



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo en plántulas de *Fagopyrum*  
*esculentum* expuestas a aluminio**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ANA VIOLETA SALAZAR CHAVARRÍA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ**  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM  
**DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX. NOVIEMBRE, 2018.**



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.

OFICIO CPCB/1007/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

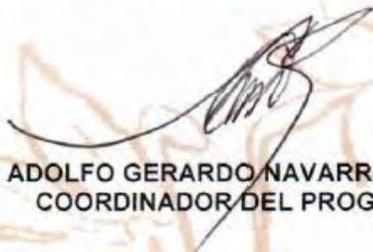
Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Evolutiva, en su sesión ordinaria del día 30 de julio de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, a la alumna **SALAZAR CHAVARRÍA ANA VIOLETA** con número de cuenta **305141976** con la tesis titulada: "**MECANISMOS DE TOLERANCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN PLÁNTULAS DE *Fagopyrum esculentum* EXPUESTAS A ALUMINIO**", bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA

Presidente:	DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal:	DR. ULISES YUNUÉN ROSAS LÓPEZ
Secretario:	DRA SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
Suplente:	DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
Suplente	DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 18 de octubre de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de este programa y por brindarme una formación de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

Al Proyecto PAPIIT con clave IN20815 titulado: “Mecanismos de tolerancia al aluminio en una planta tolerante: el papel de transportadores y del sistema antioxidante” por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por permitirme trabajar bajo su dirección y por todo el apoyo recibido durante mis estudios de maestría.

A los miembros de mi comité tutor: A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto y a la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado: Al Dr. José Pedraza Chaverri, al Dr. Ulises Yunuén Rosas López y al Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra por sus valiosas aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Charlotte Poschenrieder Wien, Al Dr. Juan Barceló y a todos los integrantes del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Autónoma de Barcelona por permitirme aprender y trabajar con ellos.

# CONTENIDO

Lista de Figuras .....	7
I. Resumen .....	8
II. Abstract.....	10
III. Introducción.....	11
IV. Marco teórico .....	13
4.1 Toxicidad por aluminio.....	13
4.2 Mecanismos de tolerancia al aluminio .....	16
4.3 Estrés oxidativo y sistema antioxidante asociado a la exposición a Al .....	19
4.4 Ácido abscísico (ABA) y su función en el balance REDOX.....	24
4.5 <i>Fagopyrum esculentum</i> como planta modelo en el estudio de la tolerancia a Al <sup>3+</sup> .....	26
4.6 Antecedentes .....	30
V. Hipótesis .....	32
VI. Objetivos.....	32
VII. Metodología .....	34
7.1 Evaluación de la tasa de crecimiento radicular relativo.....	34
7.2 Evaluación de la penetración y acumulación de aluminio.....	35
7.3 Actividad de las enzimas del sistema antioxidante durante el estrés por Al.....	35
7.3.2.1 Cuantificación del radical superóxido.....	38
7.4 Localización de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	40
7.5 Evaluación de la viabilidad celular en las puntas de las raíces .....	40
7.6 Cuantificación de los niveles endógenos de ABA .....	41
7.7 Actividad de las enzimas del sistema antioxidante y producción de ROS con la aplicación de ABA exógeno .....	41
7.8 Análisis estadístico de los resultados .....	42
VIII. Resultados.....	43
8.1 Crecimiento radicular de <i>F. esculentum</i> expuesta a Al .....	43
8.2 Penetración y acumulación de Al en las raíces .....	45
8.3 Cuantificación de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (CAT, SOD, APX, GR) .....	47

8.4 Niveles del radical superóxido en las puntas de las raíces expuestas a Al.....	49
8.5 Localización de ROS .....	50
8.6 Evaluación de la viabilidad celular en las puntas de las raíces .....	52
8.7 Niveles endógenos de ABA .....	53
8.8 Confirmación de la inducción del sistema antioxidante por la aplicación de ABA exógeno .....	55
8.9 Localización de ROS en las puntas de las raíces tratadas con ABA.....	58
<b>IX. Discusión.....</b>	<b>60</b>
9.1 La inhibición del crecimiento radicular es el primer síntoma de la toxicidad por aluminio.....	60
9.2 Penetración y acumulación de aluminio en las raíces de <i>F. esculentum</i> .....	62
9.3 El aluminio dentro de las células puede inducir estrés oxidativo .....	63
9.4 Aunque hay acumulación de ROS no hay daño a nivel celular .....	64
9.5 El sistema antioxidante como mecanismo para la tolerancia al aluminio.....	65
9.6 Los niveles endógenos de ABA contribuyen a la regulación del sistema antioxidante ...	68
<b>X. Conclusiones .....</b>	<b>72</b>
<b>XI. Perspectivas .....</b>	<b>74</b>
<b>XII. Referencias.....</b>	<b>75</b>

## Lista de Figuras

<b>Fig. 1</b> Efecto del pH sobre las diferentes formas iónicas del Al soluble.....	13
<b>Fig. 2</b> Esquema del efecto del Al en las puntas de las raíces. ....	15
<b>Fig. 3</b> Modelos de resistencia al aluminio en las células de las plantas.....	18
<b>Fig. 4</b> Producción de especies reactivas de oxígeno .....	19
<b>Fig. 5</b> Mecanismos del sistema antioxidante.....	23
<b>Fig. 6</b> Red de señalización por ABA .....	25
<b>Fig. 7</b> <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.....	27
<b>Fig. 8</b> Captación y distribución del Al. ....	29
<b>Fig. 9</b> Crecimiento radicular de las plántulas de <i>F. esculentum</i> .....	44
<b>Fig. 10</b> Tasa de crecimiento radicular relativo (RRG).....	44
<b>Fig. 11</b> Tinción con hematoxilina .....	45
<b>Fig. 12</b> Penetración y acumulación de Al .....	46
<b>Fig. 13</b> Actividad enzimática .....	48
<b>Fig. 14</b> Niveles de superóxido.....	49
<b>Fig. 15</b> Localización de ROS. ....	50
<b>Fig. 16</b> Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	51
<b>Fig. 17</b> Tinción vital.....	52
<b>Fig. 18</b> Tinción vital.....	53
<b>Fig. 19</b> Cuantificación de los niveles de ABA.....	54
<b>Fig. 20</b> Actividad enzimática .....	56
<b>Fig. 21</b> Gráfico comparativo de la actividad del sistema antioxidante .....	57
<b>Fig. 22</b> Localización de la acumulación de ROS .....	58
<b>Fig. 23</b> Acumulación de especies reactivas de oxígeno .....	59
<b>Fig. 24</b> Diagrama propuesto del mecanismo de tolerancia en las raíces de <i>F. esculentum</i> .....	71

## I. Resumen

La toxicidad por aluminio (Al) es la principal limitante para los cultivos en suelos ácidos (pH <5.0). En estas condiciones de acidez la especie  $\text{Al}^{3+}$  es soluble y tóxica para la mayoría de las plantas, ya que causa estrés oxidativo entre otros efectos que provocan la inhibición del crecimiento radicular. Algunas especies de plantas han desarrollado mecanismos de tolerancia para sobrevivir a estas condiciones, como la exudación de ácidos orgánicos, la acumulación del metal en la parte aérea, y el aumento del sistema antioxidante, el cual podría estar regulado por ABA, una de las hormonas que confieren tolerancia bajo condiciones de estrés. Entre las especies tolerantes reportadas está *Fagopyrum esculentum* Moench. (Polygonaceae), la cual es una planta acumuladora de Al. Teniendo como modelo a plántulas de *F. esculentum*, el objetivo de este trabajo fue evaluar el papel del sistema antioxidante en la tolerancia a este metal y si éste a su vez era regulado por ABA en la etapa de plántula. Para ello se evaluó la respuesta de *F. esculentum* a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 3, 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. Inicialmente se determinó la tasa de crecimiento radicular (RRG) la cual reflejó que durante las primeras 12 h de exposición hay una reducción en la tasa de crecimiento de las raíces, pero que ésta se recupera a partir de las 24 h. Al evaluar la entrada y acumulación del aluminio, se observó que el Al penetra a la raíz desde las 3 h de exposición, sin embargo, a partir de las 12 h no se observa un aumento en la entrada del metal. Por otro lado, para conocer si el sistema antioxidante formaba parte de los mecanismos iniciales de tolerancia, se midió la actividad de varias enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR). Los resultados mostraron que la exposición a Al aumentó la actividad de CAT, GR y APX. Así mismo, se evaluó la acumulación de ROS mediante una tinción fluorescente con la cual se demostró un aumento de ROS desde las 6 h de tratamiento. Igualmente, se evaluó la viabilidad celular, con la que se comprobó que a pesar de la mayor producción de ROS, no hay daño celular en las puntas de las raíces. Para evaluar si el ácido abscísico (ABA) estaba mediando la respuesta antioxidante, se midieron los niveles endógenos de esta hormona con lo que se confirmó que el Al induce un aumento en los mismos. Finalmente, para relacionar los niveles de ABA con la actividad de las enzimas antioxidantes antes mencionadas y la producción de ROS en las puntas de las

raíces, éstas fueron expuestas a ABA exógeno y se encontró que la exposición a esta hormona aumentó las actividades enzimáticas de CAT, APX y GR, además de la producción de ROS desde las 12 h de tratamiento. Estos resultados sugieren que en las primeras 12 h de exposición a Al, las raíces de *F. esculentum* presentan un daño y una mayor producción de ROS producida por la penetración del metal, sin embargo el aumento en la actividad del sistema antioxidante junto con el aumento en los niveles de ABA, entre otros mecanismos, permiten la posterior recuperación del crecimiento radicular.

## II. Abstract

Aluminum toxicity (Al) is one of the major constraints for plant growth on acid soils (pH <5.0). The trivalent species of aluminum ( $Al^{3+}$ ) becomes soluble and it does cause phytotoxicity to most plants, generating oxidative stress and other toxic effects, and thus inhibiting radicle growth. Some plant species have developed tolerance mechanisms that allow them to cope Al toxicity. These mechanisms include releasing organic acids into the rhizosphere, translocation and accumulation of the metal in both roots and leaves, and increasing the activity of the antioxidant system. This latter mechanism might be regulated by ABA, a plant hormone involved in stress tolerance. Among the plant species reported as Al tolerant, *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) is considered an Al-accumulator. The aim of this study was to evaluate in root seedlings of *F. esculentum* the role of the antioxidant system in Al-tolerance, and if this is regulated by levels of ABA. For this, *F. esculentum* seedlings were exposed to 50  $\mu$ M Al for 3, 6, 12, 24 and 48-h. The relative root growth (RRG) was measured, showing that radicle growth is inhibited during the first 12-h of Al-treatment, but at 24-h and 48-h the RRG started to be recovered. Al entrance was evaluated, and results showed that Al enters and accumulated into roots since 3-h up to 24-h, and then the level of Al remained unchanged. To evaluate the role of the antioxidant system during Al-treatment, we measured the activity of cytosolic catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase (APX). Results showed that activity of CAT, GR and APX activity increased from 6 to 48-h of Al-treatment. Reactive Oxygen Species (ROS) production was evaluated by a fluorescent method and showed an increase in levels of ROS from 6h of Al-treatment. Although that ROS increased, there was not cell damage at root tip. On the other hand, to evaluate if ABA might be regulating the activity of the antioxidant system, the endogenous ABA levels were measured. Results showed a significantly ABA level increased in Al treated roots. Moreover, root seedlings treated with exogenous ABA increased the CAT and GR activity and elevated ROS production since 12-h of treatment. All together, these results suggest that during the first 12-h of Al treatment, there is a decline in root growth and an increase in ROS levels due to Al entrance to the root. However, the increase in antioxidant activity, as well as the increase in ABA levels allows the recovery of root growth.

### III. Introducción

La toxicidad por aluminio (Al) es el primer factor que limita la producción de cultivos en suelos ácidos, los cuales representan el 40% del suelo arable mundial (Revisado en: Lenoble *et al.*, 1996; Matsumoto, 2000; Ma *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2017). El Al causa inhibición del crecimiento radical (Xu *et al.*, 2017), lo que ocasiona una disminución del desarrollo y crecimiento de las plantas, sumado a deficiencias nutricionales provocadas por la baja solubilidad y toma de elementos como el calcio, magnesio, fósforo y molibdeno (Toneatti y Rivera, 2005). Además el Al<sup>3+</sup> causa disfunción mitocondrial, altera la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> e induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Revisado en: Carreño y Chaparro, 2013; Singh *et al.*, 2017). La acumulación de ROS da como resultado la inactivación de enzimas, peroxidación de lípidos y degradación de proteínas (González *et al.*, 2008). Así mismo, 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 y una disminución de la actividad de un gran número de enzimas asociadas a las funciones de la membrana, especialmente la H<sup>+</sup>-ATPasa (Casierra, 2001; Revisado en: Singh *et al.*, 2017).

Para controlar los efectos tóxicos de las ROS, las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes que contribuyen a la disminución del estrés oxidativo mediante la síntesis de enzimas tales como la SOD, CAT, APX, guaiacol peroxidasa (GPOX), GR (Tabaldi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2017), entre otras, así como otros mecanismos antioxidantes no enzimáticos como los tocoferoles, el ácido ascórbico, el glutatión (GSH), taninos, flavonoides y carotenoides (Matsumoto y Motoda, 2012; Peralta y Volke, 2012; Singh *et al.*, 2017) que intervienen en la protección contra las ROS y, en consecuencia, en el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante (González *et al.*, 2008). Así mismo, se ha encontrado que una de las hormonas que puede inducir la actividad de este grupo de enzimas es el ácido abscísico (ABA) (Agarwal *et al.*, 2005), el cual puede aumentar la expresión de genes que codifican para enzimas del sistema antioxidante como: CAT, SOD

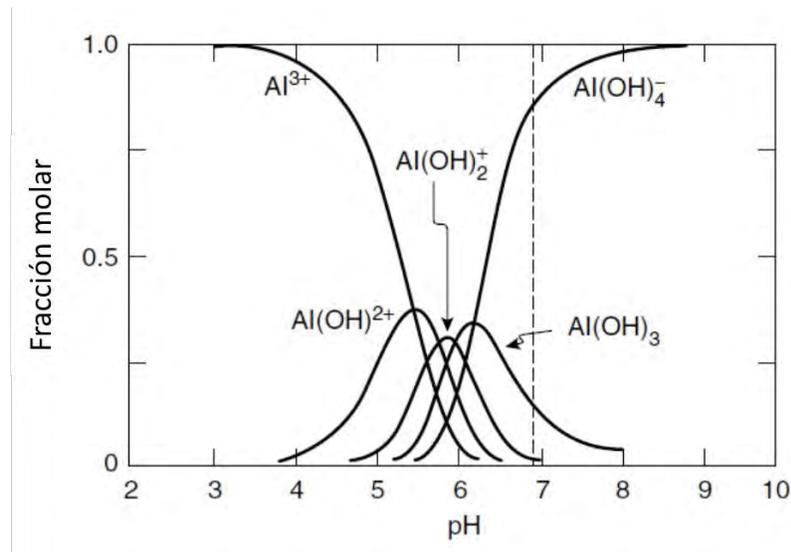
y GR, entre otras, además de incrementar los niveles de antioxidantes no enzimáticos (Jiang y Zhang, 2004; Agarwal *et al.*, 2005).

La especie *Fagopyrum esculentum* Moench. es tolerante al aluminio (Ma y Hiradate, 2000; Yokosho *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017), ya se ha descrito como mecanismo de tolerancia a este metal la exudación de ácido oxálico a partir de sus raíces y la capacidad de acumularlo en las células de las hojas en un complejo no tóxico Al-oxalato (Ma *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2017). Como antecedentes inmediatos, en el laboratorio ya se han realizado estudios para conocer a través de análisis de microarreglos, los genes involucrados en la tolerancia a este metal además de la caracterización de un transportador tipo ABC que podría estar involucrado en el transporte de  $Al^{3+}$  (Reyna-Llorens *et al.*, 2015). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de tolerancia en etapas tempranas de su desarrollo, en las cuales se ha observado que la planta presenta síntomas de sensibilidad al aluminio. Ya que se conoce que este metal genera estrés oxidativo, es relevante conocer la participación del sistema antioxidante y su relación con los niveles endógenos de ABA, para poder tolerar el Al cuando este ha penetrado en las raíces y aún no se han activado los mecanismos de exclusión del metal.

## IV. Marco teórico

### 4.1 Toxicidad por aluminio

El Al es un metal ligero que constituye el 7 % de la corteza terrestre (Dong *et al.*, 2002; Matsumoto, 2000; Singh *et al.*, 2017) 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, hasta que el pH desciende como resultado de los procesos naturales o de las actividades humanas (Ma *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2017) como: el uso excesivo de fertilizantes acidificantes, la lluvia ácida, la lixiviación de cationes básicos como;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y las altas tasas de extracción de nutrientes, producto del aumento en la intensidad del uso de suelos (Jungjohann *et al.*, 1997; Tabaldi *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2017). Cuando el Al se solubiliza lo hace como catión trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ), el cual es sumamente tóxico para las plantas (Ma *et al.*, 2001). Éste aumenta 1000 veces su actividad por cada unidad de pH reducido en el suelo (Kopittke *et al.*, 2016). 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 Efecto del pH sobre las diferentes formas iónicas del Al soluble.** En pH ácido se encuentra en mayor concentración el catión  $\text{Al}^{3+}$ , el cual es considerado el más fitotóxico. Tomado de: Miyasaka *et al.*, 2007.

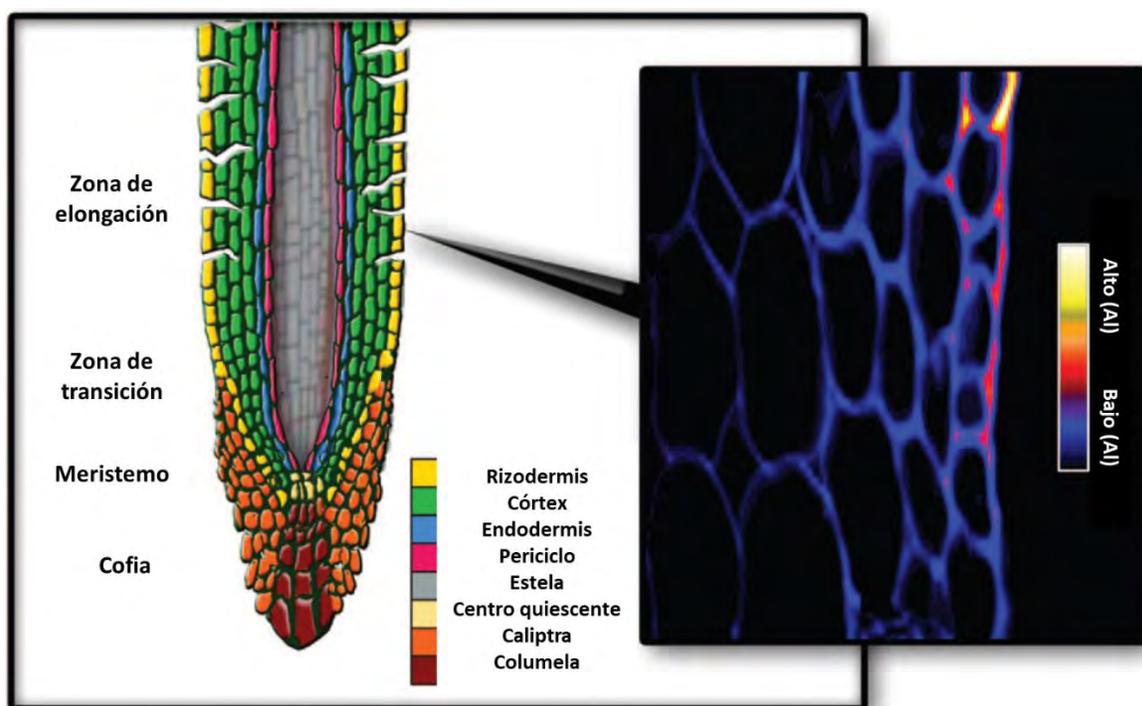
La disminución en el pH del suelo provoca niveles elevados de  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , la reducción de la concentración de macronutrientes en forma catiónica ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ ), así como la disminución de la solubilidad del fósforo y del molibdeno. Una consecuencia del incremento de  $\text{Al}^{3+}$  soluble es la 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; Kopittke *et al.*, 2016). La toxicidad por aluminio se ha considerado como la principal limitante para la productividad de los suelos ácidos (Revisado en: Inostroza *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2014), los cuales comprenden 3.95 billones de hectáreas de la superficie terrestre libre de hielo (Kopittke *et al.*, 2016) y representan aproximadamente el 40 % de la superficie arable de la tierra (Lenoble *et al.*, 1996; Matsumoto, 2000; Ma *et al.*, 2001).

El Al es generalmente tóxico para las especies de importancia agronómica en un rango de 5-100  $\mu\text{M}$  en la solución del suelo (Kopittke *et al.*, 2016), el sitio crítico dónde este metal se percibe y se produce la toxicidad, es la punta de la raíz (zona meristemática y de elongación) (Zhou *et al.*, 2014). Inicialmente se informó que el sitio dónde se presentaba un mayor daño por el metal eran las células periféricas de la caliptra, sin embargo posteriormente se demostró que la zona meristemática de la raíz es la más sensible al aluminio (Kopittke *et al.*, 2016).

Cuando el aluminio (el cual no tiene una función biológica específica en las plantas; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017) penetra en las raíces, se acumula en éstas (Fig. 2) y sólo una pequeña cantidad se transloca a la parte aérea, con excepción de las plantas acumuladoras, como la planta del té, *Camellia sinensis*, *Hydrangea macrophylla*, entre otras (Kopittke *et al.*, 2016). En la raíz, el aluminio provoca modificaciones en la estructura de la membrana, desplaza al calcio e inhibe la expansión de las paredes celulares, altera el transporte de iones y causa un desequilibrio de nutrientes. Además el Al afecta a los constituyentes del simplasto como las calmodulinas, causa rupturas en la membrana del aparato de Golgi, interfiere con la organización del citoesqueleto, altera las funciones de la mitocondria, daña al ácido desoxirribonucleico (DNA) y causa alteraciones en el apoplasto (pectinas), por lo que se restringe la elongación y división de las células de la punta de la raíz y éstas no pueden tener un crecimiento adecuado (Weil y Brady, 2016; Bojórquez-

Quintal *et al.*, 2017; Daspute *et al.*, 2017). La división celular en raíces de maíz se detiene desde los 5 min de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de Al, asimismo, se ha observado la inhibición de la elongación radicular desde la exposición a  $\approx 2 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  en *Vigna radiata* (Menzies *et al.*, 1994; Doncheva *et al.*, 2005).

El Al 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 alterado con abundantes raíces laterales, cortas, gruesas y quebradizas (Poschenrieder *et al.*, 2008).



**Fig. 2 Esquema del efecto del Al en las puntas de las raíces.** El Al se acumula predominantemente en las paredes celulares, y las concentraciones más elevadas se encuentran en los tejidos externos (rizodermis y corteza externa) (der.). La acumulación del Al causa la ruptura de la rizodermis y la corteza externa en la zona de elongación (izq.) Tomado de: Kopittke *et al.*, 2016.

Los daños causados por este metal pueden observarse desde los pocos minutos o incluso algunos segundos después de la exposición al aluminio (respuesta a corto plazo), como la interrupción del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  por la membrana plasmática, o pueden necesitar de horas para que sean visibles (respuesta a largo plazo) (Revisado en: Bojórquez-Quintal *et al.*,

2017), los cuales pueden ser el resultado de una alteración en la homeostasis causada por la toxicidad por aluminio (Kochian *et al.*, 2005).

## 4.2 Mecanismos de tolerancia al aluminio

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). Particularmente, la tolerancia a Al se ha descrito como el conjunto de características que les permiten a las plantas crecer de forma óptima en presencia de elevadas concentraciones de aluminio. En la mayoría de los cultivos, la tolerancia se basa en la exclusión del metal mediante la formación de complejos y por el secuestro del Al en bajas concentraciones en las vacuolas de las hojas (Klug y Horst, 2010a).

Hall (2002) divide los posibles mecanismos de tolerancia en las siguientes formas: (1) mecanismos externos de tolerancia mediados por 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).

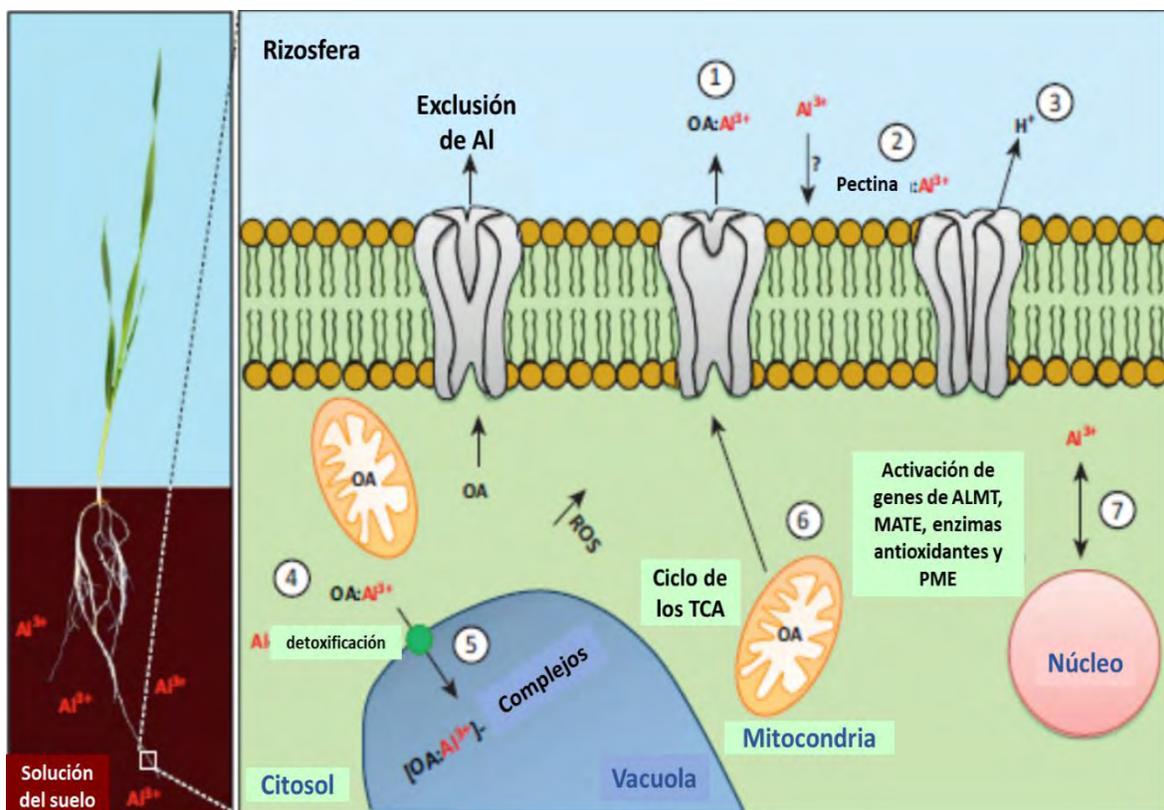
Dentro de los mecanismos que evitan la entrada del Al en las plantas se destaca, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática frente al flujo de Al, la formación de una barrera de pH en la rizósfera o en el apoplasto de la raíz, la producción de mucilago y la exudación de ácidos orgánicos u otros ligandos como los compuestos fenólicos, mucopolisacáridos, sideróforos, fosfatos y pectatos (Barceló y Poschenrieder, 2002; Carreño y Chaparro, 2013). Como ejemplo de plantas que aumentan el pH de la solución del suelo (Fig. 3) y con ello precipitan el Al están: *Triticum aestivum*, *Cucurbita pepo*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, un híbrido de *Zea mays* y la mutante de *Arabidopsis alr-104* resistente a Al (mutante del cromosoma 4 que no aumenta la liberación de ácidos

orgánicos) (Salas, 1996; Degenhardt *et al.*, 1998; Revisado en: Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017).

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 (Revisado en: Dai *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2017). La naturaleza de los ácidos orgánicos presentes en la rizósfera, difiere con el tipo de planta expuesta a Al; 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 (Revisado en: Peñaloza *et al.*, 2004). Tanto el citrato como el malato tienen un papel muy importante en la tolerancia a Al; por tanto, la activación de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de estos ácidos, como los de la familia *MATE* y *ALMT* (Fig. 3), son vitales en la exudación inducida por este metal y su consiguiente tolerancia, como se da en los genotipos de trigo resistentes a Al, sorgo y arroz, entre otras (Revisado en: Casierra y Niño, 2007; Bojórquez-Quintal *et al.*, 2017). Otro ácido orgánico de gran relevancia en la tolerancia a Al es el ácido oxálico, y entre las especies que lo exudan se encuentran *Rumex acetosella*, *Camellia sinensis*, *Fagopyrum esculentum* y *Colocasia esculenta* (Revisado en: Barceló y Poschenrieder, 2002).

Conjuntamente, la detoxificación interna del Al 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. 3). La capacidad de detoxificación difiere en relación con el tipo de ácido orgánico con el que se esté formando el complejo, debido a las diferencias en estabilidad de los mismos, siendo los más comunes citrato, malato y oxalato (Revisado en: Kochian, 1995). Además de los ácidos orgánicos, se ha reportado que el Al también puede formar complejos en el citoplasma con otro tipo de ligandos como los compuestos fenólicos, adenosín trifosfato (ATP), ácido ribonucleico (RNA) o azúcares fosfato (Revisado en: Singh *et al.*, 2017). Las plantas que poseen este mecanismo se denominan acumuladoras y almacenan aproximadamente  $1000 \text{ mg Kg}^{-1}$  de aluminio en las hojas. Existen alrededor de 100 especies con estas características dentro de 30 familias botánicas entre las que se encuentran: *Asteraceae*, *Caesalpinaceae*, *Euphorbiaceae*,

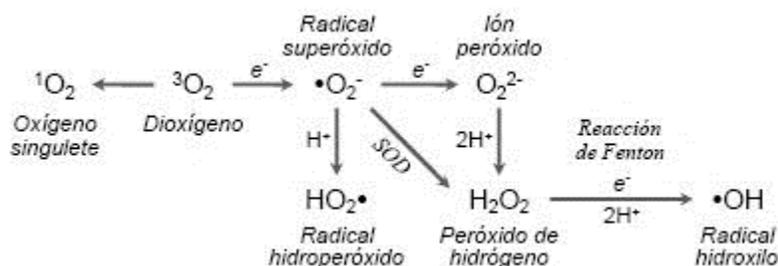
*Melastomataceae, Myrtaceae, Polygonaceae, Rubiaceae y Theaceae* (Revisado en: Barceló y Poschenrieder, 2002).



**Fig. 3 Modelos de resistencia al aluminio en las células de las plantas.** El aluminio (Al) activa canales aniónicos en la membrana plasmática y estimula la secreción de ácidos orgánicos (OA) desde las raíces. La presencia de OA en la rizosfera previene posiblemente que el Al entre en las células (mecanismo de exclusión): (1) Liberación de OA y quelación de  $Al^{3+}$  [OA: $Al^{3+}$ ]; (2) Unión de  $Al^{3+}$  a las pectinas en la pared celular; (3) disminución del pH de la rizosfera. En contraste si el Al entra en la célula, se dan los mecanismos internos de tolerancia; (4) El  $Al^{3+}$  es quelado en el citosol por los OA [OA: $Al^{3+}$ ]; (5) El Al es secuestrado y almacenado en organelos como la vacuola; (6) Cambia el metabolismo de los ácidos orgánicos por el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) causado por el exceso de Al; (7) Activación de vías metabólicas involucradas en la tolerancia a Al, incluyendo el aumento en la expresión de genes que codifican para transportadores de membrana, biosíntesis de enzimas antioxidantes, y la regulación del contenido de pectina en la pared celular, así como la expresión de pectin-metilesterasa (PME) la cual se encarga de la desmetilación de pectina. Al: aluminio, ALMT: aluminum-activated malate transporter, MATE: multidrug and toxic compound extrusion family, OA: ácidos orgánicos, PME: pectin-metilesterasa, ROS: especies reactivas de oxígeno, TCA: ácidos tricarbónicos. Modificado de: Nunes-Nesi *et al.*, 2014.

### 4.3 Estrés oxidativo y sistema antioxidante asociado a la exposición a Al

Los metales son una fuente potencial de estrés oxidativo porque inducen la producción de especies reactivas de O<sub>2</sub> (ROS por sus siglas en inglés; Reactive Oxygen Species) (Fig. 4) que causan inactivación de enzimas, degradación de proteínas, oxidación de carbohidratos, daño al DNA, desintegración de pigmentos y peroxidación de lípidos (González *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2017). La exposición a aluminio eleva los niveles celulares de ROS como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y radical hidroxilo (•OH) en diferentes regiones de la raíz (Darkó *et al.*, 2004; Daspute *et al.*, 2017). Esta elevada producción de ROS, conduce a la lipoperoxidación de la membrana que tiene como consecuencia, una notoria modificación en la permeabilidad de la misma, el incremento del transporte de iones y también la alteración de la actividad de un gran número de enzimas asociadas a la membrana plasmática (Matsumoto, 2000; Casierra, 2001).



**Fig. 4 Producción de especies reactivas de oxígeno** durante la reducción del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>). Tomado de: Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012.

El aluminio no es un metal de transición, sin embargo, induce la generación de ROS por la disfunción mitocondrial, activación de la NADPH oxidasa, descenso de los niveles de ascorbato (por la conversión del ascorbato a oxalato), mediante la reacción de Fenton (por unión a otros metales como el cobre) y por lipoperoxidación como se ha observado en las raíces de *Glycine max* (Cakmak y Horst, 1991), *Pisum sativum* tratadas con 10 μM de Al (Yamamoto *et al.*, 2001) y plántulas de arroz expuestas a 80 y 160 μM de Al (Sharma y Dubey, 2007). Esta producción de ROS puede incrementarse por la acidificación y el desbalance del estado redox en el citosol provocado por el aluminio (Revisado en: Daspute *et al.*, 2017). En células fotosintéticas, los cloroplastos son de los principales organelos en

los cuales 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 (Revisado en: Carreño y Chaparro, 2013) como se ha observado en células de *Nicotiana tabacum* y raíces de *Pisum sativum* expuestas a 100  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de Al respectivamente (Yamamoto *et al.*, 2002).

El incremento instantáneo y sostenido de ROS en la raíz, parece ser un factor determinante en el endurecimiento de la pared celular y en la producción de lignina, lo que puede inducir la inhibición del crecimiento de la raíz por el aluminio (Matsumoto y Motoda, 2012; Carreño y Chaparro, 2013). Además, en las raíces tratadas con este metal, se observa un incremento del  $\text{O}_2^-$ , que es la mayor fuente de ROS, formada principalmente en la membrana plasmática por la acción de la NADPH oxidasa (Benavides *et al.*, 2009). Por esta razón, se planteó una asociación entre el estrés oxidativo, la inhibición del crecimiento y los cambios estructurales de la raíz (Matsumoto y Motoda, 2012).

Sin embargo, resultados recientes han concluido que el estrés oxidativo no es la única causa de la inhibición del crecimiento radicular, ya que la adición de antioxidantes, evita la peroxidación y la producción de calosa pero no previene la acumulación de Al ni la inhibición de la elongación de las raíces (Revisado en: Kopittke *et al.*, 2016).

Las ROS además de generar estrés oxidativo también pueden actuar como segundos mensajeros en las vías de señalización (Mittler, 2002), éstas pueden ayudar a coordinar eventos como el desarrollo, la aclimatación y finalmente la tolerancia a diversos factores de estrés. Entre todas las ROS, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la que tiene mayor relevancia como molécula de señalización, debido a sus características, como son: su larga vida media (1 ms), mayor abundancia dentro de la célula (rango  $\mu\text{M}$ -mM) y su fácil transporte intermembranal (Cuypers *et al.*, 2016). Se ha encontrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la transcripción de *AtALMT1* y *AtMATE* en *Arabidopsis thaliana*, los cuales son transportadores de ácidos orgánicos implicados en la tolerancia al aluminio (Revisado en: Daspute *et al.*, 2017).

Para controlar la sobreproducción de ROS y ésta no conduzca a la muerte celular, las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes que contribuyen a la disminución del estrés oxidativo mediante la síntesis de enzimas tales como CAT, SOD, APX,

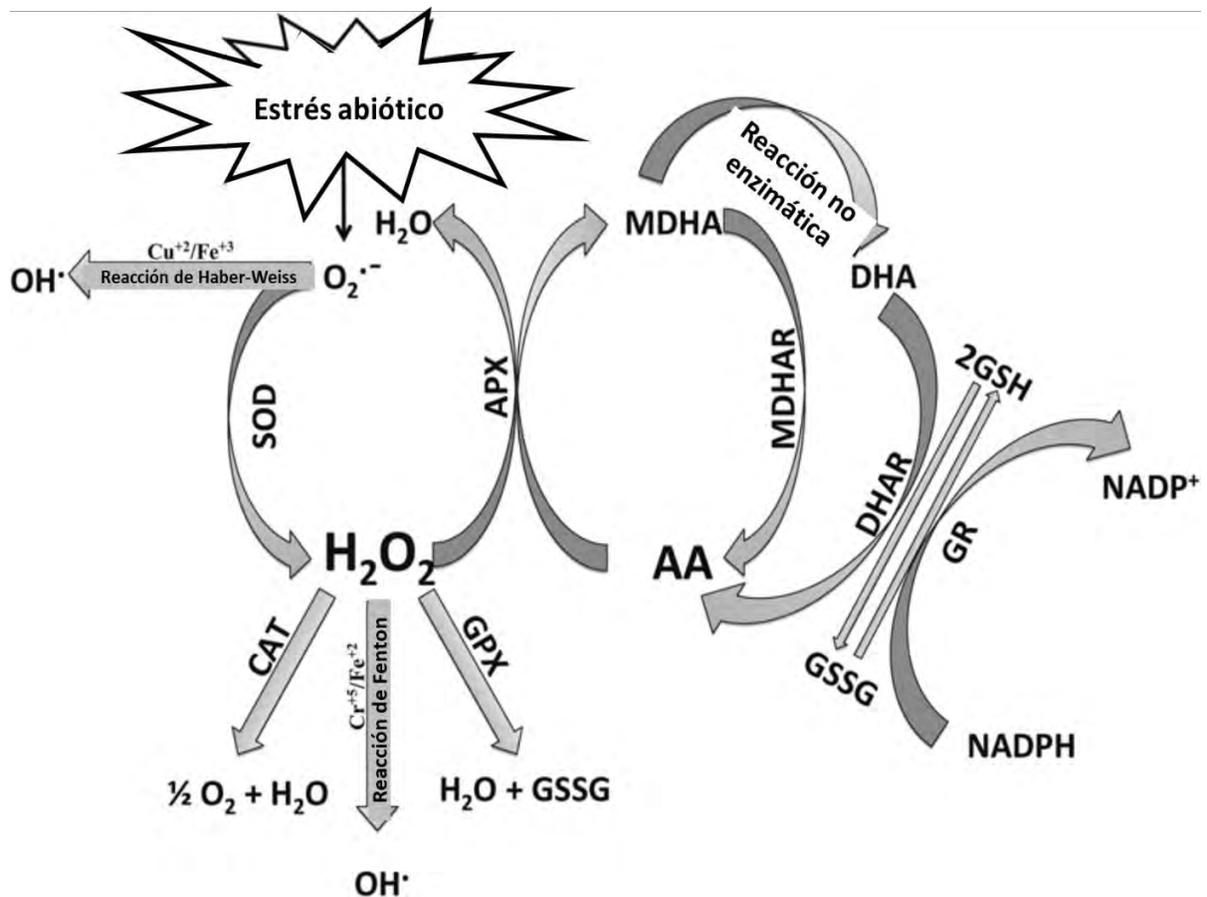
monodehidro-ascorbato reductasa (MDAR), GR, glutatión peroxidasa (GPX), peroxidasas (POD), entre otras (Tabaldi *et al.*, 2009; Revisado en: Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Gill y Tuteja, 2010), y otros mecanismos antioxidantes no enzimáticos como los tocoferoles, el ácido ascórbico, el glutatión (GSH), taninos, flavonoides, carotenoides y precursores de lignina (Revisado en: Matsumoto y Motoda, 2012; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012) que intervienen en la protección y, en consecuencia, en el mantenimiento del balance oxidante/antioxidante (González *et al.*, 2008). Por ejemplo, las SODs actúan como la primera línea de defensa contra las ROS, dismutando el  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , esta reacción es 10,000 veces más rápida que la dismutación espontánea. La sobrerregulación de esta enzima tiene un papel fundamental en la sobrevivencia de las plantas expuestas a factores de estrés bióticos y abióticos (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010). Se ha observado que en plantas de *A. thaliana* tratadas con Cd y en plantas de *O. sativa*, tratadas con Cd y Al, se incrementa la actividad de esta enzima (Skorzynska-Polit *et al.*, 2003; Hsu y Kao, 2004; Meriga *et al.*, 2004). Entre los inhibidores de las SOD's se encuentran el KCN y el  $H_2O_2$  (Gill y Tuteja, 2010).

La CAT, la APX y la GR subsecuentemente contribuyen a la eliminación del  $H_2O_2$  (De Sousa *et al.*, 2016), estas dos últimas enzimas, entran en un sistema importante de detoxificación; el ciclo del ascorbato-glutatión. Dicho sistema se encuentra en casi todos los organelos celulares, juega un papel central en la integración de la señalización redox y se considera la principal ruta de eliminación del  $H_2O_2$ , asociada a una elevada afinidad de la APX por esta molécula, este ciclo se compone de una serie de reacciones redox que incluyen: la oxidación de glutatión (GSH) y del ascorbato (ASC) por  $H_2O_2$  (Revisado en: Mittler, 2002; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012) (Fig. 5). De igual forma, la actividad de APX y GR aumenta durante distintas condiciones de estrés (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010). La actividad de APX aumenta con la exposición a Cd y Al en plantas de *Triticum aestivum* y *Avena sativa* respectivamente (Khan *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2013). Además, se ha observado que la exposición a altas concentraciones de Fe en plantas de *A. thaliana*, induce la sobreexpresión del gen (*AtAPX1*) que codifica para esta enzima en hojas (Fourcroy *et al.*, 2004). Asimismo, la acumulación de  $H_2O_2$  durante choque térmico, aumenta la actividad de APX en plántulas de arroz (Hsu y Kao, 2007). No obstante, se ha

observado que el tratamiento con Hg reduce la actividad de las isoformas APX-a y APX-b en plántulas de arroz (Chen *et al.*, 2012).

La GR tiene una función esencial en el sistema de defensa contra las ROS ya que cataliza la reducción de GSH (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010). Se ha observado un incremento en la actividad de esta enzima en plantas de *T. aestivum* tratadas con Cd (Khan *et al.*, 2007), de igual forma, se encontró mayor tolerancia al tratamiento con Al en plantas transgénicas de *A. thaliana* las cuales sobreexpresaban el gen que codifica para esta enzima (*AtGRI*) (Yin *et al.*, 2017). Yang *et al.* (2016) encontraron que el tratamiento con distintas combinaciones de Zn, Fe y Cu en plantas de trigo aumentó la actividad de GR en raíces.

La CAT es indispensable para la eliminación de ROS en condiciones de estrés y presenta diversas isoformas dependiendo de la especie, las cuales tienen expresión y regulación independiente. (Gill y Tuteja, 2010). En el caso del maíz CAT1 y CAT2 se localizan en peroxisomas y citosol, mientras CAT3 se encuentra en la mitocondria (Scandalios *et al.*, 1997). Se ha observado que la exposición de plantas de *T. aestivum* a Cd aumenta la actividad de CAT (Khan *et al.*, 2007), sin embargo la actividad de esta enzima se inhibe al exponer raíces de *Allium cepa* a Al (Achary *et al.*, 2008).



**Fig. 5 Mecanismos del sistema antioxidante.** El estrés abiótico provoca la producción del radical superóxido y este es dismutado por la enzima superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno, este a su vez es eliminado por enzimas como la catalasa, la glutatión peroxidasa y la ascorbato peroxidasa. Esta última requiere de moléculas de ascorbato que son reducidas por la monodehidroascorbato reductasa y la dehidroascorbato reductasa, las cuales necesitan de moléculas de glutatión, que son reducidas finalmente, por la glutatión reductasa usando NADPH. Modificado de: Gill y Tuteja, 2010.

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  $O_2$  y el  $H_2O$ , acompañados de liberación de calor (Benavides *et al.*, 2009).

Ya se ha documentado que las plantas regulan la actividad del sistema antioxidante durante la exposición a aluminio (Revisado en: Singh *et al.*, 2017), y se ha relacionado la sobreexpresión de genes que codifican para enzimas del sistema antioxidante, así como el aumento de la actividad de las mismas en la tolerancia a este metal. Este comportamiento,

en particular, se ha descrito en plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) en las que la sobreexpresión de un gen que codifica para la dehidroascorbato reductasa, aumenta los niveles de ascorbato y a su vez la tolerancia a aluminio en esta especie (Yin *et al.*, 2010). De igual forma, se observó una mayor expresión de los genes relacionados con el metabolismo del ascorbato en plantas de *Triticum aestivum* (trigo) tolerantes a aluminio (Houde y Diallo, 2008).

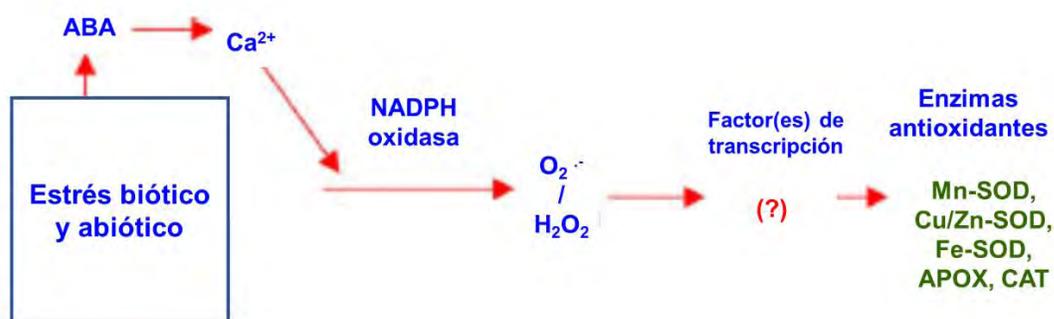
#### **4.4 Ácido abscísico (ABA) y su función en el balance REDOX**

Las fitohormonas además de participar en procesos como el desarrollo y elongación de las raíces, también ayudan a mediar las respuestas al estrés biótico y abiótico. En muchos estudios, se ha demostrado que las fitohormonas (como el etileno y las auxinas) están involucradas en la inhibición del crecimiento radicular inducida por Al, además de que pueden modificar el transcriptoma y activar genes de tolerancia al aluminio (Revisado en: Kopittke, 2016; Kopittke *et al.*, 2016; Daspute *et al.*, 2017). Una de las fitohormonas que regula la resistencia al estrés abiótico es el ABA, el cual coordina una serie de funciones que les permiten a las plantas resistir a los diferentes factores de estrés (Revisado en: Sah *et al.*, 2016). Esta hormona es un isoprenoide sintetizado a partir de xantofilas (Revisado en: Liotenberg *et al.*, 1999; Hung y Kao, 2004) el cual, está involucrado en el cierre estomático, en la germinación, la latencia, la senescencia, entre otros procesos. Además, aumenta sus niveles dentro de las plantas cuando estas están sometidas a algún factor de estrés, induciendo la resistencia en las mismas (Agarwal *et al.*, 2005; Sah *et al.*, 2016; Kopittke, 2016). Este aumento en los niveles de ABA también ha sido observado en plantas expuestas a aluminio como en el caso de las raíces de *Hordeum vulgare* tratadas con 20  $\mu\text{M}$  de Al y de los ápices de soya expuestos a 30  $\mu\text{M}$  de Al (Revisado en: Kopittke, 2016). Estos incrementos permiten la unión del ABA con su receptor para iniciar la transducción de señales que conducen a la tolerancia al factor de estrés (Sah *et al.*, 2016).

Así mismo, se ha encontrado que la aplicación de ABA exógeno puede activar la liberación de ácidos orgánicos en algunas especies y ayudar a la recuperación del crecimiento

radicular en plantas de soya tratadas con aluminio (Revisado en: Daspute *et al.*, 2017). Además se ha observado que la expresión de genes implicados en la tolerancia a aluminio como: *AtALMT1*, *ALS3*, *FeALS3* y *STAR 1* es regulada positivamente por los altos niveles endógenos de esta hormona (Reyna-Llorens *et al.*, 2015; Roselló *et al.*, 2015; Daspute *et al.*, 2017) Así mismo, se encontró que el factor de transcripción DREB1A y los genes regulados por DREB1A son regulados por ABA en *Arabidopsis thaliana* durante la exposición a aluminio, estos genes al estar involucrados en las respuestas a estrés abiótico pueden estar implicados en la tolerancia al metal (Sawaki *et al.*, 2016).

Además de regular la expresión de genes implicados en la secreción de ácidos orgánicos, el ABA también regula la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como la Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD, CAT, entre otros (Revisado en: Jiang y Zhang, 2004) lo que resulta en el aumento de las actividades de SOD, APX, GR, CAT y POD; además de incrementar los niveles de antioxidantes no enzimáticos como ascorbato, glutatión reducido,  $\alpha$ -tocoferoles y carotenoides, estos aumentos han sido observados en plantas como el arroz, el maíz, el tabaco, el trigo, entre otras (Hung y Kao, 2004; Jiang y Zhang, 2004; Agarwal *et al.*, 2005). El ABA regula la expresión de estos genes de defensa antioxidante a través de una cascada de señalización mediada por  $H_2O_2$  como segundo mensajero, el cual a su vez, es producido por la actividad de la NADPH oxidasa, activada por altos niveles de calcio, los cuales también pueden ser incrementados por  $H_2O_2$  formando así una red de señalización (Fig. 6) (Agarwal *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

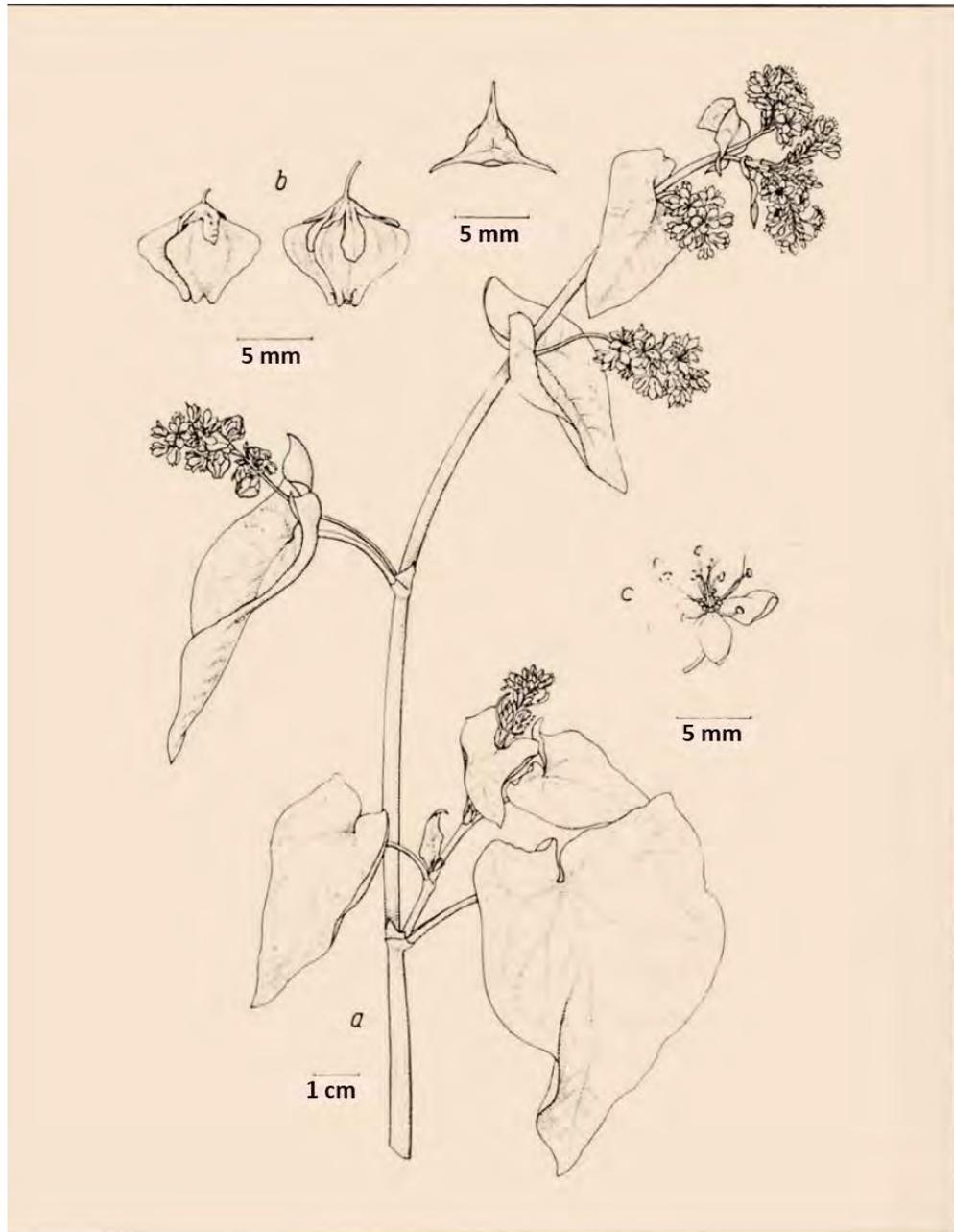


**Fig. 6 Red de señalización por ABA** para inducir la actividad de las enzimas del sistema antioxidante. Modificado de: Agarwal *et al.*, 2005.

El ABA además de regular la respuesta al estrés mediante segundos mensajeros como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, también regula la expresión de genes mediante la activación de factores de transcripción como AREBs (ABA- responsive element binding proteins) / ABFs (ABRE-binding factor), ABI5 (ABA insensitive 5), MYB (Myelocytomatosis), NAC (NAM: no apical meristem; ATAF: *Arabidopsis thaliana* activation factor; CUC: cup-shaped cotyledon) y ERF (ethylene response factor) los cuales están involucrados en la respuesta de esta hormona al estrés en plantas (Sah *et al.*, 2016).

#### **4.5 *Fagopyrum esculentum* como planta modelo en el estudio de la tolerancia a Al<sup>3+</sup>**

*Fagopyrum esculentum* pertenece a la familia Polygonaceae, es una herbácea anual con un ciclo de vida corto (2-3 meses), mide aproximadamente 60 cm, es ramificada y glabra. Tiene hojas pecioladas alternadas que miden de 2.5-7 cm de largo, las hojas superiores son más pequeñas y sésiles. Tiene inflorescencias terminales y axilares en corimbos densos o cimas paniculadas. Las flores son de color blanco o rosado, con 6 mm de diámetro y el fruto es un aquenio, de color marrón o negro-marrón (Fig. 7) (Revisado en: Campbell, 1997; Wang *et al.*, 2017).



**Fig. 7** *Fagopyrum esculentum* Moench. a) Rama con inflorescencias, b) frutos y c) flores. Tomado de (Campbell, 1997).

El nombre común de *F. esculentum* es trigo sarraceno o alforfón, es originario de Asia y se ha utilizado como un cultivo de importancia secundaria en muchos países como Rusia, China, Ucrania y Kazajistán (Zhao *et al.*, 2018), sin embargo, es sembrado en casi todas las regiones donde se cultivan los cereales (Campbell, 1997). Su nombre en inglés

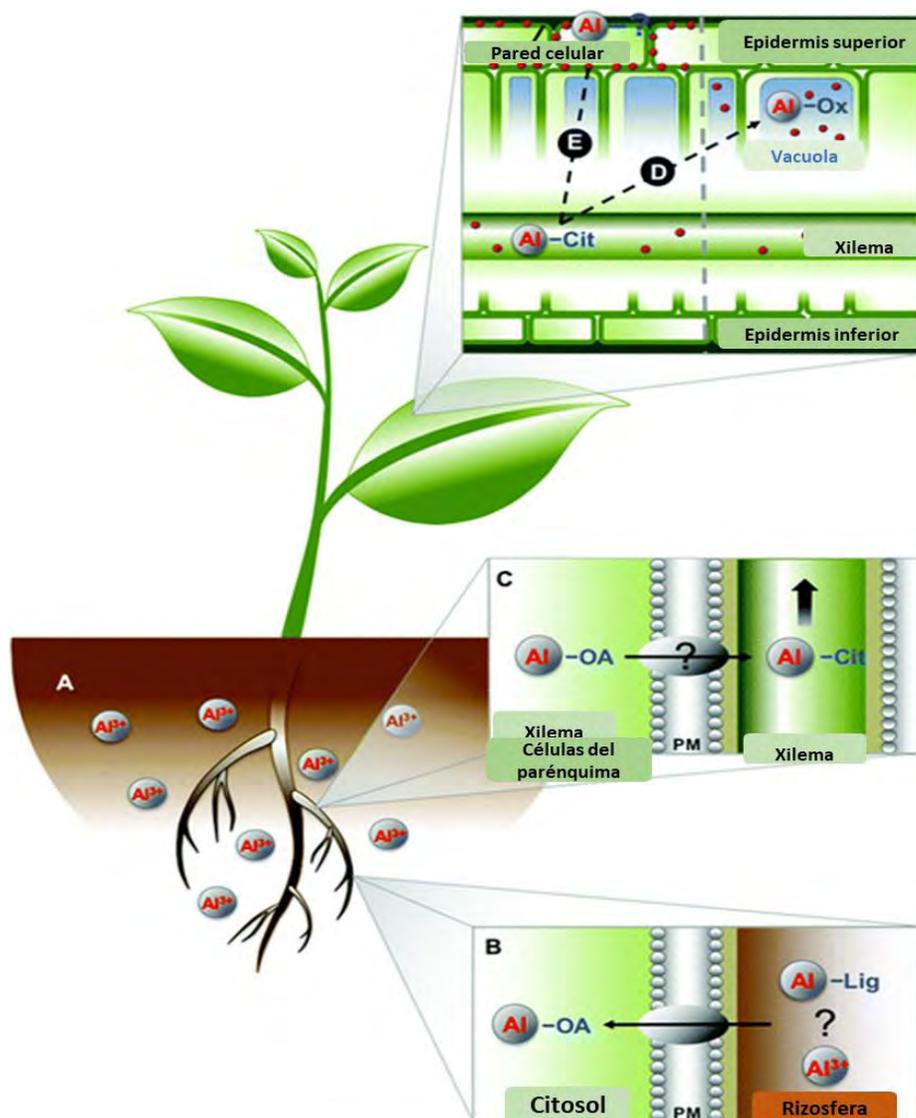
“buckwheat” proviene de la palabra anglosajona *boc* (haya) y *whoet* (trigo) ya que la semilla se asemeja a una pequeña nuez de haya (Ratan y Kothiyal, 2011).

Es utilizada como un cultivo multipropósito, ya que los brotes y las hojas pequeñas se consumen como verdura, las semillas que poseen un alto valor nutritivo, son utilizadas para hacer harina, se extrae miel con propiedades antioxidantes y de las flores y las hojas se extrae la rutina (quercetin-3-O-rutinoside) para uso medicinal (Campbell, 1997; Jacquemart *et al.*, 2012). La rutina es el glucósido flavonoide más abundante en el alforfón común, y en él se han encontrado propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, antihemorrágico y protector de vasos sanguíneos (Baumgertel *et al.*, 2010; Jacquemart *et al.*, 2012). Además de este flavonoide, *F. esculentum*, también tiene compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, D-fagomina y otros flavonoides como la quercetina y el kaempferol, los cuales tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales o se consideran antidiabéticos (Zhao *et al.*, 2018). 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, la cual tiene un alto valor nutricional (ya que presenta altas concentraciones de proteínas, lípidos, minerales y vitaminas), se elaboran: galletas, fideos, panes, entre otros productos (Revisado en: Campbell, 1997; Jacquemart *et al.*, 2012).

Esta planta tiene la capacidad de crecer en suelos pobres en nutrientes y con altas concentraciones de Cu, Zn y Pb, acumulando éste último en raíces, tallo y hojas (Campbell, 1997; Tani y Barrington, 2005; Tamura *et al.*, 2005). Así mismo, *F. esculentum* es una de las plantas que ha desarrollado estrategias para tolerar altas concentraciones de aluminio, se ha documentado en esta planta la exudación de ácido oxálico de las puntas de sus raíces para excluir al metal, además de su acumulación en las células de las hojas en un complejo no tóxico Al-oxalato (1:3) (Ma *et al.*, 1997; Yokosho *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

El Al entra en la raíz en su forma iónica como  $Al^{3+}$ . Una vez que cruza la membrana plasmática, el  $Al^{3+}$  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 (1:1) (Ma *et al.*, 2001; Yokosho *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017). 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, donde permanece inmóvil (Ma *et al.*, 2001; Yokosho *et al.*, 2014) (Fig. 8). Se ha descrito que la concentración de Al en las hojas cotiledonares es de aproximadamente  $12.2 \text{ mg/g}^{-1}$  y de hasta  $15,000 \text{ mg Kg}^{-1}$  en las hojas maduras de esta especie cultivada en suelo ácido (Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017).



**Fig. 8 Captación y distribución del Al en la planta acumuladora de aluminio: *Fagopyrum esculentum*.** Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; OA, ácido orgánico; PM, membrana plasmática; Lig, ligando. Modificado de: Grevenstuk y Romano, 2013.

## 4.6 Antecedentes

Se han realizado diversos estudios en *F. esculentum* sobre el mecanismo interno de desintoxicación por Al, los cuales se centran en la captación del Al por las raíces, su transporte y almacenamiento en las hojas (Ma *et al.*, 1998; Ma y Hiradate, 2000; Shen y Ma, 2001; Shen *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006; Klug *et al.*, 2011). Así mismo, se realizaron investigaciones para conocer el mecanismo de exudación de ácidos orgánicos y su importancia en la tolerancia al aluminio en esta especie (Zheng *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006).

Recientemente, Yokosho *et al.* (2016) caracterizaron el gen *FeIREG1*, el cual está involucrado en la desintoxicación interna del aluminio, ya que participa en la vacuolización del aluminio en las puntas de las raíces del trigo sarraceno.

De igual forma, se identificaron dos transportadores tipo ABC; FeALS1.1 y FeALS1.2 involucrados en la desintoxicación interna del aluminio en raíz y hoja, respectivamente (Lei *et al.*, 2017a) y dos genes *MATE* involucrados en la secreción de citrato de las raíces (*FeMATE1*) y en el transporte de citrato en raíces y hojas por la exposición a aluminio (*FeMATE2*) (Lei *et al.*, 2017b).

Además se realizaron análisis transcriptómicos entre los que se encuentran: un análisis del transcriptoma del ápice de la raíz expuesto a 20  $\mu$ M de Al, donde se identificaron 30 genes de transportadores y 27 de factores de transcripción (Xu *et al.*, 2017); un análisis del transcriptoma de las hojas de *Fagopyrum* expuesta a 20  $\mu$ M de Al, en el cual se encontraron 78 genes sobreexpresados de transportadores que incluyen a homólogos de *AtMATE*, *ALS1*, *STAR1* y *ALS3* (Chen *et al.*, 2017); y un análisis del transcriptoma de raíces y hojas utilizando la secuenciación del RNA (RNA-seq), en la que se observó la sobreexpresión de genes como: *FeSTAR1*, *FeALS3*, *FeALS1*, *FeMATE1* y *FeMATE2* (Yokosho *et al.*, 2014).

Finalmente, Franzaring *et al.* (2018) realizaron un estudio para probar la capacidad de *F. esculentum* como fitoestabilizadora en los suelos contaminados por los residuos de la minería, encontrando que esta especie puede ser cultivada en este tipo de suelos ya que sólo el litio y el arsénico se encontraron disponibles en la parte aérea en bajas concentraciones y de igual forma, los niveles de metales dentro de la semilla fueron muy bajos.

Como antecedentes inmediatos, en el laboratorio se realizó un análisis de crecimiento durante todo el ciclo de vida de *F. esculentum*, en este estudio no se encontraron diferencias en el crecimiento y fotosíntesis de plantas control y las expuestas a 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de Al (Martínez-Rendón, 2013). Asimismo, se realizó la caracterización de un transportador tipo ABC y se determinó su expresión a nivel transcripcional con los niveles de ABA, esto conjuntamente con la cuantificación de la exudación de ácidos orgánicos en la etapa de plántula (Reyna-Llorens *et al.*, 2015).

Finalmente, se realizó un estudio para conocer a través de análisis de microarreglos los genes involucrados en la tolerancia a este metal, en éste se encontró que el tratamiento con Al indujo la sobreexpresión de genes que codifican para transportadores de metales como: *ZIP10 (ZINC TRANSPORTER 10 PRECURSOR)*, *ATMRP1 (MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1)*; *YSL1 (YELLOW STIPE LIKE 1)* y *MATE (MULTI-ANTIMICROBIAL EXTRUSION PROTEIN)*; genes de respuesta antioxidante como *TH2 (THIOREDOXIN F2)*; genes implicados en la ligación de metales en el citoplasma *PCSI (PHYTOCHELATIN SYNTHASE 1)*; y genes que codifican para proteínas implicadas en la síntesis o percepción de la hormonas como *ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR-2)*, *ASA1 (ANTHRANILATE SYNTHASE 1)* y *ZEP (ZEAXANTHIN EPOXIDASE)* (González-Trillo, 2018).

En *Fagopyrum esculentum*, la mayoría de las investigaciones se han enfocado a estudiar ampliamente los mecanismos externos e internos de tolerancia al aluminio en la etapa adulta. Por los antecedentes generados en nuestro grupo de trabajo, se ha observado que en la etapa de plántula se presentan síntomas de sensibilidad al metal (i.e. inhibición del crecimiento radicular, Reyna-Llorens *et al.*, 2015), sin embargo no se han investigado los potenciales mecanismos de tolerancia durante esta etapa que le permiten a la planta, continuar con su crecimiento, aún y cuando el metal ya ha penetrado en las raíces. Uno de los mecanismos que puede ser esencial para la tolerancia al aluminio en esta etapa de plántula es el sistema antioxidante, el cual puede estar regulado por el incremento de los niveles de ABA.

Con base en los antecedentes mencionados, en este trabajo se propone la siguiente hipótesis:

## **V. Hipótesis**

Si *Fagopyrum esculentum* es una planta tolerante al aluminio, al ser expuesta a este metal en la primer etapa de su desarrollo, los niveles de ABA aumentarán en sus raíces lo que inducirá la actividad del sistema antioxidante, para así contrarrestar el estrés oxidativo y recuperar su tasa de crecimiento radicular.

## **VI. Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la respuesta antioxidante en las raíces de *F. esculentum* al estrés por aluminio, y determinar si esta misma está mediada por niveles de ABA durante la primer etapa de su desarrollo.

### **Objetivos particulares**

- 1) Evaluar la tasa de crecimiento radicular de las plántulas de *F. esculentum* en estrés por Al durante las primeras 48 h.
- 2) Evaluar la penetración y acumulación de Al en las puntas de las raíces durante las primeras 48 h.

- 3) Evaluar la capacidad antioxidante a través de la determinación de la actividad de las enzimas CAT, SOD, APX y GR en las puntas de las raíces durante las primeras 48 h de exposición a Al.
- 4) Determinar la localización y acumulación de ROS en las puntas de las raíces en estrés por Al durante las primeras 48 h.
- 5) Evaluar el daño celular producido por el aluminio dentro de las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) durante las primeras 48 h.
- 6) Cuantificar los niveles endógenos de ABA en las puntas de las raíces en estrés por Al durante las primeras 48 h.
- 7) Confirmar la inducción de la actividad enzimática del sistema antioxidante mediante la aplicación de ABA exógeno a las plántulas durante las primeras 48 h.
- 8) Determinar la localización y acumulación de ROS en las puntas de las raíces expuestas a ABA exógeno durante las primeras 48 h.

## VII. Metodología

Las semillas de *F. esculentum* cv. Mancan se compraron en Wildlife Management Solutions, Inc. Alberta, Canadá.

### Bioensayos con plántulas de *F. esculentum* expuestas a Al

Las semillas se germinaron en agar al 1 % en cajas Petri por 48 h en la oscuridad en una estufa (Binder) a 27 °C, posterior a este período, las plántulas se aclimataron en una solución de CaCl<sub>2</sub> (Sigma) 0.5 mM pH 4.5 durante 1 h, después de este tiempo se colocaron en hidroponía en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM pH 4.5 para el control y CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM más 50 µM de AlCl<sub>3</sub> (Sigma) pH 4.5 para el tratamiento, ambos permanecieron 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 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y una concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico de aproximadamente 390 ppm durante las primeras 48 h de tratamiento (3, 6, 12, 24 y 48 h).

#### 7.1 Evaluación de la tasa de crecimiento radicular relativo

Para determinar si el Al afecta el crecimiento de las raíces se realizó un análisis de crecimiento radicular relativo, y para ello, se midió la longitud total (en mm) de las raíces de *F. esculentum* a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento en las condiciones antes mencionadas, posteriormente a partir de los datos obtenidos, se calculó la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) con respecto al control (sin AlCl<sub>3</sub>) mediante la siguiente fórmula:

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

En dónde:

$\Delta E_{t_n} = E_{t_n} - E_{t_{n-1}}$  y  $\Delta E_{c_{t_n}} = E_{c_{t_n}} - E_{c_{t_{n-1}}}$  (siendo  $E_c$  y  $E_t$  el incremento en la elongación radicular para el control y el tratamiento respectivamente y  $t_n$  un tiempo determinado) (Chandran *et al.*, 2008).

## 7.2 Evaluación de la penetración y acumulación de aluminio

Para evaluar la penetración y acumulación de aluminio en las puntas de las raíces de *F. esculentum*, se utilizó la técnica con hematoxilina modificada (Choudhury y Sharma, 2014). Después de los diferentes tiempos de exposición a Al y bajo las condiciones antes mencionadas, las plántulas de cada tratamiento se lavaron con agua destilada por 15 min, posteriormente, se tiñeron con una solución de hematoxilina (MCB) 0.1 % p/v disuelta en  $\text{KIO}_3$  0.01 % p/v durante 15 min y finalmente fueron lavadas en agua destilada por 15 min nuevamente.

Siguiendo la metodología de tinción se cortaron 15 puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) por cada tratamiento y se colocaron en 500  $\mu\text{L}$  de HCl 1 N durante 1 h para desteñirlas, transcurrido este tiempo se procedió a medir la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50), y como blanco se utilizó HCl 1 N. La penetración de aluminio se determinó por el incremento de la absorbancia, calculado como: absorbancia de los tratamientos/ absorbancia del control.

## 7.3 Actividad de las enzimas del sistema antioxidante durante el estrés por Al

Para evaluar el sistema antioxidante en las puntas de las raíces de *F. esculentum* se midió la actividad de algunas de las enzimas del sistema antioxidante como CAT, SOD, APX y GR. Se realizaron 3 réplicas biológicas para medir la actividad de cada enzima.

Después de cada tiempo de tratamiento bajo las condiciones mencionadas, se cortaron 30 puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de las plántulas de todos los tratamientos, se congelaron y se molieron con nitrógeno líquido para posteriormente almacenarse en microtubos en un ultracongelador (REVCO) a  $-70$  °C, para posteriormente medir la actividad de cada una de las enzimas.

### **Extracción y cuantificación de proteína citoplásmica**

Para llevar a cabo la extracción de proteína se utilizó un amortiguador de Tris(hidroximetil)aminometano (Sigma) 50 mM para medir CAT y un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 para medir GR y APX que contenía 0.5 mM de EDTA, 1 % (w/v) polivinilpirrolidona (PVP) y 0.5 % (v/v) Tritón. Se añadieron 800  $\mu$ L de este amortiguador al tejido molido previamente con nitrógeno líquido, y se molió con un homogeneizador de tejido (Tissue Master 125 homogenizer Omni International) por 30 s, posteriormente se centrifugó a 1000 x g durante 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó por un filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 con un límite de peso molecular nominal (NMWL) de 10,000, Millipore, para concentración y purificación de las muestras, ya en estas columnas, se centrifugó a 16 000 x g durante 10 min a 4 °C, finalmente el extracto obtenido se diluyó en 300  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0.

La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro UV-Visible (Varian Cary 50).

#### **6.3.1 Medición de la actividad de CAT (EC. 1.11.1.6)**

Para medir la reacción de esta enzima se añadió el volumen necesario de extracto proteico para obtener 30  $\mu$ g de proteína ( $\approx 30$   $\mu$ L), 200  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.0 hasta completar 1 mL ( $\approx 770$   $\mu$ L). El último reactivo que se agregó fue el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esta reacción se preparó en fresco, en una celdilla de cuarzo a temperatura

ambiente. La lectura de reacción se tomó cada 30 s hasta completar 3 min (Verma y Dubey, 2003).

La actividad de CAT 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Aebi, 1984; Castillos *et al.*, 2011).

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula (Hernández-Pérez, 2014):

$$\text{Actividad} = m \text{ (abs/min)} * \text{Vol. Reacción (mL)} * 60 / \epsilon \text{ (L/mmol*cm)} * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}$$

En dónde:

m= pendiente

$\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### 6.3.2 Medición de la actividad de SOD (EC. 1.15.1.1)

Para medir la reacción se añadió el volumen necesario de extracto proteico para obtener 30  $\mu\text{g}$  de proteína ( $\approx 30 \mu\text{L}$ ), 200  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 mM, 50  $\mu\text{L}$  de epinefrina 0.01 M y amortiguador de carbonatos 50 mM pH 10.2 hasta completar 1 mL ( $\approx 720 \mu\text{L}$ ). El último reactivo que se agregó fue la epinefrina, esta reacción se preparó en fresco, en una celdilla de cuarzo a temperatura ambiente. La lectura de reacción se tomó cada 30 s hasta completar 13 min (Misra y Fridovich, 1972).

La autoxidación de la epinefrina se determinó a 480 nm, considerando solo lecturas después de la fase lag (6–8 min) y con el coeficiente de extinción de  $4.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula (Hernández-Pérez, 2014):

$$\text{Actividad} = \frac{m \text{ (abs/min)} * \text{Vol. Reacción (mL)}}{\epsilon \text{ (L/mmol*cm)} * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}} * 60$$

En dónde:

m= pendiente

$\epsilon = 4.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinción molar de la epinefrina)

### 7.3.2.1 Cuantificación del radical superóxido

Para cuantificar los niveles del radical superóxido, se calculó la pendiente inicial de la curva de oxidación de la epinefrina utilizando los valores desde la primera lectura hasta el valor más alto de la curva, con este dato, la concentración de proteína y el coeficiente de extinción de la epinefrina, se determina la concentración de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  mediante la siguiente fórmula:

$$C = m / \text{proteína (mg)} * \epsilon$$

En dónde:

m = pendiente inicial

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de la epinefrina

### 6.3.3 Medición de la actividad de APX (EC. 1.11.1.11)

Para medir la reacción de esta enzima se añadió el volumen necesario de extracto proteico para obtener 15  $\mu\text{g}$  de proteína ( $\approx 15 \mu\text{L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM, 50  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10 mM y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 hasta completar 1 mL ( $\approx 925 \mu\text{L}$ ). El último componente que se agregó fue el extracto proteico, esta reacción se preparó en

fresco, en una celdilla de cuarzo a temperatura ambiente. La lectura de reacción se tomó a 290 nm cada 20 s hasta completar 1 min (Nakano y Asada, 1981).

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula (Hernández-Pérez, 2014):

$$\text{Actividad} = m \text{ (abs/min)} * \text{Vol. Reacción (mL)} * 60 / \epsilon \text{ (L/mmol*cm)} * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}$$

En dónde:

m= pendiente

$\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinción molar del ácido ascórbico)

#### 6.3.4 Medición de la actividad de GR (EC. 1. 6. 4. 2)

Para medir la reacción se añadió el volumen necesario de extracto proteico para obtener 30  $\mu\text{g}$  de proteína ( $\approx 30 \mu\text{L}$ ), 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  100 mM, 50  $\mu\text{L}$  de GSSG (Glutación disulfuro) 10 mM, 15  $\mu\text{L}$  de NADPH 10 mM y amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0 hasta completar 1 mL ( $\approx 885 \mu\text{L}$ ). El último componente que se agregó fue el NADPH, esta reacción fue preparada en fresco, en una cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. La lectura de reacción se tomó a 340 nm cada 20 s hasta completar 3 min (Schaedle y Bassham, 1977).

La actividad se calculó mediante la siguiente fórmula (Hernández-Pérez, 2014):

$$\text{Actividad} = m \text{ (abs/min)} * \text{Vol. Reacción (mL)} * 60 / \epsilon \text{ (L/mmol*cm)} * 1 \text{ cm} * \text{proteína (mg)}$$

En dónde:

m= pendiente

$\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Coeficiente de extinción molar del NADPH)

#### **7.4 Localización de las especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para observar la localización y producción de ROS en las puntas de las raíces de *F. esculentum*, se realizó una tinción con diacetato de 2', 7' diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA).

Después de los diferentes tiempos de exposición bajo las condiciones antes mencionadas, las plántulas de cada tratamiento se lavaron con agua destilada, y posteriormente se tiñeron con una solución de H<sub>2</sub>DCFDA 25  $\mu$ M (Sigma) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) durante 20 min, después de este tiempo se lavaron en agua destilada y se colocaron en un amortiguador TRIS-HCl 10 mM pH 7.2 durante 20 min (Behl *et al.*, 1994), finalmente se cortaron las puntas de las raíces ( $\approx$  1 cm) y se observaron 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 Unidad de Servicios de Apoyo a la investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM.

#### **7.5 Evaluación de la viabilidad celular en las puntas de las raíces**

Con el fin de evaluar la viabilidad celular en las puntas de las raíces ( $\approx$  1 cm) de *F. esculentum* se realizó una tinción vital con Diacetato de fluoresceína (FDA) y Yoduro de propidio (IP) (Jones y Senft, 1985).

Después de los diferentes tiempos de exposición bajo las condiciones antes mencionadas, las plántulas de cada tratamiento se lavaron con amortiguador DPBS (el cual contiene NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM), y posteriormente, se tiñeron en una solución de FDA (Sigma) (0.2 mg/ 10 mL de PBS) durante 3 min, después de esta tinción, se lavaron con amortiguador DPBS y posteriormente se tiñeron con una solución de IP (1mg/ 50 mL PBS) por 10 min, finalmente se lavaron nuevamente con amortiguador DPBS y se cortaron las puntas de las raíces ( $\approx$  1 cm) para ser observadas en un estereomicroscopio Nikon SMZ 1000 adaptado a una cámara Nikon Digital Sight DS-5M utilizando una longitud de excitación de 450 nm y un filtro de emisión de 510 nm para la visualización de la fluoresceína.

## **7.6 Cuantificación de los niveles endógenos de ABA**

Para realizar la cuantificación de los niveles endógenos de ABA, después de obtener el tejido bajo las condiciones antes mencionadas, se realizó una extracción con metanol absoluto en relación 1:100 (mL de metanol : mg de tejido), los microtubos con las muestras se envolvieron en papel aluminio y se mantuvieron en agitación continua durante 24 h a 4 °C, posterior a la incubación, las muestras se centrifugaron a 1700 x g durante 10 min a 4 °C, después del tiempo de centrifugación se recuperó el sobrenadante en un microtubo nuevo y se mantuvo en hielo hasta su utilización unos minutos después. Para llevar a cabo la cuantificación se utilizó el estudio comercial de detección de ABA por inmunoensayo Phytodetek® Adgia, siguiendo el protocolo del mismo para determinar por espectrofotometría el porcentaje de unión al anticuerpo del ABA presente en cada muestra. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405 nm, en un espectrofotómetro para microplacas ELISA (BioTek ELx808, Estados Unidos).

## **7.7 Actividad de las enzimas del sistema antioxidante y producción de ROS con la aplicación de ABA exógeno**

### **Bioensayos con ABA exógeno**

Las semillas se germinaron en agar al 1 % en cajas Petri por 48 h en la oscuridad en una estufa (Binder) a 27 °C, posterior a este período, se colocaron en hidroponía en una solución de CaCl<sub>2</sub> (Sigma) 0.5 mM pH 4.5 para el control y CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM más 10 µM de ABA (Sigma) disuelto en etanol absoluto pH 4.5 para el tratamiento (Reyna-Llorens *et al.*, 2015), ambos permanecieron 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 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y una concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico de aproximadamente 390 ppm durante todos los tiempos de tratamiento (3, 6, 12, 24 y 48 h).

Posterior al tratamiento, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes que presentaron aumentos significativos expuestas a 50 µM de AlCl<sub>3</sub>, por lo que solamente se midió la actividad de CAT, APX y GR mediante los métodos espectrofotométricos antes

mencionados (Aebi, 1984; Nakano y Asada, 1981; Schaedle y Bassham, 1977 respectivamente), para ello se utilizaron 30 plántulas por muestra.

De igual forma, posterior al tratamiento, se realizó la tinción fluorescente con H<sub>2</sub>DCFDA mediante el método anteriormente descrito (Behl *et al.*, 1994) para observar la localización y producción de ROS en las puntas de las raíces por la exposición a ABA exógeno. Se utilizaron 12 plántulas por tratamiento.

## **7.8 Análisis estadístico de los resultados**

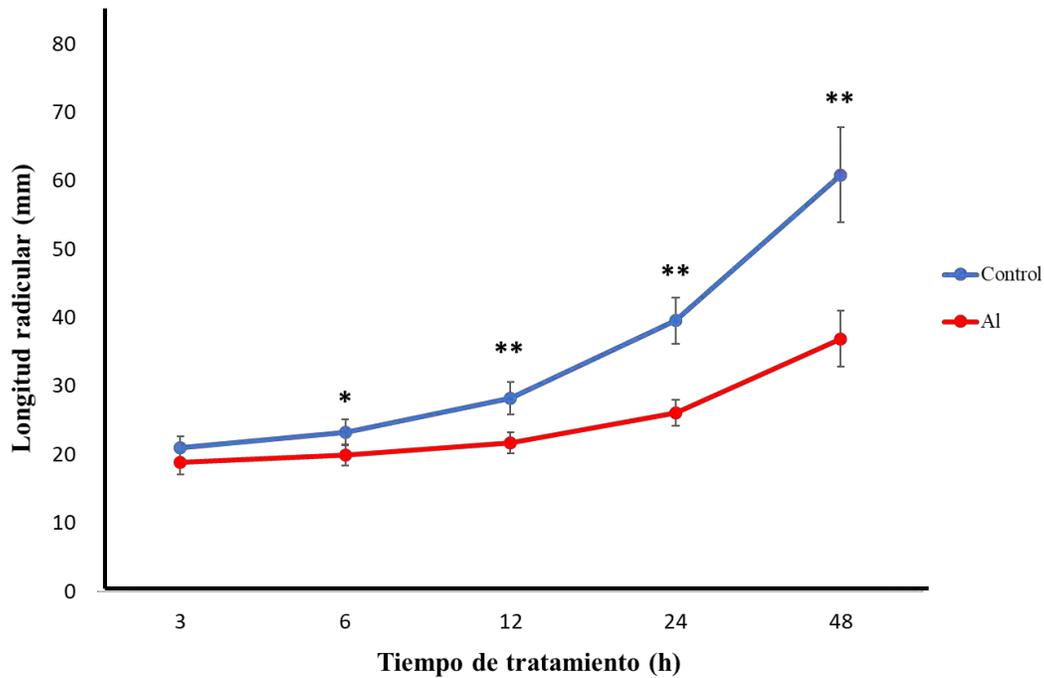
Los resultados se analizaron mediante una prueba *t* para muestras independientes para los datos normales y mediante una prueba U de Mann-Whitney para los datos no normales ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ), en el caso de los resultados de la acumulación de Al en las raíces se compararon mediante un análisis de varianza ANOVA de un sólo factor y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.01$ ). las pruebas de normalidad se realizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk con el software SPSS.

## VIII. Resultados

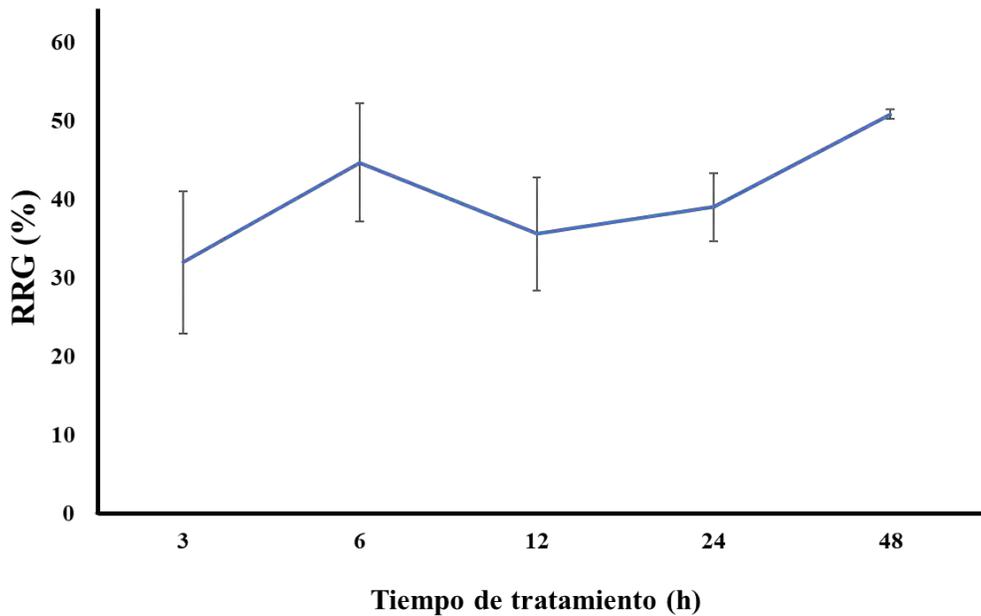
### 8.1 Crecimiento radicular de *F. esculentum* expuesta a Al

Debido a que el primer síntoma de toxicidad por Al es la inhibición del crecimiento radicular se realizó un análisis del crecimiento de las raíces de *F. esculentum* (Fig. 9 ), con éste se pudo observar que desde las 3 h de exposición la longitud de las raíces de las plántulas tratadas con Al fue menor que la del control, y es hasta las 6 h de tratamiento que las raíces con Al tienen una inhibición significativa (55%), comportamiento que se mantuvo desde este tiempo de estudio (6, 12, 24 y 48 h ). Sin embargo, a partir de las 24 h se registró una recuperación en el crecimiento radicular de las plántulas expuestas a Al, el cual se mantuvo hasta las 48 h. En los resultados de la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) (Fig. 10) se observó un comportamiento similar, desde las 3 h de tratamiento se tuvo una reducción del 68 % en la tasa de crecimiento de las raíces expuestas a aluminio con respecto al control y a las 12 h se presentó nuevamente una reducción del RRG del 64 %, sin embargo desde las 24 h de tratamiento se observó una recuperación en la tasa de crecimiento de las raíces que llega hasta el 50 % a las 48 h de exposición al metal.

Estos datos sugieren que durante las primeras horas de exposición a aluminio se inhibió el crecimiento de las raíces de *F. esculentum*, sin embargo, desde las 24 h se comenzó a restablecer la tasa del crecimiento de las mismas.



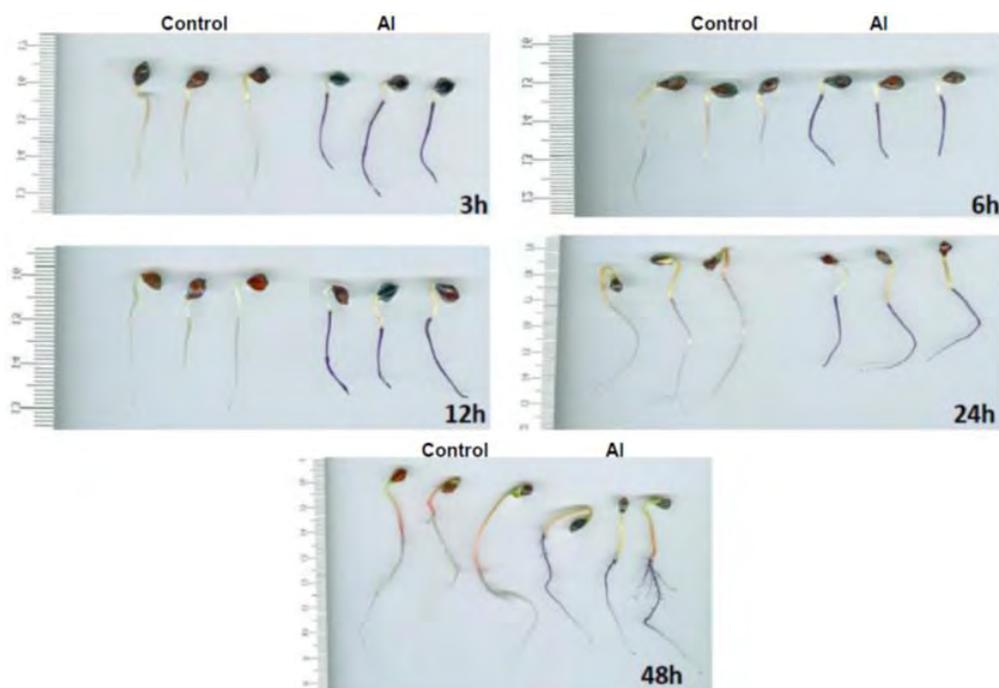
**Fig. 9** Crecimiento radicular de las plántulas de *F. esculentum* durante 48 h de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los datos muestran el promedio de 3 experimentos independientes de  $n=30$ . Las barras representan la desviación estándar. Las diferencias significativas se encontraron mediante una prueba  $t$  para muestras independientes \* ( $p < 0.01$ ) \*\* ( $p < 0.001$ ) entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio.



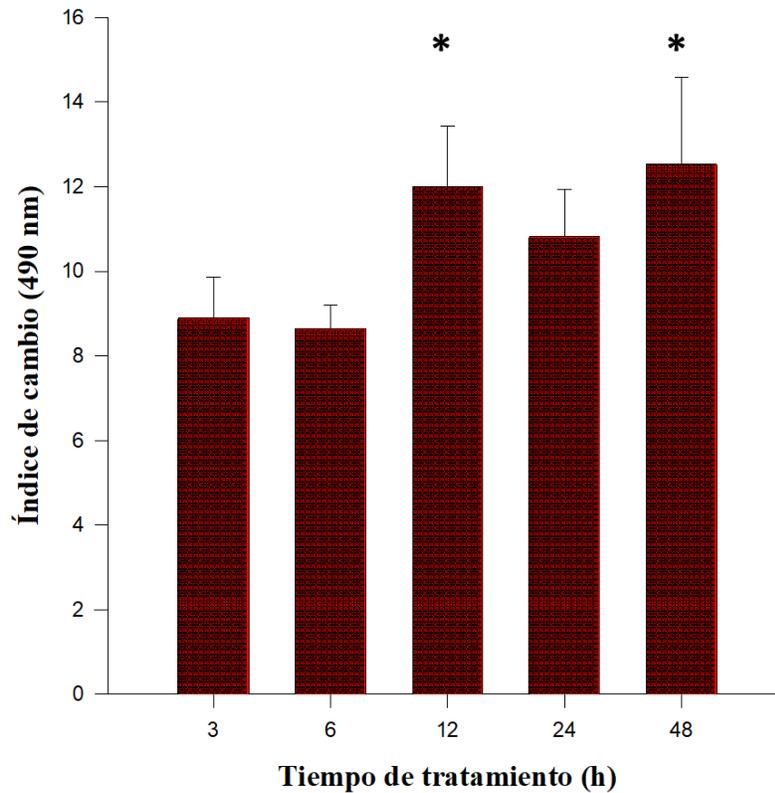
**Fig. 10** Tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) de las plántulas de *F. esculentum* durante 48 h de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes de  $n=90$ . Las barras representan el error estándar.

## 8.2 Penetración y acumulación de Al en las raíces

Para evaluar la entrada y acumulación del aluminio en las puntas de las raíces se utilizó un método espectrofotométrico empleando la tinción con hematoxilina (Fig. 11), la cual, da una coloración azul-violeta cuando forma un complejo con el Al, lo que puede utilizarse como una medida de la toma del metal por las raíces (Yan *et al.*, 2012). El resultado se expresa como: absorbancia de los tratamientos / absorbancia del control, esta relación muestra el incremento de absorbancia dado por la concentración de hematoxilina disuelta. En este experimento se pudo observar, que desde las 3 h de tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  ocurrió una penetración y acumulación de Al en las puntas de las raíces (Fig. 12). La acumulación aumentó significativamente a las 12 h y 48 h de tratamiento, teniendo niveles similares estos dos tiempos. Los resultados indican que la absorbancia no aumentó conforme transcurrió el tiempo de tratamiento, lo que sugiere que la penetración de aluminio no aumentó durante los últimos tres tiempos de estudio (Fig. 12).



**Fig. 11 Tinción con hematoxilina** de las raíces de las plántulas de *F. esculentum* expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 48h.



**Fig. 12 Penetración y acumulación de Al** en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) durante 48 h de exposición a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los resultados muestran el promedio de dos experimentos independientes de  $n = 30$ . Las barras representan la desviación estándar. \* Representan las diferencias significativas que se encontraron mediante la prueba de Tukey HSD ( $p < 0.01$ ).

### **8.3 Cuantificación de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (CAT, SOD, APX, GR)**

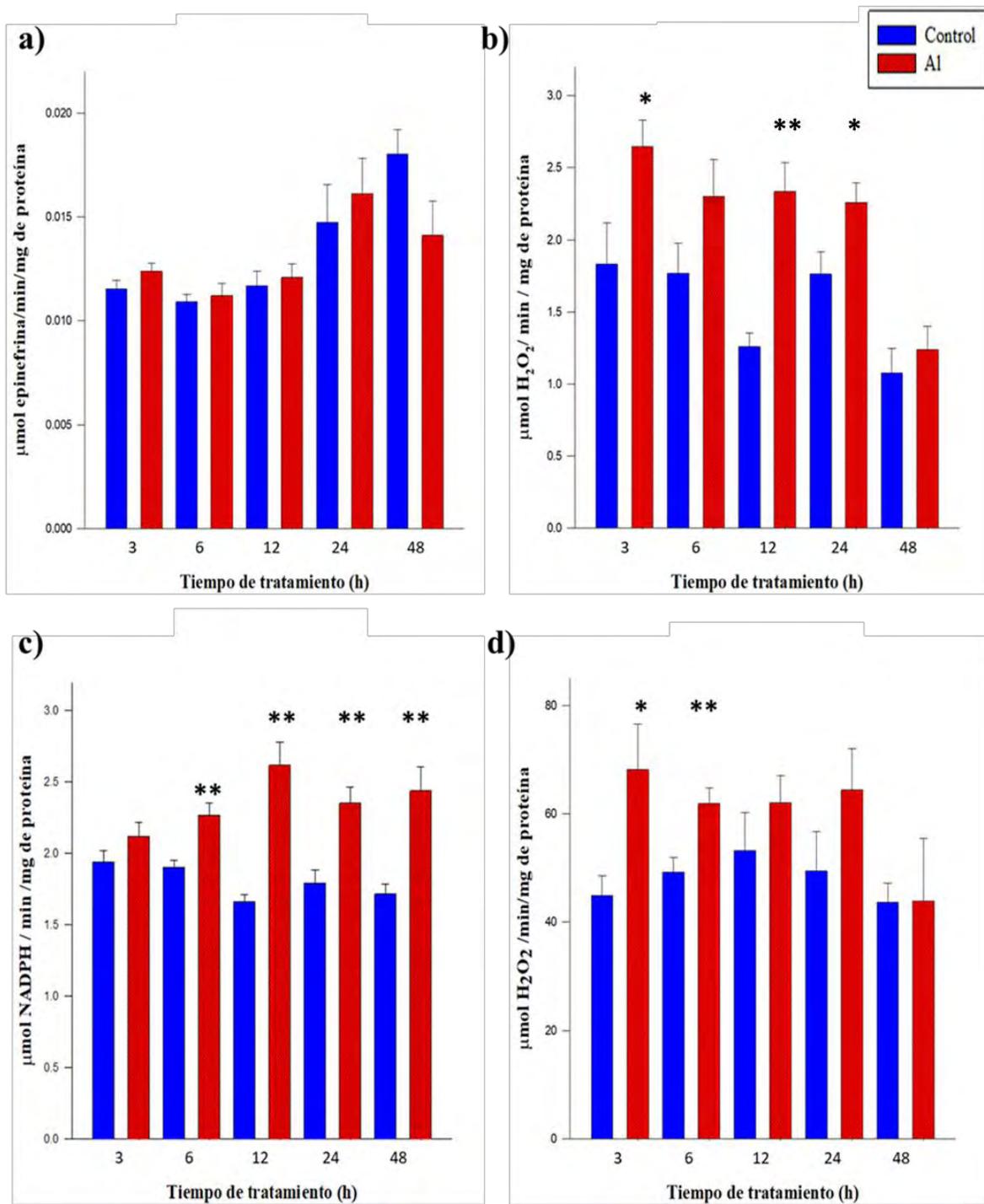
Debido a que el sistema antioxidante es uno de los principales mecanismos de tolerancia al Al, se midió la actividad de algunas enzimas antioxidantes como: SOD, la cual no incrementó su actividad en las puntas de las raíces expuestas a aluminio en ninguno de los tiempos analizados (Fig. 13a).

Así mismo, la actividad enzimática de CAT en las puntas de las raíces de las plántulas tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  aumentó un 45 % de manera significativa desde las 3 h de tratamiento con respecto a la actividad de las raíces control (Fig. 13b). Esta mayor actividad de la enzima se presentó durante todos los tiempos de exposición al aluminio, siendo el mayor a las 12 h de tratamiento (86 %), mientras que a las 6 y 48 h de tratamiento el aumento de la actividad no fue significativo, aunque si hubo una tendencia a aumentar ligeramente.

Aunque la actividad de la enzima GR (Fig. 13c) si aumentó desde las 3 h de exposición en las raíces tratadas con aluminio, y desde las 6 h hasta las 48 h, se aprecian diferencias significativas entre las actividades de las raíces del tratamiento en comparación con las del control, a las 12 h y 48 h de exposición se observaron los mayores incrementos en la actividad de un 57 % y 42 % respectivamente.

Finalmente, la actividad de APX (Fig. 13 d) incrementó de manera significativa en las puntas de las raíces durante las 3 y 6 h de exposición al aluminio (de 51 % y 25 % respectivamente con respecto al control), a las 12 y 24 h de tratamiento la actividad de las raíces expuestas al metal es mayor a la del control pero no presentó diferencias estadísticas.

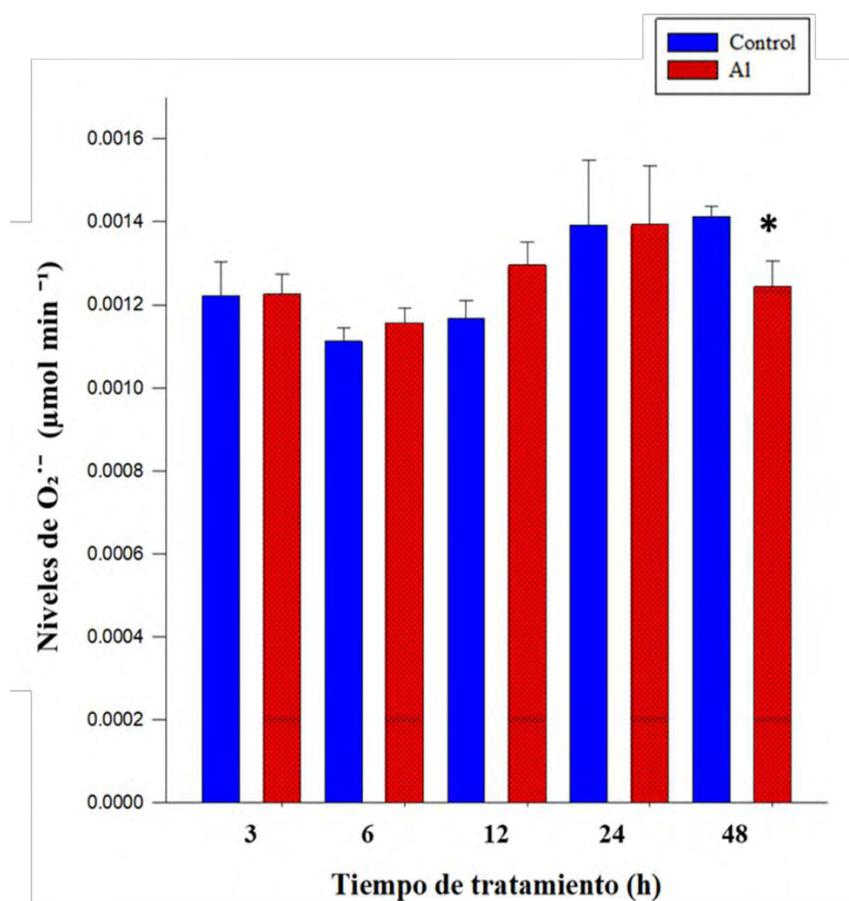
Estos resultados muestran que la producción del radical superóxido no aumenta por el tratamiento con aluminio o que éste es protonado rápidamente, además demuestran que hay una mayor producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las puntas de las raíces tratadas con aluminio ya que se observan aumentos en la actividad de las enzimas CAT y APX.



**Fig. 13 Actividad enzimática** de: a) superóxido dismutasa (SOD); b) catalasa (CAT); c) glutatiónereductasa (GR) y d) ascorbato peroxidasa (APX) en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48h de exposición a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los datos muestran el promedio de 3 experimentos independientes ( $n=12$ ). Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas se encontraron mediante una prueba *t* para muestras independientes para los datos normales y mediante una prueba U de Mann Whitney para los no normales \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ). entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio.

#### 8.4 Niveles del radical superóxido en las puntas de las raíces expuestas a Al

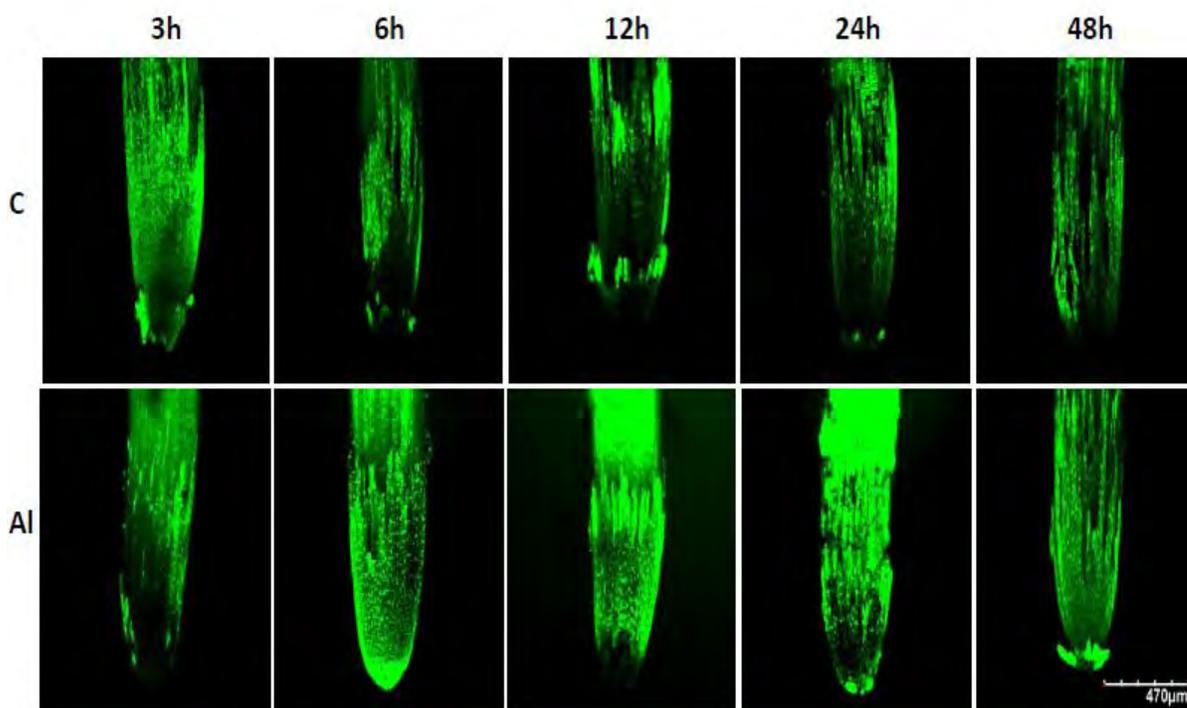
El radical superóxido es usualmente una de las primeras ROS que se generan y su producción puede desencadenar la formación de más ROS como el (OH·) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los cuales pueden causar la peroxidación de lípidos de las membranas y daño celular (Gill y Tuteja, 2010). Por ello se midieron los niveles de esta especie reactiva de oxígeno en las puntas de las raíces tratadas con aluminio, sin embargo no se encontró incremento durante todos los tiempos analizados, únicamente se observó una disminución significativa a las 48 h de tratamiento con aluminio con respecto al control (Fig. 14).



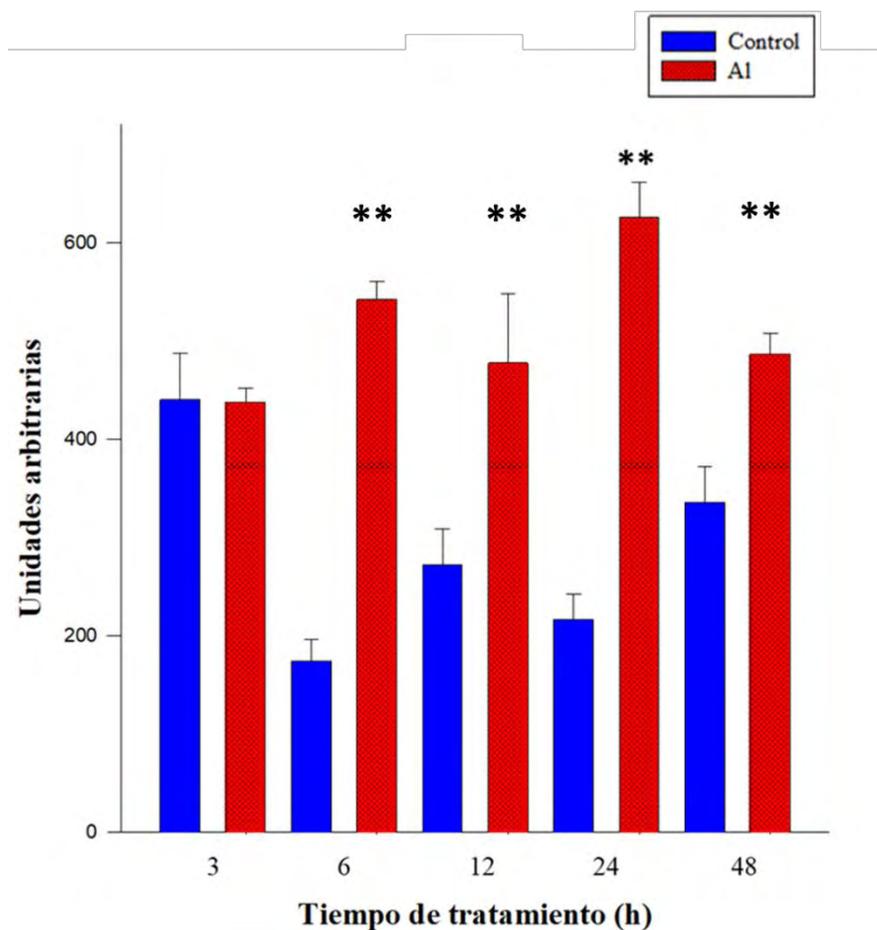
**Fig. 14 Niveles de superóxido** en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con 50  $\mu$ M de AlCl<sub>3</sub>. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes (n=10). Las diferencias significativas se encontraron mediante una prueba *t* para muestras independientes para los datos normales y mediante una prueba U de Mann Whitney para los no normales \* ( $p < 0.05$ ). Análisis entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio. Las barras representan la desviación estándar.

## 8.5 Localización de ROS

Con el fin de detectar la formación de ROS, se realizó una tinción con H<sub>2</sub>DCFDA. Esta sonda fluorescente, detecta diversos peróxidos y otras ROS intracelulares, el colorante 2', 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) penetra libremente dentro de las células y una vez dentro se hidroliza a 2', 7'-diclorofluoresceína (DCF) por la acción de esterasas, este compuesto es capaz de interactuar con las ROS 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; Rastogi *et al.*, 2010). Con esta tinción se observó un aumento en la producción de ROS en las puntas de las raíces tratadas con aluminio desde las 6 h y hasta las 48 h de exposición al metal (Fig. 15). A las 6 y 24 h de tratamiento, se encontró la mayor producción de ROS en las puntas, siendo 3 y 2 veces mayor, respectivamente, con respecto al control (Fig. 16). Los datos de la producción de ROS se obtuvieron utilizando el programa FluoView FV 1000.



**Fig. 15 Localización de ROS** en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  observada con la tinción fluorescente con H<sub>2</sub>DCFDA. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (n=12).

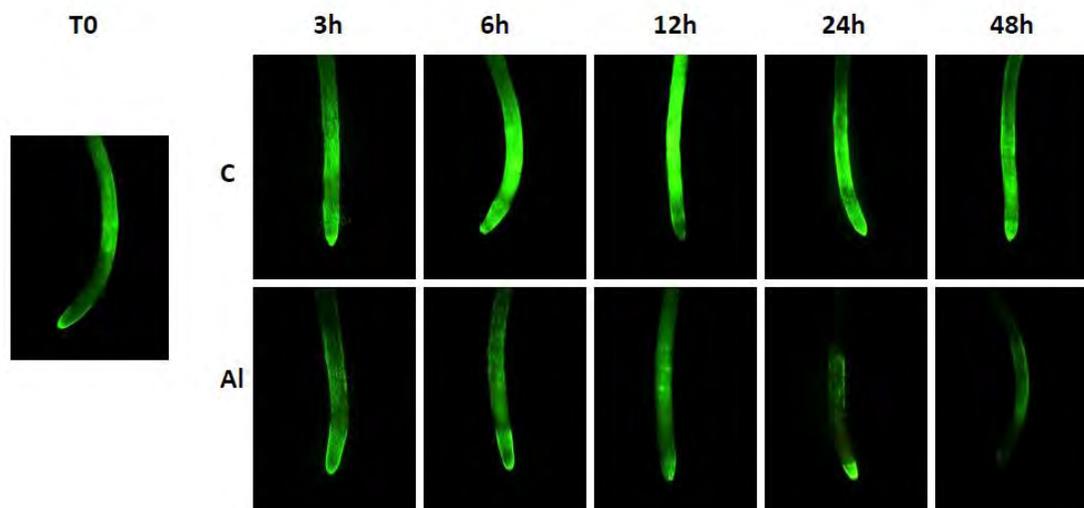


**Fig. 16 Acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes de  $n=6$ . Las barras representan la desviación estándar. \*\* Indican las diferencias significativas que se encontraron mediante una prueba  $t$  para muestras independientes ( $p < 0.01$ ) entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio. Los datos se obtuvieron mediante el programa FluoView FV 1000.**

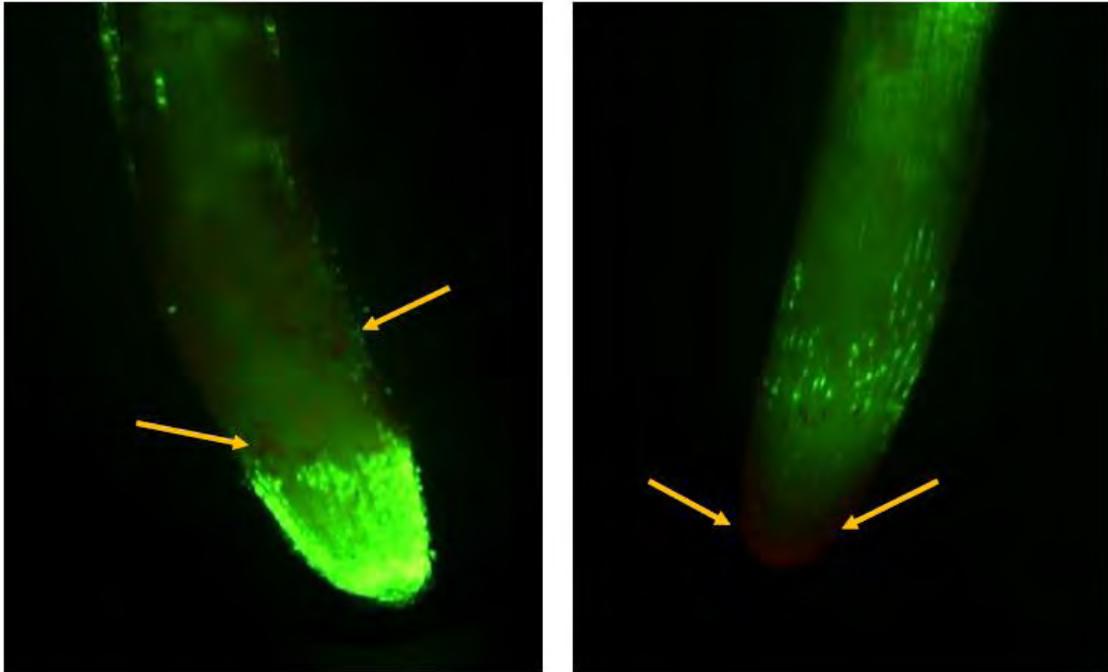
## 8.6 Evaluación de la viabilidad celular en las puntas de las raíces

La tinción vital es utilizada para la determinación de la viabilidad celular, ya que el FDA puede penetrar en las células vivas, donde se libera la fluoresceína y produce una tinción verde fluorescente. El PI sólo puede penetrar a las células cuando las membranas están dañadas, al entrar el PI reacciona con ácidos nucleicos y produce una coloración rojiza (Jones y Senft, 1985).

Con este experimento se observó que a pesar de que existe una mayor producción de ROS en las puntas de las raíces tratadas con aluminio, no se observa muerte celular en las mismas (Fig. 17), ya que es muy escasa la coloración rojiza, que sólo se aprecia levemente en las puntas de las raíces expuestas por 24 y 48 h al metal (Fig. 18).



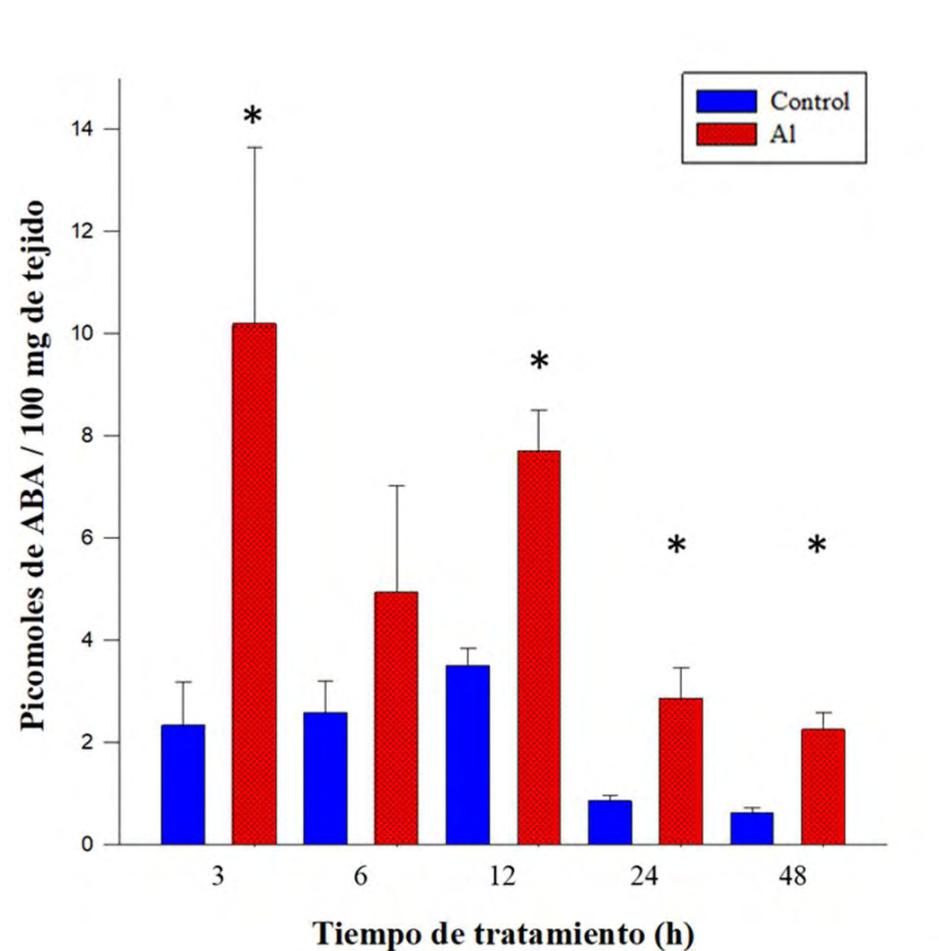
**Fig. 17 Tinción vital** con yoduro de propidio y FDA en las puntas de las raíces de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  observadas mediante microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1000 (1X). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (n=12).



**Fig. 18 Tinción vital** con yoduro de propidio y FDA en las puntas de las raíces de *F. esculentum* a las 24 h (izq.) y 48 h (der.) de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  observadas mediante microscopio estereoscópico Nikon SMZ 1000 (1X). Las flechas marcan las zonas con mayor daño.

### 8.7 Niveles endógenos de ABA

El ABA es una de las fitohormonas más importantes y está involucrada en el crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas a condiciones de estrés (Danquah *et al.*, 2014). Además, se ha encontrado que niveles elevados de esta hormona pueden inducir la respuesta antioxidante (Agarwal *et al.*, 2005), por esta razón, en este trabajo se midieron los niveles endógenos de ABA en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* tratadas con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los resultados revelaron un aumento en los niveles de esta hormona en las puntas de las raíces expuestas a este metal desde las 3 h de tratamiento, tiempo en el cual la concentración de ABA es 4 veces mayor (10.19 pmol/ 100 mg) que la encontrada en las puntas de las raíces de las plántulas control (2.33 pmol/ 100 mg). Además, se encontraron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) en las puntas de las raíces tratadas a las 3, 12, 24 y 48 h de exposición a Al (Fig. 19).



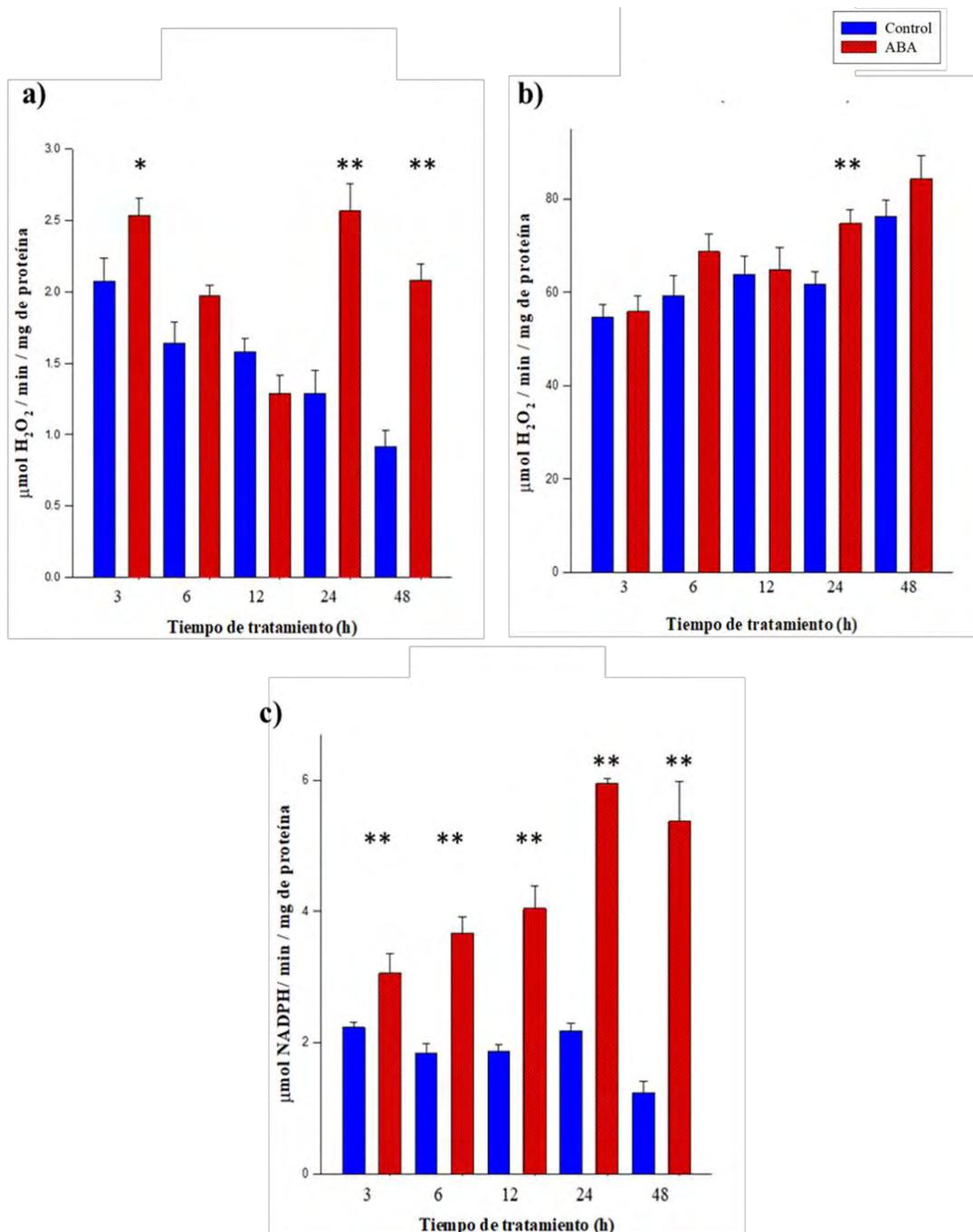
**Fig. 19 Cuantificación de los niveles de ABA** en las puntas de las raíces de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Los resultados corresponden al experimento representativo de 4 bioensayos independientes ( $n=3$ ). Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas (\*) se encontraron mediante una prueba U de Mann Whitney ( $p < 0.05$ ) entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio.

## **8.8 Confirmación de la inducción del sistema antioxidante por la aplicación de ABA exógeno**

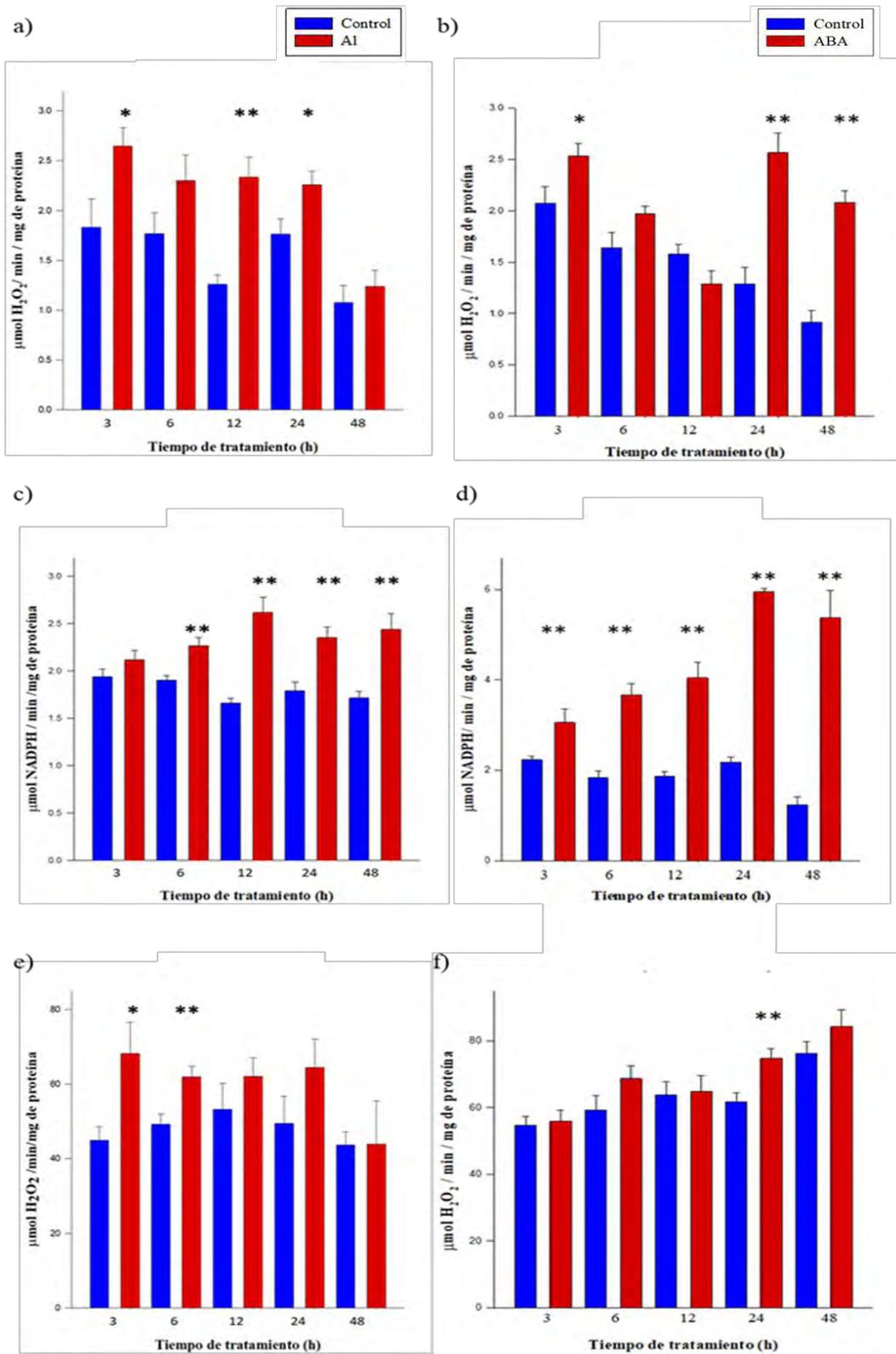
El ABA también es uno de los reguladores más importantes de las respuestas de las plantas al estrés abiótico, esta hormona puede inducir la producción de niveles bajos de ROS que actúan como segundos mensajeros en la ruta de señalización para activar la respuesta del sistema antioxidante y eliminar el exceso de ROS (Jiang y Zhang, 2004; Zhu *et al.*, 2016).

Para estudiar este mecanismo en nuestro modelo, determinamos si el ABA (10  $\mu\text{M}$ ) inducía la actividad de enzimas antioxidantes (Fig. 21). En este experimento se observó que al aplicar ABA exógeno aumentó la actividad de CAT en las puntas de las raíces a las 3, 24 y 48 h de tratamiento, aumentando un 100 % y 127 % su actividad a las 24 y 48 h el valor del control (Fig. 20 a). Así mismo, se evaluó la actividad de APX en la que sólo se encontraron aumentos significativos a las 24 h de tratamiento con ABA, siendo sólo un 20 % mayor al control (Fig. 20 b).

Finalmente, se observaron aumentos en la actividad de GR durante todos los tiempos de tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de ABA, presentando un aumento en la actividad del 100 % desde las 6 h de tratamiento y que fue incrementando hasta un 336 % con respecto al valor del control a las 48 h de exposición (Fig. 20 c).



**Fig. 20 Actividad enzimática** de: a) catalasa (CAT); b) ascorbato peroxidasa (APX); c) glutatión reductasa (GR) en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de exposición a 10  $\mu$ M de ABA. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes ( $n=12$ ). Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas se encontraron mediante una prueba *t* para muestras independientes para los datos normales y mediante una prueba U de Mann Whitney para los no normales \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio.

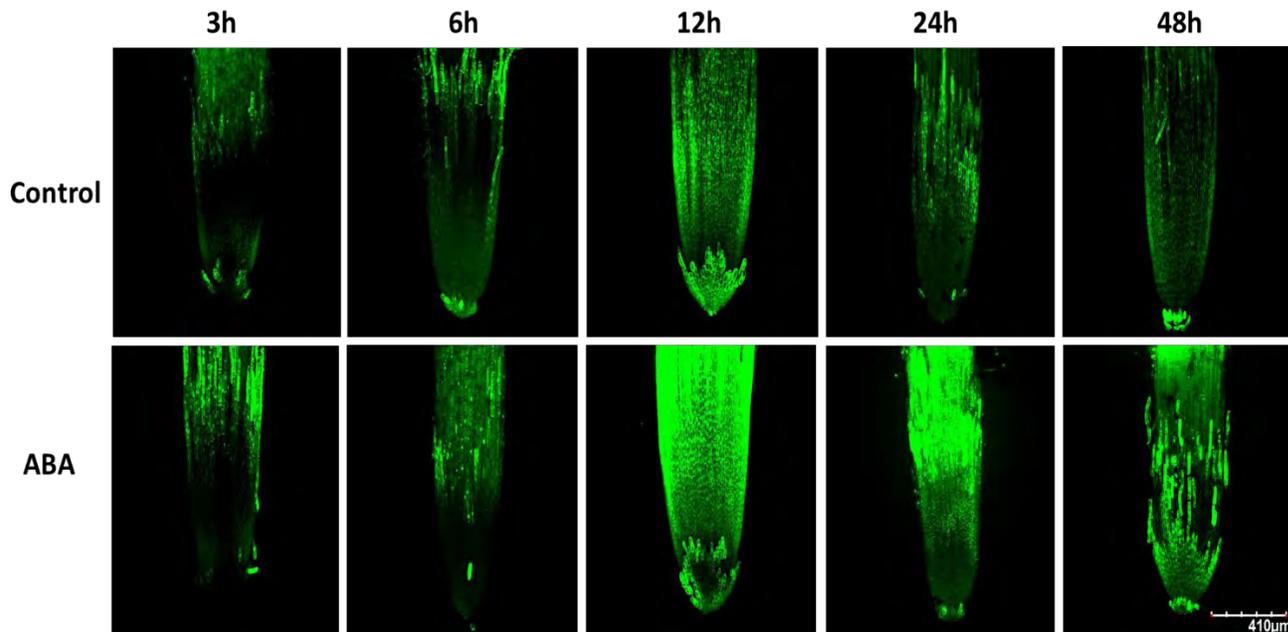


**Fig. 21 Gráfico comparativo de la actividad del sistema antioxidante en las puntas de las raíces tratadas con Al: a) CAT; c) GR; e) APX y en las puntas de las raíces expuestas a ABA: b) CAT; d) GR; f) APX.**

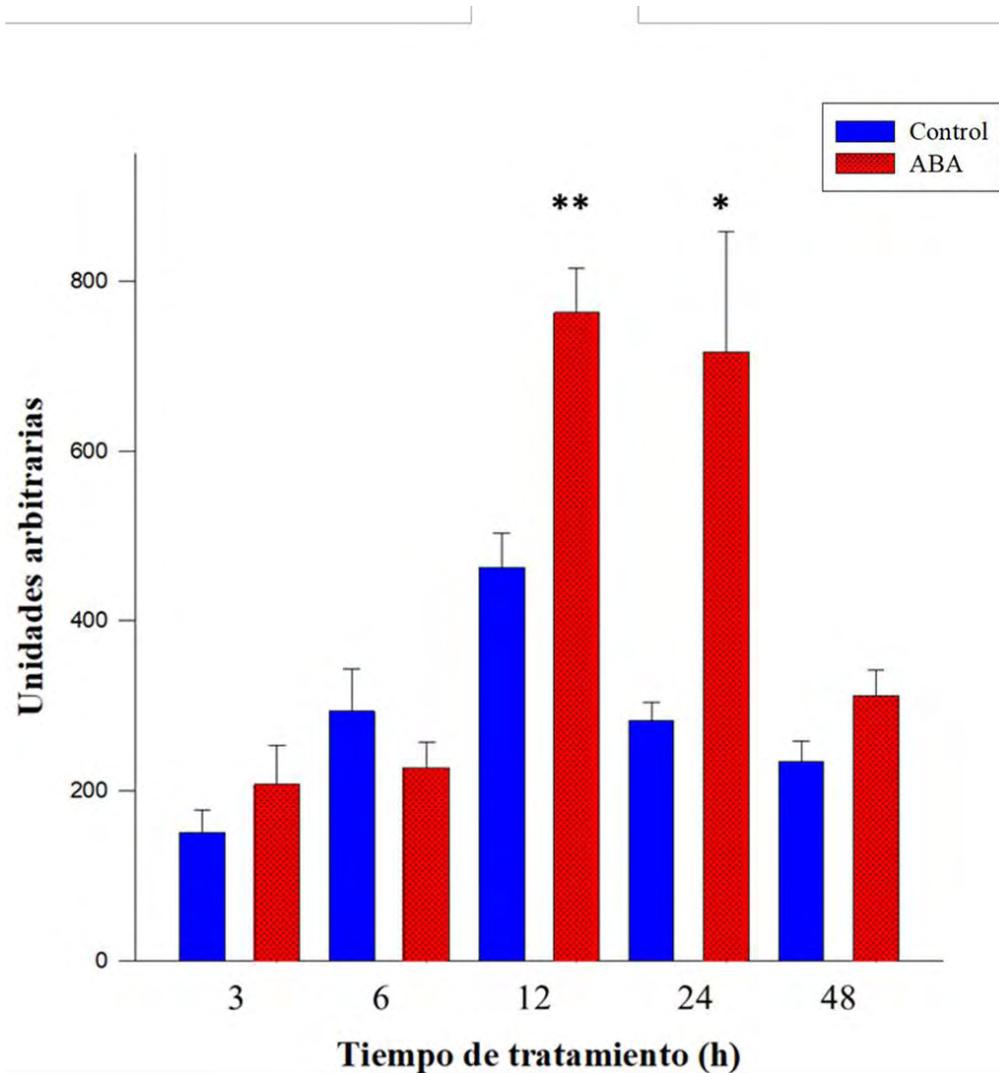
## 8.9 Localización de ROS en las puntas de las raíces tratadas con ABA

Se ha comprobado que el ABA puede estimular la producción de  $H_2O_2$ , que actúa como segundo mensajero e induce la síntesis o activa diversos factores de transcripción asociados a la respuesta antioxidante (Agarwal *et al.*, 2005).

En este trabajo, al igual que para el tratamiento con Al, se utilizó la tinción con  $H_2DCFDA$  con el fin de detectar la producción de ROS en las puntas de las raíces expuestas a ABA exógeno (Fig. 22). Mediante esta tinción se observó, que existe un aumento significativo con respecto al control en la producción de ROS en las puntas de las raíces a las 12 y 24 h de tratamiento con ABA (64 % y 153 %, respectivamente) (Fig. 23).



**Fig. 22 Localización de la acumulación de ROS** en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con  $10 \mu M$  de ABA observada con la tinción fluorescente con  $H_2DCFDA$ . Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes ( $n=12$ ).



**Fig. 23 Acumulación de especies reactivas de oxígeno** en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm) de *F. esculentum* durante 48 h de tratamiento con  $10 \mu\text{M}$  de ABA. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes de  $n=6$ . Las barras representan el error estándar. Las diferencias significativas se encontraron mediante una prueba *t* para muestras independientes \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  entre el control y el tratamiento por cada tiempo de estudio. Los datos se obtuvieron mediante el programa FluoView FV 1000.

## IX. Discusión

### 9.1 La inhibición del crecimiento radicular es el primer síntoma de la toxicidad por aluminio

El Al es el principal limitante para el crecimiento de los cultivos en los suelos ácidos, ya que concentraciones micromolares de este elemento pueden inhibir el crecimiento de las raíces, lo que provoca una reducción en la toma de agua y nutrientes (Yang *et al.*, 2013). En especies sensibles a este metal como *Vigna radiata* y *Gossypium hirsutum* la presencia de  $\approx 5 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  en la solución del suelo reduce hasta un 50 % el desarrollo radicular (Kopittke *et al.*, 2016).

Los resultados del análisis de crecimiento radicular de *F. esculentum* expuesta a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  revelaron que existe una reducción en el crecimiento de las raíces desde las 6 h de tratamiento, esto se debe a que el tiempo en el que se da la inhibición de la elongación radicular depende de la concentración de aluminio a la que este expuesta la planta, y se puede llegar a observar una disminución del crecimiento desde los 10 min de exposición a  $50 \mu\text{M}$  de Al como en el caso del trigo (cv Scout) (Revisado en: Kopittke *et al.*, 2016). Esta rápida inhibición se debe a que el aluminio interfiere con diversos procesos en las células de las raíces, provocando inhibición de la división celular, daño a la membrana plasmática, alteraciones en el funcionamiento de las mitocondrias, rigidificación de la pared celular e inhibición de sus proteínas (expansinas) (Kopittke *et al.*, 2015; Kopittke *et al.*, 2016).

La inhibición del crecimiento radicular por el aluminio, es el rasgo más evidente e identificable, por lo que se utiliza para medir el nivel de susceptibilidad o tolerancia en las plantas (Revisado en: Singh *et al.*, 2017), en el experimento del crecimiento radicular se pudo observar una reducción de  $\approx 70 \%$  en la tasa de crecimiento radicular relativo a las 3 h de tratamiento, lo que indicaría una respuesta primaria de sensibilidad al metal, sin embargo a partir de las 24 h el crecimiento comienza a restablecerse y alcanza un RRG del 50 % a las 48 h, comportamiento que se asemeja al observado en las variedades tropicales de maíz C 525 M y Sikuaní originarias de Brasil y Colombia, respectivamente en las que en un tiempo corto de exposición a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  presentaron inhibición de las raíces, sin

embargo a las 24 h de tratamiento las tasas de elongación comienzan a restablecerse, presentando valores similares a los del control, esto sucede únicamente en los genotipos resistentes al aluminio y puede deberse a que se requiere cierta concentración de este metal para que se activen los mecanismos de resistencia (Revisado en: Barceló y Poschenrieder, 2002).

Algunas especies necesitan de cierto tiempo para inducir sus mecanismos de tolerancia (Revisado en: Barceló y Poschenrieder, 2002) lo que se ha descrito como una respuesta de tipo patrón II, en ésta última, se requieren de algunas horas para su activación, ya que se necesita de la transcripción de diversos genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo y transporte de ácidos orgánicos, a diferencia de la respuesta de tipo patrón I: en la que el aluminio activa inmediatamente los canales aniónicos para liberar los ácidos orgánicos (Revisado en: Singh *et al.*, 2017), a *Fagopyrum esculentum* var. Jiangxi se le ha incluido entre las especies que presentan este último tipo de patrón (Yang *et al.*, 2006), sin embargo la variedad utilizada en este estudio (var. Mancan), presenta características que pueden incluirla dentro de las especies que presentan repuesta de tipo patrón II, ya que se ha observado que exuda ácido oxálico desde las 12 h de tratamiento y ésta misma, va incrementando conforme transcurre el tiempo de exposición (Reyna-Llorens *et al.*, 2015).

El porcentaje de RRG obtenido durante el último tiempo de estudio (48 h) fue de 50 %, valor que se asemeja a lo observado en plantas sensibles como es el caso de la variedad sensible de maíz S-1587-17, en la que se obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento radical de  $\approx 50$  % a las 48 h de exposición a  $36 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Jorge *et al.*, 2001), sin embargo, en experimentos en los cuales se ha evaluado el crecimiento radicular en plántulas de *F. esculentum* hasta las 96 h de tratamiento con  $50 \mu\text{M}$  de Al, el RRG aumenta hasta 84 % lo que comprueba la recuperación del crecimiento de las raíces (Salazar-Chavarría, 2015), además de este estudio Martínez-Rendón (2013) realizó un análisis de crecimiento de esta especie expuesta a 25, 50 y  $100 \mu\text{M}$  de Al durante todo su ciclo de vida, y no hubo diferencias significativas en el crecimiento de las raíces tratadas con el metal y las plantas control, lo que demuestra la capacidad de esta especie para tolerar altas concentraciones de Al.

## 9.2 Penetración y acumulación de aluminio en las raíces de *F. esculentum*

La tinción con hematoxilina es utilizada para la visualización del aluminio en la superficie de las raíces y para localizar al metal dentro de los tejidos (Ownby, 1993). Este colorante tiene la propiedad de tornarse azul-violeta cuando la hemateína (hematoxilina oxidada) forma un complejo con el ion  $Al^{3+}$ , el cual es fácilmente retenido en la raíz (Alvim *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2013). Mediante esta tinción se pudo observar que desde las 3 h y hasta las 12 h de tratamiento, las raíces de *F. esculentum* están completamente teñidas, comportamiento que se observa en las plantas cuyos mecanismos de resistencia han sido rebasados por las altas concentraciones del metal en la solución del suelo (Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2007). Sin embargo, después de las 24 h de tratamiento, se comienza a observar en la punta de la raíz un área sin teñir que corresponde a la zona subapical (zona de elongación), esto puede deberse a la exudación de ácidos orgánicos como el ácido oxálico que es secretado por las raíces y forma un complejo no tóxico Al-oxalato en la rizósfera; éste se ha descrito como uno de los mecanismos de esta especie para tolerar altas concentraciones de Al (Revisado en: Ma *et al.*, 1998; Klug y Horst, 2010a; Lei *et al.*, 2017), Además, Reyna-Llores *et al.* (2015), demostraron que existe una secreción de ácido oxálico desde las 12 h de exposición a 50  $\mu M$  de Al y que va aumentando conforme transcurre el tiempo de tratamiento.

La zona en la que no se presenta la característica coloración azul-violeta a las 24 y 48 h de exposición corresponde a la zona subapical (6-20 mm), en donde ya se ha descrito existe una mayor exudación de oxalato (Klug y Horst, 2010b). No obstante, el ápice de la raíz permanece teñido durante todos los tiempos de tratamiento, la mayor tinción en esta zona, se debe a que este es el mayor sitio de adsorción y acumulación de aluminio (Trejo-Téllez y Gómez-Merino, 2007). Este patrón se presenta tanto en especies excloras como acumuladoras de aluminio y se ha observado en especies como *Zea mays*, *Vicia faba*, *Pinus taeda* y *Triticum aestivum* (Klug y Horst, 2010b).

Mediante esta tinción, se obtuvieron valores semicuantitativos de la acumulación de aluminio en las puntas de las raíces ( $\approx 1$  cm), estos resultados comprueban que existe una elevada penetración del metal desde las 3 h y que aumenta hasta las 12 h de tratamiento, sin

embargo después de este tiempo la entrada del metal permanece constante, lo que coincide con la exudación de ácido oxálico informada por Reyna-Llorens *et al.* (2015) a partir de este mismo tiempo de tratamiento.

Así mismo, estos resultados se asemejan a lo descrito por Chandran *et al.* (2008) los cuales observaron, que en la variedad tolerante (T32) de *Medicago truncatula* la penetración del metal no aumentaba conforme transcurría el tiempo de exposición, a diferencia de la variedad sensible (S70) en la cual la acumulación del metal si incrementó durante las 72 h de tratamiento con aluminio.

Estos resultados, confirman la existencia de un mecanismo de exclusión en *F. esculentum* que detiene la entrada del metal desde las 12 h de tratamiento.

### **9.3 El aluminio dentro de las células puede inducir estrés oxidativo**

El aluminio aumenta la producción de ROS, debido a que este metal se une a fosfolípidos y proteínas de la membrana plasmática, lo cual altera la permeabilidad, fluidez y potencial electroquímico de la misma. Además el aluminio, interactúa con los canales catiónicos que indirectamente inhiben la actividad de la  $H^+$ -ATPasa (De Sousa *et al.*, 2016). Se ha propuesto que el estrés oxidativo es uno de los factores que provocan la inhibición del crecimiento radicular en presencia de este metal, ya que en las raíces dañadas por Al se observa una acumulación de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y lignina, y por el contrario estos compuestos reducen su concentración en el proceso de recuperación de las raíces (Matsumoto y Motoda, 2012).

Como se observó una reducción del crecimiento radicular y penetración del metal desde las 3 h de tratamiento, se evaluó la producción de ROS en las puntas de las raíces mediante la tinción con DCFDA, que se oxida principalmente por  $H_2O_2$  y genera DCF fluorescente (Trinei *et al.*, 2002). Mediante esta tinción se observó que desde las 6 h de exposición a Al se aumentó la producción de ROS, esto se debe a que este metal induce una producción de ROS en mitocondrias y peroxisomas (Revisado en: Singh *et al.*, 2017), por alteraciones en la membrana plasmática, actividad de la NADPH oxidasa, lipoperoxidación y mediante la

reacción de Fenton activada por aluminio acoplado a otros metales como el cobre (Revisado en: Daspute *et al.*, 2017).

Se ha informado que el  $O_2^{\cdot-}$  es usualmente la primera ROS que se genera durante el estrés, y que esta puede promover la formación de otras especies más reactivas como el  $\cdot OH$  que inducen fácilmente la lipoperoxidación (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010), en este trabajo se midieron los niveles de esta especie reactiva de oxígeno en las puntas de las raíces tratadas con aluminio, sin embargo no se encontraron aumentos significativos en las puntas expuestas al metal en ninguno de los tiempos analizados, esto puede deberse a la corta vida media del  $O_2^{\cdot-}$  (2-4  $\mu s$ ) (Gill y Tuteja, 2010) y a la fácil protonación de este radical para la formación del radical hidroperoxilo  $HO_2^{\cdot}$ , el cual es muy reactivo y oxida directamente a los ácidos grasos poliinsaturados, además de que la velocidad de esta reacción aumenta mientras más ácido es el medio (Gill y Tuteja, 2010; Exley, 2004; Hansberg, 2002). Además de esta protonación espontánea, la menor concentración de  $O_2^{\cdot-}$  podría deberse también a la dismutación catalizada por la SOD que tiene como producto al  $H_2O_2$  (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010).

#### **9.4 Aunque hay acumulación de ROS no hay daño a nivel celular**

A través de diversas reacciones, el  $O_2^{\cdot-}$  conduce a la formación de  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  y otras ROS ( $^1O_2$ ,  $HO_2^{\cdot}$ , hidroperóxidos  $ROOH$ , peróxidos  $ROO^{\cdot}$ ), que son altamente reactivas, tóxicas y que pueden causar daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN, lo que finalmente resulta en la muerte celular (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010). Debido a la sobreproducción de ROS encontrada en las puntas de las raíces tratadas con aluminio y a la toxicidad de estas especies, se realizó la tinción vital (con FDA e IP), la cual es utilizada para evaluar la viabilidad celular, mediante esta técnica se pudo observar que en las puntas de las raíces expuestas a aluminio no hay daño en las membranas ni muerte celular, únicamente se aprecia una tenue tinción rojiza en el ápice de las raíces a las 48 h de exposición, este hecho puede deberse a que el tratamiento con aluminio en *F. esculentum* produce una mayor concentración de  $H_2O_2$  (corroborado por las altas actividades enzimáticas de CAT y APX (Fig. 13) y ésta especie reactiva de oxígeno no reacciona fácilmente con lípidos (Peralta-

Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012), por lo que no se produjo un daño a las membranas plasmáticas (Fig. 17).

Así mismo, ya se ha descrito que la exposición a aluminio promueve la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como en el caso de los genotipos sensibles (Shang 70-119) y tolerantes (Gebeina) de cebada en los cuales, el tratamiento con 100 µM de AlCl<sub>3</sub> aumentó la producción de peróxido en las raíces de ambos genotipos y se incrementó hasta un 200 % en el genotipo sensible (Ali *et al.*, 2011).

### **9.5 El sistema antioxidante como mecanismo para la tolerancia al aluminio**

Las plantas han desarrollado un sistema de defensa para protegerse de las ROS en los diferentes organelos dentro de las células, este sistema se compone de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Sharma y Dubey, 2007; Gill y Tuteja, 2010). Entre los antioxidantes enzimáticos está la SOD que dismuta al O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es una de las principales enzimas antioxidantes y se encuentra en casi todos los compartimentos celulares (Matsumoto y Motoda, 2012; Gill y Tuteja, 2010; Sharma y Dubey, 2007; Mittler, 2002). Debido a su importancia dentro del sistema antioxidante se midió la actividad de esta enzima, en las puntas de las raíces tratadas con aluminio, sin embargo, en ninguno de los tiempos analizados se encontraron aumentos significativos en la actividad de SOD, estos resultados se comparan con los obtenidos por Sharma y Dubey (2007) en los cuales no se observaron aumentos significativos en la actividad de SOD en las raíces de plántulas de *Oryza sativa* expuestas a 80 µM de Al, sin embargo, cuando se incrementó la concentración a 160 µM de Al en la solución, se encontraron aumentos en la actividad de esta enzima durante todos los tiempos de tratamiento. Este comportamiento se observa también en *F. esculentum*, ya que igualmente se encontró un incremento en la actividad enzimática de SOD en las puntas de las raíces al aumentar la concentración de Al hasta 100 µM en la solución durante 72 h de tratamiento (Salazar-Chavarría y Cruz-Ortega, 2015).

Así mismo, los altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las puntas de las raíces, también podrían haber mantenido sin cambios la actividad de SOD, ya que se ha encontrado que la Cu/Zn-SOD

localizada en el citosol es sensible a elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gill y Tuteja, 2010).

Otra de las principales enzimas que sirven para controlar la sobreproducción de ROS, es la CAT, esta enzima cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> y es indispensable para la remoción de ROS en condiciones de estrés (Willekens *et al.*, 1997; Gill y Tuteja, 2010) por esta razón se midió su actividad en las puntas de las raíces tratadas con aluminio. En los resultados se observaron aumentos de la actividad de esta enzima desde las 3 h y hasta las 24 h de tratamiento con este metal; esto se debe a que la catalasa tiene la función de eliminar la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que tiene una alta V<sub>máx</sub> (velocidad máxima) y puede descomponer ≈ 6 millones de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> por minuto (Willekens *et al.*, 1997; Gill y Tuteja, 2010). Así mismo, se ha observado que en especies y variedades tolerantes a aluminio se aumenta la actividad de esta enzima, como en el caso del genotipo tolerante a aluminio de *Avena sativa* (UFRGS 17) en el que se observaron aumentos en la actividad de esta enzima en las raíces expuestas a 370 μM de Al (Pereira *et al.*, 2013).

Se ha encontrado una mayor actividad de CAT en las hojas y raíces del genotipo tolerante a aluminio (Brigitta), en comparación con el genotipo sensible (Bluegold) de *Vaccinium corymbosum* tratado con 100 μM de AlCl<sub>3</sub> (Inostroza-Blancheteau *et al.*, 2011).

Además de estas enzimas, una de las principales vías de remoción de ROS es el ciclo del ascorbato-glutación, el cual se localiza en cloroplastos, citosol, mitocondrias, apoplasto y peroxisomas, debido a que se encuentra en casi todos los compartimentos celulares y que la APX tiene una alta afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se sugiere que este ciclo juega un papel fundamental en el control de las ROS (Mittler, 2002), es por esto que se evaluó la actividad de APX en las puntas de las raíces tratadas con aluminio, con este experimento se pudo observar que durante las primeras 3 y 6 h de exposición al metal se presentan aumentos en la actividad de esta enzima, lo que confirma la mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el aluminio desde las 3 h de tratamiento. Ya se ha descrito que en diversas condiciones de estrés como son: el estrés por metales, sequía o salinidad, se aumenta la expresión de APX en plantas, lo cual les confiere tolerancia a los respectivos factores de estrés (Revisado en: Gill y Tuteja, 2010). Tabaldi *et al.* (2009) demostraron que el clon tolerante de *Solanum tuberosum*

subsp. tuberosum aumentó la actividad de APX hasta 184 % en raíces de plántulas tratadas con 200 mg L<sup>-1</sup> de AlCl<sub>3</sub>. De igual forma, se observó una mayor actividad de esta enzima en las raíces de plántulas de cebada del genotipo tolerante a aluminio (Gebeina), que en las raíces del genotipo sensible (Shang 70-119) expuestas a 100 μM de Al durante todos los tiempos de tratamiento (20 y 40 d) (Ali *et al.*, 2011).

Otro componente esencial, es el glutatión, el cual es una pequeña molécula que se considera un eficiente antioxidante no enzimático, además de ser esencial en diversas funciones bioquímicas en todos los organismos debido a la reactividad de su grupo tiol y por encontrarse en todos los compartimentos celulares (Hong-Bo *et al.*, 2008; Hasanuzzaman *et al.*, 2017). La enzima que se encarga de mantener un nivel óptimo de GSH reducido es la GR, por lo que ésta enzima tiene un papel fundamental en la protección contra las ROS (Gill y Tuteja, 2010; Hasanuzzaman *et al.*, 2017).

De igual forma, se evaluó la actividad de esta enzima en las raíces de *F. esculentum*, encontrando también aumentos en la actividad de GR en las puntas de las raíces tratadas con aluminio desde las 6 h y hasta las 48 h de exposición al metal (Fig. 13). Estos resultados se comparan con lo obtenido por Castilhos *et al.* (2011), quienes observaron aumentos en la actividad de GR en las puntas de las raíces del genotipo de avena tolerante a aluminio (UFRGS 17) expuestas a 740 μM de Al. Esto se debe a que tanto GR como su producto de reacción (GSH) son fundamentales para determinar la tolerancia de una planta bajo diversas condiciones de estrés (Gill y Tuteja, 2010), ya que éstos forman parte del ciclo ascorbato-glutatión que protege de las ROS en casi todos los compartimentos celulares (Mittler, 2002). Además, el GSH controla los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actúa como antioxidante reduciendo directamente a los radicales de oxígeno generados por el estrés (Hong-Bo *et al.*, 2008), de igual forma, el GSH puede proteger a la célula mediante la conjugación del metal por la glutatión-S-transferasa (GST) y por su acción como precursor de fitoquelatinas (Hasanuzzaman *et al.*, 2017), éstas últimas tienen un papel fundamental en la tolerancia a metales ya que son quelantes de iones metálicos (Zagorchev *et al.*, 2013).

## 9.6 Los niveles endógenos de ABA contribuyen a la regulación del sistema antioxidante

El ABA tiene un papel importante en la inducción de tolerancia a diversas condiciones de estrés, uno de los mecanismos de acción de esta hormona está relacionado con el estrés oxidativo (Jiang y Zhang, 2004; Agarwal *et al.*, 2005; Arasimowicz-Jelonek *et al.*, 2014). Se ha documentado que el ABA aumenta la actividad de SOD, CAT, APX, GR y POD (Jiang y Zhang, 2004; Hung y Kao, 2004; Agarwal *et al.*, 2005).

Para evaluar esta relación en *F. esculentum*, se cuantificaron los niveles de ABA endógenos en las puntas de las raíces tratadas con aluminio. Los niveles de esta hormona aumentan desde las 3 h de exposición al metal, estos incrementos se mantienen hasta las 48 h de tratamiento. Este aumento también se observó en las variedades de arroz Nipponbare (tolerante a Al) y Modan (sensible a Al), en las que se observó una mayor concentración de esta hormona en las raíces expuestas a 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , sin embargo los niveles más altos de ABA se encontraron en las raíces de la variedad tolerante a aluminio a las 24 y 48 h de tratamiento (Roselló *et al.*, 2015). Lo que sugiere que esta hormona induce tolerancia a este metal, como se ha reportado para el estrés por sequía, salinidad y baja temperatura (Agarwal *et al.*, 2005).

El ABA induce tolerancia a distintos tipos de estrés promoviendo la expresión de genes involucrados en la resistencia (Jiang y Zhang, 2004), así como una mayor actividad de las enzimas del sistema antioxidante y el aumento de moléculas antioxidantes como el ascorbato, el GSH, los  $\alpha$ -tocoferoles y carotenoides (Agarwal *et al.*, 2005).

En las puntas de las raíces de *F. esculentum* también se observó esta relación, ya que aumentó la actividad de APX, CAT y GR con exposición a 10  $\mu\text{M}$  de ABA, en esta última se observaron aumentos hasta de 400% a las 48 h de tratamiento, esto también se ha observado en hojas de *Vigna unguiculata* en las cuales el tratamiento con ABA exógeno aumenta la expresión de los genes que codifican para la enzima GR (cGR y dtGR) y de igual forma, aumenta su actividad a las 24 h de tratamiento (Contour-Ansel *et al.*, 2006). El mayor incremento de la actividad de esta enzima, puede deberse al gran número de funciones metabólicas en las que está involucrado el GSH como por ejemplo: la protección

de las membranas por mantener al  $\alpha$ -tocoferol y a la zeaxantina reducidas, evitar la desnaturalización de proteínas bajo condiciones de estrés mediante la protección de sus grupos tiol, por ser sustrato de la GPX y de la GST además de ser precursor de fitoquelatinas y ayudar a la quelación de metales tóxicos (Hasanuzzaman *et al.*, 2017).

De igual forma también se ha descrito el aumento de la actividad de la CAT y la APX en plántulas de trigo expuestas a 0.5 y 1 mM de ABA (Agarwal *et al.*, 2005), en las hojas de plántulas de *Ulmus minor* tratadas con 50 y 100  $\mu$ M de ABA (Dias *et al.*, 2014), así como en plántulas de maíz expuestas a 0.3 mM de esta hormona (Gong *et al.*, 1998), lo que comprueba el papel del ABA como inductor del sistema antioxidante, lo que contribuye al incremento de la tolerancia en las plantas ante diversos factores de estrés.

Este aumento de actividad del sistema antioxidante en respuesta a ABA, puede deberse a que esta hormona induce la expresión de algunos factores de transcripción como los de las familias NAC (Zhu *et al.*, 2016) y FtbHLH3 (Yao *et al.*, 2017), los cuales a su vez aumentan la actividad de enzimas del sistema antioxidante como: SOD, CAT, APX y POD (Zhu *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017).

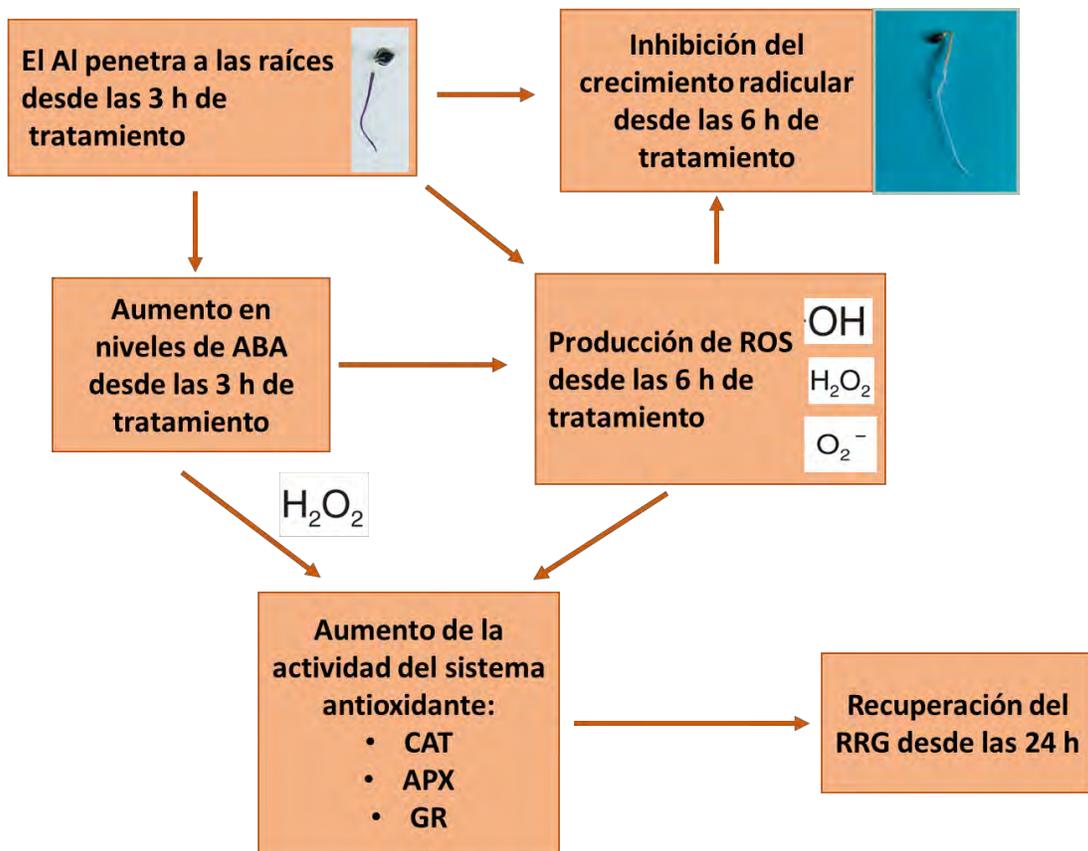
Así mismo, uno de los segundos mensajeros que también está involucrado en el aumento de la actividad del sistema antioxidante por ABA es el  $H_2O_2$ , el cual aumenta en presencia de esta hormona y se ha descrito como inductor de la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes como *Cat1* (Jiang y Zhang, 2004). En este trabajo se evaluó la producción de ROS en las puntas de las raíces de *F. esculentum* expuestas a ABA, con este experimento se comprobó que a las 12 y 24 h de tratamiento hay un aumento en la producción de ROS, estos resultados se asemejan a lo aseverado por Agarwal *et al.* (2005), quienes encontraron aumentos en los niveles de  $H_2O_2$  en plántulas de trigo expuestas a 0.5 y 1 mM de ABA. De igual forma, Hung y Kao (2004) observaron una mayor producción de  $H_2O_2$  en las hojas de arroz tratadas con 45  $\mu$ M de ABA.

El  $H_2O_2$  citosólico desencadena los eventos de transducción de señales (como el aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico) y finalmente induce la expresión génica (Jiang y Zhang, 2004; Yang *et al.*, 2007), lo cual también media la respuesta de tolerancia al estrés en plantas.

Además de mediar la respuesta antioxidante, los altos niveles de ROS también están involucrados en la producción de raíces laterales (Silva-Navas *et al.*, 2015), mecanismo que puede contribuir a la tolerancia al aluminio como se ha descrito en otras especies como el arroz (Álvarez *et al.*, 2013), y que también se ha observado en *F. esculentum* expuesta hasta 100  $\mu\text{M}$  de Al durante la etapa de plántula (Reyna-Llorens *et al.*, 2015).

Así mismo, las ROS también pueden inducir la síntesis de otras hormonas vegetales; se ha informado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede promover la acumulación de otras hormonas de respuesta al estrés como el ácido salicílico (SA) y el etileno (Revisado en: Shao *et al.*, 2008), y este último está implicado en algunos mecanismos de tolerancia al aluminio como la regulación de la exudación de malato (Revisado en: Kopittke, 2016).

Finalmente, el siguiente diagrama (Fig. 24) describe el mecanismo de tolerancia propuesto en las raíces de plántulas de 3 días de edad de *F. esculentum* expuestas a aluminio. Desde las 3 h de tratamiento se observó penetración del metal a las raíces lo que provoca una mayor producción de ROS, lo cual entre otros daños (como la inhibición de la división celular, daño a la membrana plasmática, rigidificación de la pared celular, entre otros) causa la inhibición del crecimiento radicular a las 6 h de exposición. A partir, de las 3 h de tratamiento se encontraron aumentos en los niveles endógenos de ABA, lo que contribuye a la producción de ROS, las cuales pueden ser usadas como segundos mensajeros para desencadenar el aumento en la actividad del sistema antioxidante, lo cual a su vez, contribuye a la recuperación del crecimiento radicular desde las 24 h de tratamiento.



**Fig. 24** Diagrama propuesto del mecanismo de tolerancia en las raíces de *F. esculentum* durante las primeras 48 h de tratamiento con Al.

## X. Conclusiones

- ✚ El aluminio causa inhibición de la elongación radicular en *F. esculentum* durante las primeras 12 h de tratamiento, sin embargo los resultados del RRG demuestran que desde las 24 h la tasa de crecimiento de las raíces comienza a restablecerse.
- ✚ El aluminio penetra desde las 3 h de exposición y aumenta su acumulación en las puntas de las raíces hasta las 12 h de tratamiento, pero, después de este tiempo la penetración del metal se detiene.
- ✚ Durante las primeras 12 h de exposición al aluminio, la planta presenta síntomas de sensibilidad al metal, lo que sugiere que algunos de los mecanismos de tolerancia aún no estén activados.
- ✚ El incremento en los niveles de ROS en las puntas de las raíces, confirma la inducción de estrés oxidativo por el tratamiento con Al.
- ✚ La actividad de la catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa aumentan desde las 3 h de exposición al aluminio, confirmando la inducción del sistema antioxidante como uno de los mecanismos iniciales para tolerar concentraciones tóxicas del metal.
- ✚ El aumento de la actividad enzimática del sistema antioxidante, entre otros mecanismos de tolerancia, evitan que haya muerte celular pese a que el metal penetra a las raíces desde las 3 h de tratamiento.
- ✚ El aumento en los niveles endógenos de ABA inducidos por el tratamiento con Al puede contribuir en la inducción de algunos de los mecanismos de tolerancia en esta etapa del desarrollo.

- ✚ El ácido abscísico podría ser uno de los reguladores de la actividad de CAT, APX y GR en las puntas de las raíces de *F. esculentum*, lo que contribuye a la tolerancia de esta especie durante la primera etapa de su desarrollo.

El Al penetra en las raíces desde las 3 h de tratamiento, lo que induce la inhibición del crecimiento radicular durante las primeras 12 h de exposición. En este tiempo, la planta aún no ha activado todos sus mecanismos de tolerancia al metal. Después de las 12 h de tratamiento, ya no hay penetración del metal y la tasa de crecimiento se restablece, lo que podría deberse a la exudación de oxalato y a la alta actividad del sistema antioxidante, entre otros mecanismos. Estos mecanismos de tolerancia podrían estar mediados por el aumento de los niveles de ABA observados desde las 3 h de tratamiento.

## XI. Perspectivas

- ✚ Debido a la importancia de los antioxidantes no enzimáticos para la eliminación de ROS, es necesario medir los niveles de los mismos (GSH, ASC, entre otros) en las raíces al exponerlas a Al.
- ✚ Además de la cuantificación de los niveles de antioxidantes no enzimáticos, también es imprescindible medir la actividad de otras enzimas antioxidantes que podrían ser fundamentales en el control de ROS producido por Al, tales como MDHAR, GPX, entre otras.
- ✚ Debido a la importancia de la NADPH oxidasa en la producción de ROS, las cuales pueden ser usadas como segundos mensajeros, es necesario medir la actividad de esta enzima en las raíces tratadas con Al.
- ✚ Asimismo, es necesario medir los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que éste también es un segundo mensajero en la vía de señalización por ABA.
- ✚ Finalmente, sería imprescindible evaluar el papel de otras hormonas como los brasinosteroides en la regulación del sistema antioxidante.

## XII. Referencias

- ❖ Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- ❖ Achary, M. M. V., Jena, S., Panda, K. K., Panda, B. B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in roots cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 300-310.
- ❖ Agarwal, S., Sairam, R., Srivastava, G., Tyagi, A., Meena, R. (2005). Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings. *Plant Science*, 169 (3), 559-570.
- ❖ Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I. H., Qiu, B., Wu, F., Zhang, G. (2011). The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 70, 185-191.
- ❖ Álvarez, I., Sam, O., Reynaldo, I., Testillano, P., Risueño, M. (2013). Efecto tóxico del ión  $Al^{3+}$  en el ápice radicular de dos cultivares cubanos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29 (4), 315-323.
- ❖ Alvim, M. N., Ramos, F.T., Oliveira, D.C., Isaías, R. M. S., Franca, M. G. C. (2012). Aluminium localization and toxicity symptoms related to root growth inhibition in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of Biosciences*, 37 (6), 1079-1088.
- ❖ Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Drzewiecka, K., Chmielowska-Bak, J., Abramowski, D., Izbińska, K. (2014). Aluminum induces cross-resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Planta*, 239 (3), 679-694.
- ❖ Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48, 75-92.
- ❖ 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., 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.
- ❖ Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echeverría-Machado, I., Martínez-Estévez, M. (2017). Aluminum, a friend or foe of Higher Plants in Acid Soils. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1767), 1-18.

- ❖ 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.
- ❖ Cakmak, I., Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83, 463-468.
- ❖ 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 Comalfe*, 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., Niño, R. (2007). Solubilidad y reacción del aluminio en el suelo. *Ciencia y Agricultura*, 5 (2), 7-17.
- ❖ 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.
- ❖ Chen, Y. A., Chi, W. C., Huang, T. L., Lin, C. Y., Quynh-Nguyeh, T. T., Hsiung, Y. C., Chia, L. C., Huang, H. J. (2012). Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55, 23-32.
- ❖ Chen, W. W., Xu, J. M., Jin, J. F., Lou, H. Q., Fan, W., Yang, J. L. (2017). Genome-Wide Transcriptome Analysis Reveals Conserved and Distinct Molecular Mechanisms of Al Resistance in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) Leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (9), 1859, 1-17.
- ❖ Choudhury, S., Sharma, P. (2014). Aluminum stress inhibits root growth and alters physiological and metabolic responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 85, 63-70.
- ❖ Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M. L., Cruz de Carvalho, M. H., D'arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y. (2006). Glutathione Reductase in Leaves of Cowpea: Cloning of Two cDNAs, Expression and Enzymatic Activity under Progressive Drought Stress, Desiccation and Abscisic Acid Treatment. *Annals of Botany*, 98, 1279-1287.

- ❖ Cuypers, A., Hendrix, S., Amaral dos Reis, R., De Smet, S., Deckers, J., Gielen, H., Jozefczak, M., Loix, C., Vercampt, H., Vangronsveld J., Keunen, E. (2016). Hydrogen Peroxide, Signaling in Disguise during Metal Phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science*, 7 (470), 1-25.
- ❖ 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.
- ❖ Danquah, A., Zelicourt, A., Colcombet, J., Hirt, H. (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32, 40-52.
- ❖ 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.
- ❖ Daspute, A. A., Sadhukhan, A., Tokizawa, M., Kobayashi, Y., Panda, S. K., Koyama, H. (2017). Transcriptional Regulation of Aluminum-Tolerance Genes in Higher Plants: Clarifying the Underlying Molecular Mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1358), 1-12.
- ❖ De Sousa, A., AbdElgawad, H., Han, A., Teixeira, J., Matos, M., Fidalgo, F. (2016). Oxidative Metabolism of Rye (*Secale cereale* L.) after Short Term Exposure to Aluminum: Uncovering the Glutathione-Ascorbate Redox Network. *Frontiers in Plant Science*, 7 (685), 1-17.
- ❖ Degenhardt, J., Larsen, P. B., Howell, S. H., Kochian, L. V. (1998). Aluminum Resistance in the *Arabidopsis* Mutant *alr-104* Is Caused by an Aluminum-Induced Increase in Rhizosphere pH. *Plant Physiology*, 117 (1), 19-27.
- ❖ Dias, M. C., Oliveira, H., Costa, A., Santos, C. (2014). Improving elms performance under drought stress: The pretreatment with abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 100, 64-73.
- ❖ Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., Barceló, J. (2005). Root Cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56 (414), 1213-1220.
- ❖ 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.
- ❖ Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free radical Biology and medicine*, 36 (3), 380-387.
- ❖ Fourcroy, P., Vansuyt, G., Kushnir, S., Inzé, D., Briat, J. F. (2004). Iron-Regulated Expression of a Cytosolic Ascorbate Peroxidase Encoded by the APX1 Gene in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiology*, 134 (2), 605-613.
- ❖ Franzaring, J., Damsohn, W., Fangmeier, A., Schlosser, Kurz, H., Buttner, P. (2018). Phytotoxicity of tin mine waste and accumulation of involved heavy metals

in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *International Journal of Phytoremediation*, 20 (5), 462-470.

- ❖ Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- ❖ Gong, M., Li, Y-J., Chen, S-Z. (1998). Abscisic Acid-induced Thermotolerance in Maize Seedlings is Mediated by Calcium and Associated with Antioxidant Systems. *Journal of Plant Physiology*, 153, 488-496.
- ❖ 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-Trillo, A. C. (2018). Caracterización y evaluación de la expresión de genes en *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) en condiciones de estrés por metales. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM, 124 pp.
- ❖ Grevenstuk, T., Romano, A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand?. *Metallomics*, 12 (5), 1584-1594.
- ❖ Hall, J. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366), 1-11.
- ❖ Hansberg, W., Cea-Bonilla, A., Del Arenal-Mena, I. P., Riveros-Rosas, H., Vázquez-Contreras E. (2002). Mensaje Bioquímico; Biología de las especies de oxígeno reactivas, Vol. XXVI, Depto. Bioquímica, UNAM, México.
- ❖ Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Islam-Anee, T., Fujita, M. (2017). Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23 (2), 249-268.
- ❖ 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.
- ❖ Hong-Bo, S., Li-Ye, C., Zhao-Hua, L., Cong-Min, K. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 8-14.
- ❖ Houde, M., Diallo, A. O. (2008). Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. *BMC Genomics*. 9 (400), 1-13.
- ❖ Hung, K. T., Kao, C. H. (2004). Hydrogen peroxide is necessary for abscisic acid-induced senescence of rice leaves. *Journal of Plant Physiology*, 161, 1347-1357.
- ❖ Hsu, Y. T., Kao, C. H. (2004). Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42 (3), 227-238.

- ❖ Hsu, Y. T., Kao, C. H. (2007). Heat shock-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant and Soil*, 300 (1), 137-147.
- ❖ Inostroza-Blancheteau, C., Reyes-Díaz, M., Aquea, F., Nunes-Nesi, A., Alberdi, M., Arce-Johnson, P. (2011). Biochemical and molecular changes in response to aluminium-stress in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1005-1012.
- ❖ Jacquemart, A. L., Cawoy, V., Kinet, J. M., Ledent, J. F., Quinet, M. (2012). Is Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) Still a Valuable Crop Today?. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 6 (2), 1-10.
- ❖ Jiang, M. Y., Zhang, J. H. (2004). Abscisic acid and antioxidant defense in plant cells. *Acta Botanica Sinica*, 46 (1), 1-9.
- ❖ Jones, K.H., Senft, J.A., (1985). An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33, 77-79.
- ❖ Jorge, R. A., Menossi, M., Arruda, P. (2001). Probing the role of calmodulin in Al toxicity in maize. *Phytochemistry*, 58, 415-422.
- ❖ Jungjohann, J., Longeri, L., Vidal, I. (1997). Tolerancia diferencial de cultivares de trigo al aluminio. *Agricultura Técnica*, 57 (3), 169-176.
- ❖ Khan, N. A., Samiullah, S. Singh, Nazar, R. (2007). Activities of Antioxidative Enzymes, Sulphur Assimilation, Photosynthetic Activity and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars Differing in Yield Potential Under Cadmium Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 435-444.
- ❖ Klug, B., Horst, W. J. (2010) (a). Oxalate exudation into the root-tip water free space confers protection from aluminum toxicity and allows aluminum accumulation in the symplast in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *New Phytologist*, 187, 380-391.
- ❖ Klug, B., Horst, W. J. (2010) (b). Spatial characteristics of aluminum uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 139 (2), 181-191.
- ❖ Klug, B., Specht, A., Horst, W. J. (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. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 237-260.
- ❖ Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Hoekenga, O. A. (2005). The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil*, 274, 175-195.
- ❖ Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., Menzies, N. W., Nicholson, T. M., McKenna, B. A., Wang, P., Gresshoff, P. M., Kourousias, G., Webb, R. I., Green, K., Tollenaere, A. (2015). Identification

- of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiology*, 167 (4), 1402-1411.
- ❖ Kopittke, P. M. (2016). Role of Phytohormones in aluminium rhizotoxicity. *Plant, Cell and Environment*, 39 (10), 2319-2328.
  - ❖ Kopittke, P. M., Menzies, N. W., Wang, P., Blamey, F. P. (2016). Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. *Journal of Experimental Botany*, 10 (1093), 1-17.
  - ❖ Lei, G. J., Yokosho, K., Yamaji, N., Fujii-Kashino, M., Ma, J. F. (2017)a. Functional characterization of two half-size ABC transporter genes in aluminium-accumulating buckwheat. *The New Phytologist*, 215 (3), 1080-1089.
  - ❖ Lei, G. J., Yokosho, K., Yamaji, N., Ma, J. F. (2017)b. Two MATE Transporters with different subcellular localization are involved in Al tolerance in Buckwheat. *Plant and Cell Physiology* 58 (12), 2179-2189.
  - ❖ 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.
  - ❖ Liotenberg, S., North, H., Marion-Poll, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37 (5), 341-350.
  - ❖ Ma, J. F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., Matsumoto, H. (1997). Internal detoxification mechanism of Al in Hydrangea (Identification of Al form in the leaves). *Plant Physiology*, 113, 1033-1039.
  - ❖ Ma, J. F., Hiradate S., Matsumoto, H. (1998). High Aluminum Resistance in Buckwheat, Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *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.
  - ❖ 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.
  - ❖ Menzies, N. W., Edwards, D. G., Bell, L. C. (1994). Effects of Calcium and Aluminium in the Soil Solution of Acid, Surface Soils on Root Elongation of Mungbean. *Australian Journal of Soil Research*, 32, 721-737.

- ❖ Meriga, B., Krishna-Reddy, B., Rajender-Rao, K., Ananda-Reddy, L., Kavi-Kishor, P. B. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 161 (1), 63-68.
- ❖ Misra, H., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247, 3170–3175.
- ❖ Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, 7 (9), 405-410.
- ❖ 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.
- ❖ Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22 (5), 867-880.
- ❖ Nunes-Nesi, A., Santos-Brito, D., Inostroza-Blancheteau, C., Fernie, A. R., Araújo, W. L. (2014). The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends in Plant Science*, 30 (10), 1-9.
- ❖ Ownby, J. D. (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. *Physiologia Plantarum*, 87, 371-380.
- ❖ 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-Sepúlveda, 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., 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.
- ❖ 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.
- ❖ Rastogi, R. P., Singh, S. P., Hader, D. P., Sinha, R. P. (2010). Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397 (3), 603-607.
- ❖ 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., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barceló, 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.
- ❖ Roselló, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J., Llugany, M. (2015). Differential activation of genes related to aluminium tolerance in two contrasting rice cultivars. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 152, 160-166.
- ❖ Salas, R. (1996). El aluminio en la relación suelo planta. Centro de Investigaciones agronómicas, X Congreso Nacional Agronómico, II Congreso de Suelos, 109-113.
- ❖ Salazar-Chavarría, A. V. (2015). Respuesta Fisiológica de *Fagopyrum esculentum* Moench. al estrés por aluminio. Tesis de licenciatura. Instituto de Ecología, UNAM, 64 pp.
- ❖ Salazar-Chavarría, A. V., Cruz-Ortega, R. (2015, abril). El estrés por aluminio y tolerancia en una planta acumuladora: *Fagopyrum esculentum* Moench. Póster presentado en el V Congreso Mexicano de Ecología, San Luis Potosí, México.
- ❖ Sah, S. K., Reddy, K. R., Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7 (571), 1-26.
- ❖ Sawaki, K., Sawaki, Y., Zhao, C. R., Kobayashi, Y., Koyama, H. (2016). Specific transcriptomic response in the shoots of *Arabidopsis thaliana* after exposure to Al rhizotoxicity: - potential gene expression biomarkers for evaluating Al toxicity in soils. *Plant Soil*, 409, 131-142.
- ❖ Scandalios, J.G., Guan, L., Polidoros, A. N. (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. En: Scandalios, J. G. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 343-406 pp.
- ❖ Schaedle, M., Bassham, J. (1977). Chloroplast glutathione reductase. *Plant physiology*, 59, 1011-1012.
- ❖ Sharma, P., Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26, 2027-2038.
- ❖ Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H., Kang, C. M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4 (1), 8-14.
- ❖ 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 and Soil*, 284, 265-271.
- ❖ Silva-Navas, J., Moreno-Risueno, M. A., Manzano, C., Pallero-Baena, M., Navarro-Neila, S., Téllez-Robledo, B., García-Mina, J. M., Baigorri, R., Gallego, F. J., Del Pozo, J. C. (2015). D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *The Plant Journal*, 84 (1), 244-255.
- ❖ Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plants cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.
- ❖ Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Krupa, Z. (2003). The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 47 (1), 71-78.
- ❖ 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.
- ❖ 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.
- ❖ Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C. (2007). Respuestas fisiológicas y bioquímicas de plantas de tabaco a concentraciones de aluminio en invernadero. *Terra latinoamericana*, 25 (3), 251-259.
- ❖ Trinei, M., Giorgio, M., Cicalese, A., Barozzi, S., Ventura, A., Migliaccio, E., Milia, E., Padura, I. M., Raker, A. V., Maccarana, M., Petronilli, V., Minucci, S., Bernardi, P., Lanfrancone, L., Pelicci, P. G. (2002). A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*, 21, 3872- 3878.
- ❖ Verma, S., Dubey, R. S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
- ❖ Wang, H., Chen, R. F., Iwashita, T., Shen, R. F., Ma, J. F. (2015). Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytologist*, 205, 273-279.

- ❖ Wang, C. L., Ding, M. Q., Zou, C.Y., Zhu, X. M., Tang, Y., Zhou, M. L., Shao, J.R. (2017). Comparative Analysis of Four Buckwheat Species Based on Morphology and Complete Chloroplast Genome Sequences. *Scientific Reports*, 7, (6514), 1-14.
- ❖ Weil, R. R., Brady, N. C. (2016). The nature and properties of soils. Pearson, 15<sup>o</sup> edición, 1086 pp.
- ❖ Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van-Montagu, M., Inzé, D., Van-Camp, W. (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defense in C3 plants. *The EMBO Journal*, 16 (16), 4806-4816.
- ❖ Xu, J. M., Fan, W., Jin, J. F., Lou, H. Q., Chen, W. W., Yang, J. L., Zheng, S. J. (2017). Transcriptome Analysis of Al-Induced Genes in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) Root Apex: New Insight into Al Toxicity and Resistance Mechanisms in an Al Accumulating Species. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1141), 1-14.
- ❖ Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. (2001). Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots. *Plant Physiology*, 125, 199- 208.
- ❖ Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S. R., Rikiishi, S., Matsumoto, H. (2002). Aluminum Toxicity is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*, 128 (1), 63-72.
- ❖ Yan, J., Chen, J., Yu, L., Liu, J. (2012). Aluminum tolerance in Centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.): Excluding Al from root. *Scientia Horticulturae*, 143, 212-219.
- ❖ 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.
- ❖ Yang, Y., Xu, S., An, L., Chen, N. (2007). NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide production, induced by salinity stress, may be involved in the regulation of total calcium in roots of wheat. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1429-1435.
- ❖ Yang, L-T., Qi, Y-P., Jiang, H-X., Chen, Li-Song. (2013). Roles of Organic Acid Anion Secretion in Aluminium Tolerance of Higher Plants. *BioMed Research International*, 173682, 1-16.
- ❖ Yang, Y., Ma, T., Ding, F., Ma, H., Duan, X., Gao, T., Yao, J. (2016). Interactive zinc, iron, and copper-induced phytotoxicity in wheat roots. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (1), 395-404.
- ❖ Yao, P-F., Li, C-L., Zhao, X-R., Li, M-F., Zhao, H-X., Guo, J-Y., Cai, Y., Chen, H., Wu, Q. (2017). Overexpression of a Tartary Buckwheat Gene, FtbHLH3, enhances Drought/Oxidative Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8 (625), 1-17.

- ❖ Yin, L., Wang, S., Eltayeb, A. E., Uddin, M. L., Yamamoto, Y., Tsuji, W., Takeuchi, Y., Tanaka, K. (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco. *Planta*, 231 (3), 609-621.
- ❖ Yin, L., Mano, J., Tanaka, K., Wang, S., Zhang, M., Deng, X., Zhang, S. (2017). High level of reduced glutathione contributes to detoxification of lipid peroxide-derived reactive carbonyl species in transgenic *Arabidopsis* overexpressing glutathione reductase under aluminum stress. *Physiologia Plantarum*, 161 (2), 211-223.
- ❖ Yokosho, K., Yamaji, N., Ma, J.F. (2014). Global Transcriptome Analysis of Al-Induced Genes in an Al-Accumulating Species, Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Plant and Cell Physiology*, 55 (12), 2077-2091.
- ❖ Yokosho, K., Yamaji, N., Mitani-Ueno, N., Shen, R. F., Ma, J. F. (2016). An Aluminum-Inducible IREG Gene is Required for Internal Detoxification of Aluminum in Buckwheat. *Plant and Cell Physiology*, 57 (6), 1169-1178.
- ❖ Zagorchev, L., Seal, C. E., Kranner, I., Odjakova, M. (2013). A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (4), 7405-7432.
- ❖ Zhao, J., Jiang, L., Tang, X., Peng, L., Li, X., Zhao, G., Zhong, L. (2018). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Flower Volatile Oils of *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* and *Fagopyrum cymosum*. *Molecules*, 23, (182), 1-10.
- ❖ 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, 1-8.
- ❖ Zhu, Y., Yan, J., Liu, W., Liu, L., Sheng, Y., Sun, Y., Li, Y., Vibe-Scheller, H., Jiang, M., Hou, X., Ni, L., Zhang, A. (2016). Phosphorylation of a NAC transcription factor by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates abscisic acid-induced antioxidant defense in maize. *Plant Physiology*, 171, 1651-1664.