



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**LABORATORIO DE ALELOPATÍA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**Efectos de diferentes concentraciones de aluminio  
en la fisiología de plántulas de *Fagopyrum  
esculentum* cv. Mancan.**

**Área específica  
Ciencias Ambientales.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**Morales Moreno Joselin Damaris**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. María del Rocío Cruz Ortega**

**ASESOR INTERNO:**

**M. en C. Germán Calva Vásquez**



**Ciudad de México, 2021.**



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.

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta máxima casa de estudios. La educación laica y gratuita amplía la visión del mundo de las juventudes.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por dejarme aprender en sus aulas y darme la mejor formación profesional.

Al Instituto de Ecología por permitirme desarrollar mis habilidades en sus laboratorios y espacios de aprendizaje, durante la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis la Dra. María del Rocío Cruz Ortega por permitirme trabajar bajo su dirección y hacerme parte de su equipo personal de laboratorio, por todo el apoyo que me ha brindado y por ser una persona a la cual admiro con cada cosa que me permite aprender de ella.

A mi asesor interno el M. en C. Germán Calva Vásquez por abrirme las puertas de su laboratorio, que fue durante mucho tiempo como un hogar para mí, por permitirme aprender de él y brindarme todo su apoyo académico y personal.

A mis sinodales Rodrigo Aníbal Mateos Nava, Carlos Castillejos Cruz y Aida Zapata Cruz por sus valiosas observaciones, aportaciones y por toda la atención brindada.

Al Dr. Gastón Contreras Jiménez por brindarme su apoyo dentro del Laboratorio de microdissección láser (LabMicroLas) del Instituto de Ecología, UNAM, durante la realización de esta tesis.

A la Biol. Susana Guzmán Gómez responsable del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (II) del Instituto de Biología, UNAM, por brindarme su apoyo.

A la Biol. Bárbara Estrada por su ayuda en la realización del colorante de azul de anilina.

A la M. en C. y futura Doctora Verónica Rodríguez por permitirme aprender de ella y de su experiencia, por aconsejarme y apoyarme tanto en la realización de esta tesis como en lo personal.

# Dedicatorias

A mi madre por ser la primera en creer en mis capacidades y por inculcarme que siempre puedo hacerlo mejor.

A mi hermano Roberto por ser mi mejor compañero durante nuestra infancia, y por los días que pude despertar e ir a la universidad gracias a él.

A mis tíos Omar y Esther por permitirme ser parte de su familia, por tratarme y apoyarme como a una hija.

A mi tía Lourdes por apoyarme, escucharme y no juzgarme.

De nuevo a Vero y Mora por hacerme reflexionar y ser una mano amiga en el momento que lo necesitaba.

Y por último pero no menos importante a todos mis amigos y conocidos que me escucharon y me alentaron a seguir adelante. Son muchas las buenas personas que el universo ha puesto en mi camino.

# Índice General

I. Resumen.....	6
II. Introducción.....	8
III. Marco Teórico.....	10
3.1 Aluminio en el suelo.....	10
3.2 Adquisición y transporte del aluminio en la planta.....	11
3.3 Toxicidad por aluminio.....	12
3.4 Efectos del aluminio en raíces.....	14
3.5 Calosa en raíces.....	14
3.6 Mecanismos de tolerancia al aluminio.....	16
3.7 <i>Fagopyrum esculentum</i> como planta modelo en la tolerancia al Al <sup>3+</sup> .....	20
IV. Antecedentes.....	23
V. Justificación.....	24
VI. Pregunta de investigación.....	24
VII. Hipótesis.....	24
VIII. Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
IX. Metodología.....	26
9.1 Material vegetal.....	26
9.2 Bioensayos con plántulas de <i>F. esculentum</i> expuestas a Al <sup>3+</sup> .....	26
9.3 Evaluación de la tasa de crecimiento radicular relativo.....	26
9.4 Absorción y acumulación de aluminio.....	27
9.5 Intensidad de fluorescencia.....	28

9.6 Análisis estadístico de los resultados.....	28
X. Resultados.....	29
10.1 Efecto en el crecimiento radicular relativo de <i>F. esculentum</i> a concentraciones crecientes de Al <sup>3+</sup> durante las primeras 48 h.....	29
10.2 Evaluación de la penetración y acumulación de Al <sup>3+</sup> en las raíces expuestas durante las primeras 48 h.....	33
10.3 Formación de calosa en las raíces expuestas a Al <sup>3+</sup> durante las primeras 48 h.....	38
XI. Discusión.....	42
11.1 Efecto en el crecimiento radicular relativo de <i>F. esculentum</i> a concentraciones crecientes de Al <sup>3+</sup> durante las primeras 48 h.....	42
11.2 Evaluación de la penetración y acumulación de Al <sup>3+</sup> en las raíces expuestas durante las primeras 48 h.....	45
11.3 Formación de calosa en las raíces expuestas a Al <sup>3+</sup> durante las primeras 48 h.....	48
XII. Conclusiones.....	53
XIII. Perspectivas.....	54
XIV. Referencias bibliográficas.....	55

## Índice de Figuras.

Figura 1. Suelos ácidos.....	11
Figura 2. Respuestas integradas de la planta respecto a los efectos de estrés por aluminio.....	13
Figura 3. Inducción de ácidos orgánicos.....	18
Figura 4. <i>Fagopyrum esculentum</i> .....	20
Figura 5. Captación y distribución del Al en la planta acumuladora de aluminio: <i>Fagopyrum esculentum</i> .....	22
Figura 6. Longitud radicular a diferentes concentraciones.....	31
Figura 7. <i>Fagopyrum esculentum</i> expuestas a diferentes concentraciones de Al <sup>3+</sup> .....	31
Figura 8. Crecimiento radicular relativo a diferentes concentraciones de Al <sup>3+</sup> .....	32
Figura 9. Crecimiento radicular relativo a 50 µM de Al <sup>3+</sup> .....	32
Figura 10. Tinción con hematoxilina, tratamiento a 50 µM de Al <sup>3+</sup> (3 y 6 h).....	34
Figura 11. Ápice de las raíces de <i>F. esculentum</i> expuestas a 50 µM de Al <sup>3+</sup> durante 12, 24, 48 y 72 h teñidas con hematoxilina.....	35
Figura 12. Tinción con hematoxilina, tratamiento con 50 µM de Al <sup>3+</sup> (24 h).....	36
Figura 13. Raíces de plántulas de <i>F. esculentum</i> expuestas a diferentes concentraciones (25, 50,100, 250 y 500 µM) de Al <sup>3+</sup> por 24 h.....	37
Figura 14. Raíces de <i>F. esculentum</i> expuestas a 50 y 500 µM de Al <sup>3+</sup> por 24 h, con tinción de hematoxilina.....	37
Figura 15. Área de fluorescencia.....	39
Figura 16. Intensidad de fluorescencia.....	40
Figura 17. Tinción con azul de anilina, tratamiento a 25, 50,100, 250 y 500 µM de Al <sup>3+</sup> (24 y 48 h).....	41

# I. Resumen

La toxicidad por aluminio (Al) en suelos ácidos provoca una severa inhibición y deformación radicular, produciendo alteraciones en los procesos fisiológicos en la mayoría de las plantas. Existen especies tolerantes al Al, tal es el caso de *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae), una planta tolerante y acumuladora, en la que aún no se han dilucidado los efectos tóxicos y los mecanismos de tolerancia en la etapa inicial de su desarrollo. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos en la fisiología de las raíces de *Fagopyrum esculentum* expuestas a diferentes concentraciones de  $\text{Al}^{3+}$  durante la primera etapa de su desarrollo, y se evaluó el umbral de tolerancia de la especie. Para ello, se realizaron bioensayos con plántulas de *F. esculentum* expuestas a  $\text{Al}^{3+}$  en hidroponía, evaluando la tasa de crecimiento radicular (RRG) con 0, 25, 50, 100, 250 ó 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  a las 0, 24 y 48 h de tratamiento respectivamente, con la finalidad de comparar el efecto de concentraciones crecientes con la concentración que se conoce induce los mecanismos de tolerancia, se evaluó el RRG a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento. Así mismo, se evaluó la absorción y acumulación de  $\text{Al}^{3+}$  en los ápices radiculares por medio de una tinción con hematoxilina. Además, se observó la producción de calosa inducida por este metal, con microscopía de fluorescencia mediante la tinción con azul de anilina. Los **resultados** obtenidos muestran que el crecimiento radicular relativo de plántulas *F. esculentum* expuestas a concentraciones crecientes de  $\text{Al}^{3+}$ , durante las primeras 48 h se vio afectado conforme aumentaba la concentración, siendo la exposición a 25  $\mu\text{M}$  la única no dañina. Mientras que, comparando el efecto de concentraciones, fue a partir de la exposición a 50  $\mu\text{M}$  que se inhibió la tasa de crecimiento radicular desde las 3 h, aumentando también el daño

celular. La exposición a 250  $\mu\text{M}$  fue la concentración con la cual la radícula deja de crecer en su totalidad. De igual manera se evidenció que existe penetración del metal a partir de la exposición a 50  $\mu\text{M}$ , siendo la exposición a 250  $\mu\text{M}$  donde se observó un daño más severo en la raíz, hasta prácticamente morir a los 500  $\mu\text{M}$ . Finalmente se evidenció el aumento de la formación de calosa en las raíces expuestas a crecientes concentraciones de  $\text{Al}^{3+}$ , observándose durante las primeras 24 h de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  que la producción de calosa se ubicó en las áreas correspondientes a la zonas de división y transición. Mientras la exposición a 100  $\mu\text{M}$  mostró tejido muy deteriorado concordante al aumento en la producción del polisacárido. Y a partir del tratamiento a 250  $\mu\text{M}$  la formación de calosa aumentó distribuyéndose a lo largo de la raíz. Exhibiendo una mayor formación en el ápice tanto de la raíz principal como de las raíces laterales.

Basado en los resultados de este estudio se evidenció que *F. esculentum* es sensible a nivel de plántula, y se propone que la concentración umbral en la tolerancia al Al para *F. esculentum* es de 250  $\mu\text{M}$ .

## II. Introducción.

Las actividades humanas han contribuido a la acidificación del suelo mediante el uso excesivo de fertilizantes, lluvia ácida y altas tasas de extracción de nutrientes. Para el crecimiento de los cultivos en suelos ácidos ( $\text{pH} < 5.0$ ) la toxicidad por aluminio (Al) es la principal limitante, puesto que, en estas condiciones el Al se solubiliza a catión trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ) ocupando más de la mitad de los sitios de intercambio iónico en el suelo (Casierra y Aguilar, 2007) y al ser absorbido por las plantas causa una severa inhibición y deformación radicular, lo que genera una disminución en la absorción de nutrientes y agua, al igual que alteraciones en procesos fisiológicos (Singh et al., 2017).

La mayoría de las especies vegetales son sensibles al  $\text{Al}^{3+}$ , que a nivel celular genera disfunción mitocondrial, alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Singh et al., 2017). La acumulación de ERO resulta en la peroxidación de lípidos y la degradación de proteínas (González et al., 2008). Así mismo, el incremento de la peroxidación y/o la alteración de los lípidos de la membrana tienen una notoria modificación en su permeabilidad (Singh et al., 2017).

La activación de vías de señalización explícitas sugiere que el Al no provoca una interrupción completa del metabolismo celular, sino que actúa en sitios específicos. Uno de los efectos mejor documentados del Al en el apoplasto es un rápido aumento en la síntesis y deposición de calosa (Wissemeier y Horst; 1995, Sivaguru et al., 2000). Demostrando que esta producción de calosa bloquea los plasmodesmos, inhibiendo la transferencia simplástica de solutos (Sivaguru et al., 2000). En plantas como el maíz (*Zea mays*), la producción de calosa inducida por Al es un indicador temprano de la sensibilidad a este metal (Llugany et al., 1994; Zhang y Rengel, 1999).

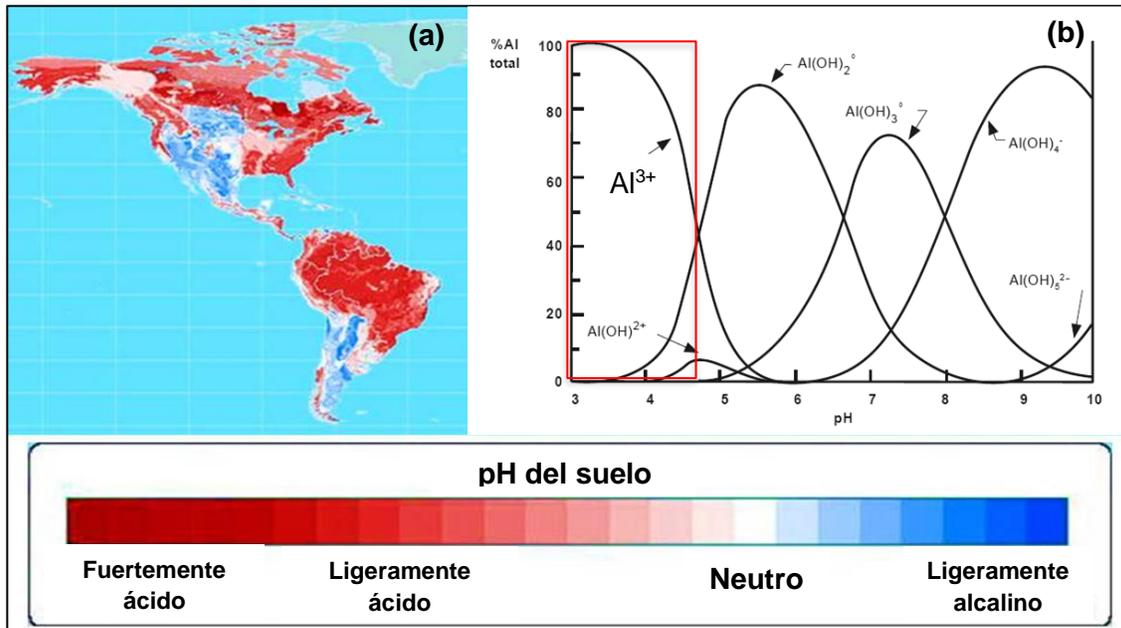
La mayoría de las especies vegetales son sensibles al efecto tóxico del Al, no obstante, existen plantas que presentan mecanismos de tolerancia. *Fagopyrum esculentum* es una de las especies que ha desarrollado estrategias para tolerar altas concentraciones de Al (Yokosho et al., 2014; Xu et al., 2017). En esta especie se ha documentado la exudación de ácido oxálico en las puntas de sus raíces para excluir al metal, además de su acumulación en las células de las hojas formando un complejo no tóxico, Al-oxalato (1:3) (Ma et al., 1998; Yokosho et al., 2014; Wang et al., 2015). A pesar de que esta especie es tolerante y acumuladora de Al<sup>3+</sup>, se han observado síntomas de sensibilidad a este metal en etapas tempranas de su desarrollo (Reyna-Llorens et al., 2015; Salazar-Chavarria et al., 2020). Siendo relevante conocer si la especie tiene un umbral de tolerancia al Al<sup>3+</sup>, y cuáles son sus respuestas fisiológicas cuando es expuesta a concentraciones crecientes.

## III. Marco Teórico

### 3.1 Aluminio en el suelo

El aluminio (Al) es el tercer elemento metálico más abundante y distribuido de forma ubicua en la corteza terrestre (Foy, 1988). En soluciones alcalinas ( $\text{pH} > 8$ ) comúnmente adopta la forma aniónica  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  o aluminato. En soluciones con un  $\text{pH}$  de 7.0, se encuentra en la forma de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  mineral comúnmente llamado gibbsite. En este rango de  $\text{pH}$  mayores a 5.5 la concentración del Al en la solución del suelo suele ser menor a  $37 \mu\text{M}$ . Pero en soluciones con  $\text{pH}$  debajo de 5.5, adopta las formas catiónicas  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  y  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ , mientras que cerca del 90% del Al total en solución se encuentra en forma de  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  (Kinraide, 1991), o soluble e intercambiable como Al trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ) (Kochian et al., 2004) el cual es fitotóxico para la mayoría de las plantas.

En el mundo, aproximadamente el 30% de la superficie agrícola y el 50% de la superficie potencialmente arable está formada por suelos ácidos, de esta cifra el 41% se encuentra en América (Figura 1). La acidez de los suelos limita el crecimiento de las plantas debido a una combinación de factores que incluyen la baja disponibilidad de nutrientes esenciales especialmente calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) y/o la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$ . Esta última es una de las principales limitaciones para la producción de cultivos en todo el mundo. Teniendo un rango de toxicidad para las especies de 5-100  $\mu\text{M}$  en la solución del suelo (Kopittke et al., 2016).



**Figura 1. Suelos ácidos.** Relación entre la distribución de suelos ácidos en América (a) tomado de Kochian, 2014. Y la forma o especie del Al de acuerdo con el pH (b) tomado de Porta et al. 2003.

### 3.2 Adquisición y transporte del aluminio en la planta

En condiciones de pH ácido, el  $Al^{3+}$  está disponible y es absorbido por las plantas, el cual no tiene una función biológica específica (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Por medio de inhibidores metabólicos se demostró que su permeabilidad es un proceso que no requiere energía (Feixa, 2001). Este metal tiene una alta afinidad por la pared celular, debido principalmente a la gran densidad de cargas negativas en los componentes de la misma. Esta propiedad de la pared celular se denomina capacidad de intercambio catiónico (CEC). Una gran parte de la CEC es aportada por las pectinas de la pared celular, así como por la membrana plasmática (Horst, 1995). La absorción del Al se produce a través de los canales de  $Ca^{2+}$ , debido a su diámetro similar es capaz de

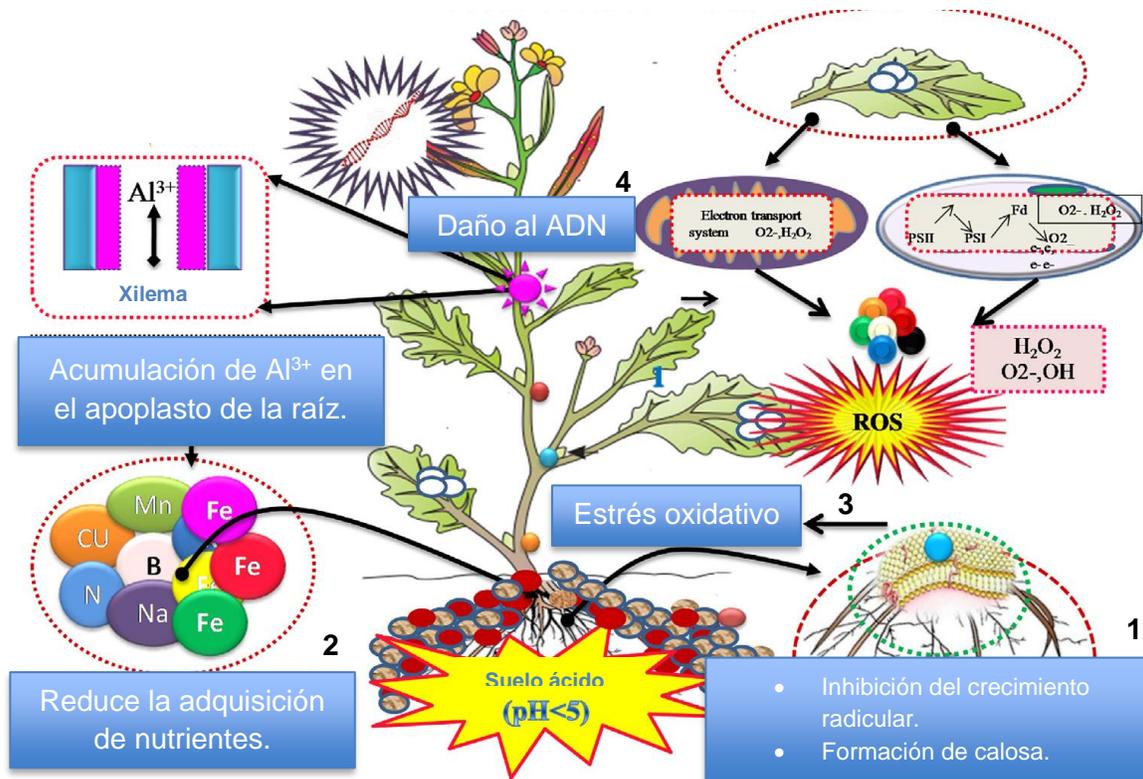
desplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  de la pared celular y de la membrana plasmática, rigidizando la pared y alterando las funciones de elongación en la célula. Cerca del 95 % del Al asociado a las raíces de las plantas se encuentra en la pared celular y es el responsable del rápido e irreversible desplazamiento y sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  en el apoplasto (Macêdo et al., 2001). Una gran proporción del Al que entra a las raíces se localiza en el apoplasto (Horst, 1995; Sivaguru y Horst, 1998), aunque una pequeña cantidad también logra entrar al simplasto. Y una vez en el citoplasma, el Al afecta la homeostasis de los iones  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  (Bose et al., 2010).

### 3.3 Toxicidad por aluminio

Debido a las fuertes y rápidas interacciones del  $\text{Al}^{3+}$  con múltiples sitios en el apoplasto y simplasto, éste induce efectos perjudiciales como: una severa inhibición del crecimiento de la raíz, reducción en la biomasa de los brotes y reducción en el rendimiento del cultivo a través de la alteración de procesos fisiológicos (Figura 2) (Kochian et al., 2004). Se ha demostrado también que el  $\text{Al}^{3+}$  induce la producción de calosa, un polisacárido lineal conocido como 1,3- $\beta$ -D-glucano (Guichang et al., 1994), el cual representa uno de los pocos polisacáridos de la pared celular capaz de ser localizado citoquímicamente, formando complejos con colorantes (i.e. anilinas) (Kauss, 1985).

En general, el  $\text{Al}^{3+}$  impide la división y elongación celular; modifica la estructura y el funcionamiento de las membranas plasmáticas: uniéndose a los grupos fosfato de los fosfolípidos o a las proteínas de membrana; aumenta la rigidez de la pared celular mediante el entrecruzamiento de las pectinas, alterando su estructura. Se ha demostrado que el  $\text{Al}^{3+}$  induce una disminución de la permeabilidad de la membrana y del flujo de

electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual tiene como consecuencia la disminución de las reservas de ATP, y de la tasa de consumo (Yamamoto et al., 2002). Lo anterior sugiere que la disfunción mitocondrial inducida por el  $\text{Al}^{3+}$  podría estar directamente relacionada con la pérdida de la capacidad de crecimiento; reduce la toma de agua; y disminuye el metabolismo de varios nutrientes (Casierra y Aguilar, 2007) dificultando el de cationes, facilitando el de aniones, además del decremento en la actividad enzimática de proteínas membranales (Marín et al., 2010).



**Figura 2. Respuestas integradas de la planta respecto a los efectos tóxicos del aluminio.**

(1) Acumulación de calosa en los plasmodesmos de células de la raíz, obstruyendo la comunicación célula a célula. (2) Disminución de la adquisición de nutrientes de la rizosfera, causando deficiencia de nutrientes tanto en raíz como en el brote. (3) Estrés oxidativo desencadenado por ERO. (4) Efectos perjudiciales en la composición y replicación del ADN e incremento en la rigidez de la estructura de la doble hélice y la cromatina (tomada y modificada de Singh et al., 2017).

### 3.4 Efectos del aluminio en raíces

El primer sitio de afectación son las raíces, específicamente los ápices (Zheng et al., 2005), siendo la cofia y las zonas meristemática y de elongación las que acumulan más y registran la mayor sensibilidad al daño físico en comparación con los tejidos maduros (Doncheva et al., 2005). La toxicidad temprana en las raíces tiene como resultado un sistema radicular atrofiado con abundantes raíces laterales, las cuales son cortas, gruesas y quebradizas (Poschenrieder et al., 2008).

El  $Al^{3+}$  provoca modificaciones en la estructura de la membrana, desplaza al  $Ca^{2+}$  e inhibe la expansión de las paredes celulares, altera el transporte de iones y causa un desequilibrio de nutrientes; se ha observado que en las raíces el  $Al^{3+}$  altera la organización de los microtúbulos y los filamentos de actina del citoesqueleto, siendo este efecto más pronunciado en células de la zona de transición distal (ZTD), la cual se localiza entre el meristemo y la zona de elongación (ZE) (Horst et al., 1999; Sivaguru et al., 1999). Además de afectar a los constituyentes del simplasto como las calmodulinas, causa rupturas en el aparato de Golgi, interfiere con la organización del citoesqueleto, altera las funciones de la mitocondria, y causa alteraciones en el entrecruzamiento de las pectinas del apoplasto, 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 (Bojórquez-Quintal et al., 2017; Daspute et al., 2017).

### 3.5 Inducción de calosa

Como se mencionó anteriormente, la calosa (1,3-  $\beta$ -d-glucano) es un polisacárido producido mediante el aumento del  $Ca^{2+}$  citosólico ( $[Ca^{2+}]_{cit}$ ) y la modificación de la

membrana plasmática (MP) como factores cruciales para la activación de la 1,3- $\beta$ -glucano sintasa (Kauss et al., 1990; Kauss 1996), y es degradado por las  $\beta$ -1,3-glucanasas. La formación de calosa en raíces inducida por Al se ha documentado en diferentes especies de plantas entre ellas la planta del té *Camellia sinensis* (Lian et al., 1998).

La calosa juega un papel importante en diversos procesos durante el desarrollo de la planta y / o en respuesta a estrés biótico y abiótico, incluido el estrés por Al (Stass y Horst 2009). En el maíz se ha observado que la mayor formación de calosa se encuentra en las células de la corteza externa de la zona distal de transición que podría estar relacionada con una mayor despolarización de la membrana plasmática (Sivaguru et al., 1999).

Se ha reportado esta deposición de calosa especialmente en la epidermis y la corteza exterior de los ápices radiculares (Schreiner et al., 1994). Donde se observa que se acumula en la pared celular alrededor de los plasmodesmos, inhibiendo la transferencia simplástica de solutos. El hecho de que la producción de calosa inducida por  $Al^{3+}$  se origine progresivamente, a través de las capas de las células corticales, sugiere que la comunicación de célula a célula está siendo inhibida (Sivaguru et al., 2000).

Debido a la alta afinidad del Al con la matriz péptica y la hemicelulosa, se ven afectadas sustancialmente propiedades químicas y mecánicas de la pared celular (Horst et al., 2010). Por ello se ha sugerido que una fuerte unión del Al a la matriz péptica puede inhibir la extensión física de la pared celular y disminuir la eficacia de las enzimas que participan en la extensibilidad de esta (Wehr et al., 2004).

### 3.6 Mecanismos de tolerancia al aluminio

Principalmente, en la mayoría de los cultivos, la tolerancia al  $\text{Al}^{3+}$  se basa en dos estrategias la exclusión de este metal mediante la formación de complejos, y por el secuestro del mismo en bajas concentraciones dentro de las vacuolas de las hojas (Klug y Horst, 2010). De manera general entre los mecanismos que evitan la entrada del  $\text{Al}^{3+}$  en las plantas se destacan: la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática frente al flujo de  $\text{Al}^{3+}$ , 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 (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 a nivel de la rizosfera, y con ello se precipita el Al están: *Triticum aestivum*, *Cucurbita pepo*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, un híbrido de *Zea mays* y la mutante de *Arabidopsis thaliana alr-104* resistente a aluminio (Bojórquez-Quintal et al., 2017).

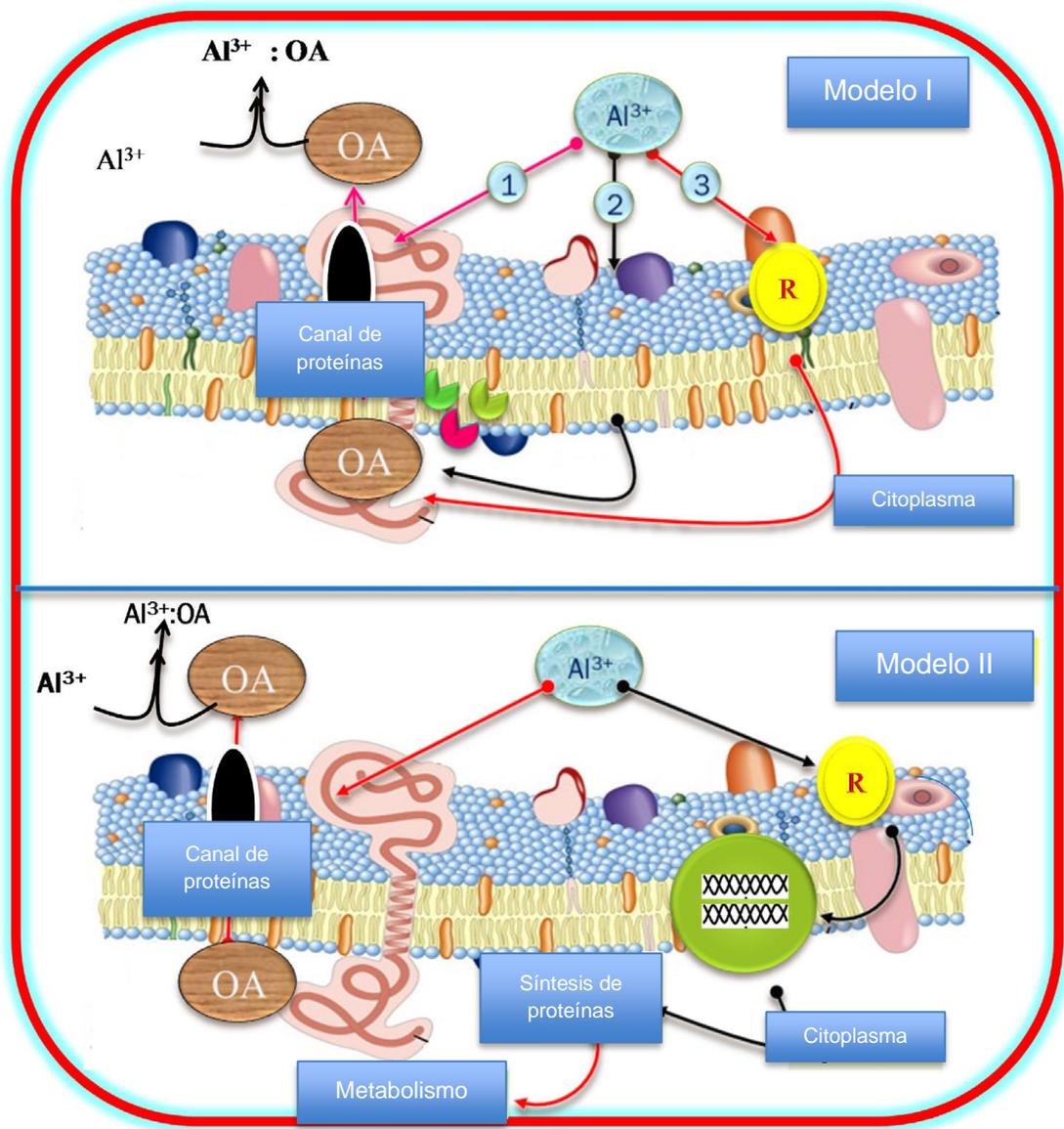
Por otra parte, la secreción de ácidos orgánicos en plantas expuestas a  $\text{Al}^{3+}$  se considera un mecanismo de vital importancia para desarrollar tolerancia a este metal (Xu et al., 2017). La naturaleza de los ácidos orgánicos presentes en la rizósfera difiere con el tipo de planta expuesta a  $\text{Al}^{3+}$ ; en *Phleum pratense* se ha reportado la exudación de ácido oxálico, fórmico, acético y láctico, pero no se ha detectado ácido málico y cítrico, al igual que en la rizósfera de otras plantas (*T. aestivum*, *Phaseolus vulgaris*, *Z. mays*, *Lupinus sp.* entre otras) (Peñaloza et al., 2004).

El citrato y el malato tienen un papel muy importante en la tolerancia al  $\text{Al}^{3+}$ ; por tanto, la activación de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte de estos

ácidos, por ejemplo, los que se encuentran en las familias MATE y ALMT, son vitales en la exudación inducida por este metal y su consiguiente tolerancia (Bojórquez-Quintal et al., 2017). Otro ácido orgánico (AO) de gran relevancia es el ácido oxálico y entre las especies que lo exudan se encuentran *Rumex acetosella*, *Camellia sinensis*, *Colocasia esculenta* y *Fagopyrum esculentum* (Barceló y Poschenrieder, 2002). En general se han planteado dos posibles modelos en la inducción de AO:

**1.-Modelo o patrón de tipo I:** El  $Al^{3+}$  activa los canales iónicos localizados en la membrana plasmática, resultando en una liberación específica de ácidos orgánicos de las raíces en la planta. Esta estimulación de ácidos orgánicos ocurre por tres posibles rutas: **1)** el  $Al^{3+}$  actúa directamente con el canal de proteínas localizado en la membrana plasmática. **2)** entra al citoplasma y activa el canal iónico, directa o indirectamente a lo largo de la cascada de segundos mensajeros. **3)** interactúa con un receptor específico (R) en la membrana plasmática, interviniendo como cascada de segundos mensajeros activando los canales (Figura 3) (Singh et al., 2017).

**2.-En la respuesta del Modelo o patrón de tipo II,** la demora por varias horas de la liberación de ácidos orgánicos puede ocurrir entre la percepción del  $Al^{3+}$  y el flujo de salida del ácido orgánico: Interactuando el Al con la célula, por vía de un receptor de proteína (R) localizado en la membrana plasmática, que ordene la transcripción de genes que codifiquen para proteínas específicas involucradas en el metabolismo de ácidos orgánicos, o de su transporte hacia la membrana plasmática. Liberando así ácidos orgánicos que formen un complejo no tóxico con el Al. De modo que se detoxifique el  $Al^{3+}$  en la rizosfera (Figura 3) (Singh et al., 2017).



**Figura 3. Inducción de ácidos orgánicos.** Dos posibles modelos o patrones del flujo de ácidos orgánicos en las raíces, inducido por Al<sup>3+</sup> (tomado de Singh et al., 2017).

Conjuntamente, la detoxificación interna del  $Al^{3+}$  sucede cuando éste ya ha penetrado al simplasto de las células, entonces es quelado por aniones de carboxilatos que son secuestrados en la vacuola. 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 (Kochian, 1995). Además de los ácidos orgánicos se ha reportado que el  $Al^{3+}$  también puede formar complejos en el citoplasma con otro tipo de ligandos como son los compuestos fenólicos, ATP, ARN o azúcares fosfato (Singh et al., 2017).

Hay plantas que pueden aprovechar este mecanismo y acumular en varias partes el  $Al^{3+}$  acomplexado, se denominan acumuladoras, y existen alrededor de 100 especies con estas características dentro de 30 familias botánicas entre las que se encuentran: *Asteraceae*, *Caesalpinaceae*, *Euphorbiaceae*, *Melastomataceae*, *Myrtaceae*, *Rubiaceae*, *Theaceae* y *Polygonaceae* (Barceló y Poschenrieder, 2002).

### 3.7 *Fagopyrum esculentum* como planta modelo en la tolerancia al Al<sup>3+</sup>

*Fagopyrum esculentum* es una dicotiledónea perteneciente a la familia de las Polygonáceas (Campbell, 1997), se conoce por “trigo sarraceno” o “alforfón” (Figura 4). Las semillas (en sentido estricto aquenios) suelen clasificarse entre los granos de cereal debido a su uso similar. El grano es utilizado en la elaboración de alimento: para aves de corral y harina en la preparación de galletas, fideos, cereales y cerveza. La proteína de trigo sarraceno es de excelente calidad y es alta en el aminoácido esencial lisina (que no se encuentra en los cereales comunes).

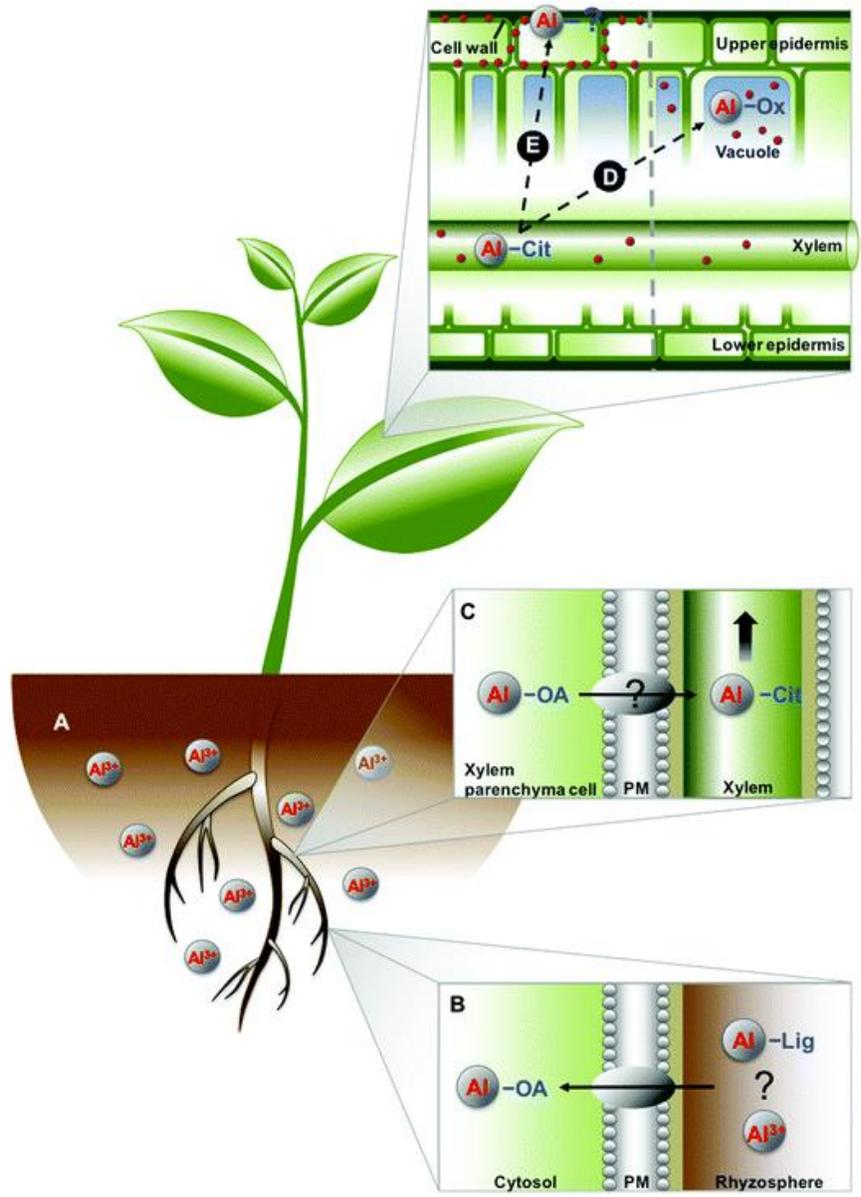


**Figura 4.** *Fagopyrum esculentum* Moench. Fotografías de flor y hoja. Ilustración de la planta tomada de Campbell, 1997.

Se distingue por ser una especie acumuladora y tolerante al  $\text{Al}^{3+}$ , ya que ha desarrollado algunas estrategias: por ejemplo, la exudación de ácido oxálico de los ápices radiculares para excluir al  $\text{Al}^{3+}$ , además de su acumulación en las células de las hojas formando un complejo no fitotóxico (Ma et al., 1998; Yokosho et al., 2014; Wang et al., 2015) de la siguiente manera:

El Al entra en la raíz en su forma iónica ( $\text{Al}^{3+}$ ), una vez que cruza la membrana plasmática, el  $\text{Al}^{3+}$  es quelado para formar un complejo Al-oxalato en una relación 1:3 de  $\text{Al}^{3+}$  y ácido oxálico. Que, al ser trasladado desde las raíces a la parte aérea, se produce en el xilema una reacción de intercambio de ligando para formar Al-citrato en una relación 1:1 (Ma et al., 2001; Yokosho et al., 2014; Chen et al., 2017). Una vez transportado por el xilema el Al-citrato 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, dónde permanece inmóvil (Figura 5) (Ma et al., 2001; Yokosho et al., 2014).

Se ha reportado que la concentración de Al en los cotiledones es de aproximadamente  $12.2 \text{ mg g}^{-1}$  de peso seco, y de hasta  $15 \text{ g Kg}^{-1}$  de peso seco en las hojas maduras de esta especie cultivada en suelo ácido (Wang et al., 2015; Chen et al., 2017). Sorprendentemente, no acumula Al en el aquenio, lo que resulta importante debido al potencial de *F. esculentum* para cultivo alterno en suelos ácidos (Horbowicz et al., 2011).



**Figura 5. Captación y distribución del Al en la planta acumuladora: *Fagopyrum esculentum*.** Abreviaturas: Cit, citrato; Ox, oxalato; AO, ácido orgánico; PM, membrana plasmática (tomada de Grevenstuk y Romano, 2013).

## IV. Antecedentes

Como antecedentes inmediatos, en el laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM, se han realizado estudios a nivel fisiológico y molecular para conocer los mecanismos de tolerancia de esta especie en el desarrollo temprano (plántulas). A nivel fisiológico se realizó un análisis de crecimiento durante todo el ciclo de vida de *F. esculentum* donde no se encontraron diferencias en el desarrollo de las plantas control y las expuestas a 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de Al (Martínez-Rendón, 2013).

A nivel molecular se caracterizó un transportador tipo ABC que podría estar involucrado en el transporte de  $\text{Al}^{3+}$  y se determinó su relación con los niveles de ácido abscísico (ABA), además de cuantificar la exudación de ácidos orgánicos en la etapa de plántula (Reyna-Llorens et al., 2015). Asimismo, se realizó un análisis de microarreglos para identificar los genes involucrados en la tolerancia a este metal. Dentro de los genes inducidos, destacan dos que participan en los procesos de síntesis del ABA; *ZEP* (*ZEAXANTHIN EPOXIDASE*) y *HVA22G* (*HVA22-LIKE PROTEIN H*) y otro relacionado con la señalización del estrés y la síntesis de hormonas: auxinas (*ASA2*) (González-Trillo, 2018).

A nivel bioquímico, se ha mostrado que la exposición a  $\text{Al}^{3+}$  aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (catalasa), GR (glutación reductasa) y APX (ascorbato peroxidasa). En las primeras 12 h de exposición a 50  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ , las raíces de *F. esculentum* presentan daño y mayor producción de ERO causada por la penetración del catión, sin embargo, el aumento en la actividad del sistema antioxidante, entre otros mecanismos, permiten la posterior recuperación del crecimiento radicular (Salazar et al., 2020).

## V. Justificación

Teniendo en cuenta que la acidificación del suelo implica una amenaza para las tierras potencialmente cultivables, a través de la alteración de procesos fisiológicos en las plantas como los descritos en los antecedentes ya mencionados, en este trabajo se tomará por objeto de estudio a *Fagopyrum esculentum* cv. Mancan, que a pesar de ser tolerante y acumuladora de  $Al^{3+}$ , se han observado síntomas de sensibilidad a este metal en etapas tempranas de su desarrollo. Siendo el objetivo principal evaluar si la especie tiene un umbral de tolerancia al  $Al^{3+}$ , y cuáles son sus respuestas fisiológicas a concentraciones crecientes.

## VI. Pregunta de investigación

Siendo *Fagopyrum esculentum* sensible a  $Al^{3+}$  a nivel de plántula, al ser expuesta a concentraciones crecientes de este metal ¿incrementará la actividad de los mecanismos de defensa para contrarrestar los efectos tóxicos en la raíz?, o bien, ¿tendrá un umbral de tolerancia y no soportará concentraciones mayores?

## VII. Hipótesis

Si *Fagopyrum esculentum* es sensible a  $Al^{3+}$  a nivel de plántula, al ser expuesta a concentraciones crecientes de este metal se inducirá el incremento de la síntesis de calosa, y la inhibición del crecimiento radicular, hasta llegar al umbral de tolerancia donde se colapsará el sistema y no podrá contrarrestar los efectos tóxicos en la fisiología de la raíz a concentraciones mayores.

## VIII. Objetivos

### Objetivo general

Evaluar los efectos en la fisiología de las raíces de *Fagopyrum esculentum* expuestas a diferentes concentraciones de  $\text{Al}^{3+}$  durante la primera etapa de su desarrollo, y así determinar el umbral de tolerancia de la especie.

### Objetivos particulares

- Evaluar el crecimiento radicular relativo de *F. esculentum* expuesta a concentraciones crecientes (0, 25, 50, 100, 250 o 500  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Al}^{3+}$  durante las primeras 48 h.
- Comparar el efecto de concentraciones crecientes con la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , que se conoce induce los mecanismos de tolerancia y se recupera el crecimiento de la raíz.
- Evaluar la penetración y acumulación de Al en las raíces expuestas a 0, 25, 50, 100, 250 o 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  durante las primeras 48 h.
- Demostrar la formación de calosa en las raíces expuestas a 0, 25, 50, 100, 250 o 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  durante las primeras 48 h.

## IX. Metodología.

### 9.1 Material vegetal

Todos los experimentos se realizaron con semillas de *F. esculentum* cv. Mancan, que se adquirieron en *Wildlife Management Solutions, Inc.* Alberta, Canadá.

### 9.2 Bioensayos con plántulas de *F. esculentum* expuestas a $Al^{3+}$

Las semillas se germinaron sobre agar al 1 % en cajas Petri por 48 h en la oscuridad dentro de una estufa (Binder) a 27° C, posterior a este período, las plántulas se aclimataron en medio ácido sumergiéndolas en solución de cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) (Sigma-Aldrich) 0.5 mM, pH 4.5 durante 1 h, inmediatamente después se colocaron en hidroponía en una solución de  $CaCl_2$  0.5 mM pH 4.5, con un rango de concentraciones crecientes, contemplando 0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$  de  $AlCl_3$  (Sigma- Aldrich) con una  $n=10$ , según el tratamiento. Estas concentraciones se propusieron con base en trabajos previos del laboratorio (Reyna-Llorens et al. 2015; Salazar-Chavarría 2015). Todos los tratamientos 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  $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$  y una concentración de  $CO_2$  atmosférico de aproximadamente 390 ppm.

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

Para determinar si el  $Al^{3+}$  afecta el crecimiento de las raíces, se realizó un análisis de crecimiento radicular relativo, para ello, se midió la longitud total (en mm) de las raíces de *F. esculentum* a las 0, 24 y 48 h de tratamiento con 0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$  de

Al<sup>3+</sup> en las condiciones antes mencionadas. De igual manera se midió el crecimiento radicular a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h de tratamiento con 50 µM de Al<sup>3+</sup>, esto con la finalidad de comparar el efecto de concentraciones crecientes con la concentración que se conoce activa los mecanismos de tolerancia, en este caso 50 µM de Al<sup>3+</sup>. Posteriormente, a partir de los datos obtenidos de los diferentes experimentos con tres repeticiones cada uno, se calculó la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) con respecto al control (sin AlCl<sub>3</sub>) mediante la siguiente fórmula:

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

En dónde:

$$\Delta E_{t_{tn}} = E_{t_{tn}} - E_{t_{tn-1}} \text{ y } \Delta E_{c_{tn}} = E_{c_{tn}} - E_{c_{tn-1}}$$

Siendo Ec y Et el incremento en la elongación radicular para el control y el tratamiento respectivamente y tn un tiempo determinado (Chandran et al., 2008).

#### 9.4 Absorción y acumulación de aluminio

Para evaluar la absorción y acumulación del Al<sup>3+</sup> en las puntas de las radículas de *F. esculentum*, se utilizó la tinción de hematoxilina (modificada de Choudhury y Sharma, 2014). Después de los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de Al<sup>3+</sup>, bajo las condiciones antes mencionadas, las plántulas (n=5) de cada tratamiento y el control se lavaron con agua destilada por 15 min, posteriormente se tiñeron con una solución de hematoxilina (MCB) 0.1% p/v disuelta en KIO<sub>3</sub> 0.01% p/v durante 15 min, y se lavaron en agua destilada por 15 min nuevamente.

Se seleccionaron y seccionaron ( $\approx 1$  cm) los ápices de al menos tres plántulas más representativas de cada tratamiento y del control, para examinarlas con un microscopio estereoscópico (Leica Z16APOA, cámara Leica DFC490, 8 megapíxeles acoplada al microscopio), con módulos de multicon foco y montaje del programa LAS (Leica Application Suite 4.3.0), del Instituto de Biología, UNAM. La absorción del  $Al^{3+}$  se determinó por el incremento de la coloración violeta y el daño por el estriado.

### 9.5 Tinción de azul de anilina para calosa

Para evidenciar la formación de calosa en las plántulas expuestas a 0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  durante las primeras 24 h y 48 h de tratamiento las plántulas ( $n=5$ ) se lavaron con agua destilada por 15 min y se seccionaron los ápices para ser tratados con una solución de azul de anilina. La solución del colorante se preparó en metilcelosolve, aceite de clavo y alcohol absoluto (6.5 mL, 12.5 mL, 0.5 g y 31 mL respectivamente) (gr/L). Se incubaron los ápices de las radículas con la solución de anilina fluorocromo (50  $\mu L$ /sección) durante 45 min a 20 °C. Se lavaron las muestras con agua destilada y se examinaron por microscopía de fluorescencia con un microscopio Nikon Eclipse® Ti-E, lámpara de halógeno y epifluorescencia de 100W (X- lite, serie 120PC) del Laboratorio de microdissección láser (LabMicroLas) del Instituto de Ecología, UNAM.

## 9.6 Intensidad de fluorescencia

La intensidad se midió mediante el programa *Image J* el cual separa por canales de color la imagen y analiza la densidad en la fluorescencia del azul de anilina, proporcionando en pixeles la intensidad y el área que ocupa dicha fluorescencia.

## 9.7 Análisis estadístico de los resultados

Los datos se analizaron mediante la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) mediante un modelo lineal general y la comparación de medias se analizó mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), con el software *Minitab19* (2020).

# X. Resultados

## 10.1 Efecto en el crecimiento radicular relativo de *F. esculentum* a concentraciones crecientes de $Al^{3+}$ durante las primeras 48 h.

Para evidenciar el efecto de la exposición a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  en *F. esculentum*, se llevaron a cabo una serie de experimentos donde mediante el análisis de crecimiento radicular se observó que la exposición durante 24 y 48 h a concentraciones crecientes de  $Al^{3+}$ , aumentó significativamente la inhibición en la longitud radicular conforme la concentración se incrementó (Figura 6 y 7).

A las 24 h de tratamiento se puede observar que no existen diferencias significativas entre la longitud media de las raíces control (42.1 mm) y las expuestas a 25 y 50  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  (41.4 y 40.9 mm, respectivamente). A diferencia de las expuestas a 100, 250 y 500  $\mu M$  que si presentaron diferencias significativas en la longitud radicular respecto al

control. Siendo las expuestas a 100 y 250  $\mu\text{M}$  (25.6 y 26.3 mm, respectivamente) similares en longitud media, mientras que las expuestas a 500  $\mu\text{M}$  difirieron significativamente respecto a las anteriores con 20.6 mm de longitud media. Está inhibición en la longitud radicular conforme se aumenta la concentración puede ser observada incluso a simple vista (Figura 7).

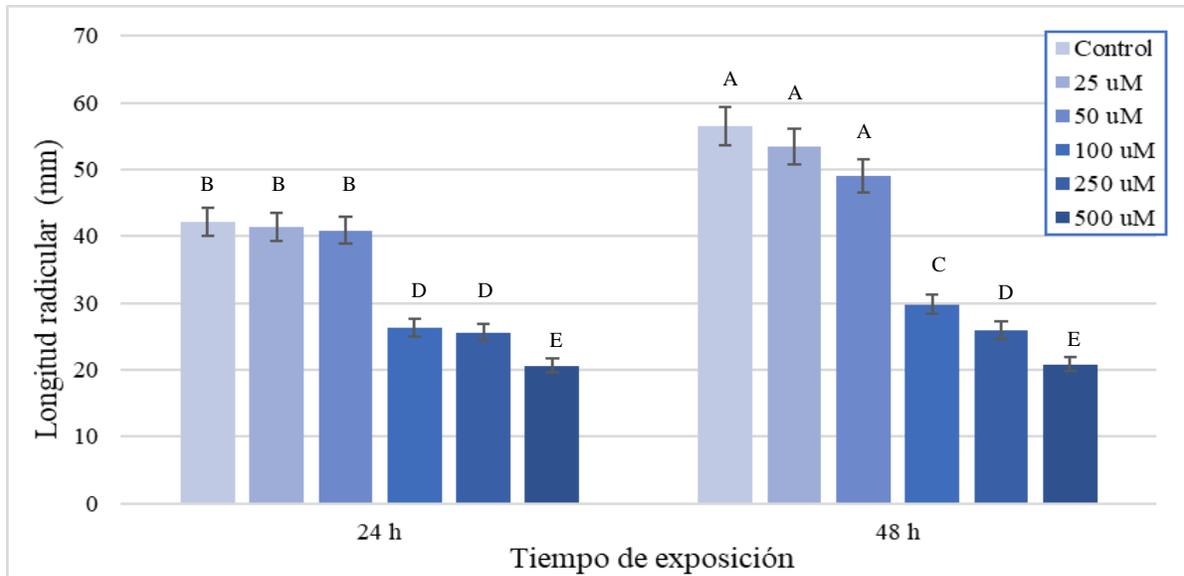
En cuanto al tratamiento a las 48 h se muestra un comportamiento similar, pues no hubo diferencias significativas de crecimiento entre la longitud media de las raíces control (56.5 mm) y las expuestas a 25 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  (53.5 y 49.0 mm, respectivamente). Mientras que las expuestas a 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  sí presentaron diferencias significativas en la longitud radicular (29.8, 25.9 y 20.8 mm, respectivamente) con relación al control y entre ellas. Siendo las expuestas a 250 y 500  $\mu\text{M}$  las únicas que no tuvieron diferencias significativas a través del tiempo (24 y 48 h) en la longitud media (Figura 6).

Para evidenciar el efecto en la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG) se muestran las siguientes gráficas (Figura 8 y 9). Donde se observó que las raíces expuestas a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  tuvieron una RRG de 72.68% durante las 24 h, mientras que alcanzaron el 119% a las 48 h, lo cual sugiere que a esta concentración a las 24 h comienza la inhibición en el crecimiento de la raíz, pero éste logra recuperarse a las 48 h. A partir de la concentración de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  se observaron diferencias significativas en el crecimiento radicular con respecto al control y entre tratamientos, con un RRG de 26.80% a las 24 h y 66.94% a las 48 h (Figura 8).

A 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  mientras mayor es el tiempo de exposición, la tolerancia que posee *F. esculentum* se ve disminuida muy notablemente, pues tuvieron un 18.04% a las 24 h y 28.92% de RRG a las 48 h. En la exposición a 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  observamos que, existen

diferencias significativas entre los tratamientos con 9.79% a las 24 h y 2.47% a las 48 h de RRG. A 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  (la concentración más alta probada) la radícula prácticamente no creció mostrando un 3.60 % de RRG a las 24 h y un 1.65% de RRG a las 48 h (Figura 8).

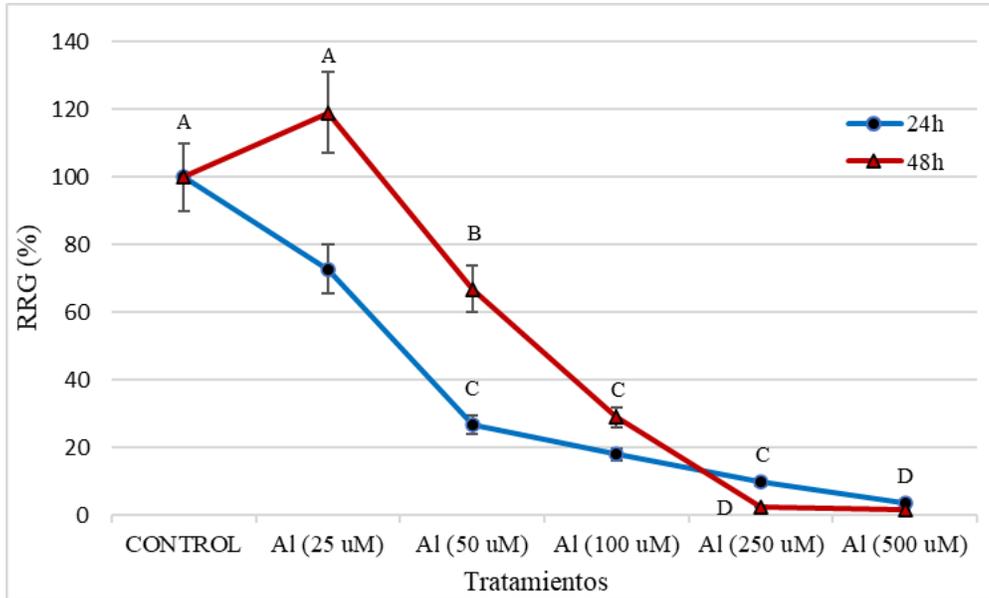
Para comparar el efecto de concentraciones crecientes con la concentración que se conoce que activa los mecanismos de tolerancia, y la raíz recupera su crecimiento (50  $\mu\text{M}$ ), se realizó un experimento en donde se expuso a las plántulas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  durante 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h, en el cual se observó la inhibición del crecimiento radicular con un RRG del 60% a partir de las 3 h, teniendo una tasa de crecimiento similar a las 6 y 12 h. Después de este decaimiento en el RRG, se observó una menor inhibición en el crecimiento con un RRG del 78% a las 24 h, mientras que la raíz aumentó su recuperación, observándose un porcentaje del 88.09% a las 48 h (Figura 9).



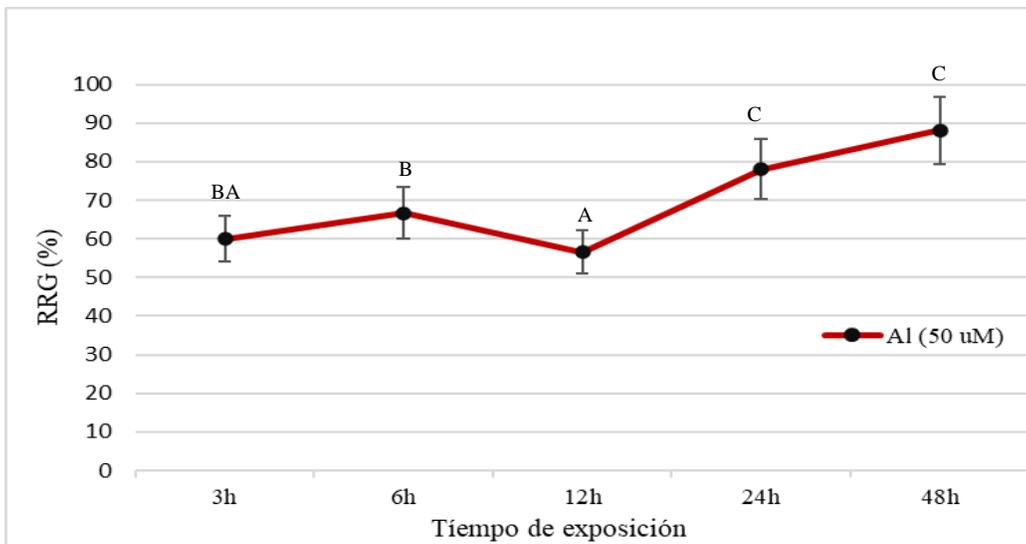
**Figura 6. Longitud radicular a diferentes concentraciones.** Crecimiento radicular en mm (eje “y”) con respecto al control de *Fagopyrum esculentum*, expuestas a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  (0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$ ) durante 24 y 48 h. En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes en cada tiempo ( $n= 60$ ). Las barras denotan el error estándar. Las letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) siendo A las de mayor longitud.



**Figura 7. *Fagopyrum esculentum* expuesta a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$ .** Se observa la inhibición del crecimiento de raíces de *Fagopyrum esculentum* cv. Mancan expuestas a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  ( $\mu M$ ) durante 24 h.



**Figura 8. Porcentaje de crecimiento radicular relativo (RRG) de *Fagopyrum esculentum* expuestas a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  con respecto al control.** En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes (n= 10). Las barras denotan el error estándar. Las letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p <0.05).



**Figura 9. Porcentaje de crecimiento radicular relativo a 50  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  con respecto al control.** En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes (n= 10). Las barras denotan el error estándar. Las letras muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p <0.05).

## 10.2 Evaluación de la penetración y acumulación de $\text{Al}^{3+}$ en las raíces expuestas durante las primeras 48 h.

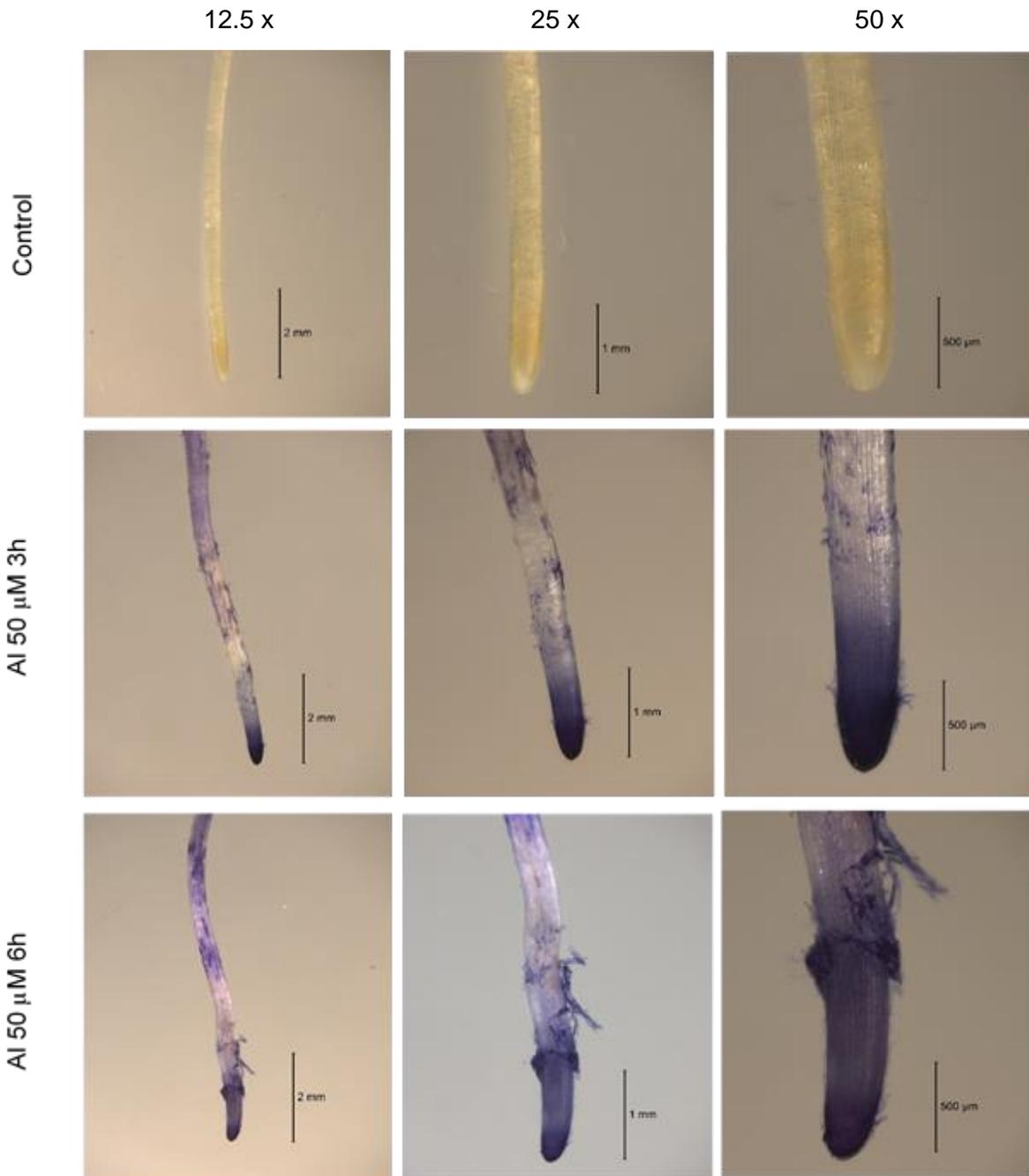
Para evaluar la absorción del  $\text{Al}^{3+}$  en la plántula, las raíces se tiñeron con hematoxilina, la tinción también permitió observar un daño celular en la raíz (de la punta hacia la zona meristemática).

Las raíces expuestas a  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  desde las 3 h exhibieron células de la rizodermis desprendidas y un notable color violeta (absorción de  $\text{Al}^{3+}$ ), abarcando aproximadamente 2 mm, al igual que a las 6 h, donde se observó un ligero curvamiento justo a 1 mm de distancia del ápice, el cual también presentó mayor absorción de  $\text{Al}^{3+}$  (indicada por mayor coloración violeta) sobrepasando los 2 mm (Figura 10).

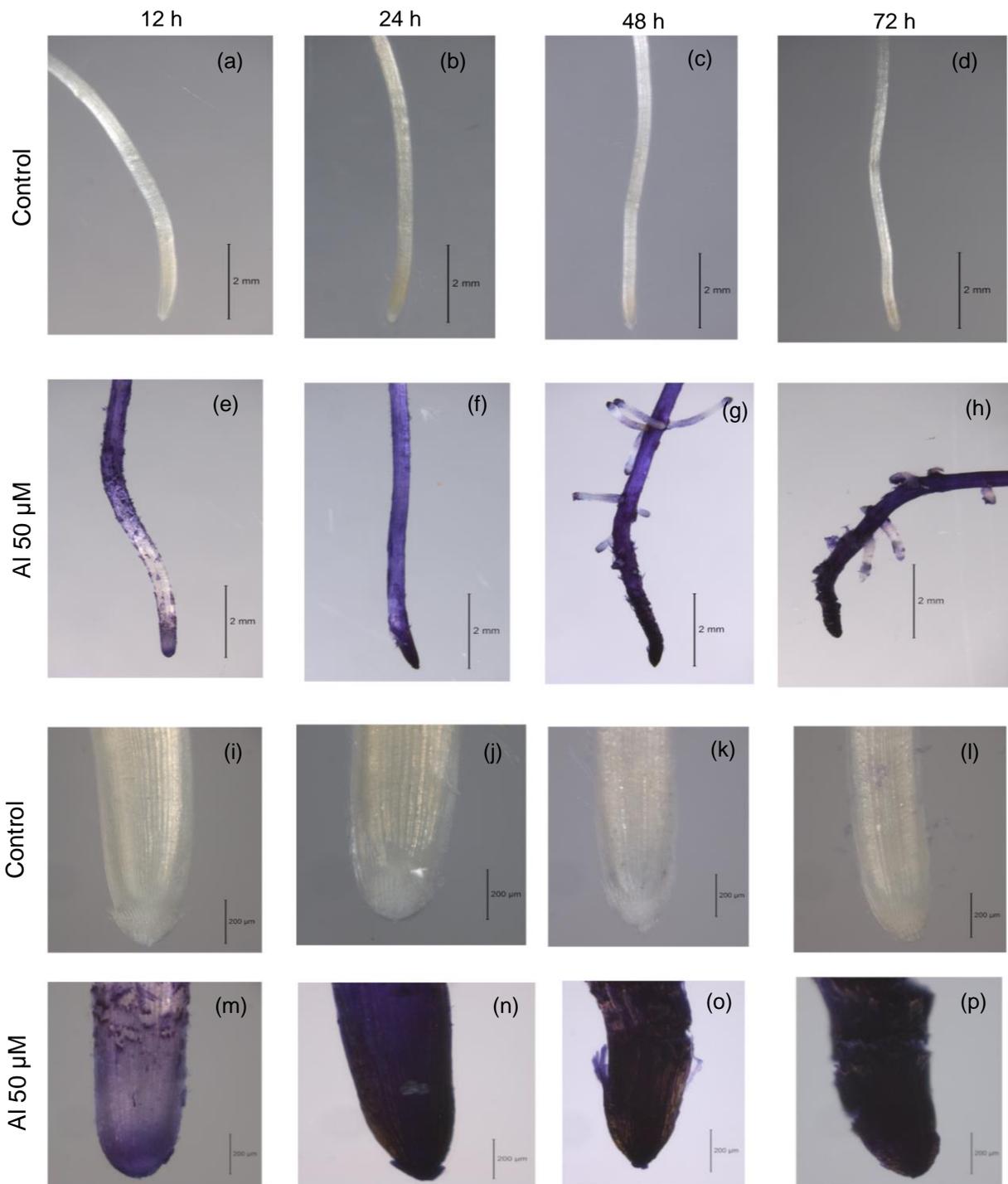
En la exposición al  $\text{Al}^{3+}$  por 12 h se observó el desprendimiento de las células y en general el desprendimiento de la caliptra, así como una coloración violeta hacia la zona de elongación, interrumpida en la zona de transición (Figura 11), mientras que a las 24 h el  $\text{Al}^{3+}$  ya ha penetrado más allá de la zona de elongación sin observarse ninguna interrupción en la coloración, lo que se va acentuando conforme pasa el tiempo, haciendo evidente el daño a las 24 h (Figura 11). Estos resultados confirman que dentro de las primeras 24 h la absorción del  $\text{Al}^{3+}$  aumenta con el tiempo de exposición, causando un daño celular además de inhibir la elongación.

Durante las 48 h se evidenció el crecimiento precoz de raíces laterales a partir de los 2.5 mm, en las cuales solo se observó absorción de  $\text{Al}^{3+}$  en sus respectivos ápices; la distancia entre el ápice de la raíz y la raíz lateral proximal (es decir, la más cercana a la punta de la raíz) disminuyó con el aumento de la concentración. Y dentro de esta misma

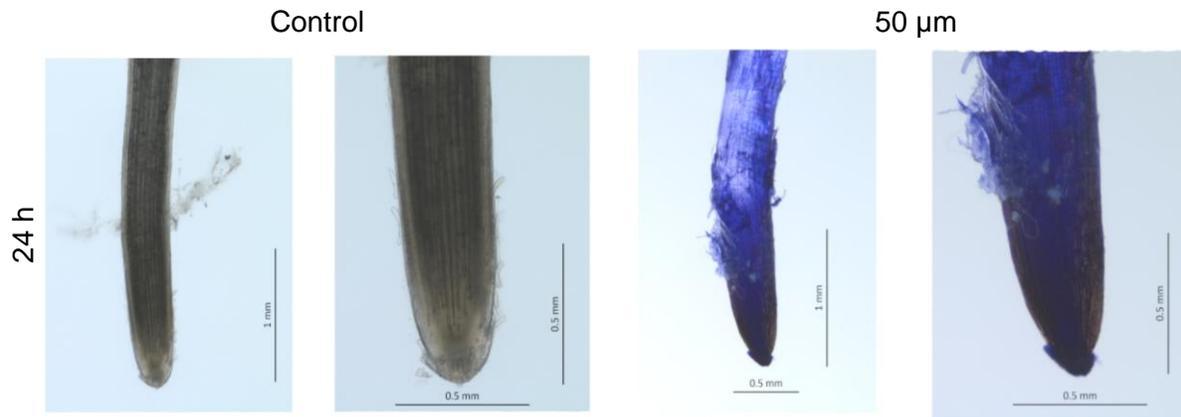
distancia (2.5 mm) se hizo evidente la ruptura del tejido de la rizodermis, e incluso se observa que a las 72 h este tejido se está desprendiendo y, deformándose (Figura 11).



**Figura 10.** Tinción con hematoxilina en ápices de la raíz de *Fagopyrum esculentum* expuestas a 50 µM de Al<sup>3+</sup> durante 3 y 6 h y el control. La parte superior indica el aumento respectivo de las columnas.

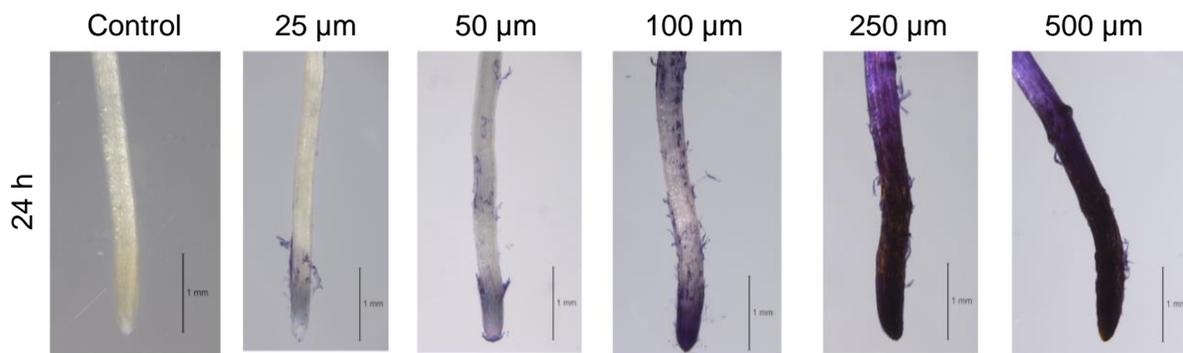


**Figura 11. Ápice de las raíces de *F. esculentum* expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  durante 12, 24, 48 y 72 h teñidas con hematoxilina. Los paneles a-h muestran las raíces a 12.5x, en donde se observa el crecimiento temprano de raíces laterales en los tratamientos. En los paneles i-p con un objetivo de 100x, se puede observar mejor el daño a la raíz que es tiempo-dependiente.**

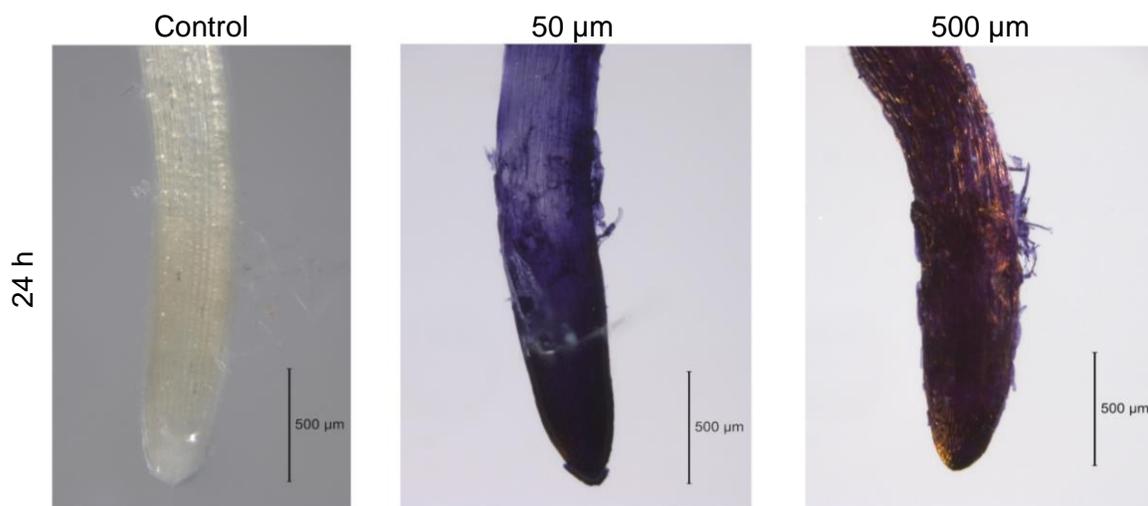


**Figura 12. Tinción con hematoxilina en ápices de la raíz de *F. esculentum* en condiciones control y de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  a las 24 h de tratamiento.**

Para los tratamientos a concentraciones crecientes, se observó que en las raíces del tratamiento de 25  $\mu\text{M}$  la absorción de  $\text{Al}^{3+}$  aún permanece solo en la zona meristemática, de igual manera se puede distinguir como se desprenden células de la epidermis en las que se ha absorbido el  $\text{Al}^{3+}$ , a 50  $\mu\text{M}$  se observó cómo ha penetrado dentro de la zona de elongación y existe el desprendimiento de la cofia (Figura 12 y 13); a 100  $\mu\text{M}$  se pudo diferenciar una coloración violeta más intensa acompañada de curvamiento en la raíz, y desprendimiento en forma de desgarros de la epidermis dentro de la zona meristemática. El  $\text{Al}^{3+}$  se acumuló principalmente en el ápice de la raíz poco tiempo después del comienzo de los tratamientos, siendo las raíces expuestas a las concentraciones más altas (250 y 500  $\mu\text{M}$  Al) las más teñidas y, por ende, las que mostraron daños severos como la formación y grietas acentuadas. Los sitios de acumulación de  $\text{Al}^{3+}$  coincidieron con aquellos que presentaban mayor daño celular (Figura 14).



**Figura 13. Raíces de plántulas de *F. esculentum* expuestas a diferentes concentraciones (25, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Al}^{3+}$  por 24 h. Tinción de hematoxilina que pone de evidencia la acumulación del  $\text{Al}^{3+}$ .**



**Figura 14. Raíces de *F. esculentum* expuestas a 50 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  por 24 h y con tinción de hematoxilina. Se observa un creciente curvamiento y daño en la raíz, y que el  $\text{Al}^{3+}$  se va acumulado totalmente en el ápice.**

### 10.3 Formación de calosa en las raíces expuestas a $\text{Al}^{3+}$ durante las primeras 48 h.

Con el fin de evidenciar la formación de calosa en la región del ápice radicular de *F. esculentum*, se llevó a cabo una tinción de azul de anilina en cada uno de los tratamientos, que muestra una coloración verde. Dicha coloración se sometió a un análisis de fluorescencia, analizando la densidad y el área.

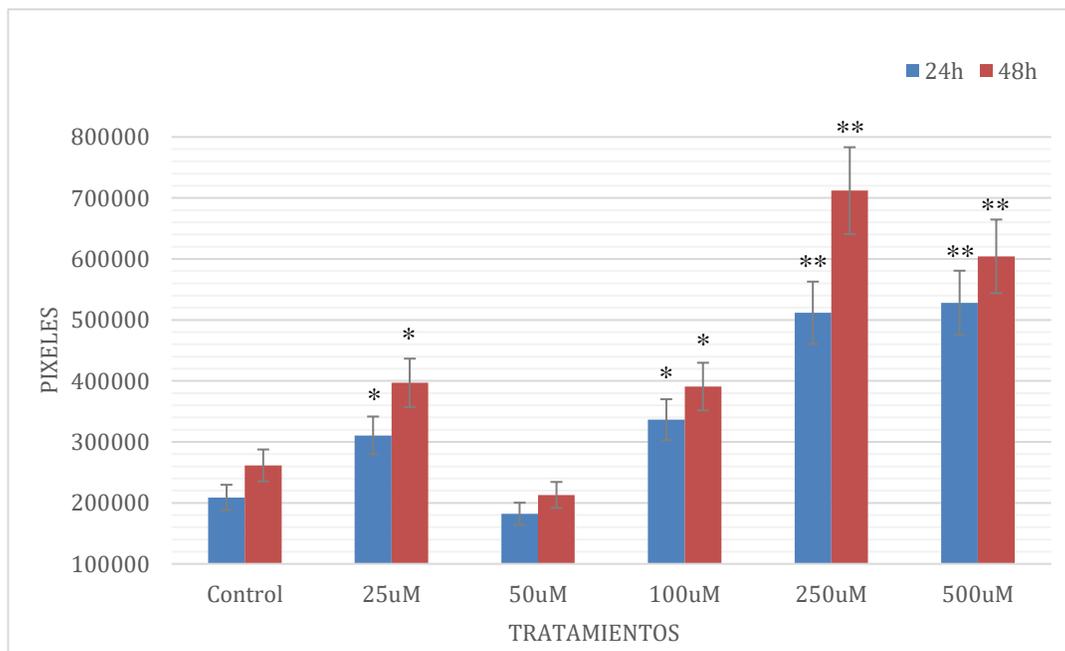
En el control, se detectó el color verde opaco lo que significa que pueden presentar bajos niveles de calosa en el ápice debido al crecimiento constante propio de la etapa de plántula. Mientras que los tratamientos con  $\text{Al}^{3+}$  a las 24 h mostraron más intensidad en la fluorescencia (color verde brillante) indicando mayor formación de calosa, como se puede apreciar en la figura 17.

En el tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  se observaron algunos puntos de color verde brillante hacia la zona de transición, indicando puntos de deposición de calosa. En dicha concentración el análisis de densidad de fluorescencia mostró un aumento en la intensidad con respecto al control a las 24 h (Figura 16) pero sin ser significativo, mientras que a las 48 h se pudo notar una disminución significativa respecto al control. El área de fluorescencia para esta concentración aumentó significativamente en ambos tiempos con respecto a sus controles.

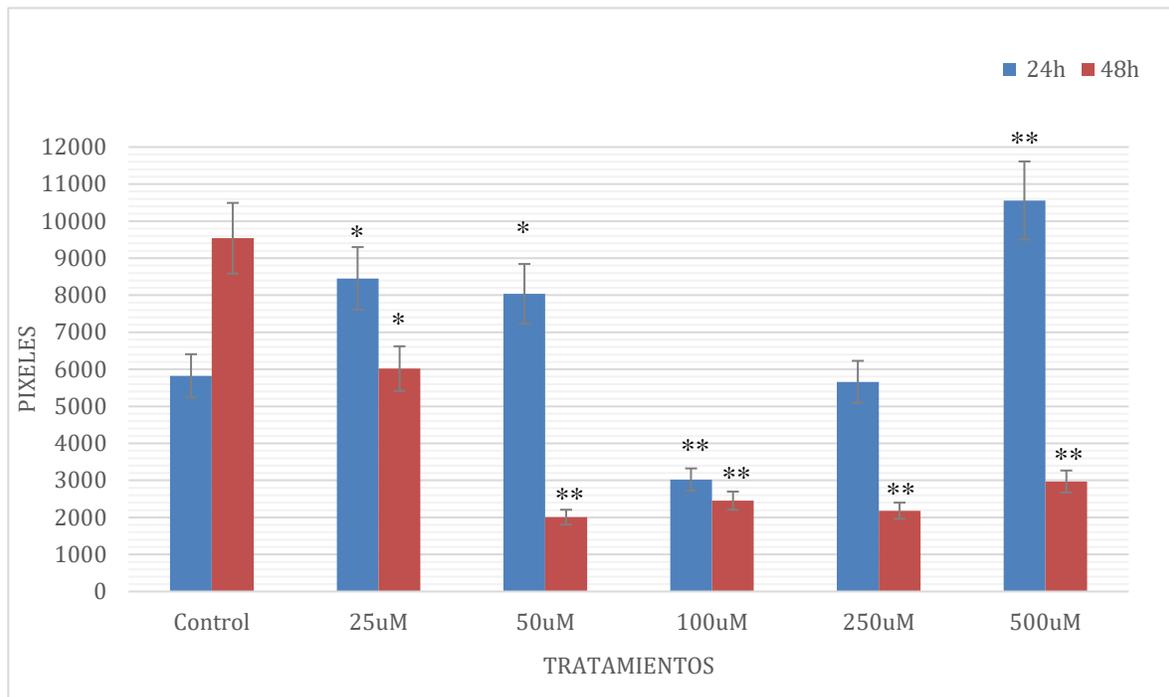
A 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  durante las primeras 24 h se observó una intensidad de fluorescencia muy similar a la concentración anterior (Figura 16), pero ubicada dentro de una menor área (teniendo una disminución significativa) (Figura 15), sobre todo en la punta de los ápices (Figura 17). No así a las 48 h donde se evidenció que tanto el área como la intensidad de fluorescencia disminuyó significativamente. En tanto que a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$

la fluorescencia se ubicó dentro de una mayor área muy similar en ambos tiempos (Figura 15), y su intensidad disminuyó significativamente a las 24 h, mientras que se mantuvo a las 48 h. En este tratamiento comenzó a notarse pequeñas zonas sombreadas que indican el daño inducido (tejido muy deteriorado) por la penetración del  $Al^{3+}$  (Figura 17).

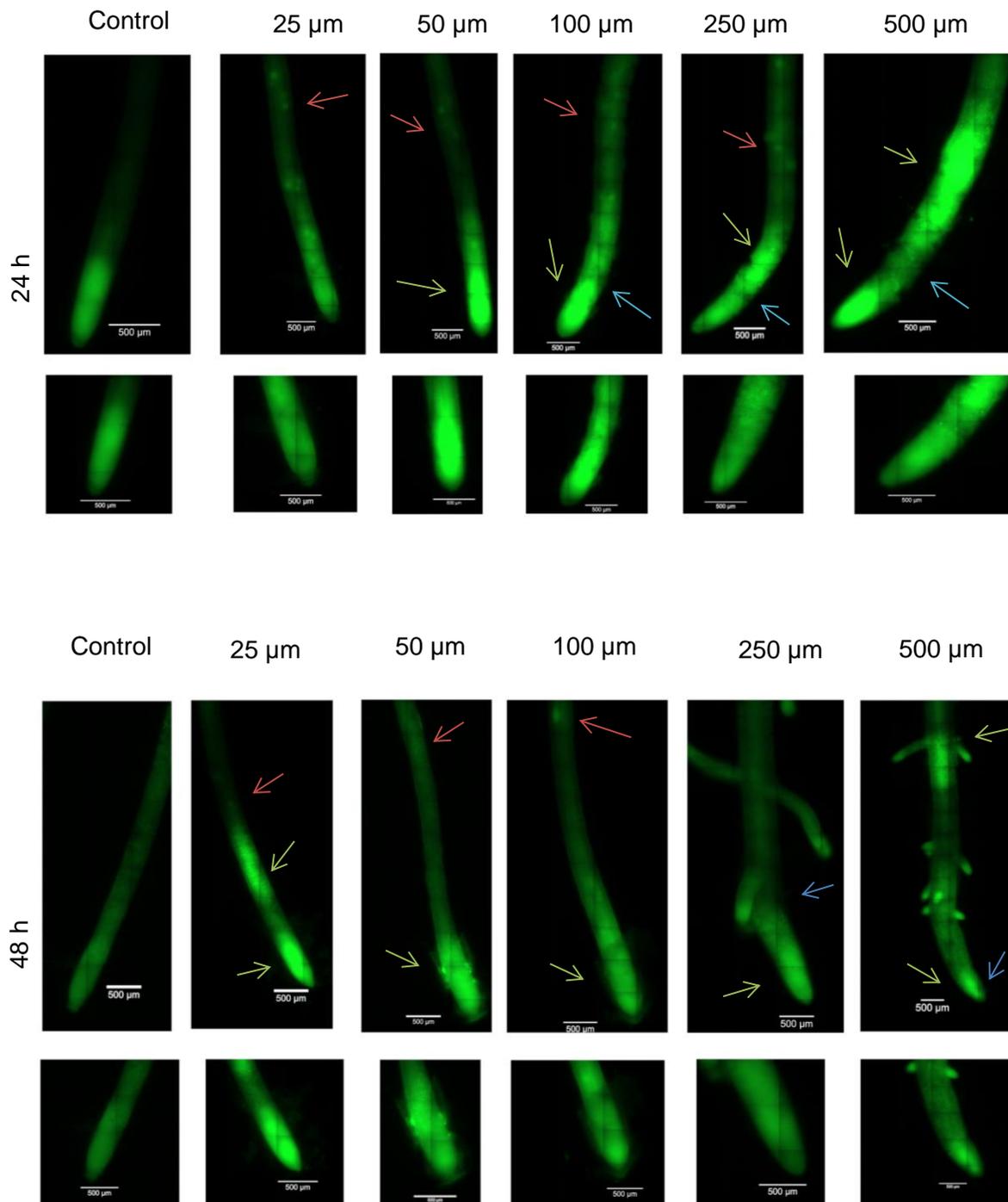
A 250  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  la intensidad de fluorescencia aumentó significativamente a las 24 h al igual que incrementó el área que ocupa, en tanto que a las 48 h la intensidad se mantuvo, pero al igual que a las 24 h el área aumentó significativamente. Para el tratamiento con 500  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  hubo un aumento tanto en la intensidad como en el área de fluorescencia a las 24 h de exposición (Figura 15 y 16), exhibiendo una mayor intensidad en los ápices, y en las puntas de las raíces laterales (Figura 17). Mientras que, a las 48 h la intensidad se mantuvo, pero se redujo el área que ocupaba.



**Figura 15. Área de fluorescencia.** Área en pixeles ocupada por fluorescencia dada con la tinción de azul de anilina para detectar calosa, en la radícula de *F. esculentum*, expuestas a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  (0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$ ) durante 24 y 48 h. En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes (n= 18). Las barras denotan el error estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01 de acuerdo con la prueba de Tukey.



**Figura 16. Intensidad de fluorescencia.** Intensidad en la fluorescencia dada por la tinción con azul de anilina para detectar calosa, en la radícula de *F. esculentum*, expuestas a diferentes concentraciones de  $Al^{3+}$  (0, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$ ) durante 24 y 48 h. En la gráfica se muestra el promedio de 3 repeticiones independientes (n= 18). Las barras denotan el error estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al control, \* p < 0.05 y \*\* p < 0.01 de acuerdo con la prueba de Tukey.



**Figura 17. Tinción con azul de anilina, tratamiento a 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  (24 y 48 h).** Ápices de raíces de *F. esculentum* teñidas con azul de anilina, expuestas a diferentes concentraciones durante 24 (a) y 48 h (b). Las flechas indican lo siguiente, verdes: mayor formación de calosa; rojas: los puntos de deposición de calosa; y azules: las partes no brillantes debido al daño inducido por el  $Al^{3+}$  en la raíz.

## XI. Discusión

El rendimiento de los cultivos en suelos ácidos ( $\text{pH} < 5.0$ ) tiene de principal limitante a la toxicidad por aluminio (Al), puesto que, en estas condiciones se solubiliza como catión trivalente ( $\text{Al}^{3+}$ ) ocupando más de la mitad de los sitios de intercambio iónico en el suelo (Casierra y Aguilar, 2007). Los resultados de este estudio mostraron que existe un umbral de tolerancia al  $\text{Al}^{3+}$  en *F. esculentum* y este depende de la concentración del  $\text{Al}^{3+}$ .

### 11.1 Efecto en el crecimiento radicular relativo de *F. esculentum* a concentraciones crecientes de $\text{Al}^{3+}$ durante las primeras 48 h.

Los efectos de la exposición afectaron principalmente al crecimiento de la raíz principal como consecuencia de las fuertes y rápidas interacciones del  $\text{Al}^{3+}$  con múltiples sitios en el apoplasto y simplasto de la célula (Kochian et al., 2004). A través de la alteración de procesos fisiológicos que inducen efectos perjudiciales, p. ej: el desarrollo temprano de raíces laterales, el daño celular y la formación de calosa, observados en la presente tesis.

Para evidenciar la inhibición del crecimiento radicular se llevaron a cabo una serie de experimentos que, involucraban en primer lugar, la medición de la longitud en mm y posteriormente la tasa de crecimiento radicular relativo (RRG), donde se muestra que a  $25 \mu\text{M Al}^{3+}$  ni la concentración ni el tiempo de exposición (primeras 48 h) afectan el crecimiento de la raíz, puesto que no se inhibe su longitud ni su RRG significativamente respecto al control. Por lo tanto, esta concentración no es dañina para *F. esculentum* ya que el mecanismo de exudación de ácido oxálico no permite la penetración del  $\text{Al}^{3+}$  (Reyna-Llorens et.al., 2015).

Por otro lado, el tratamiento a  $50 \mu\text{M Al}^{3+}$ , donde no existe una inhibición en la longitud respecto al control, pero presenta una disminución en el RRG. Mostrando que la raíz

sigue en crecimiento, pero no de manera óptima. Lo que podría indicar que los mecanismos de tolerancia apenas comienzan a encenderse y el  $Al^{3+}$  aún provoca síntomas de toxicidad en la planta. Siendo consistente a lo observado por Salazar et al., (2020), donde se propone que *F. esculentum* c.v Mancan sigue el modelo o patrón de tolerancia tipo II descrito por Singh et. al. (2017), que requiere de una fase lag para la expresión completa de la tolerancia al Al lo cual se ha documentado previamente en *Zea mays* y *Brachiaria decumbens* (Amenós et al., 2009, Arroyave et al., 2011). Ya que se necesita de la transcripción de diversos genes que codifiquen proteínas implicadas en el metabolismo y transporte de ácidos orgánicos, para disminuir los efectos del  $Al^{3+}$  en la planta (Singh et al., 2017).

Con el fin de comparar el efecto de concentraciones crecientes de Al respecto la concentración de  $50 \mu M Al^{3+}$  que activa los mecanismos de tolerancia y la raíz recupera su crecimiento, se realizó un tratamiento a diferentes tiempos (0, 3, 6, 12, 24 y 48 h). En el cual se observó que los efectos de toxicidad para esta concentración existen a partir de las 3 h de tratamiento, puesto que se registra un RRG del 60%. Comparable a lo reportado en raíces de soja (*Glycine max*) expuestas a  $75 \mu M Al^{3+}$ , donde se redujo el crecimiento de la raíz después de solo 5 min (o 30 min a  $30 \mu M Al^{3+}$ ) como parte de una lesión primaria en el apoplasto causada por el Al, generando toxicidad en las paredes celulares (Kopittke et. al., 2008). Esto demuestra de manera concluyente que el tiempo para que se genere la inhibición de la elongación radicular, depende de la concentración del Al. Después de este decaimiento en la tasa de crecimiento radicular, a las 24 h se registró una menor inhibición con un RRG del 78%, lo cual refuerza lo determinado en el experimento inicial a diferentes concentraciones, puesto que a las 48 h la raíz aumentó

su recuperación, observándose un porcentaje del 88.09% (Figura 9). El hecho de que las tasas de crecimiento comiencen a restablecerse sugiere que se han activado los mecanismos que hacen de *F. esculentum* una planta resistente a Al.

En contraste, los tratamientos a partir de 100  $\mu\text{M Al}^{3+}$  sobrepasaron la tolerancia de *F. esculentum* en la fase de crecimiento temprano, ya que no hay recuperación significativa en la longitud, ni en la tasa de crecimiento radicular relativo a través del tiempo (Figura 6 y 8). Esto confirma lo observado por Reyna-Llorens (2015) cuando *F. esculentum* fue expuesta a 100  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , donde evidenció la inhibición significativa en el crecimiento radicular. Sin embargo, existen datos que muestran que las plantas pueden recuperar completamente sus tasas de crecimiento una vez expuestas a 100  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , y mantenerlas igual a los niveles del control durante todo el ciclo de vida de la planta (Martínez-Rendón, 2013).

Esto demuestra que, a pesar de ser tolerante al Al, *F. esculentum* se comporta como una especie sensible en la etapa de plántula por lo que sus mecanismos de tolerancia se ven afectados teniendo como respuesta primaria de sensibilidad la inhibición radicular a 100  $\mu\text{M Al}^{3+}$  desde las 24 h. Lo cual según Mossor- Pietraszewska (2001), es común en la mayoría de las plantas en etapas tempranas de desarrollo, pues presentan menos tolerancia y mayores síntomas de toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$ , interfiriendo con la división celular en las puntas de las raíces e incrementando la rigidez de la pared celular con el entrecruzamiento de las pectinas.

En este estudio, los datos de crecimiento sugieren que el umbral de tolerancia a la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  en *F. esculentum* es de 250  $\mu\text{M Al}^{3+}$ , ya que a partir de esta concentración se registró una longitud de menos del 50% respecto al control en ambos

tiempos y un decaimiento casi total en la tasa de crecimiento (Figura 8). Observándose que al sobrepasar este umbral se colapsa el sistema y no puede contrarrestar los efectos tóxicos en el crecimiento radicular a concentraciones mayores (p.ej. 500  $\mu\text{M Al}^{3+}$ ).

## 11.2 Evaluación de la penetración y acumulación de $\text{Al}^{3+}$ en las raíces expuestas durante las primeras 48 h.

Para evaluar la absorción del  $\text{Al}^{3+}$  en la plántula, las raíces se tiñeron con hematoxilina, dado que, la hematoxilina revela un color violeta ante la presencia de Al. Esta tinción también permitió observar un daño celular en la zona meristemática de la raíz. Los daños en las raíces expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  (desprendimiento de las células de la rizodermis, y absorción de  $\text{Al}^{3+}$  abarcando aproximadamente 2 mm) tanto a las 3 como a las 6 h de tratamiento (Figura 10). Esta evidencias son comparables con la presentada por Sivaguru y Horst (1998), en 'Lixis' un cultivar de maíz sensible a  $\text{Al}^{3+}$  donde la parte distal de la zona de transición (DTZ, por sus siglas en inglés; 1–2 mm) es la zona más sensible a  $\text{Al}^{3+}$  en la raíz.

También se evidenció que la inhibición del alargamiento de la raíz es acompañada de cambios morfológicos en el ápice. A las 12 h de exposición, se pudo observar en general el desprendimiento de la caliptra y células del borde, así como la penetración de  $\text{Al}^{3+}$  en la zona meristemática; mientras que, a las 24 h, el Al ya ha penetrado más allá de la zona de elongación (Figura 11), donde termina la división celular y las células comienzan a alargarse. Esto sugiere que la inhibición del alargamiento radicular está relacionada con el contenido de Al en el ápice, pues la mayor parte de la acumulación de Al se observa en dichas regiones, mismas que ya se han reportado como regiones sensibles en la toxicidad por Al (Matsumoto y Motoda, 2013) y otros factores de estrés ambientales.

A las 48 h de tratamiento, se evidenció el crecimiento precoz de raíces laterales a partir de los 2.5 mm, en él se observó la absorción de  $Al^{3+}$  en sus respectivos ápices. En plantas acumuladoras de Al, como *Melastoma malabatricum*, *Camelia sinensis* y *Conostegia xalapensis*, el aumento de la formación de raíces laterales es una característica importante, ya que facilita el mantenimiento de la biomasa en las raíces. Este ajuste en las raíces laterales y la biomasa parece necesario en los primeros momentos de estrés por Al debido al daño que este le ha inducido (Watanabe et al., 2005, Ghanati et al., 2005, González-Santana et al., 2012).

Tal como se ha reportado, la toxicidad temprana en las raíces tiene como resultado un sistema radicular atrofiado con abundantes raíces laterales, las cuales son cortas, gruesas y quebradizas (Poschenrieder et al., 2008). Concordando con lo observado en los bioensayos, pues dentro de los primeros 2.5 mm, se hizo evidente la ruptura del tejido de la rizodermis, e incluso se observa que a las 72 h este tejido está desprendiéndose y deformándose (Figura 11).

En las condiciones experimentales de este estudio, la concentración donde se observó un aumento en la entrada del  $Al^{3+}$ , que provoca un daño fue a 50  $\mu M$  de  $Al^{3+}$ , a partir de las 3 h y hasta las 24h, que es el tiempo necesario para que se enciendan los mecanismos de tolerancia (Figura 10 y 11). Estos datos son confirmados por Reyna-Llorens et al., (2015) y Salazar et al., (2020), donde sugieren que después de las primeras 12 h de tratamiento con Al, el crecimiento de la raíz disminuye mientras que los niveles de ERO aumentan debido a la entrada de Al en la raíz.

Para los tratamientos a concentraciones crecientes, se observó que en las raíces expuestas a 25  $\mu M$   $Al^{3+}$ , su absorción aún permanece solo en la cofia y zona

meristemática, de igual manera se puede distinguir como se desprenden las células del borde en las que ha absorbido el  $\text{Al}^{3+}$ . El trabajo realizado por otros grupos con *Triticum aestivum* ha demostrado que estas células adheridas a las puntas de las raíces pueden desempeñar un papel en la protección a la lesión por Al (Zhu et al., 2003).

En el tratamiento a  $50 \mu\text{M Al}^{3+}$ , el metal ya ha penetrado dentro de la zona de elongación, evidenciando también el desprendimiento de la cofia. Ma et al., (2004), encontraron que la adición de Al resulta en una reducción de la extensibilidad de las paredes celulares, provocando la inhibición radicular en la zona de transición en los ápices de las raíces del trigo sensible a Al. Cabe señalar que esta región de la raíz es única, ya que es la unión entre la zona de elongación de la raíz y el meristemo de la raíz, y es la región donde las células están pasando por una fase preparatoria para el alargamiento celular (Baluška et al., 2010).

Por otra parte, a  $100 \mu\text{M Al}^{3+}$  la penetración de Al es más evidente, acompañada de un curvamiento en la raíz y el desprendimiento del tejido en forma de desgarros, de la epidermis dentro de la zona meristemática. Este tipo de rupturas ligadas a la toxicidad por Al, se deben a la alteración en la división de las células de la rizodermis y la corteza externa en la zona de elongación, tal como se ha observado en guisantes (*Pisum sativum* cv. Harunoka), alcanfor (*Cinnamomum camphora*), soja, caupí (*Vigna unguiculata*) (Kopittke et al., 2016; Motoda et al., 2010; Osawa et al., 2011).

El  $\text{Al}^{3+}$  se acumuló principalmente en el ápice de la raíz poco tiempo después del comienzo de los tratamientos, como lo muestran investigaciones anteriores que indican que la captación de  $\text{Al}^{3+}$  está restringida principalmente al sistema radicular, en donde, el Al se acumula predominantemente en la rizodermis y las células más externas del

córtex, causando la formación de rupturas o 'grietas' las cuales se producen debido al desgarro y separación de las capas celulares externas (Ryan y Kochian, 1993; Kochian, 1995). En otras palabras, los tejidos externos se alargan a un ritmo más lento que los de las células subyacentes y aún en expansión de la corteza interna y la estela (Kopittke et. al., 2016).

Siendo las raíces expuestas a las concentraciones más altas (250 y 500  $\mu\text{M}$ ) en las que el Al ha penetrado en mayor proporción, por ende, son las raíces que mostraron daños severos como la formación de grietas acentuadas que coinciden con los sitios de acumulación de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 13). Esto coincide con lo reportado por Jones et al., (2006), cuyos resultados también sugieren que la rigidez de la pared celular representa un efecto tóxico importante del Al, causando rupturas, incluso a concentraciones que provocan una inhibición casi completa de la elongación de las raíces.

### 11.3 Formación de calosa en las raíces expuestas a $\text{Al}^{3+}$ durante las primeras 48 h.

En la exposición a Al, la pared celular es el primer compartimento con el que interactúa el metal y juega un papel importante en la manifestación y percepción de la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  (Horst et al., 2010). La unión de este metal cambia su estructura, la vuelve más rígida y reduce su extensibilidad mecánica y expansión celular (Ma et al., 2004); posteriormente al llegar a la membrana plasmática, induciendo la producción de calosa, (Guichang et al., 1994), por lo que se conoce a este polisacárido como un indicador de sensibilidad a la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  (Sinhg et al., 2017).

En este estudio la distribución espacial de la calosa dentro de las raíces fue evidente como un aumento de color verde brillante (mayor formación de calosa). Dicha coloración

se sometió a un análisis de fluorescencia, tomando en cuenta la intensidad de la señal y el área de distribución, conforme al incremento en la concentración de  $\text{Al}^{3+}$  que va de 0 a 500  $\mu\text{M}$ . En el control, se detectó una señal en la fluorescencia poco intensa lo que significa que pueden presentar bajos niveles de calosa en el ápice, debido al crecimiento constante propio de la etapa de plántula (Kaneko et al., 1999).

Los puntos de deposición de calosa observados hacia la zona de transición en 25  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$  indican sitios de producción de este polisacárido sin llegar a tener un aumento significativo (Figura 16), lo que sugiere que las paredes aún no se rigidizan lo suficiente para impedir que se lleve a cabo la elongación de la raíz; esto es consistente con los análisis de crecimiento anteriormente mencionados para 25  $\mu\text{M}$   $\text{Al}^{3+}$ . Por otra parte, a las 48 h se pudo notar una disminución de calosa significativa respecto al control, lo que podría significar que las raíces adquieren cierta resistencia conforme pasa el tiempo.

Durante las primeras 24 h de tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , se observó un patrón diferente en la formación de calosa, que si bien la producción fue similar a la de la concentración de 25  $\mu\text{M}$  (Figura 15), su ubicación se concentró en una menor área (Figura 16); correspondiente a la zonas de división y transición (Figura 17) donde se sabe el  $\text{Al}^{3+}$  daña más a la raíz (Sivaguru y Horst, 1998). Jones et al., (2006), al estudiar las raíces de maíz expuestas a Al, encontraron que la calosa solo se produjo en concentraciones discretas, por lo tanto, esto refleja la capacidad específica de una célula para producir calosa donde percibe mayor daño debido a la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$ , en lugar de una activación a nivel sistémico de la calosa sintasa (CaIS) a lo largo de las diferentes regiones de la raíz que no se encuentran mayormente comprometidas. Esto está

respaldado por evidencia que muestra que la comunicación de célula a célula es inhibida por el Al (Sivaguru, et. al. 2000).

Ma et al., (2004) compararon cultivares (cv) de trigo tolerante (cv. Atlas 66) y sensible (cv. Scout 66) encontrando que la producción de calosa era menos evidente en los cultivares denominados como tolerantes. Esto apoya los resultados que se obtuvieron a las 48 h, con *F. esculentum* en donde se observó una disminución en la formación de calosa, en donde la producción se concentró en el ápice y la zona de división, esto podría tomarse como una señal más de que la concentración inicial de toxicidad por Al para *F. esculentum* es de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , puesto que existe una inhibición en el crecimiento, pero no hay suficiente formación de calosa para que la raíz no se recupere.

En tanto que, a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  la formación de calosa disminuye y se mantiene constante conforme pasa el tiempo, pero se distribuye dentro de una mayor área, lo que reflejaría que la raíz evita la entrada del  $\text{Al}^{3+}$  mediante la rigidez de una mayor porción de sus paredes (Figura 15); pues bloquea los plasmodesmos, inhibiendo la transferencia simplástica de solutos. El hecho de que su producción inducida por  $\text{Al}^{3+}$  se origine progresivamente a un ritmo lento, a través de las capas de las células corticales, sugiere que la comunicación de célula a célula está siendo inhibida (Sivaguru et al., 2000), puesto que ya no concentra la producción solo en los sitios donde es más vulnerable.

En este tratamiento (a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ ) comenzaron a notarse pequeñas zonas sombreadas que indican el daño inducido (tejido muy deteriorado) por la penetración del  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 17). Las rupturas se formaron debido a la presencia de células externas rígidas (de expansión lenta) superpuestas a las células del cilindro vascular y las células internas del córtex que se expanden a un ritmo más rápido. Esto apoya los hallazgos de

Jones et al., (2006), quienes concluyeron que el Al redujo el crecimiento de las raíces del maíz al aumentar la rigidez de la pared celular en la rizodermis.

El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]$  op. cit.) y la modificación de la membrana plasmática son factores cruciales en la inducción de síntesis de calosa mediante la activación de 1,3- $\beta$ -glucano sintetasa (Kauss et al. 1990). Y debido a la alta afinidad del Al con la matriz péptica y la hemicelulosa se ven afectadas sustancialmente las propiedades químicas y mecánicas de la pared celular (Horst et al., 2010). Lo cual se pudo observar en el tratamiento a 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , donde la formación de calosa aumentó al igual que su distribución a lo largo de la raíz hacia las 24 h, en tanto que, a las 48 h tuvo significativamente una mayor distribución de este polisacárido. Por ello, se ha sugerido que una fuerte unión de Al a la matriz péptica de la pared celular puede prevenir su extensión física y/o fisiológicamente al disminuir la eficacia de las enzimas que aflojan la pared celular (Wehr et al., 2004).

Para el tratamiento de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  hubo un aumento tanto en la formación de calosa como en su distribución a las 24 h de exposición (Figura 15 y 16). Exhibiendo una mayor formación en el ápice de la raíz principal y los ápices de las raíces laterales (Figura 17). La deposición de calosa inducida por Al en las puntas de las raíces se correlaciona positivamente con una acumulación e inducción en la inhibición del crecimiento por Al (Larsen et al., 1996; Horst et al., 1997; Yang et al., 2013). Singh et al., (2016) en su estudio con *Lens culinaris Medikus* reportan una tasa de crecimiento radicular baja en conjunto con una alta formación de calosa como símbolo de una mayor sensibilidad al  $\text{Al}^{3+}$ . Puesto que la raíz deja de alargarse y se rigidizan sus paredes evitando la entrada de solutos.

Finalmente, con los resultados obtenidos en el presente estudio, se propone que la concentración umbral en la tolerancia al Al es de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , sugiriendo que a partir de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  la raíz trata de inhibir la transferencia simplástica de solutos para evitar la entrada del  $\text{Al}^{3+}$ , mediante la rigidez de una mayor porción de sus paredes afectando severamente el crecimiento, hasta llegar a la concentración umbral de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Asimismo, debido a la severa modificación de la membrana plasmática, se inhibe casi totalmente la extensión física de la pared celular permitiendo una mayor penetración mediante las rupturas llegando al cilindro vascular, en donde el metal logra colapsar la eficacia fisiológica lo cual impide el desarrollo radicular y una posible recuperación.

## XII. Conclusiones

- La exposición a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  no es dañina para *Fagopyrum esculentum*. Al aumentar las concentraciones de Al, a partir de la exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , la tasa de crecimiento radicular si disminuye y el daño celular aumenta.
- El crecimiento radicular comienza a inhibirse desde las 3 h de exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Siendo la exposición a 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  la concentración con la cual la radícula deja de crecer y se ve severamente deformada durante 48 h.
- Se evidenció que existe penetración de Al a partir de la exposición a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Penetrando en mayor proporción las raíces expuestas a las concentraciones más altas (250 y 500  $\mu\text{M}$ ), mostrando daños severos como la formación de grietas acentuadas que coinciden con los sitios de acumulación de  $\text{Al}^{3+}$ .
- Se probó que el aumento de la formación de calosa a partir de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  donde la producción se ubicó en las zonas de división y transición. Mientras que a 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  aumentó la formación de calosa a lo largo de la raíz. Exhibiendo producción de calosa en el ápice tanto de la raíz principal como de las raíces laterales. Por lo que se propone a esta concentración como la concentración umbral en la tolerancia al  $\text{Al}^{3+}$  en *F. esculentum*.

### XIII. Perspectivas

- Es necesario realizar estudios para evaluar la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes a crecientes concentraciones de  $Al^{3+}$ , contra el estrés oxidativo que provoca en *F. esculentum*, y así tener un panorama más amplio del mecanismo de defensa ante la toxicidad por  $Al^{3+}$ .
- Así como evaluar la expresión de genes que codifiquen para estas enzimas que se conoce participan en la remoción de ERO en *F. esculentum*, para conocer si su regulación es a nivel transcripcional.
- Debido al umbral de tolerancia propuesto es necesario el estudio de la respuesta de *F. esculentum* expuesta a 250  $\mu M$  de  $Al^{3+}$  durante todo su ciclo de vida para corroborar que la planta no puede recuperarse.

## XIV. Referencias bibliográficas

- Amenós, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illes, P., Baluška, F., y Barceló, J. (2009). Different effects of aluminum on the actin cytoskeleton and brefeldin a-sensitive vesicle recycling in root apex cells of two maize varieties differing in root elongation rate and aluminum tolerance. *Plant and Cell Physiology*, 50 (3), 528–540.
- Arroyave, C., Barceló, J., Poschenrieder, C., y Tolrà, R. (2011). Aluminum-induced changes in root epidermal cell patterning, a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105 (11), 1477–1483.
- Baluška, F., Jasik, J., Edelman, H.G, Salanova, T., y Volkmann, D. (2010). *Latrunculin B*-induced plant dwarfism: plant cell elongation is F-actin dependent. *Developmental Biology*, 231 (1), 113-124.
- Barceló, J., y Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminum toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48 (1), 75-92.
- Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., y Rengel, Z. (2010). Aluminum-induced ion transport in *Arabidopsis*: the relationship between Al tolerance and root ion. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 3163-3175
- Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echeverría-Machado, I., y Martínez-Estévez, M. (2017). Aluminum, a friend, or foe of Higher Plants in Acid Soils. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1767), 1-18.
- 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, Rome, Italy, 95 pp.

- Carreño, A., y Chaparro, A. (2013). Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes. *Universitas Scientiarum*, 18 (3), 283-310.
- Casierra, F., y 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.
- Chandran, D., Sharopova, N., VandenBosch, K., Garvin, D., y Samac, D. (2008). Physiological and molecular characterization of aluminum resistance in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 8 (89), 1-17.
- Chen W.W., Xu J.M., Jin J.F., Lou H.Q., Fan W., y 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.
- Choudhury, S., y 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.
- Daspute, A. A., Sadhukhan, A., Tokizawa, M., Kobayashi, Y., Panda, S. K., y 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.
- Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., y Barceló J. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56 (414), 1213-1220.
- Feixa, X. (2001). Poliaminas y tolerancia al aluminio en variedades tolerantes y sensibles de *Zea mays*. Tesis presentada para optar el título de Doctor en Ciencias. Universidad de Barcelona, España.

- Foy, C.D. (1988). Adaptación de la planta a suelos ácidos, aluminio-tóxicos. *Comunicaciones en ciencias del suelo y análisis de plantas*, 19, 959–987.
- Ghanati, F., Morita, A., y Yokota, H. (2005). Effects of Aluminum on the Growth of Tea Plant and Activation of Antioxidant System. *Plant and Soil*, 276 (1-2), 133-141.
- Guichang Z., J. Hoddinott y G. Taylor. (1994). Characterization of 1,3-β-D-Glucan (Callose) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to Aluminum Toxicity. *Journal of Plant Physiology*. 144, 229-234.
- González, D., y Zapata, O. (2008). Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82, 53-61.
- González-Santana, I. H., Márquez-Guzmán, J., Cram-Heydrich, S., y Cruz-Ortega, R. (2012). *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): An aluminum accumulator plant. *Physiologia Plantarum*, 144 (2), 134-145.
- 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, 86 pp.
- Grevenstuk, T., y Romano, A. (2013). Aluminium speciation and internal detoxification mechanisms in plants: where do we stand? *Metallomics*. 12 (5), 1584-1594
- Hernández-Pérez, V. (2014). Efecto del potencial hídrico en la actividad del sistema antioxidante durante la germinación de *Alvarado amorphoides* especie de la Selva Baja Caducifolia. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, UNAM, 83 pp.
- Horst W.J. C.J. (1995). The role of apoplast on the aluminum toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z. Pflanzernahr. Bodenk. Genetics and Molecular Biology of Plant Nutrition*. 158, 419-428.

- Horst W.J., Wang Y., y Eticha D. (2010). The role of the root apoplast in aluminum-induced inhibition of root elongation and in aluminum resistance of plants: a review. *Annals of Botany*, Oxford 106,185–197.
- Jones DL., Blancaflor EB., Kochian LV., y Gilroy S. (2006). Spatial coordination of aluminum uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant Cell and Environment* 29, 1309–1318.
- Kauss, H. (1985). Callose biosynthesis as a  $Ca^{2+}$  regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *Journal of Cell Science*. Supplement. 2.5, 89-103.
- Kauss, H., Waldmann, T., y Quader, H. (1990).  $Ca^{2+}$  as a Signal in the Induction of Callose Synthesis. En: R. Ranjeva & A. M. Boudet (Eds.), Signal Perception and Transduction in Higher Plants. *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 117-131.
- Kauss, H. 1996. Callose synthesis. En: M. Smallwood, J.P. Knox, D.J. Bowles (eds.) Membranes: Specialized Functions in Plants. *Bios Scientific Publishers*, Guildford, UK, pp. 77-92.
- Kaneko M., Yoshimura E., Nishizawa NK., y Mori S. (1999). Time course study of aluminum-induced callose formation in barley roots as observed by digital microscopy and low-vacuum scanning electron microscopy. *Soil Plant Nutrition*, 45, 701–712.
- Kinraide, T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminium species. En: Plant- Soil Interactions at Low pH: Proceedings of de Second International Symposium on Plant- Soil. Beckley West Virginia, U.S.A, R.J. *Springer Netherlands*, pp 717-728.
- Klug, B., y 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 Trust*, 187, 380-391.

- Klug, B., y Horst, W. J. (2010) (b). Spatial characteristics of aluminum uptake and translocation in roots of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Physiologia Plantarum*, 139 (2), 181-191.
- Kochian, L. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 237-260.
- Kochian, L., Hoekenga, O., y Piñeros, M. (2004). Mechanisms of aluminium tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 55, 459–493.
- Kopittke, P. M., Blamey, F. P. C., y Menzies, N. W. (2008). Toxicities of soluble Al, Cu, and La include ruptures to rhizodermal and root cortical cells of cowpea. *Plant and Soil*, 303 (1-2), 217-227.
- Kopittke Peter M., Neal W., Menzies, Peng Wang, F., Pax C, y Blamey. (2016). Cinética y naturaleza de los efectos rizotóxicos de aluminio: una revisión. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4451–4467.
- Larsen, P. B., Tai, C. Y., Kochian, L. V., y Howell, S. H. (1996). Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. *Journal of Plant Physiology*, 110 (3), 743–751.
- Lian, Ch unlan., Oi wake, Y., Yokota, H., Wang, G., y Konishi, S. (1998). Effect of aluminum on callose synthesis in root tips of tea (*Camellia sinensis* L.) plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44 (4), 695-700.
- Llugany, M., Massot, N., Wissemeier, A. H., Poschenrieder, C., Horst, W. J. y Barceló, J. (1994). Aluminum Tolerance of Maize Cultivars as Assessed by Callose Production and Root Elongation. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 157 (6), 447–451.

- Ma, J., Zheng, S., y Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat: Al induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Journal of Plant Physiology*, 117, 745–751.
- Ma J.F. (2001). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell and Physiology*, 41, 383–390.
- Ma J., Shen R., Nagao S., y Tanimoto E. (2004). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology*, 45(5), 583-589.
- Marín, T., Gómez, F., Trejo, L., Muñoz, A., Tavitas, L., Hernández, L., y Santacruz, A. (2010). Respuesta fisiológica y nutrimental de variedades de arroz a la concentración de aluminio. *Fitotecnia Mexicana*, 33(1), 37-44.
- 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., y Motoda, H. (2012). Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science*, 185-186, 1-8.
- Matsumoto, H., y Motoda, H. (2013). Oxidative stress is associated with aluminum toxicity recovery in apex of pea root. *Plant and Soil*, 363(1/2), 399-410.
- Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., y Matsumoto, H. (2010). Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminum treatment. *Plant and Soil*, 333 (1-2), 49-58.
- Mossor-Pietraszewska T. (2001). Effect of aluminum on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48 (3), 673-686.

- Osawa, H., Endo, I., Hara, Y., Matsushima, Y., y Tange, T. (2011). Transient Proliferation of Proanthocyanidin-Accumulating Cells on the Epidermal Apex Contributes to Highly Aluminum-Resistant Root Elongation in Camphor Tree. *Journal of Plant Physiology*, 155 (1), 433-446.
- Peñaloza, E., Martínez, J., Montenegro, A., y Corcuera, J. (2004). Respuesta de dos especies de Lupino a aluminio fitotóxico. *Agricultura Técnica*, 64 (2), 127-138.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., y Barceló, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *The Science of the Total Environment*, 400 (1-3), 356–368.
- Patterson, C.A. y W. Rauser. (1979). Callose deposition and photo assimilate export in *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel, and zinc. *Journal of Plant Physiology*, 63, 1170-1174.
- Ratan, P., y 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.
- Ryan, P. R., y Delhaize, E. (2010). The convergent evolution of aluminum resistance in plants exploits a convenient currency. *Functional Plant Biology*, 37(4), 275.
- Reyna-Llorens, I., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barceló, J., y 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.
- Salazar-Chavarría, A. V. (2015). Respuesta Fisiológica de *Fagopyrum esculentum* Moench. al estrés por aluminio. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, 64 pp.

- Salazar-Chavarría, V., Sánchez-Nieto, S., y Cruz-Ortega, R. (2020). *Fagopyrum esculentum* at early stages copes with aluminum toxicity by increasing ABA levels and antioxidant system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 152, 170-176.
- Singh, D., Dikshit, H. K., y Kumar, A. (2015). Aluminum tolerance in lentil (*Lens culinaris* Medik.) with monogenic inheritance pattern. *Plant Breeding*. 134(1), 105-110.
- Singh, D., Pal, M., Singh, C. K., Taunk, J., Jain, P., Chaturvedi, A. K., Maurya, S., Karwa, S., Singh, R., Tomar, R. S. S., Nongthombam, R., Chongtham, N., y Singh, M. P. (2016). Molecular Scanning and Morpho-Physiological Dissection of Component Mechanism in Lens Species in Response to Aluminium Stress. *PLOS ONE*, 11(7), e0160073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160073>
- Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., y Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminum on various levels of plants cells and organism: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.
- Singh, C. K., Singh, D., Tomar, R. S. S., Karwa, S., Upadhyaya, K. C., y Pal, M. (2018). Molecular mapping of aluminum resistance loci based on root re-growth and Al-induced fluorescent signals (callose accumulation) in lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Molecular Biology Reports*, 45 (6).
- Sivaguru, M., & Horst, W. J. (1998). The Distal Part of the Transition Zone Is the Most Aluminum-Sensitive Apical Root Zone of Maize. *Plant Physiology*, 116(1), 155–163.
- Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluška., Yang ZM, Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D. y Matsumoto H. (2000). Aluminum-induced 1→3, β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants.. *Plant Physiology*, 124(3), 991 - 1005.

- Sivaguru, M., Baluska, F., Volkmann, D., Felle, H. H., y Horst, W. J. (1999). Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, 119 (3), 1073–1082.
- Stass, A., y Horst, W. J. (2009). Callose in Abiotic Stress. Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides. *Journal Elsevier.*, pp. 499-524.
- Van de Venter, H. A., y Currier, H. B. (1977). The effect of boron deficiency on callose formation and <sup>14</sup>C translocation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *American Journal of Botany*, 64 (7), 861–865.
- Wang, H., Chen, R. F., Iwashita, T., Shen, R. F., y Ma, J. F. (2015). Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytologist*, 205, 273-279.
- Watanabe, T., Misawa, S., y Osaki, M. Yang. (2005). Aluminum accumulation in the roots of *Melastoma malabathricum*, an aluminum-accumulating plant. *Canadian Journal of Botany*, 83(11), 1518-1522.
- Wehr, J. B., Menzies, N. W., y C. Blamey, F. P. (2004). Inhibition of cell-wall autolysis and pectin degradation by cations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 485-492.
- Wissemeier, A.H., F. Klotz y W.J. Horst. (1987). Aluminum induced callose synthesis in roots of soybean (*Glycine max* L.). *Journal of Plant Physiology*, 129, 487-492.
- Wissemeier, A. H. y Horst, W. J. (1995). Effect of Calcium Supply on Aluminium-Induced Callose Formation, its Distribution and Persistence in Roots of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Plant Physiology*, 145, 470–476.
- Xu, J. M., Fan, W., Jin, J. F., Lou, H. Q., Chen, W. W., Yang, J. L., y 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., Devi, S. R., Rikiishi, S., y 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.
- Yang, Z.-B., Rao, I. M., y Horst, W. J. (2013). Interaction of aluminum and drought stress on root growth and crop yield on acid soils. *Plant and Soil*, 372 (1-2), 3-25.
- Yokosho, K., Yamaji, N., y 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.
- Zhang, W.H., y Rengel, Z. (1999). Aluminum induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Functional Plant Biology*, 26(5), 401-409.
- Zheng, S., Yang, J., He, Y., Yu, X., Zhang, L., You, J., Shen, R., y Matsumoto, H. (2005). Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, 138, 297-303.
- Zhu, M., Ahn, S., y Matsumoto, H. (2003). Inhibition and growth development of root border cells in wheat by Al, *Physiology Plantarum*, (117) 359-367.