuantitativa de la sensibilidad al aluminio (Álvarez *et al.*, 2013).

Las puntas de las raíces de *F. esculentum* tratadas con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  mostraron una tinción similar con la hematoxilina a través de las 96 h de exposición. La coloración más intensa se aprecia en el ápice, siendo muy tenue la tinción en la zona de elongación de las raíces para estos tres tratamientos. El control no presenta la característica coloración azul-violeta evidenciando la ausencia de aluminio, y las raíces tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  presentaron desde las 24 h de exposición al metal, una coloración intensa y uniforme que cubrió toda la raíz y que permaneció hasta las 96 h de tratamiento. Los resultados mostrados son representativos de cinco repeticiones y de dos experimentos independientes (Fig. 11).



**Fig. 11** Tinción con hematoxilina de las raíces (1 cm) en los diferentes tratamientos durante las primeras 96 h. Las imágenes fueron tomadas a 1.5X y son representativas de cinco repeticiones de dos experimentos independientes.

### VIII.3 Localización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las puntas de las raíces

Con el fin de detectar la formación de ROS, se realizó una tinción con H<sub>2</sub>DCFDA. Esta tinción fluorescente, detecta diversos peróxidos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Darkó *et al.*, 2004) ya que el colorante 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), penetra libremente dentro de las células y una vez dentro se hidroliza a 2', 7'-diclorofluoresceín (DCF), este compuesto es capaz de interactuar con los peróxidos que lo oxidan convirtiéndolo a su forma fluorescente el 2', 7'-diclorofluoresceína, que puede ser detectado fácilmente usando un



microscopio de fluorescencia (Behl *et al.*, 1994). Con esta tinción se pudo observar desde las primeras 24h de exposición que sólo existe una mayor producción de ROS en las raíces tratadas con 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , siendo más visible con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , lo que evidencia un bajo contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las raíces expuestas a los diferentes tratamientos con  $\text{AlCl}_3$ . Así mismo, se pudo observar que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se ve incrementada a lo largo del tiempo de exposición en los diferentes tratamientos con aluminio, comportamiento que se repite tanto en las puntas como en la zona de elongación de las raíces (Fig. 13 y 14). En las imágenes mostradas se restó la fluorescencia del control para poder observar sólo la producida por la exposición a los diferentes tratamientos (Fig. 12).

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran las imágenes de las raíces con la fluorescencia emitida.

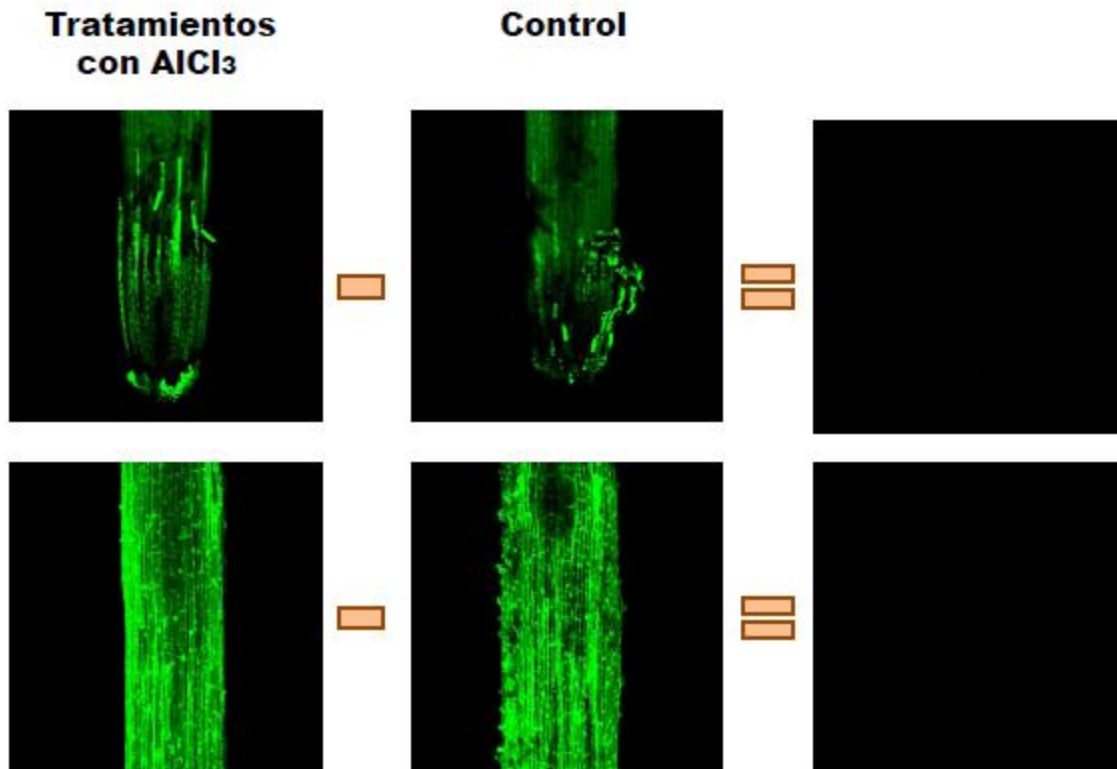
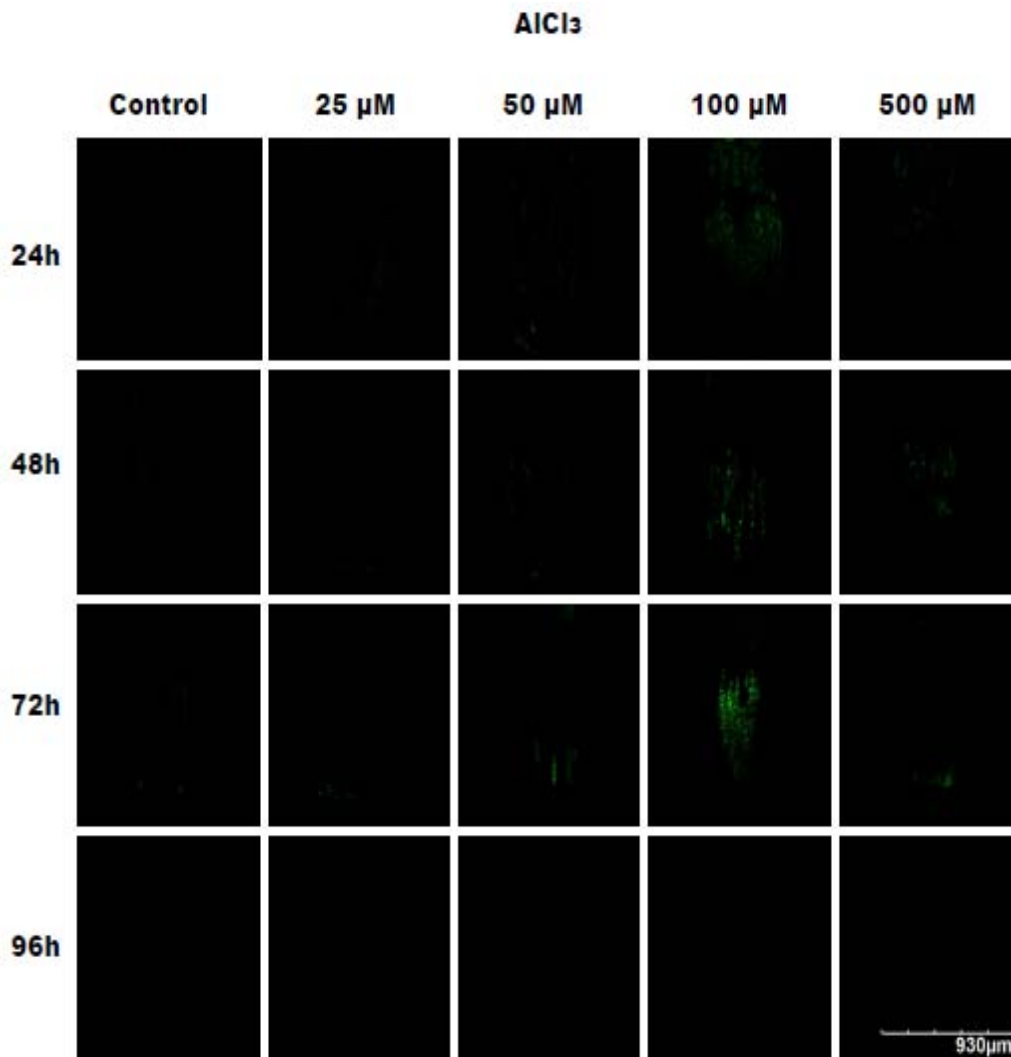
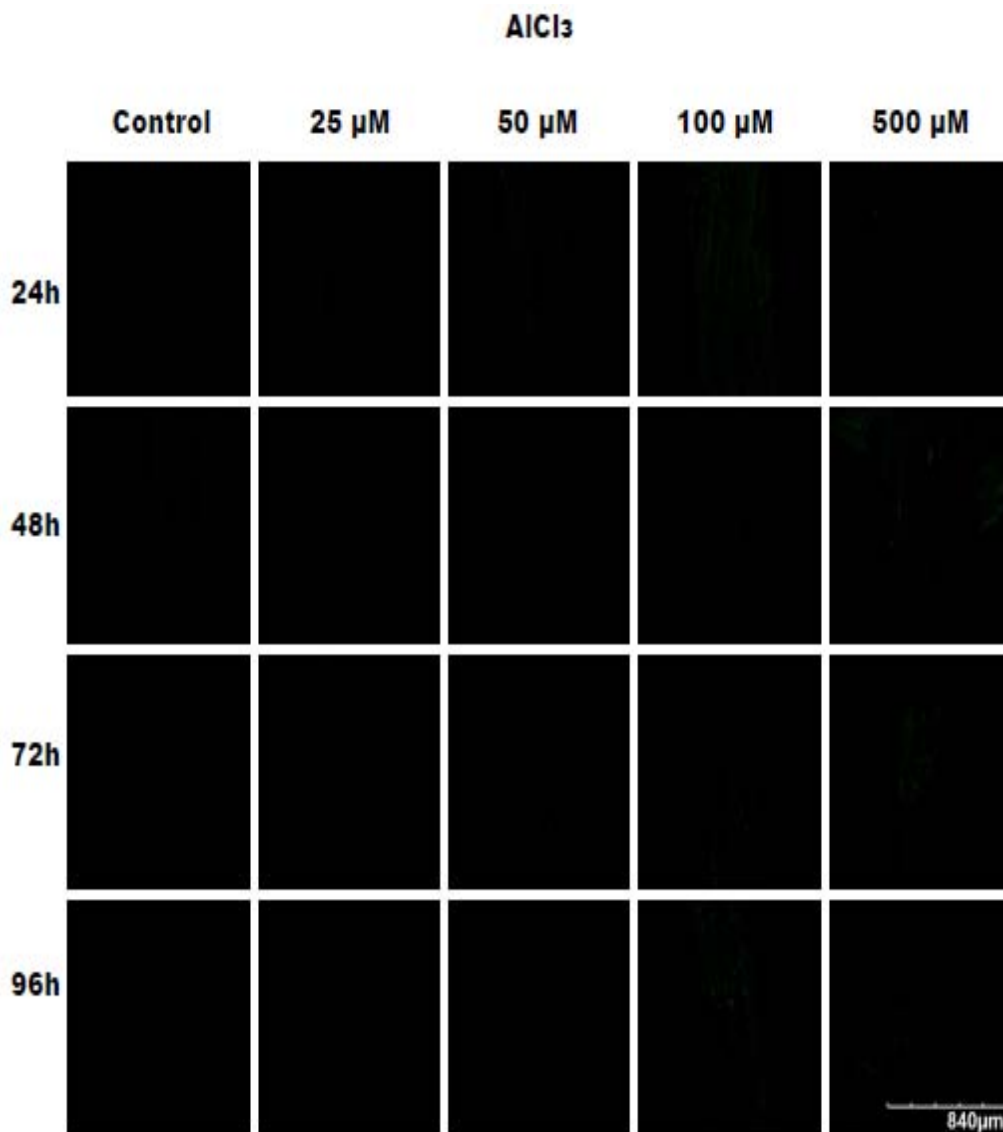


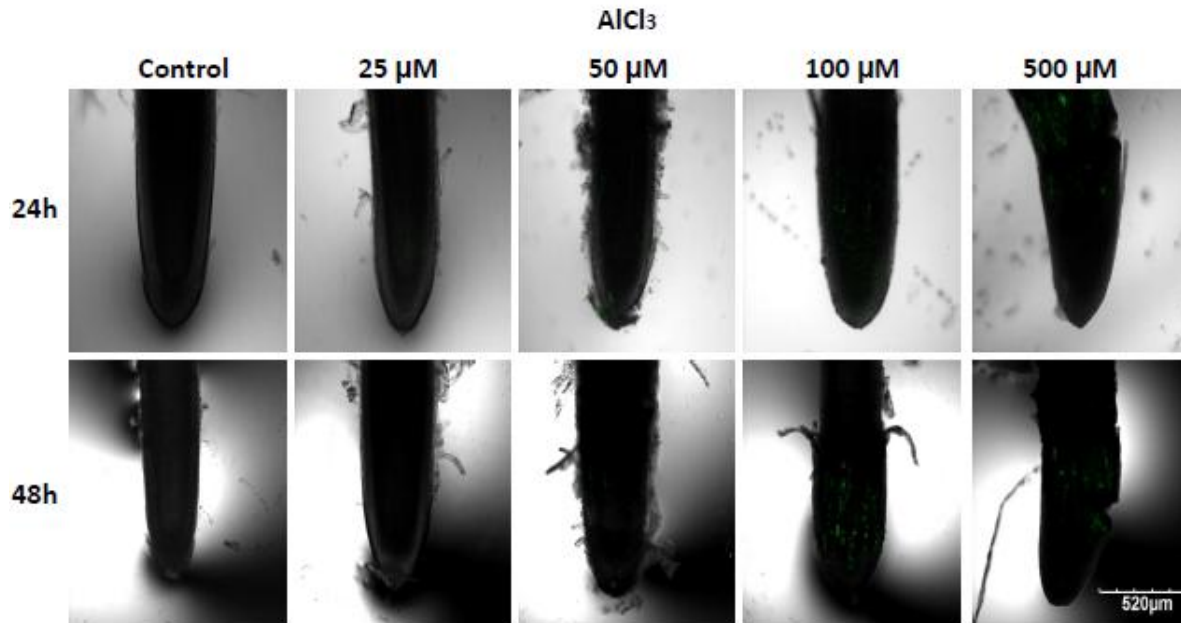
Fig. 12 Eliminación de la fluorescencia emitida por las raíces de los tratamientos sin  $\text{AlCl}_3$ .



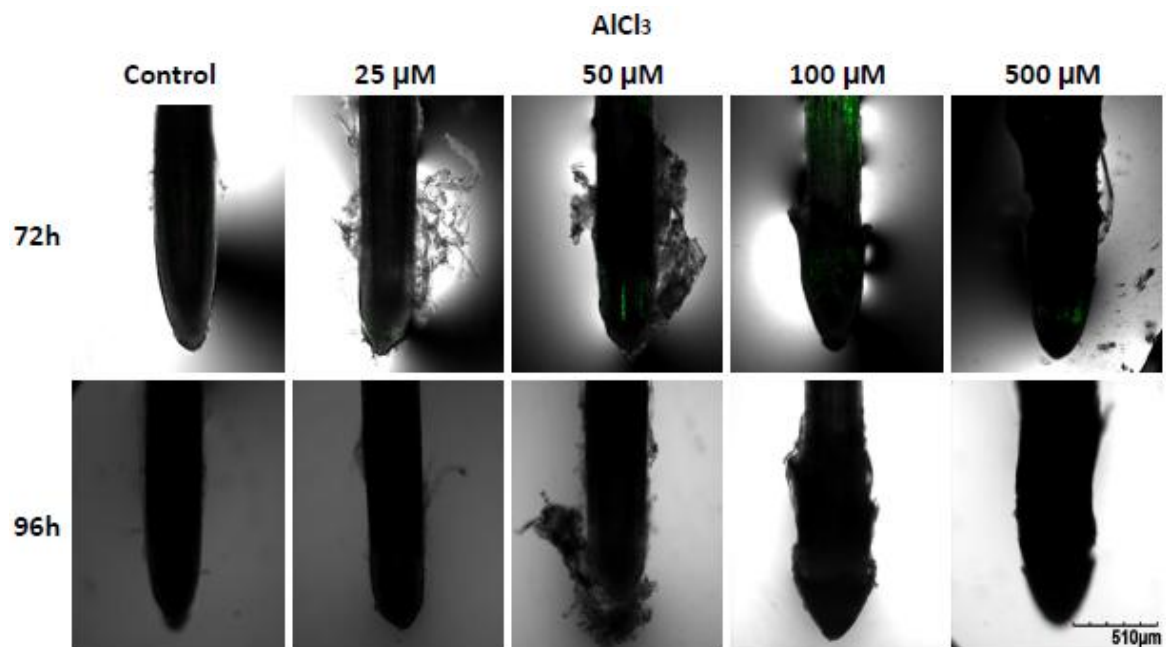
**Fig. 13** Fluorescencia de las puntas de las raíces con H<sub>2</sub>DCFDA en los diferentes tratamientos con AlCl<sub>3</sub> durante las primeras 96 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X y son representativas de 5 repeticiones.



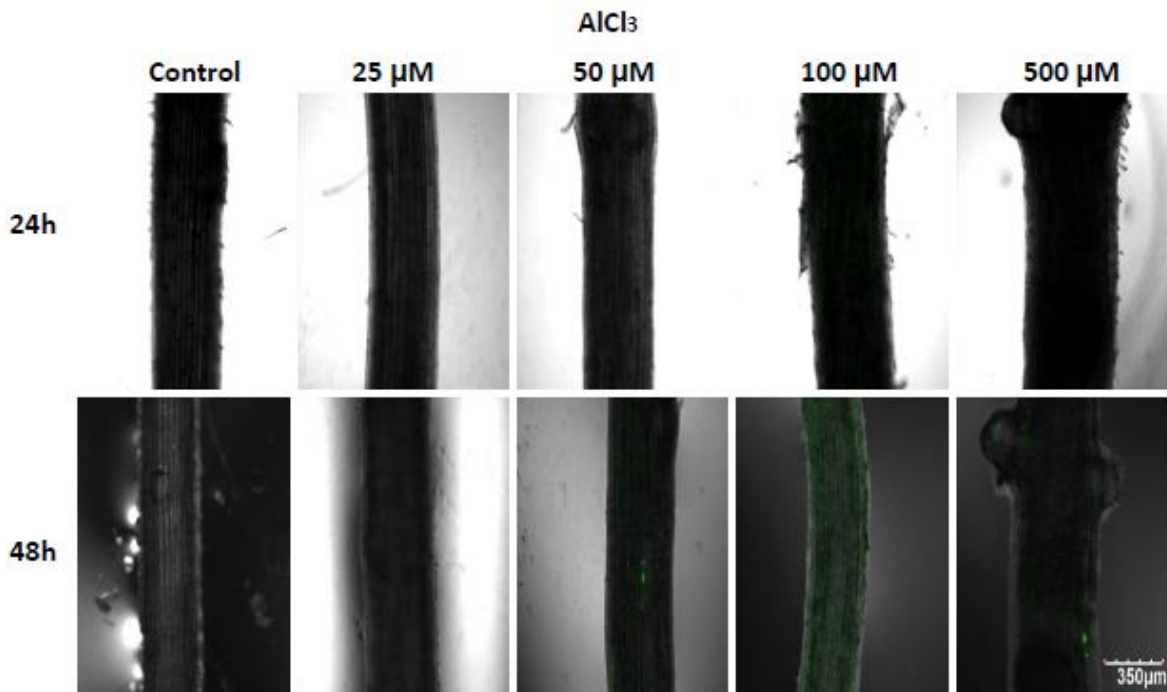
**Fig. 14** Fluorescencia de la zona de elongación con H<sub>2</sub>DCFDA en los diferentes tratamientos con AlCl<sub>3</sub> durante las primeras 96 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X son representativas de 5 repeticiones.



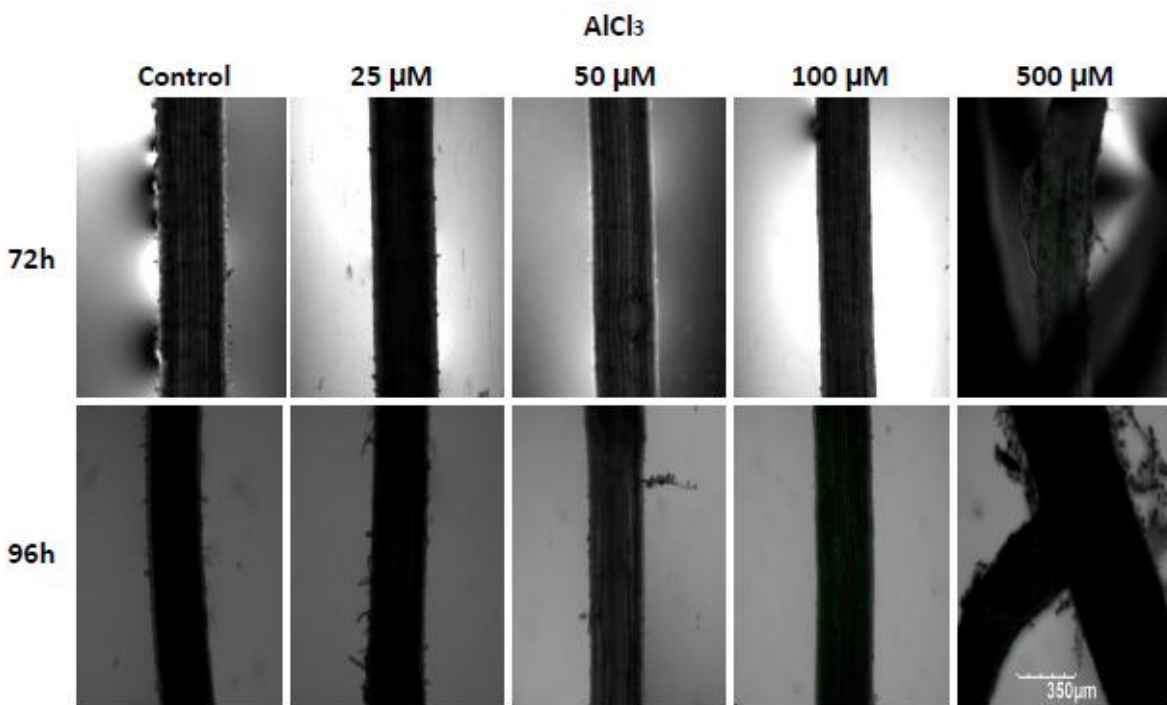
**Fig. 15** Imágenes de las puntas de las raíces teñidas con H<sub>2</sub>DCFDA expuestas a los diferentes tratamientos con AlCl<sub>3</sub> durante 24 y 48 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X y son representativas de 5 repeticiones.



**Fig. 16** Imágenes de las puntas de las raíces teñidas con H<sub>2</sub>DCFDA expuestas a los diferentes tratamientos con AlCl<sub>3</sub> durante 72 y 96 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X y son representativas de 5 repeticiones.



**Fig. 17** Imágenes de la zona de elongación teñidas con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , expuestas a los diferentes tratamientos con  $\text{AlCl}_3$  durante 24 y 48 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X, son representativas de 5 repeticiones.



**Fig. 18** Imágenes de la zona de elongación teñidas con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , expuestas a los diferentes tratamientos con  $\text{AlCl}_3$  durante 72 y 96 h. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal a 10X, son representativas de 5 repeticiones.

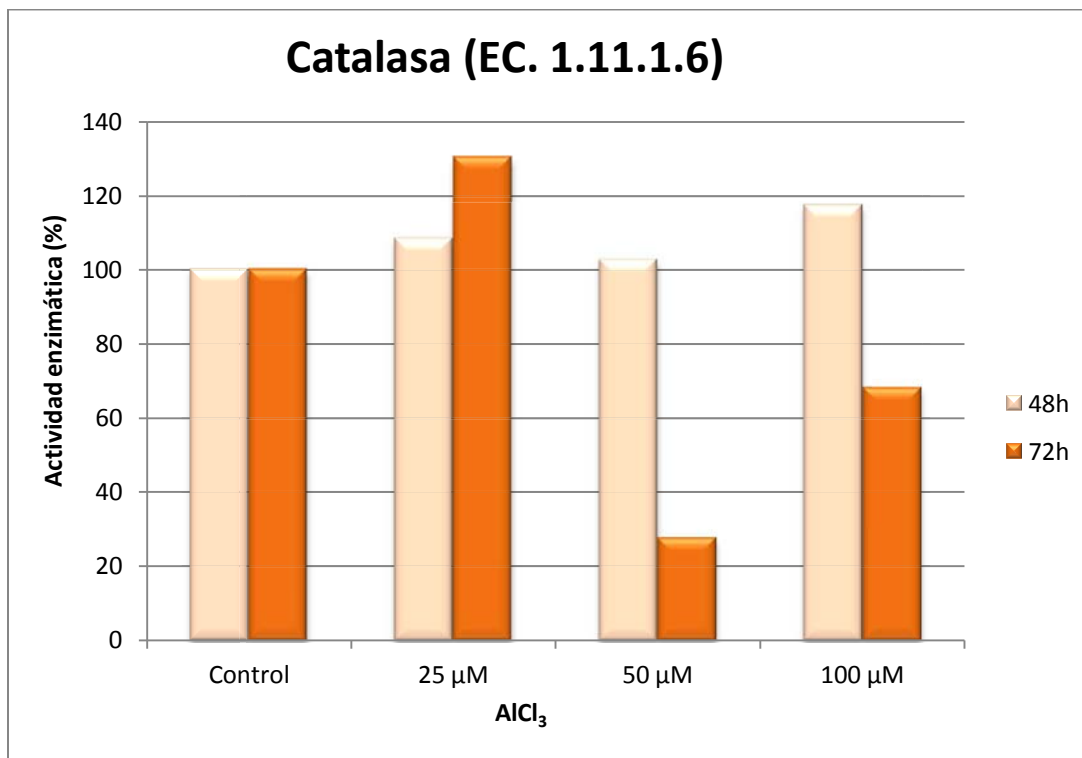
#### VIII.4 Actividad enzimática de la catalasa (EC. 1.11.1.6) en las puntas de las raíces

La actividad enzimática de la catalasa es medida por la desaparición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es a su vez es determinada por el descenso en la absorbancia a 240 nm (Pereira *et al.*, 2013). Los resultados de esta actividad a las 48 y 72 h de exposición (Cuadro 1) muestran un comportamiento similar entre los diferentes tratamientos y entre los dos tiempos de exposición. Sólo se presenta un mayor descenso en la actividad enzimática de las raíces expuestas a 50 µM de AlCl<sub>3</sub> por 72 h (Fig. 19). En este experimento no se incluyeron los tratamientos con 500 µM de AlCl<sub>3</sub> ni a las 24 h de exposición ya que la cantidad de proteína extraída era muy baja, lo que dificultó la medición de la actividad enzimática.

Debido a que los datos no cumplían con el supuesto de normalidad, se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ni entre las diferentes horas de exposición.

**Cuadro 1.** Valores de la actividad enzimática de catalasa expresada en µmol/min/mg de proteína en las puntas de las raíces (≈ 2 cm) de *F. esculentum* expuestas por 48 y 72 h a AlCl<sub>3</sub>. Promedio de n=6 y de dos experimentos independientes. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon en la que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (p < 0.05). Se muestra el error estándar.

Tratamiento (AlCl <sub>3</sub> )	48h	72h
<b>Control</b>	0.0196 ± 0.0032	0.0237 ± 0.0066
<b>25 µM</b>	0.0212 ± 0.0064	0.0309 ± 0.0073
<b>50 µM</b>	0.0201 ± 0.0052	0.0066 ± 0.0009



**Fig. 19** Actividad de CAT (expresada en porcentaje) en las puntas de las raíces ( $\approx 2$  cm) de *F. esculentum* expuestas durante 48 y 72 h a AlCl<sub>3</sub>. Promedio de n=6 de dos experimentos independientes. Se realizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon en la que no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## IX. Discusión

### IX.1 Crecimiento, longitud radicular y tasa de crecimiento radicular relativo (RRG)

Las características de la raíz son utilizadas frecuentemente para evaluar el efecto del aluminio sobre la planta y establecer así, su nivel de susceptibilidad, o bien, de tolerancia (Posso *et al.*, 2013). El primer síntoma perceptible cuando se presenta la toxicidad por aluminio es la reducción del crecimiento radicular en longitud, efecto que en plantas de *Triticum aestivum* empieza una hora después de la exposición de las raíces a  $\text{Al}^{3+}$  (Casierra y Aguilar, 2007). En el presente estudio se evaluó el efecto del aluminio en el crecimiento de la raíz de *F. esculentum* las primeras 96 h después de la germinación, encontrando desde las 24 h de exposición, una reducción en la longitud de las raíces principales en las plantas expuestas a todos los tratamientos con  $\text{AlCl}_3$ , siendo más evidente en las tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , éste comportamiento permaneció hasta las 96 h de tratamiento. Estos resultados son similares a lo reportados por Pereira y colaboradores (2013), quienes evaluaron el efecto de 370  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  en el crecimiento de las raíces de tres genotipos de avena; tolerante (UFRGS 17), intermedio (UFRGS 280) y sensible (UFRGS 930598), observando una disminución del crecimiento de las raíces del genotipo sensible desde las 12 h de exposición, a diferencia de los genotipos intermedio y tolerante dónde, no se encontró una reducción significativa de las longitudes de las raíces expuestas a  $\text{AlCl}_3$ . La inhibición del crecimiento radicular observada ante la exposición al aluminio pudiera deberse a que el metal interfiere directa o indirectamente en el proceso de división celular, ejerciendo su efecto tóxico sobre éste (Álvarez *et al.*, 2005; Casierra y Cárdenas, 2009; Álvarez *et al.*, 2012).

Como se mencionó en *F. esculentum* también se observó una reducción del crecimiento radicular en todos los tratamientos con aluminio con respecto al control, desde las 24 h y hasta las 96 h de exposición al metal, lo que sugiere una etapa inicial de sensibilidad en esta especie. Sin embargo, no hubo una disminución significativa en el crecimiento de la raíz entre los tratamientos con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , ya que las longitudes de las raíces de las plantas expuestas a estos tratamientos no fueron estadísticamente distintas



(Fig. 8), demostrando una tolerancia de ésta especie como ya se ha reportado anteriormente (Ma *et al.*, 1998; Ma y Hiradate, 2000; Shen y Ma, 2001).

Por otro lado, si se toman en cuenta los valores de la tasa relativa del crecimiento de la raíz (RRG), estos valores muestran una recuperación gradual del crecimiento desde las 48 h, tiempo en el que aumenta el porcentaje o la tasa de crecimiento para las raíces de las plántulas expuestas a 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Fig. 9). Este aumento en la tasa de crecimiento llega a alcanzar casi el 100% (con respecto al control) en los tratamientos con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  a las 72 h de exposición: y aunque a las 96 h existe un descenso en el RRG de todas las plántulas, este porcentaje aún sigue alcanzando los mismos valores que presentan genotipos tolerantes a aluminio. Esta recuperación ya ha sido documentada anteriormente por Reyna-Llorens, *et al.* (2015) y en otros cultivos tolerantes como el genotipo Azucena de *Oryza sativa*, la cual, presenta una tasa o RRG de  $\sim 82\%$  después de 6 días de exposición a 540  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Posso *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando las raíces de *F. esculentum* fueron expuestas a una concentración muy alta (500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ) su tasa de crecimiento nunca se recuperó, a las 96 h presentaron un RRG del 0%, lo que indica que aún y cuando *F. esculentum* es una especie tolerante al aluminio, en ésta etapa de plántula, la especie tiene un alto grado de sensibilidad a ésta concentración de aluminio.

Los resultados también son comparables con lo reportado por Boscolo y colaboradores (2003). Estos autores evaluaron la toxicidad por aluminio en dos líneas de maíz; una tolerante (Cat100-6) y una sensible (S1587-17), encontrando que después de 48 h de exposición a distintas concentraciones de aluminio, el porcentaje del RRG en las plantas de la línea tolerante era más alto que en las de la línea sensible, de igual forma el RRG de la línea tolerante se mantenía constante a lo largo de las horas de exposición a diferencia de la línea sensible en la que este porcentaje disminuía. En *F. esculentum* los valores del RRG de las plántulas expuestas a los tratamientos con 25 y 50  $\mu\text{M}$  de aluminio a las 48, 72 y 96 h, son cercanos al 100% y en todos los tratamientos, a excepción de las plantas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , los porcentajes aumentan conforme transcurre el tiempo de exposición, comportamiento que se compara al de las plantas de la línea tolerante de maíz (Cat100-6) (Boscolo *et al.*, 2003). El RRG de las plántulas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  es el único que va disminuyendo desde las 24 h de exposición hasta obtener un RRG de 0% a las 96 h, comportamiento comparable al de las plantas de la línea de maíz

sensible (S1587-17), en el que el porcentaje del crecimiento relativo de la raíz también disminuyó conforme transcurrió el tiempo de exposición (Boscolo *et al.*, 2003). Estos resultados corroboran que a pesar de la disminución en la longitud de las raíces expuestas a los diferentes tratamientos con aluminio, desde las 48 h ya se observa una recuperación del crecimiento de las raíces para los tratamientos con 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  lo que ayuda a la planta a restablecer su crecimiento en etapas posteriores.

Los resultados del peso seco (Fig. 10) mostraron una disminución significativa de la biomasa de las raíces expuestas a 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , lo que muestra una respuesta inicial más susceptible al aluminio en *F. esculentum*, este resultado se compara con lo obtenido por Yu y colaboradores (2011) quienes indicaron que los valores de peso seco de las raíces disminuían proporcionalmente al aumento en la concentración de  $\text{AlCl}_3$  en la solución nutritiva de los genotipos sensibles de soya.

Este resultado se correlaciona con la disminución de la longitud de las raíces expuestas a los diferentes tratamientos (Fig. 8), lo que genera un peso seco significativamente menor en los tratamientos con  $\text{AlCl}_3$  (50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, dado que se tiene una recuperación del crecimiento radicular (Fig. 9) se sugiere que en etapas posteriores esta biomasa se recobre y ayude a restablecer el desarrollo óptimo de la planta como lo reportado por Martínez-Rendón (2013).

Como ya se mencionó en estudios anteriores se ha comprobado la tolerancia de *F. esculentum* a altas concentraciones de aluminio, y se ha documentado una acumulación del metal en las hojas (Ma *et al.*, 1998; Ma y Hiradate, 2000; Shen y Ma, 2001; Shen *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2006), así como su capacidad para completar todo su ciclo de vida sin reducir significativamente su crecimiento y biomasa, expuesta hasta 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Martínez-Rendón, 2013). Se ha sugerido que para compensar la inhibición del crecimiento en las raíces en las primeras etapas del desarrollo, promueve la formación de un sistema radical adventicio, como en el caso de la planta de arroz, *Conostegia xalapensis*, mutantes de *Arabidopsis thaliana* tolerantes a aluminio y plántulas de *Quercus serrata* en las que se desarrolla un mayor número de raíces adventicias al exponerlas a altas concentraciones de aluminio (Álvarez *et al.*, 2013; Álvarez *et al.*, 2014; González-Santana *et al.*, 2012; Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013; Tomioka *et al.*, 2012). Esta formación de raíces adventicias puede constituir una característica que les permite

fortalecer el sistema radical e incrementar así la absorción de nutrimentos y agua, proceso que es vital para la planta y que puede verse afectado por concentraciones tóxicas de aluminio (Álvarez *et al.*, 2005).

## IX.2 Penetración y acumulación de aluminio

Después de observar la reducción del crecimiento radicular en las plántulas tratadas con  $\text{AlCl}_3$ , se analizó la penetración y acumulación del mismo en las raíces, esto para correlacionar la cantidad de aluminio dentro de las raíces con la disminución de la longitud en las mismas. Para esto se utilizó la tinción con hematoxilina (Fig. 11), la tinción con este colorante permite localizar el aluminio en el interior de la raíz, siendo una herramienta esencial para relacionar los cambios morfológicos observados con el grado de tolerancia al metal (Álvarez *et al.*, 2013). Esta tinción muestra al aluminio almacenado en el apoplasto, probablemente unido a fosfatos (Arroyave *et al.*, 2013). La hematoxilina tiene la propiedad de tornarse azul-violeta cuando forma un complejo específico con el ion  $\text{Al}^{3+}$ , el que puede facilitar su penetración y retención en la raíz. Además, la intensidad del color en los ápices radicales teñidos es una medida cuantitativa de la sensibilidad al aluminio (Álvarez *et al.*, 2013). Las raíces teñidas fueron clasificadas como *no teñidas*, *parcialmente teñidas* y *completamente teñidas* según la clasificación de Minella y Sorrells (1997). En base a éste criterio las únicas *no teñidas* fueron las puntas de las raíces del control a lo largo de las diferentes horas, y las raíces de las plántulas expuestas a 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  presentaron una tinción *parcial* muy similar a lo largo del tiempo de exposición al aluminio. Las raíces *completamente teñidas* desde las 24 h de exposición, fueron las del tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , las cuales además presentaban una clara alteración de la epidermis.

Delhaize *et al.* (1993) compararon la tolerancia al aluminio en dos genotipos de trigo mediante la tinción con hematoxilina encontrando que el genotipo más sensible presentó una mayor tinción desde los primeros 10 min de exposición a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , en comparación con la línea tolerante en la cual apenas se presentó una ligera coloración después de 60 min de tratamiento, siendo más acentuada esta diferencia conforme avanzó el tiempo de exposición al metal, lo cual revela que las plantas más sensibles al aluminio dejan penetrar en mayor concentración el metal por lo que la coloración aumenta

desde las primeras horas en presencia de éste. En el caso de *F. esculentum*, aunque existe cierta penetración del aluminio a las puntas de las raíces, la acumulación no incrementa significativamente conforme aumenta la concentración (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ), ni tampoco entre las horas de exposición, lo que sugiere un mecanismo de exclusión que regula la cantidad de aluminio dentro de la planta, y que no permite que el metal se incremente cuando aumenta el tiempo de exposición. Posiblemente el mecanismo que regula la entrada del aluminio en las raíces expuestas a las diferentes concentraciones y a través del tiempo de exposición, es la secreción de oxalato, mecanismo que ya ha sido reportado en esta especie (Yang *et al.*, 2006).

Las plantas tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  fueron las únicas que presentaron una tinción completa, lo que exhibe que a esa concentración, el mecanismo que regula la entrada del metal no es enteramente efectivo y resulta tóxico para la planta, por lo que se observa una detención y alteración del crecimiento.

Éstos resultados son similares a los obtenidos por Arroyave y colaboradores (2013), quienes observaron que la especie de *Brachiaria ruziziensis*, más sensible al aluminio, presentaba raíces completamente teñidas al exponerla a 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 24 h, lo que se compara con lo obtenido en este estudio al exponer plántulas de *F. esculentum* a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , y que demuestra la sensibilidad de la planta a esta concentración de aluminio.

De igual forma, en este experimento se observó desde las 24h, que las raíces de las plántulas expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , presentaban una evidente inhibición de su crecimiento y un incremento anormal del diámetro radical, efecto que pudiera estar relacionado con una alteración en la estructura del citoesqueleto, lo cual ha sido observado como un mecanismo de acción de la fitotoxicidad por aluminio (Casierra y Aguilar, 2007).

La presencia de raíces cortas y gruesas en las plantas expuestas a aluminio, son un síntoma de fitotoxicidad por el metal, que se acentúa cuando las especies manifiestan una alta sensibilidad a la acidez y a la presencia de aluminio en el sustrato (Casierra y Cárdenas, 2007), lo que sugiere que la presencia de estas características en las raíces de las plántulas expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , demuestran que se ha sobrepasado el nivel de tolerancia de *F. esculentum* y que las plántulas expuestas a esta concentración, ya presentan síntomas de fitotoxicidad por aluminio.

Así mismo el crecimiento asimétrico de los ápices se hace más evidente con el incremento de los niveles de  $\text{Al}^{3+}$ , de manera que las plántulas expuestas a la concentración más tóxica del ión, exhiben una mayor curvatura de los ápices radiculares, lo cual ha sido reportado ya como un indicador de la sensibilidad al aluminio (Álvarez *et al.*, 2013), éste efecto fue observado en las raíces expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  desde las 24 h de tratamiento, por lo que se puede confirmar que las plantas tratadas con la concentración más alta (500  $\mu\text{M}$ ) presentaron síntomas de toxicidad.

### **IX.3 Localización de $\text{H}_2\text{O}_2$ en las puntas de las raíces**

Ya que se observó penetración de aluminio en las raíces por medio de la tinción con hematoxilina y se conoce que este metal induce una instantánea y continua producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ma, 2007), se realizó una tinción fluorescente para medir los niveles de las mismas en las raíces de *F. esculentum* tratadas con  $\text{AlCl}_3$  (Fig. 13 y 14). Se ha reportado que la producción de ROS puede ser causada inicialmente por la unión del aluminio a la membrana plasmática y por el aumento de calcio citoplasmático inducido por este metal (Ma, 2007). En este trabajo se evaluó si bajo los tratamientos con aluminio se inducía la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para esto se usó el colorante 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA), el cual ya ha sido reportado que sirve para detectar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como un indicador de la producción de ROS (Jones *et al.*, 2006).

Los resultados mostraron que no hay una formación de ROS arriba de los niveles normales en todas las raíces tratadas con las distintas concentraciones de aluminio a lo largo del tiempo de exposición, siendo más elevado el contenido de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sólo en las raíces tratadas con 100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , lo que nos puede indicar un daño a nivel de membrana, ya que uno de los primeros efectos del aluminio en la estructura de la membrana es la alta peroxidación de lípidos por la producción elevada de ROS (Matsumoto, 2000).

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Darkó y colaboradores (2004), estos autores reportan una menor acumulación de ROS en las puntas y en la zona

de elongación de las raíces de *T. aestivum* de la línea tolerante a Al expuestas a 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 10 días. En *F. esculentum* también se encontró una producción baja de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto en las puntas como en la zona de elongación de las raíces expuestas a las diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$  durante las 96 h de exposición.

La tinción fluorescente permitió observar que el contenido de ROS era mayor en la punta y particularmente en la cofia de las raíces tratadas con las concentraciones más elevadas (100 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ) (Fig. 13), resultado similar al obtenido por Ezaki y colaboradores (2000) quienes utilizaron la tinción con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  para observar la presencia de ROS, trataron raíces de *Arabidopsis* ecotipo Landsberg *erecta* (Ler-0) con 50 y 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 5 h, obteniendo como resultado una tinción más intensa en la región anterior a la punta de la raíz, así como en las células de la cofia.

En otros estudios, como el realizado por Pereira y colaboradores (2013) se encontró una relación entre el estrés oxidativo y la inhibición de la elongación de las raíces por aluminio, se sugiere que la producción de ROS y la peroxidación lipídica son los causantes de la inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al aluminio. En este trabajo a pesar de que se encontró una reducción en la longitud de las raíces de *F. esculentum* expuestas a todos los tratamientos con aluminio, no se encontró una elevada producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que podría relacionarse con los porcentajes cercanos al 100% del crecimiento relativo de las raíces (RRG) en las plántulas expuestas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  desde las 48 h, ya que se ha reportado que en la recuperación de las raíces es evidente la disminución de radicales  $\text{O}^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y el contenido de lignina; observándose finalmente la elongación del cilindro central en raíces recuperadas (Carreño y Chaparro, 2013). Lo que también sugiere un mecanismo o una regulación del sistema antioxidante de la planta.

#### IX.4 Actividad enzimática de la catalasa (EC. 1.11.1.6) en las puntas de las raíces

Dado que los niveles de  $H_2O_2$  en todas las raíces de *F. esculentum* tratadas con  $AlCl_3$  fueron muy bajos, y a que una de las principales enzimas antioxidantes presentes en las plantas es la catalasa, se evaluó su actividad en las puntas de las raíces ( $\approx 2$  cm) de las plántulas expuestas a aluminio (Fig. 19). Los resultados mostraron una actividad similar a la del control, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos, ni en los diferentes tiempos de exposición. La catalasa no es la única enzima que puede remover peróxido, así mismo existen otras enzimas del sistema antioxidante las que pueden estar involucradas. El bajo contenido de  $H_2O_2$  puede estar relacionado con un aumento en la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX) o la glutatión reductasa (GR), entre otras, como en los trabajos reportados por Mohan y colaboradores (2008) y Castilhos y colaboradores (2011), en dónde se reportan actividades diferenciales (aumento o disminución) de las enzimas SOD, GR, APX y CAT dependiendo de la variedad tolerante o sensible.

Además es importante tomar en cuenta que a pesar de que los principales sistemas de eliminación de ROS en las plantas incluyen a las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y a la catalasa (CAT), la actividad de quelatación y el secuestro de iones de metales, también ayudan a la disminución de ROS, previniendo la formación de radicales hidroxilo (Benavides *et al.*, 2009). Este mecanismo también podría ayudar a la mitigación de los niveles de ROS en las plántulas de *F. esculentum* expuestas a aluminio, ya que se ha reportado que en esta especie cuando el  $Al^{3+}$  cruza la membrana plasmática es quelado por el oxalato para formar un complejo Al-oxalato en relación 1:3. Posteriormente, cuando el  $Al^{3+}$  se traslada desde las raíces a los brotes, se produce en el xilema una reacción de intercambio de ligando para formar Al-citrato, y ya una vez transportado del xilema a las células de las hojas, se produce otro intercambio de ligandos para formar el complejo Al-oxalato, que finalmente, se almacena en la vacuola (Ma *et al.*, 2001). Por lo que se sugiere que la formación del complejo Al-oxalato pudiera ayudar a mantener niveles bajos de ROS, a pesar de la entrada del aluminio a las raíces.

## X. Conclusiones

- ❖ La longitud radicular de las plántulas de *F. esculentum* tratadas con aluminio disminuyó con respecto al control, sin embargo la tasa del crecimiento radicular es recuperada en las plántulas de todos los tratamientos a excepción de las expuestas a la mayor concentración de aluminio.
- ❖ Se sugiere que el mecanismo de exclusión en todas las plántulas tratadas, regula la entrada y acumulación del aluminio en esta etapa del desarrollo, a excepción de las plántulas expuestas a la mayor concentración de este metal.
- ❖ La acumulación de ROS no rebasó los límites normales al exponer las plántulas a ninguna de las concentraciones de aluminio.
- ❖ La actividad enzimática de la catalasa no aumentó significativamente en las raíces expuestas a las diferentes concentraciones de aluminio en el tiempo evaluado, por lo que se sugiere la participación de otra enzima antioxidante para el control de la producción de ROS en las raíces de *F. esculentum* en esta etapa.
- ❖ La mayor concentración de aluminio utilizada (500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ) es tóxica para la planta en esta etapa del desarrollo.



## XI. Perspectivas

- ❖ Es necesario corroborar los resultados del contenido de aluminio dentro de las raíces, por medio de espectrometría de absorción atómica u otro método cuantitativo.
- ❖ Para corroborar los bajos niveles de peróxido de hidrógeno es importante complementar estos resultados con análisis espectrofotométricos que proporcionen datos cuantitativos.
- ❖ Debido a la baja actividad enzimática de catalasa encontrada es necesaria la evaluación de la actividad de otras enzimas así como de otros componentes del sistema antioxidante que pudieran estar participando en la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- ❖ Así mismo es necesario realizar el estudio de la respuesta de *F. esculentum* expuesta a 500 µM de AlCl<sub>3</sub> durante todo su ciclo de vida para corroborar si la planta puede o no recuperarse.

## XII. Referencias

- ❖ Álvarez I., Sam O., Reynaldo I. 2005. Cambios inducidos por el aluminio en la morfogénesis radicular del arroz. *Cultivos Tropicales*, 26 (1): 21-25.
- ❖ Álvarez I., Reynaldo I., Sánchez P., Risueño M. 2012. Efectos del aluminio en la división y el alargamiento celular en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 33 (1): 35-40.
- ❖ Álvarez I., Sam O., Reynaldo I., Testillano P., Risueño M. 2013. Efecto tóxico del ión Al<sup>3+</sup> en el ápice radicular de dos cultivares cubanos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (4): 315-323.
- ❖ Álvarez I., Reynaldo I., Acevedo R., Brito M. 2014. Mecanismo de acción del aluminio en la raíz del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Anales de la Academia de Ciencia de Cuba*, 4 (2): 1-7.
- ❖ Arroyave C., Tolrà R., Thuy T., Barceló J., Poschenrieder C. 2013. Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. *Environmental and Experimental Botany*, 89: 11-18.
- ❖ Baumgertel A., Loebers A., Kreis W. 2010. Buckwheat as a source for the herbal drug *Fagopyri herba*: Rutin content and activity of flavonoid-degrading enzymes during plant development. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4 (1): 82-86.
- ❖ Behl C., Davis B., Lesley R., Schubert D. 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid  $\beta$  protein toxicity. *Cell*, 77: 817-827.
- ❖ Benavides A., 2002. Ecofisiología y Bioquímica del estrés en plantas. Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México, 228 pp.
- ❖ Benavides A., Ramírez H., Robledo V., Fuentes L. 2009. Antioxidantes en las plantas: algunos factores edáficos y ambientales que los modifican. En: A. Benavides-Mendoza (Compilador). *Temas Modernos de Nutrición Vegetal*, A.C., Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México. 13-26 pp.
- ❖ Boscolo P., Menossi M., Jorge R. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62: 181-189.

- ❖ Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- ❖ Campbell G. 1997. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Italy, 95 pp.
- ❖ Carreño A., Chaparro A. 2013. Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes. *Universitas Scientiarum*, 18 (3): 283-310.
- ❖ Casierra F. 2001. Fundamentos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos del estrés por aluminio en vegetales. *Revista Comafi*, 28 (2): 8-19.
- ❖ Casierra F., Aguilar O. 2007. Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 1(2): 246-257.
- ❖ Casierra F., Cárdenas J. 2007. Influencia del aluminio sobre el crecimiento de la raíz en coliflor (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis, Hib. `Nevada F1´). *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación científica*, 10 (1): 149-157.
- ❖ Casierra F., Niño R. 2007. Solubilidad y reacción del aluminio en el suelo. *Ciencia y Agricultura*, 5 (2): 7-17.
- ❖ Casierra F., Cárdenas J. 2009. Crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L. var. Porva) en solución nutritiva con baja relación (Ca+Mg+K)/Al. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica*, 12 (2): 91-100.
- ❖ Castilhos G., Gomes J., De Bernadi A., De Oliveira P., Teixeira F., Chitolina M., Delatorre C. 2011. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 74: 114-121.
- ❖ Chandran D., Sharopova N., VandenBosch K., Garvin D., Samac D. 2008. Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 8 (89): 1-17.
- ❖ Dai H., Zhao J., Mosaddek I., Cao F., Chen Z., Zhang G., Li C., Wu F. 2014. Differences in physiological features associated with aluminum tolerance in Tibetan wild and cultivated barleys. *Plant Physiology and Biochemistry*, 75: 36-44.
- ❖ Darkó E., Ambrus H., Stefanovits E., Fodor J., Bakos F., Barnabás B. 2004. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat

- genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, 166: 583-591.
- ❖ Delhaize E., Craig S., Beaton C., Bennet R., Jagadish V., Randall P. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*, 103: 685-693.
  - ❖ Díaz A. 2003. La estructura de las catalasas. *Revista de Educación Bioquímica*, 22 (2): 76-84.
  - ❖ Dong B., Sang W., Jiang X., Zhou J., Kong F., Hu W., Wang L. 2002. Effects of aluminum on physiological metabolism and antioxidant system of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 47: 87-92.
  - ❖ Ezaki B., Gardner R., Ezaki Y., Matsumoto H. 2000. Expression of Aluminum-induced genes in Transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, 122: 657-665.
  - ❖ González D., Grimaldo O., Cervantes L. 2008. Los elementos potencialmente tóxicos en las plantas de manglar: una revisión de los mecanismos de tolerancia involucrados. *Interciencia*, 33 (11): 817-820.
  - ❖ González D., Zapata O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: 53-61.
  - ❖ González-Santana I., Márquez-Guzmán J., Cram-Heydrich S., Cruz-Ortega R. 2012. *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): an aluminum accumulator plant. *Physiologia Plantarum*, 144: 134-145.
  - ❖ Hall J. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366): 1-11.
  - ❖ Hernández-Pérez V. 2014. Efecto del potencial hídrico en la actividad del sistema antioxidante durante la germinación de *Alvaradoa amorphoides* especie de la Selva Baja Caducifolia. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, UNAM, 83 pp.
  - ❖ Inostroza C., Reyes M., Aquea F., Nunes A., Alberdi M., Arce P. 2011. Biochemical and molecular changes in response to aluminium-stress in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1005-1012.
  - ❖ Jones D., Blancaflor E., Kochian L., Gilroy S. 2006. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 1309-1318.

- ❖ Jungjohann J., Longeri L., Vidal I. 1997. Tolerancia diferencial de cultivares de trigo al aluminio. *Agricultura Técnica*, 57 (3): 169-176.
- ❖ Klug B., Specht A., Horst W. 2011. Aluminium localization in root tips of the aluminium-accumulating plant species buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Journal of Experimental Botany*, 62 (15): 5453-5462.
- ❖ Kochian L. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 237-260.
- ❖ Lenoble M., Blevins D., Sharp R., Cumbie, B. 1996. Prevention of aluminum toxicity with supplemental boron I. Maintenance of root elongation and cellular structure. *Plant Cell and Environment*, 19 (10): 1132-1142.
- ❖ Ma J., Zheng S., Matsumoto H., Hiradate S. 1997. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature*, 390 (6660): 569-570.
- ❖ Ma J., Hiradate S., Matsumoto H. 1998. High aluminum resistance in Buckwheat. *Plant Physiology*, 117: 753:759.
- ❖ Ma J., Hiradate S. 2000. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Planta*, 211: 355-360.
- ❖ Ma J., Ryan P., Delhaize E. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6 (6): 273-278.
- ❖ Ma J., 2007. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants, Chapter five, *International Review of cytology*, 264: 226-247.
- ❖ Martínez-Rendón A. 2013. 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). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM, 88 pp.
- ❖ Matsumoto H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*, 200: 1-46.
- ❖ Matsumoto H., Motoda H. 2012. Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science*, 185-186: 1-8.
- ❖ Minella E., Sorrells E. 1997. Inheritance and chromosome location of Alp, a gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. *Plant Breeding*, 116: 465-469.
- ❖ Miyasaka S., Hue N., Dunn M. 2007. Aluminum. En: Barker AV, Pilbeam DJ. (Eds.) *Handbook of Plant Nutrition*. Taylor & Francis Group CRC Press, U.S.A., 439-497 pp.

- ❖ Mohan V., Jena S., Panda K., Panda B. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310.
- ❖ Mukhopadyay M., Bantawa P., Das A., Sarkar B., Bera B., Ghosh P., Mondal T. 2012. Changes of growth, photosynthesis and alteration of leaf antioxidative defence system of tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] seedlings under aluminum stress. *Biometals*, 25: 1141-1154.
- ❖ Peñaloza E., Martínez J., Montenegro A., Corcuera J. 2004. Respuesta de dos especies de Lupino a aluminio fitotóxico. *Agricultura Técnica*, 64 (2): 127-138.
- ❖ Peralta-Pérez M., Volke T. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (1): 75-88.
- ❖ Pereira L., Mazzanti C., Goncalves J., Cargnelutti D., Tabaldi L., Becker A., Spanholi N., Gomes J., Battisti V., Bohrer D., Nicoloso F., Morsch V., Schetinger M. 2010. Aluminum-induced oxidative stress in cucumber. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 683-689.
- ❖ Pereira L., Cargnelutti D., Rossato L., Fabbrin J., Almeri L., Schmatz R., Marchi J., Dressler V., Teixeira N., Federizzi L., Morsch V., Schetinger M. 2013. Differential speed of activation in antioxidant system in three oat genotypes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128: 202-207.
- ❖ Pérez J., Bornemisza E., Sollins P. 1993. Identificación de especies forestales acumuladoras de aluminio en una plantación forestal experimental ubicada en Sarapiquí, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 17(2): 99-103.
- ❖ Poschenrieder C., Gunsé B., Corrales I., Barceló J. 2008. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants, *Science of the Total Environment*, 400: 356-368.
- ❖ Posso D., Llano J., Londoño A., Lentini Z., Ghneim T. 2013. Caracterización de la tolerancia al aluminio en genotipos de la especie silvestre de arroz *Oryza glumaepatula* Steud. I Workshop sobre tolerância a estresses abióticos, Brasília, 1: 67-77.
- ❖ Ratan P., Kothiyal P. 2011. *Fagopyrum esculentum* Moench. (common buckwheat) edible plant of Himalayas: A review. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 1 (4): 426-442.

- ❖ Reyna-Llorens I. 2010. Mecanismos de tolerancia al aluminio en la planta acumuladora *Fagopyrum esculentum* (Moench.) var Mancan. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, 55 pp.
- ❖ Reyna-Llorens I., Corrales I., Poschenrieder C., Barcelo J., Cruz-Ortega R. 2015. Both aluminum and ABA induce the expression of an ABC-like transporter gene (FeALS3) in the Al-tolerant species *Fagopyrum esculentum*. *Environmental and Experimental Botany*, 111: 74-82.
- ❖ Ruíz-Herrera L., López-Bucio J. 2013. Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Soil*, 371 (1-2): 593-609.
- ❖ Salas R. 1996. El aluminio en la relación suelo planta. Centro de Investigaciones agronómicas, X Congreso Nacional Agronómico, II Congreso de Suelos, 109-113.
- ❖ Samardzic J., Nikolic D., Timotijevic G., Jovanovic Z., Milizavljevic M., Maksimovic V. 2010. Tissue expression analysis of FeMT3, a drought and oxidative stress related metallothionein gene from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Journal of Plant Physiology*, 167: 1407-1411.
- ❖ Schat H., Llugany M., Bernhard R. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. En: Terry N., Banuelos G., *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, CRC Press, Florida, 171-188 pp. Citado en: González D., Zapata O., 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: 53-61.
- ❖ Shen R., Ma J. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Journal of Experimental Botany*, 52 (361): 1683-1687.
- ❖ Shen R., Ma J., Kyo M., Iwashita T. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, 215: 394-398.
- ❖ Shen R., Iwashita T., Ma J. 2004. Form of Al changes with Al concentration in leaves of buckwheat. *Journal of Experimental Botany*, 55 (394): 131-136.
- ❖ Shen R., Chen R., Ma J. 2006. Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds. *Plant soil*, 284: 265-271.

- ❖ Sivaguru, M.; Matsumoto H. y Horst W. 2000. Control of the response to aluminum stress. En: Nick, P. (ed.). Plant microtubules: Potential for microbiology. Springer, Heidelberg. pp. 103-120.
- ❖ Tabaldi L., Cargnelutti D., Gonçalves J., Pereira L., Castro G., Maldaner J., Rauber R., Rossato L., Bisognin D., Schetinger M., Nicoloso F. 2009. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere*, 76: 1402-1409.
- ❖ Tamura H., Honda M., Sato T., Kamachi H. 2005. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Journal of Plant Research*, 118: 355-359.
- ❖ Tani F., Barrington S. 2005. Zinc and copper uptake by plants under two transpiration rates. Part II. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.). *Environmental Pollution*, 138 (3): 548-558.
- ❖ Tomioka R., Takenaka C., Maeshima M., Tezuka T., Kojima M., Sakakibara H. 2012. Stimulation of root growth induced by aluminum in *Quercus serrata* Thunb. is related to activity of nitrate reductase and maintenance of IAA concentration in roots. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 1619-1624.
- ❖ Toneatti M., Rivera N. 2005. Ensayos de Tolerancia al Aluminio de *Bromus stamineus* y *Bromus lithobius* recolectados en el Sur de Chile. *Información Tecnológica*, 17 (1): 9-17.
- ❖ Toneatti-Bastidas M. 2006. Evaluación de la tolerancia a aluminio en 125 accesiones de bromo (*Bromus valdivianus*). Tesis de maestría, Universidad Austral de Chile, 137 pp.
- ❖ Trejo-Téllez L., Gómez-Merino F. 2007. Respuestas fisiológicas y bioquímicas de plantas de tabaco a concentraciones de aluminio en invernadero, *TERRA Latinoamericana*, 25 (3): 251-259.
- ❖ Valladares F., Vilagrosa A., Peñuelas J., Ogaya R., Camarero J., Corcuera L., Sisó S, Gil E. 2004. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante, EGRAF, Madrid, 163-190 p.
- ❖ Watanabe M. 1998. Catechins as Antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46 (3): 839-845.
- ❖ Yang J., Zheng S., He Y., You J., Zhang L., Yu X. 2006. Comparative studies on the effect of a protein-synthesis inhibitor on aluminium-induced secretion of organic



acids from *Fagopyrum esculentum* Moench and *Cassia tora* L. roots. *Plant, Cell and Environment*, 29: 240–246.

- ❖ Yu H., Liu P., Wang Z., Chen W., Xu G. 2011. The effect of aluminum treatments on the roots growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. *Crop protection*, 30: 323-328.
- ❖ Zheng S., Yang J., He Y., Yu X., Zhang L., You J., Shen R., Matsumoto H. 2005. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, 138: 297-303.
- ❖ Zhou P., Yang F., Ren X., Huang B., An Y. 2014. Phytotoxicity of aluminum on root growth and indole-3-acetic acid accumulation and transport in alfalfa roots. *Environmental and Experimental Botany*, 104 (2014): 1-8.