



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**EFFECTO DEL ALUMINIO EN EL CRECIMIENTO Y
SISTEMA ANTIOXIDANTE DE *Conostegia*
xalapensis (BONLP) (MELASTOMATACEAE)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. IRIS HAYDE GONZÁLEZ SANTANA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCIO CRUZ ORTEGA



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

Gracias a:

Mi mamá **Bertha** por no solo ser la mejor madre del mundo sino por ser una gran amiga y una mujer admirable, que me ha alentado a ser mejor siempre.

Mi papá **Francisco** por enseñarme que debo de ser siempre la mejor.

Mi hermano **Cesar** por su cariño y apoyo.

Hector por acompañarme en esta jornada y por su amor.

Mi querida amiga **Erandi**, que no solo ha estado en esos momentos difíciles si no también a ver la vida desde otra perspectiva a pesar de todos los obstáculos que se presente y por ser una gran amiga.

Mi querida amiga **Aurora** que me ha enseñado a no conformarme, por apoyarme y por que a compartido su experiencia y cariño, y sobre todo su amistad.

Mi querida amiga **Dalia** que me ha enseñado a ser fuerte, buscar la excelencia y ver más allá por su gran apoyo, cariño y su gran amistad.

Mis queridos amigos **Merle, Verónica y Daniel**, por su gran apoyo, amistad y cariño, por compartir sus experiencias y confianza conmigo.

Iván y Ricardo, por no solo ayudarme en mis colectas de suelo y hojas, sino también por su amistad.

Mi tutora **Rocío** por apoyarme en mi investigación y en esos momentos difíciles y sobre todo por brindarme su amistad.

La **Dra Anaya** por su apoyo y amistad.

Mis tíos **Laura, Enrique, Victor y Juana** y mis primos, **Patricia, Erik, Diego, Adrián, Ale, Lesly y Lizbeth** por su apoyo, cariño y por creer en mí.

Dra. Alicia por apoyarme en mi investigación y ayudarme a ser mejor como investigadora y como persona.

Dra. Judith por apoyarme en mi investigación y enseñarme a ver las cosas desde muchas perspectivas.

Pilar por apoyarme en mi trabajo y por su amistad y dedicación.

Dra. Silke Cram por su apoyo y orientación en el desarrollo de esta tesis y por su revisión, comentarios y sugerencias.

Dr. Javier Plasencia, miembros del jurado por su revisión, comentarios y sugerencias a esta tesis.

A todos Ustedes Muchísimas gracias

AGRADECIMIENTOS A:

M. en C. María del Pilar Fernández Lomelín por su apoyo en esta investigación en la realización de la digestión ácida de muestras de suelo y hojas con un Microondas CEM MARS X, USA, también en la determinación de la Conductividad Eléctrica del suelo, y la cuantificación de Al total e intercambiable (Al^{3+}) y Ca^{2+} intercambiable con un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (Varian SpectrAA-10 plus Alemania) en el Laboratorio de Análisis Físicos y Químicos del Ambiente en el Instituto de Geografía de la UNAM, así como su apoyo en el Análisis Estadístico de los resultados obtenidos.

M en C Manuel Hernández Quiróz por su apoyo en esta investigación en la realización de la digestión ácida de muestras de suelo y hojas con un Microondas CEM MARS X, USA la cual se realizó en la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

M. en C. María del Pilar Torres García por su apoyo otorgado en esta investigación para la utilización del Criostato en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Biól. Eva Muñoz Mancilla por su apoyo en el montaje de las muestras con TMF (Tissue Freezing Medium, gel que embibe muestras para cortes en frío) y en la realización de los histológicos en el Criostato en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Ing. Erik Daniel Valle Vidal por su apoyo en el mantenimiento preventivo y correctivo de todo el sistema de cómputo que fue ocupado para la realización de esta investigación.

Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su apoyo y orientación en la realización de la fotografías de las tinciones con Hematoxilina con un microscopio Motic Digital en el Laboratorio de Bioquímica y Farmacia, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

M. en C. Alejandro Martínez Mena por su apoyo y orientación en la realización de las fotografías de las tinciones con Pirocatecol Violeta con un fotomicroscopio Olympus Provis AX70 en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

M. en C. Guillermina González Mancera por su gran apoyo y orientación en el montaje de los cortes seminfinos de hojas y en el análisis bioquímico de las mismas con un Microscopio Electrónico de Barrido acoplado a un Espectrofotómetro de Dispersión de Rayox X (MEB-EDS) en la Facultad de Química, Edificio D, UNAM.

Esta tesis se realizó gracias a las becas de posgrado de CONACYT y del proyecto SEP-CONACYT 59237.

CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1. ACIDIFICACIÓN DEL SUELO.....	12
2.1.2. ALUMINIO EN EL SUELO	14
2.2. TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN PLANTAS	15
2.2.1. PARED CELULAR DE LA RAÍZ.....	15
2.2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA	19
2.2.3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	20
2.2.4. CITOESQUELETO DE CÉLULAS DE RAÍZ.....	21
2.2.6. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y SISTEMA ANTIOXIDANTE	22
2.2.6.1. <i>Catalasa (CAT, E. C. 1.11.1.6)</i>	25
2.2.6.2. <i>Ascorbato peroxidasa (APX, E. C. 1.11.1.11)</i>	25
2.2.6.3. <i>Glutación reductasa (GR, E. C. 1.6.4.2)</i>	26
2.2.6.4. <i>Superóxido dismutasa (SOD, E. C. 1.11.1.11)</i>	26
2.2.5. LIPOPEROXIDACIÓN	28
2.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA AL ALUMINIO	28
2.3.1. MECANISMOS EXTRÍNSECOS	29
2.3.1.1. <i>Exudación de ácidos orgánicos</i>	29
2.3.1.3. <i>Exudación de compuestos fenólicos</i>	29
2.3.1.4. <i>Mucilago</i>	30
2.3.2. MECANISMOS INTRÍNSECOS	31
2.3.2.1. <i>Transporte de complejos Al-Ácido Orgánico a través de canales</i>	31
2.3.2.2. <i>Unión o fijación del Aluminio en la pared celular</i>	32
2.3.2.3. <i>Permeabilidad selectiva de la membrana plasmática</i>	32
2.4 PLANTAS ACUMULADORAS DE AL	32
2.4.1. MECANISMOS DE ACUMULACIÓN	37
2.4.1.1. <i>Formación de complejos quelantes con Al</i>	37
2.4.1.2. <i>Acumulación del Al y localización celular</i>	39
2.5 FAMILIA MELASTOMATACEAE	40
3. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS.....	43
4. OBJETIVOS	44
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	44
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS	45
5.1 MATERIAL VEGETAL	45
5.3 COLECTA DE SUELO Y HOJAS.....	45
5.4 ANÁLISIS DE SUELO Y DE HOJAS DE <i>CONOSTEGIA XALAPENSIS</i> COLECTADAS EN CAMPO	48
5.4.1 DETERMINACIÓN DE pH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA, TEXTURA Y COLOR DEL SUELO	48
5.4.2 DETERMINACIÓN DE Al^{3+} Y Ca^{2+} INTERCAMBIABLE EN EL SUELO	49
5.4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AL EN HOJAS COLECTADAS EN CAMPO.....	50
5.5 BIOENSAYO CON PLANTULAS DE <i>C. XALAPENSIS</i>	50
5.6 CRECIMIENTO DE <i>C. XALAPENSIS</i>	52
5.6.1 TASA DE CRECIMIENTO ABSOLUTA (AGR).....	52
5.6.2 TASA DE CRECIMIENTO RELATIVA (RGR).....	53
5.6.3 TASA PROMEDIO DE CRECIMIENTO RELATIVO (\bar{RGR})	53
5.6.4 TASA DE ASIMILACIÓN NETA (NAR).....	53
5.6.5 PROPORCIÓN DE ÁREA FOLIAR (LAR).....	54
5.6.6 ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA (SLA).....	54
5.6.7 FRACCIÓN DEL PESO DE LAS HOJAS, PESO DEL TALLO Y PESO DE LA RAÍZ (LWR, SWR Y RWR)	55
5.6.8 COCIENTE ALOMÉTRICO RAÍZ/PARTE AÉREA (R/S).....	55

5.7 LOCALIZACIÓN DEL AL EN HOJAS Y RAÍCES	55
5.7.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA (HTX)	55
5.7.2 TÉCNICA DE TINCIÓN CON PIROCATECOL VIOLETA (PCV)	56
5.7.3 LOCALIZACIÓN DEL AL EN HOJAS UTILIZANDO UN MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO ACOPLADO A UN ESPECTROFOTÓMETRO DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (MEB-EDS)	57
5.8 ENSAYOS BIOQUÍMICOS:	58
5.8.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	58
5.8.2 ACTIVIDAD DE CATALASA (CAT, E. C. 1.11.1.6) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	58
5.8.3 ACTIVIDAD DE ASCORBATO PEROXIDASA (APX, E.C. 1.11.1.11) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	59
5.8.4 ACTIVIDAD DE GLUTATION REDUCTASA (GR, E.C.1.6.4.2) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	60
5.8.5 ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD, E.C. 1.11.1.11) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	60
5.8.6 CONCENTRACIÓN DE RADICAL SUPEROXIDO ($O_2^{\bullet-}$) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	61
5.8.7 CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2) POR ESPECTROFOTOMETRÍA	61
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
6. RESULTADOS	63
6.1 CONCENTRACIÓN DE Al^{3+} , Ca^{2+} , pH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA, TEXTURA Y COLOR DEL SUELO	63
6.2 CONCENTRACIÓN DE AL EN HOJAS DE <i>C. XALAPENSIS</i> COLECTADAS EN CAMPO.....	65
6.3 CRECIMIENTO	67
6.3.1 LONGITUD DE LA RAÍZ PRINCIPAL	67
6.3.2 FORMACIÓN DE RAÍCES NUEVAS	68
6.3.3 BIOMASA	68
6.3.4 ÁREA FOLIAR	69
6.3.5 PESO SECO DE RAÍZ Y HOJAS	69
6.3.6 COEFICIENTE ALOMÉTRICO	69
6.4 LOCALIZACIÓN DE AL EN HOJAS Y RAÍCES	72
6.4.1 TINCIÓN CON HEMATOXILINA	72
6.4.2 TINCIÓN CON PIROCATECOL VIOLETA (PCV)	72
6.4.3 LOCALIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AL EN HOJAS CON MED-EDS	73
6.5 ACTIVIDAD DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE	76
6.5.1 CATALASA (CAT)	76
6.5.2 ASCORBATO PEROXIDASA (APX)	77
6.5.3 GLUTATION REDUCTASA (GR)	77
6.5.4 SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)	78
6.6. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS).....	79
6.6.1 CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDO E HIDRÓGENO (H_2O_2)	79
6.6.2 CONCENTRACIÓN DEL RADICAL SUPERÓXIDO ($O_2^{\bullet-}$)	80
7. DISCUSIÓN	81
7.1. <i>CONCENTRACIÓN DE Al^{3+} EN SUELO</i>	81
7.2. <i>CONCENTRACIÓN DE AL EN HOJAS DE C. XALAPENSIS COLECTADAS EN CAMPO</i>	82
7.3. <i>CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE C. XALAPENSIS EN LABORATORIO</i>	83
7.4. <i>LOCALIZACIÓN DEL AL EN EL TEJIDO DE PLÁNTULAS DE C. XALAPENSIS</i>	85
7.5. <i>SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PLÁNTULAS DE C. XALAPENSIS</i>	87
8. CONCLUSIONES	90
9. LITERATURA CITADA	91

RESUMEN

En los suelos ácidos el exceso de Aluminio intercambiable (Al^{3+}) limita el crecimiento de la mayoría de las plantas. Sin embargo, algunas plantas pueden crecer en suelos con altas concentraciones de Al^{3+} . Por ejemplo, en la familia Melastomataceae, la especie *Melastoma malabathricum* presenta mecanismos intrínsecos de tolerancia que le permiten a esta especie acumular Aluminio (Al) en su tejido, sin daños aparentes. A las especies de plantas que acumulan más de 1 g Al kg^{-1} tejido son designadas como **acumuladoras de Al**. En *C. sinencis* el contenido de Al puede llegar a ser hasta de 30 g Al kg^{-1} tejido seco en hojas adultas, aunque en hojas jóvenes tienen alrededor de 0.6 g Al kg^{-1} tejido seco. También, el género *Conostegia* (Melastomataceae) ha sido reportado como una planta acumuladora de Al. *Conostegia xalapensis*, es la especie arbustiva más común y ampliamente distribuida de las Melastomataceas leñosas de México y Centroamérica. Coloniza con frecuencia sitios perturbados y persiste por muchos años en áreas sometidas a sucesión secundaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar si *Conostegia xalapensis* es una planta acumuladora de Al y sus posibles mecanismos intrínsecos de tolerancia que presenta esta especie en respuesta a la toxicidad del Al^{3+} , para lo cual se realizó un (1) Trabajo de campo, en el cual se determinó la concentración de Al en el tejido de hojas de *C. xalapensis* colectadas en dos Potreros y dos Vegetaciones Secundarias, y la concentración del Al^{3+} presente en el suelo de estos sitios; en donde se encontró que las hojas colectadas en los Potreros obtuvieron la mayor concentración de Al en el tejido, y además los suelos de estos sitios presentaron la mayor concentración de Al^{3+} en comparación con la Vegetación Secundaria. (2) En el laboratorio se realizó un bioensayo con plántulas de 8 meses de edad de *C. xalapensis* para evaluar el efecto de 0.5 mM y 1.0 mM AlCl_3 en el crecimiento, la localización de Al en el tejido y la respuesta del sistema antioxidante. En este bioensayo se encontró que el crecimiento de la raíz de las plántulas tratadas con 0.5 mM Al no fue inhibido, e incluso el número de raíces nuevas fue tres veces mayor en los tratamientos con Al en comparación con el control. La localización de Al con Pirocatecol Violeta y Hematoxilina y el análisis con el espectrofotómetro de dispersión de rayos X, mostraron que en las hojas de los tratamientos el Al se localizó en la epidermis adaxial e abaxial y en algunas células del mesofilo esponjoso, y en las raíces, el Al se localizó desde la epidermis hasta el floema y xilema. Para evaluar la respuesta del sistema antioxidante se midió la actividad de las enzimas Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato peroxidasa (APX) y Glutathion reductasa (GR), y la concentración de Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Los resultados mostraron que la CAT y SOD fueron las enzimas que presentaron la mayor actividad, seguidas por la

actividad de APX y GR, en las plántulas tratadas con Al, en comparación con las del control. El aumento en la actividad de estas enzimas se correlacionó con la disminución de la concentración de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$. En conclusión este trabajo mostró que *C. xalapensis* puede crecer en suelos ácidos con altas concentraciones de Al^{3+} , y acumula este metal en su tejido sin ningún daño aparente, por lo que puede ser considerada como una especie acumuladora e incluso como indicadora de suelos con problemas de acidez. Además, en plántulas de 8 meses de edad, su biomasa y crecimiento no se ve disminuido, en la concentración de 0.5 mM y el incremento de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante puede ser uno de los mecanismos intrínsecos que permite a *C. xalapensis* contrarrestar los efectos tóxicos del Al.

ABSTRACT

In acid soils, the excess of soluble Al^{3+} restricts plant growth. However, some plants can tolerate high Al^{3+} concentrations by accumulating it in their tissues. Plants that accumulate more than 1 g Al/kg are designated as **Al accumulators**; i. e. the genus *Conostegia* (Melastomataceae) has been reported as an Al accumulator plant. The species *C. xalapensis* is the most common shrub in Mexico and Central America, and it has been observed that colonize mainly disturbed areas. The aim of this work was to evaluate whether *C. xalapensis* is an Al accumulator plant and if this plant presents intrinsic tolerance mechanisms. This work was divided into: 1) Fieldwork, the concentration of Al was determined in leaves of *C. xalapensis* as well as the Al^{3+} concentration of soil at three different habitats: Pasture, secondary and primary vegetation. Results showed that Al concentrations of leaves of *C. xalapensis* and Al^{3+} in soil were the highest in pasture. 2) Laboratory work, a growth experiment was performed, seedlings of 8 months old was treated with 0.5 and 1.0 mM AlCl_3 in culture solution during 24 days, Relative Growth Rate (RGR), localization of Al in leaves and roots, and activity of some antioxidant enzymes were evaluated. *C. xalapensis* growth was not inhibited with 0.5 mM Al, and treated plants showed a higher number of new roots than control plants. On the other hand, Aluminum was localized in leaves and roots using PCV and Hematoxylin stain, and MEB-EDS; I observed that in leaves Al accumulation was restricted mainly at upper and lower epidermis, and in all tissues of roots. The activity of the enzymes CAT and SOD was higher in the root of plants treated with Al, and levels of H_2O_2 and $\text{O}_2^{\bullet-}$ were low. In conclusion, *C. xalapensis* can grow in acid soils with higher Al^{3+} concentrations, accumulate this metal in their tissues without damage, and therefore it can be considered as Al accumulator plant.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La acidificación del suelo es resultado de una variedad de factores biológicos, químicos y físicos en los que intervienen la oxidación microbiana de la biomasa, la respiración de las raíces, la lluvia ácida, la fertilización excesiva, la intemperización de arcillas, entre otros. Cuando el pH del suelo es menor de 5, el aluminio (Al) presente en el suelo, comienza a ser soluble y tóxico provocando una inhibición del crecimiento de las plantas (Watanabe *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002a). El Al es el metal más abundante de la corteza terrestre, y dependiendo del pH del suelo, se pueden encontrar especies de Al no tóxicas o insolubles como Al_2SiO_5 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , y especies tóxicas o solubles principalmente Al^{3+} (Marshner, 1995; Bertsch y Bloom, 1996). En la forma soluble el Al es capaz de moverse a través del suelo, desplazando a los nutrientes cargados positivamente como el Ca^{2+} de los sitios de intercambio en las partículas del suelo, causando una disminución de éstos a una tasa muy rápida (Marshner, 1995; Bertsch y Bloom, 1996; Watanabe *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2002a; Harter, 2002; Carr *et al.*, 2003).

En las especies sensibles al Al^{3+} , la inhibición del crecimiento ha sido relacionada con: 1) Alteración de la estructura de la pared celular (Kochian, 1995; Schildknecht y Campos, 2002; Kochian *et al.*, 2004; Zheng y Yang, 2005); 2) Desestabilización de la homeostasis y señalización de Ca^{2+} (Zhang y Rengel, 1999; Piñeros y Kochian, 2001; Ma *et al.*, 2002; Zheng y Yang, 2005); 3) Inhibición de canales, i. e. K^+ y Ca^{2+} (Ryan *et al.*, 1997; Piñeros y Kochian, 2001; Zhang *et al.*, 2001); 4) Alteraciones en los microtúbulos de actina (Jones y Kochian, 1995; Blancafor *et al.*, 1998; Sivaguru y Horts, 1998; Sivaguru *et al.*, 1999); 5) Inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y como consecuencia 6) Daño oxidativo a la membrana plasmática de las células de la raíz (Yamamoto *et al.*, 2001; Boscolo *et al.*, 2003; Kochian *et al.*, 2004).

Sin embargo, algunas especies de plantas son tolerantes a altas concentraciones de Al^{3+} en el suelo (Cuenca *et al.*, 1991). Esta tolerancia se da principalmente a través de dos mecanismos: I) Extrínsecos, los cuales excluyen el Al del ápice de la raíz, e II) Intrínsecos que acumulan el Al en el simplasto o apoplasto de la raíz y las hojas (Kochian *et al.*, 2004). Los mecanismos de exclusión incluyen: 1) Exudación de ácidos orgánicos (AO) en la zona del ápice de la raíz, tales como citrato, i.e. en *Cassia tora* y en soya (*Glycine max*) (Delhaize *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000), y oxalato, i.e. en *Fagopyrum esculentum* (Ma *et al.*, 1998; Shen y Ma, 2001); 2) Incremento del pH en la rizosfera i.e. *Arabidopsis thaliana* (mutante *alr-104*) (Denenhardt *et al.*, 1998); 3) Producción de mucílago en el

ápice de la raíz como en el trigo (*Triticum aestivum* var. Atlas) (Henderson y Ownby, 1991; Puthota *et al.*, 1991); y 4) Formación de calosa en la raíz, i. e. en una variedad tolerante de maíz (*Zea mays* L, Ag 5011) (Schildknecht y Campos, 2002; Zheng y Yang, 2005). Otros ejemplos de plantas que presentan mecanismos de tolerancia extrínsecos al Al son: sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), alfalfa (*Medicago sativa*), trigo (*Triticum aestivum* L. cv Atlas 66), girasol (*Helianthus annuus*), tabaco (*Nicotina tabacum*), arroz (*Secale cereale*), soya (*Glycine max*) y algunas variedades de maíz (*Zea mays*) (Cruz-Ortega y Ownby, 1993; Kochian *et al.*, 2004).

Los mecanismos intrínsecos se dividen de acuerdo al sitio en el cual el Al es acumulado: 1) Interno o en el Simplasto, el cual involucra el secuestro del Al en la vacuola (Sivaguru *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2002; Naumann *et al.*, 2001), y 2) Externo o en el Apoplasto, previniendo que el Al entre al citoplasma (Kochian, 1995; Watanabe *et al.*, 1998; Kollmeier *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2001; Piñeros y Kochian, 2001; Ryan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2002b; Piñeros *et al.*, 2002; Kochian *et al.*, 2004). Las especies de plantas que acumulan más de 1 g Al/kg tejido son designadas como **acumuladoras de Al** (Chenery, 1948). Por ejemplo, en *Camellia sinensis* el contenido de Al puede llegar a ser hasta de 30 g Al/kg tejido seco en hojas adultas, aunque en hojas jóvenes tienen alrededor de 0.6 g Al/kg tejido seco sin ningún daño aparente (Matsumoto *et al.*, 1976; Yokota *et al.*, 2005). En *Melastoma malabathricum* (Melastomataceae), cuando la planta crece en presencia de 0.5 mM AlCl₃ durante 6 semanas, la concentración de Al excede los 10 g Al/kg tejido seco en hojas viejas y 7 g Al/kg tejido seco en hojas jóvenes. Además, utilizando cortes histológicas de hojas y raíces, se encontró que en esta especie el Al se localiza en las células epidérmicas adaxiales, y se distribuye en las células del mesófilo de las hojas y en todo el tejido de la raíz, particularmente en la epidermis y endodermis (Watanabe *et al.*, 1998). Este patrón de compartimentalización, sugiere que el Al no participa en los procesos metabólicos (Carr *et al.*, 2003).

En un estudio sobre la distribución y el significado sistemático de la acumulación de Al en la familia Melastomataceae, realizado por Jansen *et al.* (2002b), encontraron que 107 géneros son acumuladores de Al, entre los que se encuentra el género *Conostegia*. En particular, *Conostegia xalapensis*, un arbusto de 1.5 a 7 m de alto, es la especie más común y ampliamente distribuida de las Melastomataceas leñosas de México y Centroamérica. *C. xalapensis* coloniza con frecuencia sitios perturbados y persiste por muchos años en áreas sometidas a sucesión secundaria, además de que sus frutos son de consumo humano, a las hojas se les atribuyen propiedades medicinales (la infusión de las ramas se utiliza para baños posparto [Villavicencio y Pérez, 2005]) y la madera se utiliza como

combustible, o para la construcción de cercas, así como de soporte para el fríjol trepador (Almeda, 1993a). Por estas características, *C. xalapensis*, puede ser una especie acumuladora de Al, y este mecanismo permitirle colonizar sitios con problemas de toxicidad por Al^{3+} , y por lo tanto ser una especie indicadora de suelos con problemas de acidez.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ACIDIFICACIÓN DEL SUELO

El suelo es un cuerpo natural que comprende sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que se presentan en la superficie de la tierra. El suelo se forma por el intemperismo físico, químico y biológico de las rocas resultando en partículas pequeñas (el componente mineral), que junto con la materia orgánica constituyen la fase sólida, y su composición química refleja la composición de la roca a partir de la cual se formó. El componente principal en la mayoría de los suelos es sílice en las arenas y arcillas. El Aluminio (Al), el hierro (Fe), el potasio (K), el sodio (Na), el titanio (Ti) y el manganeso (Mn) también se presentan en varios minerales, y el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) derivan especialmente de calizas (Campbell, 2001). Los factores químicos del suelo tales como pH, salinidad y disponibilidad de nutrientes determinan la distribución de la vegetación, e incluso las especies vegetales y ecotipos pueden clasificarse en términos ecofisiológicos de acuerdo a su distribución en los suelos (Marshner, 1995).

La acidificación del suelo es un proceso por el cual el pH del suelo disminuye bajo condiciones naturales después de cientos de años, i. e., el dióxido de carbono que es producido por la descomposición de la materia orgánica, se equilibra con el agua del suelo en la siguiente reacción (Taíz y Zeiger, 2006; Natural Resource and Water Department, 2006):



Esta reacción libera los iones hidrógeno (H^+), disminuyendo el pH del suelo. La descomposición microbiana de la materia orgánica también produce amonio y ácido sulfhídrico, este último puede ser oxidado en el suelo para formar ácidos fuertes como el ácido nítrico (HNO_3) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4), respectivamente. También el suelo puede acidificarse rápidamente en tan solo unos pocos años por prácticas de agricultura intensiva o lluvia ácida, afectando no sólo la superficie del suelo, sino también el subsuelo (Taíz y Zeiger, 2006). Esta acidificación del suelo provoca que los cationes básicos como el Ca, sean removidos a una tasa muy rápida, antes de que puedan ser reemplazados en la solución del suelo. Cuando esto sucede los cationes ácidos como el H^+ y Al^{3+} reemplazan los sitios de intercambio de los cationes básicos en la solución del suelo (Figura MT1) (Quiñonez, 2007).

En un suelo ácido las principales causas o factores que inhiben el crecimiento de la planta son (Marshner, 1995; Taíz y Zeiger, 2006):

- Incremento en la concentración de H^+ : toxicidad por H^+ .
- Incremento en la concentración de Al soluble: toxicidad por Al^{3+} .
- Incremento en la concentración de Mn: toxicidad por Mn^{2+} .
- Disminución en la concentración de macronutrientes catiónicos: deficiencia en Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ .

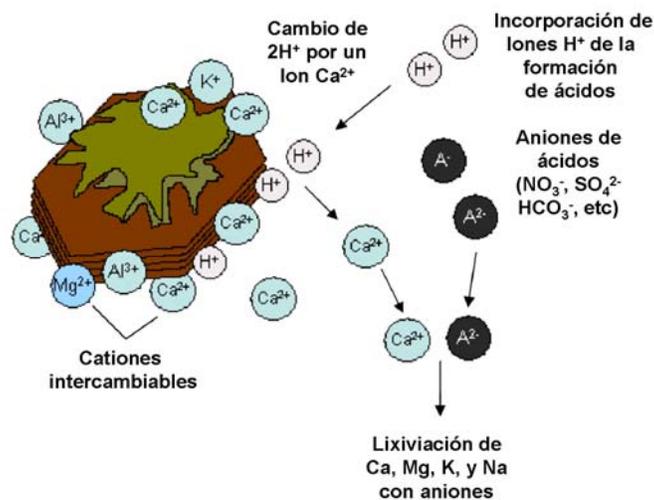


Figura MT1. Diagrama del proceso de acidificación del suelo (Quiñonez, 2007).

El efecto de estos factores depende de las especies y genotipos de las plantas, el tipo de suelo y el horizonte, la roca madre, el pH del suelo, la concentración y las especies de Al presentes, la estructura y aeración de suelo y el clima. La toxicidad de Al y la deficiencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fósforo (P) se presenta en más del 70% de los suelos ácidos tropicales de América (Marshner, 1995).

La toxicidad del Al provoca una disminución en la capacidad de la absorción de cationes polivalentes de las raíces, por ejemplo, inhibe la absorción de Ca^{2+} al bloquear los canales de la membrana plasmática, y la absorción de Mg^{2+} al bloquear los sitios de transporte de proteínas. También, la nodulación¹ es severamente inhibida por altas concentraciones de H^+ en combinación con bajas concentraciones de Ca^{2+} y por las altas concentraciones de Al^{3+} (Marshner, 1995).

¹ Es un mecanismo de fijación de N_2 en las raíces, la cual involucra la relación simbiótica entre microorganismos fijadores de N_2 (i. e. *Rizhonium*) y una planta hospedera (i. e. alfalfa y soya).

2.1.2. Aluminio en el Suelo

En particular, el Al es el metal más abundante y el tercer elemento más común en la corteza terrestre, generalmente se encuentra como silicatos de Al, el principal constituyente de muchos suelos, y a pesar de su amplia disponibilidad, parece que el Al no es necesario para los procesos biológicos. Las fuentes más ricas son el Al trihidratado o bauxita², el mineral del cual se deriva el Al y puede presentarse en diferentes formas dependiendo del pH del suelo. Las formas más comunes en las que el Al no es tóxico y es estable son; Al_2SiO_5 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , y sus complejos con ácidos orgánicos. Sin embargo, cuando el pH es menor a 5, el contenido de Ca^{2+} , el cual es responsable del efecto amortiguador³ del suelo, disminuye provocando que el exceso de H^+ inicie la hidrólisis del Al y comience a solubilizarse formando Al^{3+} (cada ion Al consume 3 iones H^+). El incremento de pH aumenta la formación de los productos mononucleares de hidrólisis como $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ (Figura MT2) (Marshner, 1995). El Al^{3+} es tóxico para las plantas, ya que es susceptible de moverse a través del suelo y competir con los nutrientes cargados positivamente en la superficie del suelo, causando una remoción de éstos a una tasa muy rápida (Harter, 2002).

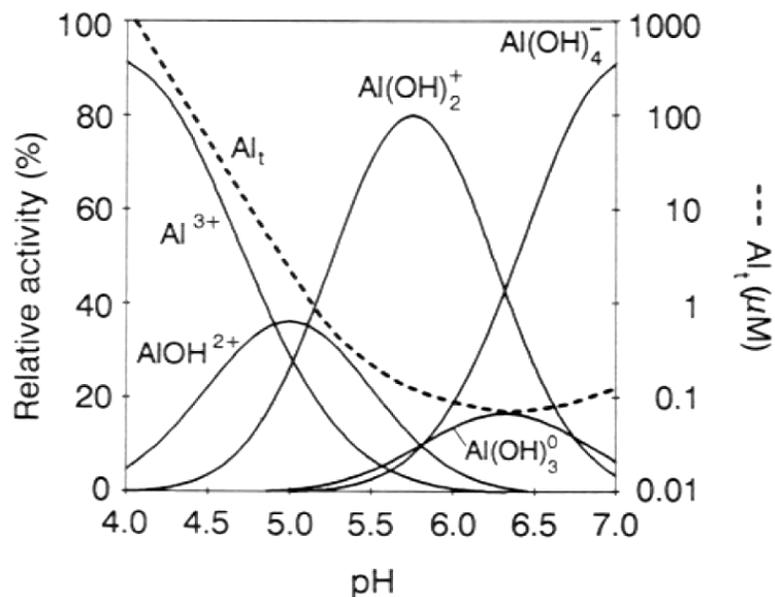


Figura MT2. Actividades relativas de especies mononucleares de Al y la concentración total (Al_t) de Al soluble en función del pH (Kinraide, 1991).

² La cual consiste en grandes minerales de gibbsita $\text{Al}(\text{OH})_3$, boehmita y diaspora AlOOH , junto con óxidos de hierro goetita y hematita, el mineral arcilloso caolinita y pequeñas cantidades de anatasa (TiO_2).

³ Una reacción amortiguadora involucra una sal y su asociación a un ácido. Por ejemplo, $\text{Ca-Suelo} + 2\text{H}^+ = 2\text{H-Suelo} + \text{Ca}^{2+}$

2.2. TOXICIDAD DEL ALUMINIO EN PLANTAS

El interés del estudio de los compuestos de Al se ha incrementado en años recientes dado los efectos perjudiciales que tiene en el ambiente, como por ejemplo, causa el decline de los bosques y la disminución de la fertilidad del suelo; y sobre la salud humana, sobre todo en los desórdenes neurodegenerativos humanos como la enfermedad del Alzheimer (Jansen *et al.*, 2002a). En particular la toxicidad de Al en las plantas se expresa en dos formas: 1) Induce la deficiencia de nutrientes en el suelo, incrementando el lavado de estos del suelo; y 2) Provoca la inhibición del crecimiento de la raíz a través de diferentes mecanismos, los cuales incluyen: alteración de la estructura de la pared celular, inducción de la rigidez de la membrana plasmática, modificación en la transducción de señales, cambios en el arreglo de los microtúbulos y filamentos del citoesqueleto, inducción de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación (Jansen *et al.*, 2002a; Watanabe *et al.*, 2004).

También, la inhibición de la elongación de la raíz causa que la penetración del sistema de raíces sea más superficial, y por lo tanto, la planta presente una baja absorción de nutrientes y de agua del subsuelo, provocando un estrés hídrico y limitando el crecimiento de la parte aérea (Marshner, 1995; Harter, 2002). A continuación se describen los principales efectos tóxicos, a nivel celular, que provoca el Al en el crecimiento de la raíz.

2.2.1. Pared celular de la raíz

La pared celular es la primera barrera que cualquier ión tiene que pasar antes de entrar a la célula, y cuando la raíces crecen en suelos ácidos, el apoplasto o pared celular de las células de la raíz, es la parte de la planta que primero entra en contacto con el Al^{3+} . Los iones de Al están positivamente cargados en condiciones ácidas (Al^{3+} , $Al(OH)^{2+}$ y $Al(OH)^{+}$), por lo tanto, los sitios cargados negativamente en la superficie de la raíz son los principales sitios para la absorción del Al (Zheng *et al.*, 2004).

La unión del Al a la pared celular, y particularmente a la matriz de pectina y otros constituyentes puede alterar las características y funciones de la pared celular, como por ejemplo la extensibilidad, porosidad y la actividad de las enzimas asociada a ésta, resultando en la inhibición del crecimiento de la raíz (Schmohl y Horst, 2000; Schildknecht y Campos, 2002; Sivaguru *et al.*, 2006). Además, el apoplasto juega un papel importante en la penetración de Al y la expresión de la toxicidad, ya que del 30% al

90% del Al absorbido en el tejido de la raíz se encuentra localizado en los compartimentos extracelulares (Wang *et al.*, 2004; Zheng y Yang, 2005).

Zheng *et al.* (2004), investigaron las propiedades de la pared celular sobre la cinética de la absorción y la remoción del Al, y observaron que la mayor parte de los iones de Al estaban unidos eléctricamente a la pared celular. Cuando las paredes celulares fueron tratadas con 1% de pectinasa por 30 min para degradar parte de la pectina, la cantidad total de Al absorbido fue 50% menor, indicando que la pectina de la pared celular es el sitio donde se une el Al. También observaron que cuando estas paredes celulares eran preincubadas con 1 y 10 mM de malato durante toda la noche, la absorción de Al se reducía hasta un 80%, sugiriendo que el malato también puede reducir la capacidad de la pared celular para unirse al Al.

También, la acumulación de Al está determinada por la capacidad de intercambio catiónico (CIC) de la pared celular, particularmente en la matriz de pectina. Como se mencionó anteriormente, la CIC (la densidad de las cargas negativas), está determinada por la disponibilidad de grupos iónicos en el apoplasto (Schildknecht y Campos, 2002). Se han hecho varios estudios sobre la correlación entre el CIC del tejido de la planta con su sensibilidad al Al, por ejemplo, la pectina tiene un CIC muy alto, por lo que a mayor concentración de pectina en la pared celular mayor será la concentración de Al acumulado en el ápice de la raíz (Zheng y Yang, 2005). Por otro lado, Eticha *et al.* (2005) en un estudio sobre la relación del contenido de pectina y su grado de metilación con la resistencia al Al de dos variedades de maíz, una sensible (cv Lixis) y una tolerante (cv ATP-Y), encontraron que el Al no solo incrementó el contenido de pectina en ambas variedades, sino que fue mayor en la variedad sensible. Además el grado de metilación de la pectina fue significativamente menor en cv Lixis, lo que indujo un aumento en la electronegatividad de la pared celular, y por lo tanto una mayor acumulación del Al, resultando en la alteración de las funciones de ésta.

El Ca^{2+} participa en el entrecruzamiento de los materiales de la pectina de la pared celular, por lo tanto el desplazamiento de Ca^{2+} unido a la pectina, altera las propiedades físicas de ésta (Rengel y Zhang 2003). Sivaguru *et al.* (2000), en un estudio sobre el bloqueo del tráfico célula-célula inducido por Al en *Triticum aestivum* cv Scout 66, encontraron que el Al altera la homeostasis de Ca^{2+} , induciendo un aumento en su concentración, y causando la formación de calosa en la interfase membrana plasmática - pared celular y por lo tanto un bloqueo del tráfico molecular y de la comunicación de célula a célula.

Se ha reportado que en plantas de papa con mayor actividad de la enzima pectin - metilesterasa (PME), la cual regula la cantidad de los grupos carboxilo en la pared celular, fueron más sensibles al Al que las que tuvieron un menor actividad de la PME (Schmohl y Horst, 2001). La síntesis de calosa es un indicador de la toxicidad de Al, ya que su producción previene el ablandamiento de la pared celular (Schildknecht y Campos, 2002; Tahara *et al.*, 2005). Por ejemplo, Schmohl y Horst (2000), en un estudio sobre el efecto del Al en la pared celular, compararon la síntesis de calosa inducida por digitonina (un inductor de la síntesis de calosa) y por 25, 50, 100 y 200 μM de Al por 2 horas. Los resultados que obtuvieron fueron que el Al induce la misma producción de calosa, que las células tratadas con digitonina, lo cual resultó en la inhibición de la elongación de la raíz. Además, también se observó un incremento en el contenido de pectina de la pared celular, lo cual se correlacionó positivamente con un alto contenido de Al en las células. Esto indica que la pectina juega un papel importante en la fijación del Al, y por lo tanto, las células con alto contenido de pectina son más sensibles al Al.

Sivaguru y Horst (1998), demostraron que en el maíz variedad Lixis la zona de elongación de la raíz (1 – 2 mm desde el ápice) fue la más susceptible a la toxicidad del Al, ya que en esta región, se presentó la mayor formación de calosa y la mayor acumulación de este metal. Jones *et al.* (2006), en un estudio sobre la penetración del Al a la raíz de maíz, encontró que la acumulación del Al se lleva a cabo en todas las regiones de la raíz, aunque la formación de calosa sólo se observó en la región de elongación, lo que indujo la rigidez de la raíz. También, se ha observado que el Al no modifica el flujo de agua, pero sí inhibe el flujo de solutos de alto peso molecular, como por ejemplo las hormonas, lo cual puede contribuir a la disminución del crecimiento de la raíz (Sivaguru *et al.*, 2006).

La extensibilidad de la pared celular es un importante factor para la regulación de la elongación de las células de la raíz, la cual incluye dos componentes, la viscosidad (la habilidad de la pared celular para deformarse irreversiblemente) y la elasticidad (la habilidad de la pared celular para deformarse, y es reversible cuando la fuerza que la deforma desaparece) (Ma *et al.*, 2004). En un estudio sobre el efecto del Al (10 μM) sobre la viscosidad y elasticidad de la pared celular de células de la raíz de dos variedades de *Triticum aestivum* L., con diferentes grados de tolerancia al Al, se observó que el Al causa una rápida disminución de la viscosidad y de la elasticidad en la variedad sensible de trigo Scout 66, además de una fragmentación o rompimiento de la misma, lo cual es consistente con la inhibición de la elongación de la raíz (Ma *et al.*, 2004).

Schildknecht y Campos (2002), encontraron que en maíz los efectos del Al en la matriz de pectina resultaron en una pared celular más cristalina y menos plástica, lo cual la hacía más susceptible al rompimiento físico, y además el Al inhibió la actividad de la enzima glucanasa, la cual es responsable, en parte, de la elongación de la pared celular. Dado que la rigidez de la pared celular depende del suministro de los componentes de la pared, un aporte insuficiente de los nuevos materiales en una zona de elongación rápida de la raíz, puede causar una modificación en su estructura haciéndola más susceptible al rompimiento, por lo que se ha propuesto que el Al interfiere con el ensamblaje de los nuevos componentes de la pared celular (Schildknecht y Campos, 2002; Ma *et al.*, 2004).

Estos resultados sugieren que: 1) La pared celular tiene una alta afinidad de unión con el Al dada su alta densidad de cargas negativas, lo que incrementa su rigidez. 2) Reduce la actividad de las enzimas de la pared celular, por ejemplo la glucanasa, la cual participa en la elongación de la pared celular. 3) Altera la organización de la matriz extracelular y en consecuencia, altera la señalización de Ca^{2+} . Todos estos eventos reducen la fuerza mecánica y el crecimiento de las células en contacto con el Al, particularmente las células de la superficie, por lo tanto, estas células al no poder elongarse, no pueden resistir la presión interna generada por el crecimiento celular, lo que lleva a la fractura de las células y subsecuentemente a la muerte de la raíz (Schildknecht y Campos, 2002).

La variedad sensible de maíz HS 16X36 cuando es tratada con 50 μ M en los primeros 5 min de tratamiento, ocurre la inhibición de la actividad mitótica de los meristemos proximales de la raíz, particularmente en el centro quiescente de la punta de la raíz, en cambio en la zona distal de elongación la división celular se ve aumentada, y después de 180 min se puede observar emerger una raíz lateral. Por lo tanto, los cambios en la arquitectura de la raíz son uno de los primeros síntomas inducidos por la toxicidad del Al (Doncheva *et al.*, 2005).

Por otro lado, efectos similares en la estructura de las células de la raíz entre la toxicidad del Al y las fitohormonas, apoya la hipótesis de que la inhibición del flujo de las auxinas juega un papel importante en la toxicidad del Al. En raíces de maíz se ha encontrado que el Al inhibe el flujo basipetalo de las auxinas (Kollmeier *et al.*, 2000), el cual es interpretado como un mecanismo que induce la inhibición de la elongación de la raíz, ya que las auxinas participan en la división celular (Doncheva *et al.*, 2005).

2.2.2. Membrana plasmática

La toxicidad del Al puede estar asociada con la interacción del Al y el sitio de unión a metales de las enzimas y lípidos, causando una alteración en el metabolismo y señalización celular (Zheng y Yang, 2005; Piñeros y Kochian, 2001). Ishikawa *et al.* (2001; citado por Zheng y Yang, 2005), proponen que el mantenimiento de la integridad de la membrana de las células de la punta de la raíz es el principal factor asociado con la tolerancia al Al, ya que este puede interactuar con los lípidos e inducir la peroxidación de la membrana.

El potencial de membrana es uno de los primeros procesos que se ve alterado por la presencia del Al. La membrana plasmática posee dos tipos de potencial, el primero es el potencial transmembranal que refleja el equilibrio en la concentración de aniones y cationes dentro de la célula, en células normales es siempre negativo en el simplasto con respecto al apoplasto, y este potencial es afectado por el movimiento neto de nutrientes a través de la membrana plasmática y por la acción de proteínas transportadoras tales como la bomba de protones dependiente de ATP (H^+ -ATPasa), la cual juega un papel crucial en el influjo/eflujo de H^+ y la regulación del pH del citoplasma (Ahn *et al.*, 2001; Zheng y Yang, 2005). El segundo tipo de potencial se debe a la concentración neta de aniones y cationes unidos a la superficie de la membrana, y específicamente en las cadenas de los lípidos y en las proteínas unidas a membrana, llamado potencial de superficie o “zeta” (Sivaguru *et al.*, 2005). Al parecer el Al es capaz de alterar estos dos tipos de potenciales (Zheng y Yang, 2005), por ejemplo, en células de raíz de calabaza (*Cucurbita pepo* L. cv Tetsukabuto) 10 μ M de Al inhibió la actividad de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática, además de despolarizar la superficie de ésta (Ahn *et al.*, 2001). También, en un experimento con raíces intactas de *Beta vulgaris*, se encontró que cuando el pH es de 4.0 – 5.0, el Al causa una hiperpolarización de la membrana plasmática (Sivaguru *et al.*, 2005).

Como resultado de estos dos potenciales de membrana, la concentración de iones unidos a los poros de los canales o las proteínas transportadoras puede ser afectada, ocasionando una alteración del movimiento de los iones a través de la membrana, y por lo tanto en la absorción de nutrientes (Zheng y Yang, 2005). También se ha demostrado que el Al es un potente antagonista para muchos canales, incluyendo los canales de K^+ y Ca^{2+} (Piñeros y Kochian, 2001).

Además, las diferencias en la magnitud de las cargas negativas en la superficie de la membrana plasmática atraen los iones de Al cargados positivamente, los cuales pueden alterar el perfil de los

lípidos afectando la señalización regulada por éstos (Sivaguru *et al.*, 2005). Tales alteraciones en las propiedades eléctricas de la superficie de la membrana, llevan a una desestabilización de la misma, provocan una rápida acumulación de Al, e inducen un incremento en el Ca^{2+} intracelular y por lo tanto la despolarización de la membrana plasmática (Sivaguru *et al.*, 2005), sugiriendo además, que se dispara una vía de transducción de señales, que finalmente lleva a la activación de un canal, de tal forma que el resultado es el eflujo de iones orgánicos que pueden ayudar a reducir la actividad tóxica del Al e incrementar la resistencia de la planta a este metal (Piñeros y Kochian, 2001).

2.2.3. Transducción de Señales

Las vías de transducción de señales transmiten la información de células individuales a toda la planta, además de llevar a cabo la expresión de genes, resultando en la modificación de procesos celulares y moleculares (Mossor-Pietraszewska, 2001). Datos experimentales sugieren que existe una cascada de señalización inducida por el Al (Mossor-Pietraszewska, 2001). Osawa y Matsumoto (2001), en un estudio sobre el flujo de malato inducido por Al en el trigo y el papel de la fosforilación de proteínas como mecanismos de resistencia al Al, demostraron que el inicio del flujo del malato en respuesta al Al está asociado a la fosforilación de una proteína relacionada con un canal específico a un anión orgánico.

Las cascada de proteínas cinasas de actividad mitogénica (MAPK) es una de las principales vías de transducción de señales en respuesta a la luz, al estrés por temperatura, al estrés mecánico, a la inundación, la deficiencia de nutrientes, la señalización de hormonas y el estrés por Al (Osawa y Matsumoto, 2001). Por ejemplo se ha observado que el Al induce una proteína MAPK en células de una línea sensible (L2) de *Coffea arabica L.*, la cual antecede el eflujo de ácidos orgánicos en presencia del Al, sugiriendo que esta cascada de señalización contribuye a la inducción de los mecanismos celulares de resistencia al Al (Benítez-Hernández *et al.*, 2008). En un estudio sobre el eflujo de malato inducido por Al en maíz utilizando varios inhibidores de la fosforilación y desfosforilación de proteínas, observaron que la inhibición del flujo de malato en respuesta al Al está asociado con la activación de una proteína cinasa de 48 kDa, la cual puede estar involucrada en la respuesta fisiológica temprana al Al (Osawa y Matsumoto, 2001).

El Al también interactúa con la homeostasis y señalización de Ca^{2+} . Ma *et al.*, (2002) en un estudio acerca de los efectos del Al en los cambios dinámicos del Ca^{2+} en células apicales de raíz de maíz y

arroz, encontraron que en ambas especies el Al induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} citoplásmico, afectando los procesos metabólicos que dependen de Ca^{2+} (i.e., regulación de la división y elongación celular) lo que provoca la inhibición del crecimiento de la raíz. Por otro lado, Jones *et al.* (1998), demostraron que niveles citotóxicos de Al causan una rápida reducción en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en células cultivadas BY-2 de tabaco, y que este cambio está correlacionado con la inhibición del crecimiento de estas células.

Por otra parte, el Al inhibe la actividad de la fosfolipasa C, la cual es responsable de la fosforilación del fosfoinositol bifosfato para producir inositol 1,4-5, trifosfato, el cual participa en la división y elongación celular. La inhibición de la fosfolipasa C bloquea la transición de Ca^{2+} regulada por inositol 1,4-5, trifosfato, lo que provoca que los eventos de crecimiento celular y la dinámica del crecimiento del citoesqueleto se vean alterados (Jones y Kochian, 1995).

2.2.4. Citoesqueleto de células de raíz

El citoesqueleto está compuesto principalmente por microtúbulos y microfilamentos, los cuales están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares, como por ejemplo, división y expansión celular, síntesis de pared celular y movimiento de organelos (Sivaguru *et al.*, 1999). Se ha observado que el daño a los microtúbulos y filamentos del citoesqueleto puede inhibir el crecimiento del ápice de la raíz, síntomas similares provocados por la toxicidad del Al (Blancaflor *et al.*, 1998).

Un modelo propuesto para explicar la alteración del citoesqueleto, menciona que la eficiencia del Al para unirse a los sitios de unión de GTP (Guanosin trifosfato) en la tubulina, la cual es requerida para el ensamblaje de los microtubulos, es de 10 veces mayor que la de Mg. Cuando el Al se asocia con el complejo tubulina-GTP, el intercambio de GTP por GDP es más lento (Blancaflor *et al.*, 1998). También el sistema de señalización del fosfoinositol y Ca^{2+} /calmodulina están implicados en la regulación del citoesqueleto de la plantas y también han sido propuestos como sitios celulares sensibles a la toxicidad del Al (Jones y Kochian, 1995).

El efecto del Al en la reorganización del citoesqueleto es evidente en la zona de elongación de la raíz, donde el Al es inicialmente detectado (Sivaguru y Horts, 1998). Generalmente, el efecto del Al en el citoesqueleto es rápido, coincidiendo con el tiempo de inhibición del crecimiento, siendo más pronunciado en los microtúbulos que en los microfilamentos (Blancafor *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*,

1999). Por ejemplo, Blancaflor *et al.* (1998) en un estudio sobre los efectos del Al en la elongación de los microtúbulos y microfilamentos en células de raíz de maíz, encontraron que el sitio de la toxicidad del Al está asociado con la zona de elongación de la raíz, y que en esta región el Al provoca una reorganización de los microtúbulos de la corteza interna, provocando que la elongación de las células sea irregular, induciendo la fragmentación del tejido de la raíz (Figura MT3).

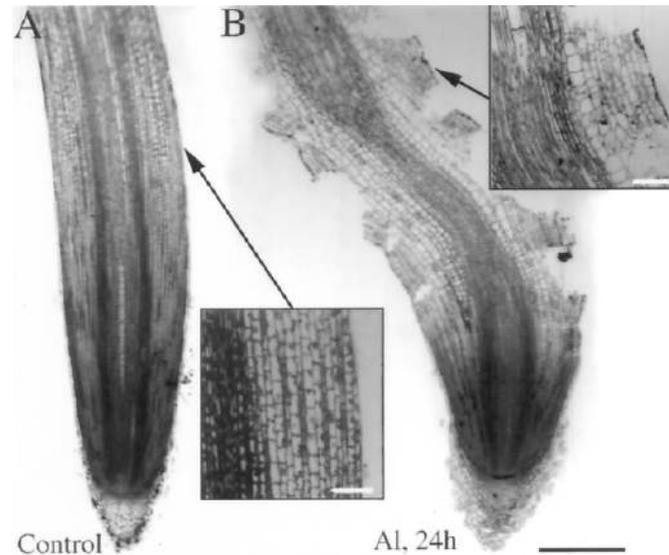


Figura MT3. Micrografías de luz y tinción de viabilidad de raíces primarias de maíz tratadas con 50 µM de Al. Las raíces fueron fijadas con historeina, y las fotografías insertadas muestran una vista magnificada de la superficie de la raíz del control (A) y la raíz después de 25 horas de tratamiento con 50 µM Al (B). La barra en B = 1 µm; la barra en magnificaciones = 100 µm (Blancaflor *et al.*, 1998).

2.2.6. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y Sistema Antioxidante

El oxígeno molecular es poco reactivo, pero dependiendo de la configuración electrónica y protonación que adopte, puede formar especies altamente reactivas como los radicales libres y sus derivados. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) resultan de la reducción secuencial del oxígeno molecular, con variaciones en el número de electrones lo que da origen a los diferentes ROS, por ejemplo, de la excitación de O_2 se forma oxígeno singulete (O_2^1), o por la transferencia de uno, dos o tres electrones a O_2 se forma el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o un radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Mittler, 2002). Esta cadena de reacción requiere la estimulación de la primera

reducción, mientras que las reducciones subsecuentes son exotérmicas y pueden ocurrir espontáneamente, siendo catalizados o no (Smirnoff, 2005).

En la primera reducción de O_2 se producen ROS de vida corta que realmente no se difunden: hidroxilo (HO_2^-) y el superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este último es relativamente reactivo y tiene una vida media de 2 – 4 μs , además se encuentra en un estado desapareado y está clasificado como un radical libre. Ciertos aminoácidos como histidina, metionina y triptofano pueden ser oxidados por el $O_2^{\bullet-}$, además de inducir la lipoperoxidación de las membranas celulares (Dat *et al.*, 2000). La dismutación⁴ del $O_2^{\bullet-}$, la cual es catalizada por la enzima Superóxido Dismutasa resulta en una protonación que genera H_2O_2 (Van Breusegem *et al.*, 2001; Desikan *et al.*, 2005). El H_2O_2 se genera principalmente en las cadenas de transporte de electrones, tanto fotosintética como en la respiración, cuando sus niveles son altos causa daños en los residuos de cisteína de la proteínas, como la metionina, y también inhibe enzimas del ciclo de Calvin como la fructosa-1,6-bifosfatasa, inhibiendo a su vez la fijación de CO_2 (Feierabend, 2005).

La oxidación de los grupos SH por H_2O_2 aumenta por la presencia de la catálisis de metales a través de reacciones de tipo Fenton⁵ (Van Breusegem *et al.*, 2001; Desikan *et al.*, 2005). En comparación con los demás ROS, el H_2O_2 es el oxidante menos reactivo, sin embargo, puede ser el más activo, debido a que tiene una vida media de 1 ms y puede dispersarse en o entre las células por difusión, aumentando así su reactividad con las moléculas biológicas (Van Breusegem *et al.*, 2001; Mittler, 2002; Feierabend, 2005). La última especie generada en esta reacción es el OH^\bullet , la cual es potencialmente fuerte y tiene una vida media de menos de 1 μs (Mittler y Poulos, 2005).

Las altas o bajas temperaturas, la sequía, la salinidad, los rayos UV, el estrés por ozono, la contaminación, el dióxido de azufre (SO_2), el estrés mecánico y las infecciones por patógenos son potencialmente dañinos para las plantas. Un aspecto común de todas estas condiciones adversas es el aumento en la producción de ROS en varios de los compartimentos subcelulares de la célula vegetal (Mittler, 2002; Van Breusegem *et al.*, 2001).

⁴ Se denominan las reacciones redox donde un elemento es al mismo tiempo oxidado y reducido. Un ejemplo es la descomposición del agua oxigenada, los productos de este proceso son el oxígeno molecular y el agua: $2H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2H_2O + O_2$.

⁵ Las reacciones Fenton o mecanismo Haber – Weiss, involucran la generación del radical hidroxilo, cuando el peróxido de hidrógeno reacciona con metales de transición, por ejemplo $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$

La producción de ROS durante el estrés resulta de la fotorespiración, de la cadena de electrones tanto del aparato fotosintético como de la mitocondria, por la actividad de las NADPH oxidasa, de la amino oxidasa y de las peroxidasas unidas a la pared celular. Cuando los niveles de ROS no son disminuidos o controlados, pueden ser extremadamente reactivos y oxidar moléculas biológicas, como por ejemplo el DNA, proteínas y lípidos (Van Breusegem *et al.*, 2001).

Por otro lado, los ROS durante el estrés pueden actuar también como segundos mensajeros involucrados en la vía de transducción de señales en respuesta al estrés (Mittler, 2002). Las células tienen niveles en estado estable de ROS, los cuales son usados por la planta para monitorear sus niveles intracelulares de estrés, regulando su concentración por la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (Mittler, 2002; Van Breusegem *et al.*, 2001).

La actividad coordinada de todas las enzimas que eliminan ROS es necesaria para controlar las vías de señalización que utilizan H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ y O_2^1 en plantas, como por ejemplo, el control y regulación de procesos contra los patógenos, la apertura estomática y la respuesta a diferentes tipos de estrés (i.e. hídrico), el crecimiento, el desarrollo y la señalización hormonal, además de evitar los daños provocados por estos radicales como la lipoperoxidación (Mittler y Poulos, 2005).

Evolutivamente los seres vivos han desarrollado numerosos mecanismos para protegerse del estrés oxidativo. Las plantas, al igual que los animales superiores, sintetizan además de enzimas, un complemento de defensas moleculares que incluyen agentes reductores hidrofílicos y vitaminas liposolubles. Estas representan una línea de defensa crítica, pues en su mayoría impiden que se inicien las reacciones en cadena de los ROS, al eliminar intermediarios de O_2 parcialmente reducidos como $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 (Vranová *et al.*, 2002).

Estas defensas antioxidantes constan de enzimas capaces de eliminar, neutralizar o detoxificar ROS, e incluyen: la Superóxido dismutasa (SOD), la Catalasa (CAT), la Ascorbato peroxidasa (APX,) y la Glutatión reductasa (GR). La SOD, CAT, APX y GR son parte del sistema antioxidante de la plantas y controlan los niveles de ROS. Una modificación en la actividad de estas enzimas puede producir un desbalance en ROS y por lo tanto, producir un daño a nivel de membrana, en proteínas, DNA o en los mecanismos de transducción de señales (Vranová *et al.*, 2002).

2.2.6.1. Catalasa (CAT, E. C. 1.11.1.6)

La CAT, es una hemoproteína tetramérica que convierte $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, protegiendo a las células contra el daño causado por la acumulación de H_2O_2 (Feierabend, 2005). La CAT ha sido asociada con la remoción de H_2O_2 en microcuerpos, y se encuentra en peroxisomas y glioxisomas (Dat *et al.*, 2000). La reacción catalítica de CAT sigue dos pasos: en el primero la enzima nativa es oxidada por una primera molécula de H_2O_2 , resultando en la formación de una forma intermediaria (componente I). En el segundo paso, una segunda molécula de H_2O_2 sirve como donador de dos electrones para reducir el componente I, generando ferri-CAT, y formando H_2O y O_2 (Feierabend, 2005). La afinidad de CAT por el H_2O_2 es baja ($K_m = 10 - 140 \text{ mM}$), en comparación con la enzima Ascorbato peroxidasa ($K_m = 200 - 400 \text{ }\mu\text{M}$), sugiriendo que CAT puede estar más relacionada en la remoción del exceso de H_2O_2 durante el estrés (Feierabend, 2005; Mittler, 2002).

2.2.6.2. Ascorbato peroxidasa (APX, E. C. 1.11.1.11)

En contraste con CAT, la APX, es una enzima que se encuentra en la mayoría de los organelos de la célula (cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas) y en el citosol. Tiene una alta preferencia por el ácido ascórbico (AsA) como un sustrato reducido y cataliza la siguiente reacción:



En el cloroplasto, APX se encuentra en al menos tres diferentes lugares: 1) APX tilacoidal que esta unida a la membrana de los tilacoides; 2) APX de estroma; y 3) APX de lumen. APX utiliza AsA como un donador específico para reducir H_2O_2 a H_2O , en esta reacción genera monodehidroascorbato (MDA), un oxidante univalente de AsA. MDA es espontáneamente desprotonizado a AsA y dehidroascorbato (DA), o también puede ser directamente reducido por AsA por la acción de la monodehidroascorbato reductasa (MDAr) dependiente de NAD(P)H. La MDAr utiliza glutation (GSH) para reducir DA y regenerar AsA. El GSH oxidado es entonces regenerado por la Glutation reductasa (GR), utilizando equivalentes reductores de NAD(P)H. De esta forma, APX en combinación con la efectividad del ciclo AsA-GSH previene la acumulación de niveles tóxicos de H_2O_2 (Dat *et al.*, 2000; Shigeoka *et al.*, 2002; Mittler y Poulos, 2005).

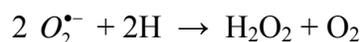
Existen otras dos enzimas de APX localizadas en el estroma que son gradualmente activadas en los cloroplastos y mitocondrias, estas enzimas son la MDAr y la Glutation reductasa (GR). Las enzimas del ciclo AsA-GSH están presentes en peroxisomas, glioxisomas y el apoplasto, además en los cloroplastos y mitocondrias, por lo que esta vía es clave para la remoción de H₂O₂ (Mittler y Poulos, 2005).

2.2.6.3. Glutación reductasa (GR, E. C. 1.6.4.2)

El glutatión reducido (GSH), es un producto del metabolismo del azufre y actúa como un transportador y almacenador de las formas reducidas del azufre (Foyer *et al.*, 2005). También es el sustrato para la Glutation-S-Transferasa (GST) que cataliza numerosas reacciones de conjugación para remover xenobióticos, y cataliza la conjugación de glutatión a antocianinas y otros metabolitos secundarios, los cuales son transportados a la vacuola (Foyer *et al.*, 2005). GSH es conocido como un antioxidante que reacciona químicamente con ROS, además protege a las proteínas contra la desnaturalización que es causada por la oxidación de los grupos tiol de éstas durante el estrés oxidativo. Todas estas funciones involucran la oxidación del grupo tiol, para formar disulfuro de glutatión (GSSG). La relación que mantienen GSSG/GSH, es esencial para la protección y detoxificación en condiciones de estrés oxidativo, e incluso la alteración de esta relación puede actuar como una señal disparadora de respuestas celulares específicas. Esta relación está regulada por la actividad de la enzima GR, una flavoproteína homodimérica que usa NADPH para reducir GSSG a dos GSH (Foyer *et al.*, 2005).

2.2.6.4. Superóxido dismutasa (SOD, E. C. 1.11.1.11)

En la célula la SOD constituye la primera línea de defensa contra los ROS. Su mecanismo de reacción emplea la reducción-oxidación alternada del metal asociado a su sitio activo (Scandalios, 1993). SOD cataliza la dismutación de O₂^{•-} para producir H₂O₂ y H₂O.



El O₂^{•-} es producido en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y del cloroplasto, pero la reducción del O₂ puede ocurrir en otras localizaciones subcelulares tales como los glioxisomas, los peroxisomas, el apoplasto y en el citosol. Se conocen 3 tipos de isoenzimas, las cuales son

metaloproteínas multiméricas altamente eficientes en la detoxificación del $O_2^{\bullet-}$. Dependen del metal asociado a su sitio activo, y se dividen en: 1) de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD) localizada en el citosol de eucariontes y en cloroplastos; 2) de manganeso (Mn-SOD) y 3) de hierro (Fe-SOD), las cuales se encuentran en la matriz mitocondrial de organismos procariontes y algunas plantas. Las tres isoenzimas pueden diferenciarse por su sensibilidad a ser inhibidas por cianuro (CN) y H_2O_2 (Scandalios, 1993).

Estructuralmente, se sabe que las Cu/Zn-SOD y la mayoría de las Mn-SOD y Fe-SOD de procariontes son dímeros, mientras que la Mn-SOD mitocondriales son tetraméricas. La acción combinada de SOD y CAT evita la formación de radicales OH^{\bullet} , y aunque no se conocen detoxificadores directos de 1O_2 y OH^{\bullet} , se piensa que SOD lo hace reaccionando químicamente con ellos (Scandalios, 1993).

Aunque la lipoperoxidación probablemente no es el primer mecanismo de toxicidad del Al, la generación de ROS puede estar relacionado con los primeros mecanismos de toxicidad de este metal (Kochian *et al.*, 2004). Por ejemplo, Boscolo *et al.* (2003) en un estudio de la relación entre la toxicidad de 36 μM Al y el estrés oxidativo en dos variedades de maíz, encontraron que la variedad de maíz sensible al Al presentó un aumento en las actividades de las enzimas SOD y peroxidasa (PX), las cuales se correlacionaron con el incremento en la producción de H_2O_2 , y que este incremento bloqueó las funciones celulares (tales como los mecanismos de reparación del ADN), lo que puede explicar la fragmentación de la cromatina detectada en las raíces de la variedad sensible de maíz expuestas al Al.

Yamamoto *et al.* (2002) en un estudio sobre los efectos del Al en la mitocondria encontraron que el Al aumenta la producción de ROS en células de tabaco tratadas con 100 μM Al, éstos provocan la inhibición de la respiración y la producción de ATP, inhibiendo la elongación de la raíz. Ezaki *et al.* (2000) sugiere que el aumento en la actividad de la peroxidasa podría actuar como un mecanismo de tolerancia para la remoción de ROS y de esa manera evitar la peroxidación de los lípidos de la membrana. También, se ha observado que la actividad de SOD se incrementa conforme aumenta la concentración de $O_2^{\bullet-}$, especialmente en los sitios donde el crecimiento de la raíz es inhibido y la membrana plasmática se ha degradado (Šimonovičova *et al.*, 2004).

2.2.5. Lipoperoxidación

Los ácidos grasos insaturados que forman los lípidos de la membrana son altamente susceptibles a la degradación peroxidativa, lo cual resulta en la generación de productos potencialmente tóxicos. La lipoperoxidación de un ácido graso insaturado (RH) se inicia con la eliminación de un átomo de hidrógeno (H^+) a un metileno ($-CH_2-$) adyacente a una insaturación, dando origen a un radical libre orgánico ($R\bullet$). Este $R\bullet$ reacciona con O_2 para formar un peroxirradical ($ROO\bullet$) tras un rearrreglo de la cadena, y cuando éste reacciona con un RH vecino se forma un hidroperóxido ($ROOH$), el cual es inestable y se degrada para formar nuevos radicales libres. Un aspecto importante de las reacciones de autooxidación es que son autocatalíticas – es decir que su velocidad aumenta conforme la reacción continúa – y autoperpetuantes – o en cadena (Reiter, 1995). Los productos de la lipoperoxidación tienen diversos efectos en las células, desnaturalizan el DNA e impiden la síntesis de proteínas; pueden provocar oxidación de aminoácidos, entrecruzamientos entre proteínas, inhibición de diversos eventos metabólicos, inactivación de enzimas, etc (Priestley, 1986).

Se ha reportado que la exposición de la raíz al Al también induce la producción de ROS, provocando la lipoperoxidación de la membrana plasmática. Por ejemplo, Yamamoto *et al.* (2001), en un trabajo sobre los efectos del Al en la membrana plasmática de células de la raíz de chícharo (*Pisum sativum*), a través de la utilización de un colorante no permeable (Evans blue), encontraron que la lipoperoxidación de los lípidos es uno de los primeros eventos de la exposición al Al y que al parecer también influye en la producción de calosa, pero la inhibición de la elongación de la raíz no es inducida de manera directa por el Al, sino que se debe a que las células de la raíz se elongan de manera asimétrica provocando la ruptura del tejido de la raíz.

2.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA AL ALUMINIO

Existen dos principales mecanismos de tolerancia al Al: 1) los que excluyen el Al del ápice de la raíz, y 2) los que le permiten a la planta tolerar la acumulación de Al en el simplasto o apoplasto de la raíz y las hojas (Kochian *et al.*, 2004). Sin embargo, todavía no está claro si pueden existir otros mecanismos de tolerancia al Al en diferentes especies de plantas. Pese a esto, es posible hacer una distinción entre los mecanismos externos e internos que presentan las plantas en respuesta al estrés por Al.

2.3.1. MECANISMOS EXTRÍNSECOS

2.3.1.1. Exudación de ácidos orgánicos

La exclusión del Al de la pared celular y del simplasto de raíz esta relacionada con la continua liberación de ligandos que se unen al Al y que forman complejos en la rizosfera previniendo la entrada de este metal a la raíz (Kochian *et al.*, 2004). Ma (2000) y Ma *et al.* (2001) mencionan que los ácidos orgánicos con capacidad de quelatar Al en la punta de la raíz juegan un papel importante en la detoxificación del Al. Otros estudios han demostrado que las formas quelatadas de Al son menos tóxicas para el crecimiento de la plantas de lo que son la formas iónicas.

Delhaize *et al.* (1993), observaron una correlación positiva entre el Al y la liberación de malato, la resistencia al Al y su exclusión del ápice de la raíz de trigo, sugiriendo que la liberación de malato protege el ápice de la raíz al quelatar el Al^{3+} . Diversos trabajos han demostrado que la tolerancia al Al está relacionada con la exudación de ácidos orgánicos en el ápice de la raíz, tales como citrato como en *Cassia tora* y soya (*Glycine max*) (Ma *et al.*, 1997a; Yang *et al.*, 2000) y oxalato en *Fagopyrum esculentum* (Ma *et al.*, 1997; Kochian *et al.*, 2004; Ma, 2000).

4.3.1.2. Incremento del pH en la rizosfera

El incremento de pH en la rizosfera provee de dos importantes ventajas: 1) reduce la concentración del Al^{3+} y 2) ocasiona un cambio en las especies de Al presentes en el suelo, hacia formas menos tóxicas (Jansen *et al.*, 2002a; Kochian *et al.*, 2004). La primera evidencia de este mecanismo se demostró en el mutante *alr-104* de *Arabidopsis* resistente al Al. En éste mutante la tolerancia al Al fue correlacionada con un influjo de H^+ del ápice de la raíz, el cual resultó en un incremento en el pH del medio circundante al ápice de la raíz, provocando una disminución significativa de la actividad de Al^{3+} , y permitiendo el crecimiento de la raíz de esta mutante (Denenhardt *et al.*, 1998).

2.3.1.3. Exudación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos han recibido atención en relación con la tolerancia al Al ya que la presencia de compuestos fenólicos permite la formación de complejos con metales, actuando como fuertes antioxidantes en respuesta al estrés abiótico. Los compuestos fenólicos contienen uno o más anillos

aromáticos hidroxilados y representan un amplio grupo de metabolitos secundarios en las plantas, incluyendo flavonoides, terpenoides y glicósidos (Kochian *et al.*, 2004).

Se ha reportado que forman fuertes complejos con el Al^{3+} en pH neutro y están implicados en la detoxificación interna del Al en *Camellia sinensis* y otras especies acumuladoras (Kochian *et al.*, 2004). Sin embargo, el papel de la exudación de fenoles desde la raíz como un mecanismo de exclusión del Al en la rizósfera aún no está claro. La razón de esto es que en condiciones ácidas el Al^{3+} y los H^+ compiten para unirse a los compuestos fenólicos, reduciendo su capacidad para unirse con los metales cuando se compara con los ácidos orgánicos. Otros autores sugieren que la exudación de fenoles inducida por el Al puede jugar un papel importante en la detoxificación de Al en la rizósfera alrededor del ápice de la raíz (Kochian *et al.*, 2004).

2.3.1.4. Mucilago

La desaparición del mucílago en la punta de la raíz del trigo es uno de los primeros síntomas visuales del efecto fitotóxico del Al. Por ejemplo, Puthota *et al.* (1991) en un estudio sobre el efecto del Al en la producción de mucílago en trigo, encontraron que la variedad sensible Victory, después de ser tratada con 20 μM Al durante 1, 2 y 4 h, presentó cambios en la acumulación de vesículas secretorias en el citoplasma, y una desaparición progresiva de dictiosomas⁶ y del retículo endoplasmático. Los autores concluyeron que la inhibición de la producción del mucílago inducida por el Al se debe a la inhibición del transporte y acumulación de las vesículas que contienen el mucílago, interfiriendo en el movimiento extracelular de los polisacáridos para la producción del mismo, y por lo tanto evitando la formación de una barrera límite, en la cual la difusión del Al hacia las células de la raíz es más lenta (Henderson y Ownby, 1991).

Otra hipótesis es que el fosfato exudado por la raíz, inmoviliza el Al como un precipitado Al-fosfato en el apoplasto, sin embargo, en otros estudios han encontrado que la precipitación del Al con complejos de fosfato probablemente refleja también el daño celular por el Al y no solo el mecanismo de resistencia *per se* (Jansen *et al.*, 2002a).

⁶ Los dictiosomas son conjuntos de cisternas aplanadas y curvas, presentan conexiones tubulares que permiten el flujo de sustancias entre ellas. Presentan dos caras, una convexa (la cara de formación) y una cóncava (cara de maduración) de la cual se desprenden las vesículas de secreción.

2.3.2. MECANISMOS INTRÍNSECOS

Los mecanismos internos de tolerancia al Al operan en el simplasto (Jansen *et al.*, 2002a). Algunos de los mecanismos de detoxificación del Al cuando entra al citoplasma son (Kochian, 1995):

- Formación de quelantes de Al por ácidos orgánicos, proteínas u otros ligandos orgánicos. El complejo Al-citrato formado en *Hydrangea* no es fitotóxico, Ma *et al.* (1998) también encontró que el ácido oxálico detoxifica el Al en *Fagopyrum esculentum*.
- Compartimentalización del Al en la vacuola.
- Aumento de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (Šimonovičova *et al.*, 2004) y de enzimas que participan en la síntesis de ácidos orgánicos como la enzima citrato sintasa (Yang *et al.*, 2004).

2.3.2.1. Transporte de complejos Al-Ácido Orgánico a través de canales

En el citoplasma de las células de la raíz con un pH cercano a 7.0, los ácidos orgánicos están completamente disociados y existen como aniones de ácidos orgánicos. Por lo tanto, es probable que el mecanismo de transporte puede estar regulado por la activación de la exudación de ácidos orgánicos mediada por el Al, a través de un canal aniónico que se abre cuando está expuesto al Al, permitiendo el flujo del ácido orgánico hacia el citoplasma (Kochian *et al.*, 2004). Los canales de aniones que son activados por Al^{3+} extracelular fueron recientemente identificados usando la técnica de patch clamp con protoplastos aislados de las punta de la raíz de variedades tolerantes de trigo y maíz (Zhang *et al.*, 2001; Piñeros y Kochian, 2001; Piñeros *et al.*, 2002).

Ryan *et al.* (2001) proponen tres posibles escenarios para la activación por Al del canal aniónico de membrana plasmática involucrado en la exudación de ácidos orgánicos: 1) El ion Al^{3+} puede unirse directamente al canal y activarlo; 2) El Al^{3+} podría unirse a un receptor de membrana, el cual puede activar el canal; o 3) El Al^{3+} podría activar el canal indirectamente a través de una cascada de señalización que podría involucrar componentes citosólicos.

En un estudio con una variedad de maíz tolerante al Al, la cual exuda citrato en respuesta a la presencia de Al en el medio, se observó la activación de un canal de aniones en la membrana plasmática (Piñeros y Kochian, 2001). En un segundo estudio también en maíz se reportó que el canal de aniones activado

por el Al es permeable al malato y citrato (Kollmeier *et al.*, 2001). Ambos estudios concluyen que la activación de canales por el Al está restringida a las células localizadas en el ápice de la raíz (Ma *et al.*, 2001). Estos estudios sugieren que la señal inducida por el Al para la activación de la exudación de los ácidos orgánicos, es un componente importante para disparar los mecanismos de tolerancia a este metal (Kochian *et al.*, 2004).

2.3.2.2. Unión o fijación del Aluminio en la pared celular

Se ha sugerido que la pared celular de las raíces es el principal sitio de acumulación de Al, y que posiblemente ahí es donde se lleva a cabo la inmovilización y unión del Al^{3+} , limitando el movimiento del Al en el simplasto, encontrándose principalmente en la epidermis y la corteza externa de las células de la raíz (Jansen *et al.*, 2002a; Kochian *et al.*, 2004). El Al también se ha localizado en las células epidérmicas de hojas de hiperacumuladoras como *Melastoma malabathricum* (Wanatabe *et al.*, 1998) y también, se ha encontrado en el xilema y floema de las hojas (Wanatabe *et al.*, 1998).

2.3.2.3. Permeabilidad selectiva de la membrana plasmática

Se ha sugerido a la membrana plasmática como el primer sitio de toxicidad del Al (Jansen *et al.*, 2000a) y también que la principal diferencia entre los incluyentes de Al y los excluyentes es la permeabilidad de las células de la endodermis a la presencia de Al^{3+} (Jansen *et al.*, 2002a). Las células de la epidermis de la raíz y de la hojas de las plantas no acumuladoras limitan el movimiento del Al, mientras que en las plantas acumuladoras de Al, tanto en las células de la epidermis de las hojas como de las raíces está presente el Al (Watanabe *et al.*, 1998).

2.4 PLANTAS ACUMULADORAS DE AL

El principal síntoma de la toxicidad de Al es la rápida inhibición del crecimiento de la raíz, la cual resulta en la disminución del sistema radicular, induciendo una deficiencia en la absorción de nutrientes (*i. e.*, Ca y Mg) y un estrés hídrico. La mayoría de las plantas nativas de suelos ácidos no son sensibles a la toxicidad del Al, ya que presentan una gran variedad de mecanismos de resistencia (ver Cap., 2.3). Las plantas no acumuladoras de Al presentan mecanismos para excluir altos niveles de Al, y llegan a presentar un promedio de 0.2 gAl/kg de peso seco (Ma *et al.*, 1997). Mientras que las plantas que

presentan más de 1 g Al/kg en su tejido seco son consideradas como especies acumuladoras de Al, además, esta concentración no sólo se limita a las hojas sino que también puede encontrarse Al en las raíces, en la madera y los frutos (Matsumoto *et al.*, 1976; Haridasan, 1987).

Dependiendo de la cantidad de Al que se acumule en su tejido, las especies de plantas pueden ser clasificadas de la siguiente manera: 1) **Hiperacumuladoras** o **Acumuladoras Obligadas** que muestran concentraciones mayores a 1 g Al/kg en el tejido, independientemente de la solubilidad del Al en el suelo y de los cambios estacionales; 2) **Excluyentes** que tienden a mantener bajos niveles en las hojas, independientemente de las concentraciones externas; y 3) **Indicadoras** ó **Acumuladoras Facultativas**, los niveles de Al en el tejido de la especie indicadora generalmente reflejan los niveles del metal en el suelo, los cuales pueden fluctuar dependiendo de las variaciones estacionales (Chenery, 1949; de Medeiros y Haridasan, 1985; Jansen *et al.*, 2004).

La acumulación del Al es un carácter primitivo, y está asociado principalmente con formas de vida arbustiva. Según Muller (1970, citado por Chenery y Sporne, 1976) este carácter se pudo originar en el Oligoceno, ya que en esta época hay registro de una gran proporción de especies acumuladoras de Al. Chenery en 1948, determinó la concentración de Al de cientos de especies de plantas, y además las clasificó en plantas acumuladoras y no acumuladoras de Al, con los siguientes resultados: de 2,859 especies de dicotiledóneas, 1,779 son acumuladoras; de 269 monocotiledóneas y gimnospermas solo 33 acumulan Al, y finalmente de 1,401 especies de criptógamas 615 son acumuladoras de Al.

Actualmente, las especies de plantas acumuladoras de Al se encuentran distribuidas en aproximadamente 55 familias de angiospermas, que en su mayoría pertenecen a las Eudicotiledóneas⁷, de las cuales, cerca del 93% de todas las acumuladoras se encuentran en los clados⁸ Asteroidas y Rosidas. En estos grupos, la mayoría de las plantas acumuladoras conocidas se restringen a los Órdenes Myrtales (42.5%) y Gentianales (35%) (Jansen *et al.*, 2002a; Jansen *et al.*, 2002b; Jansen *et al.*, 2004) (Tabla MT1).

⁷ Es un término utilizado para hacer referencia a un grupo monofilético de angiospermas que previamente habían sido llamadas "tricolpadas". El término proviene del griego y significa "dicotiledóneas verdaderas" debido a que contiene a la mayoría de las plantas que habían sido llamadas anteriormente dicotiledóneas, y tienen caracteres de dicotiledóneas típicas.

⁸ Se llama **Clado** a cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas.

Tabla MT1. Lista de familias de plantas acumuladoras de Al en las angiospermas, resumida a partir de Jansen *et al.*, 2002a; las familias en negritas incluyen a las especies que acumulan gran cantidad y/o son hiperacumuladoras de Al (Jansen *et al.*, 2004).

	Orden	Familia
Angiospermas basales		Amborellaceae, Illiciaceae, Trimeniaceae, Winteraceae
	Laurales	Lauraceae, Monimiaceae, Siparunaceae
Monocotiledóneas	Asparagales	Orchidaceae
	Liliales	Liliaceae
Commelinoideas		Rapateaceae
	Poales	Poaceae
Eudicotas basales	Proteales	Proteaceae (Grenvilleoideae, Placospermum C.T.White y W.D. Francis)
	Ranunculales	Lardizabalaceae
Centro de Eudicotas basales	Santalales	Olacaceae
	Saxifragales	Daphniphyllaceae, Gossulariaceae, Saxifragaceae
Eurrosidas I	Cucurbitales	Anisophylleaceae
	Fabales	Polygalaceae (Moutabeae, Xanthophylleae)
	Fagales	Fagaceae, Juglandaceae
	Malpighiales	Euphorbiaceae (Aporuseae, Phyllantheae subtribu Uapaceae) , Flacourtiaceae (Soyauxia Oliv.), Goupiaceae, Lacistemataceae, Violaceae
	Oxalidales	Cunoniaceae
Eurrosidas II	Myrtales	Combretaceae, Crypteroniaceae, Melastomataceae, Memecylaceae , Myrtaceae, Rhunchoalycaceae, Vochysiaceae
Asteridas Basales	Cornales	Cornaceae, Hydrangeaceae
	Ericales	Diapensiaceae , Ebenaceae, Lecythidaceae, Myrsinaceae, Symplocaceae, Ternstroemiaceae , Theaceae
Euasteridas I	Gentianales	Apocynaceae, Gentianaceae, Strychnaceae, Rubiaceae (Rubioideae)
	Labiales	Lentibulariaceae
Euasteridas II		Icacinaceae, Polyosmaceae
	Aquifolales	Phyllonomaceae
Posición incierta		Cardiopteridaceae (incluye <i>Gonocaryum</i> , Miq., <i>Leptaulus</i> Benth.), Geissolomataceae, Pentaphragmaceae, Peridiscaceae

Ejemplos de familias que incluyen muchas especies acumuladoras de Al son Hydrangeaceae (*Hydrangea macrophylla*, el color de sus pétalos que va de rosa a azul depende de la concentración de Al en el suelo [Chenery, 1946]), Melastomataceae (*Miconia albicans* [Haridasan, 1987]), Rubiaceae, Theaceae (*Camellia sinensis* [Matsumoto, 1976]), Symplocaceae y Vochysiaceae. Las plantas acumuladoras de Al son principalmente arbustos perennes de los trópicos, sin embargo, en monocotiledóneas 6 géneros de la familia Rapateaceae son acumuladoras de Al, los cuales incluyen al género *Aletris* (Liliaceae) y unos pocos pastos (Poaceae).

Otro ejemplo de monocotiledóneas es el género *Coccocypselum* de la familia Rubiaceae, el cuál es una pequeño género neotropical de herbáceas con moras de color azul metálico, que también puede acumular grandes cantidades de Al en sus hojas (Jansen *et al.*, 2000). En gimnospermas hay pocos reportes en algas, helechos y licopodios (Chenery, 1949). Chenery (1949), menciona que la escasez de especies acumuladoras de Al en las monocotiledóneas puede estar relacionada con la forma de vida herbácea.

Otro aspecto que puede afectar la concentración de Al entre las plantas arbustivas o herbáceas, puede ser la diferencia del ciclo de vida de los órganos de la planta o de la tasa de crecimiento entre estas dos formas de vida. Algunos autores consideran que el carácter de acumulación de Al puede ser utilizado para diferenciar especies, géneros y familias, aunque otros autores consideran que este carácter no provee de una sistemática significativa que permita realizar de manera confiable la clasificación, por lo que se necesita realizar más investigaciones sobre los aspectos ecológicos y fisiológicos de las especies acumuladoras de Al y su significado filogenético (Jansen *et al.*, 2004).

Los niveles de Al en las hojas de las plantas que acumulan este metal dependen de ciertos factores ecológicos, como i. e., el grado de acidez del suelo (Figura MT2, Capítulo 2.1.2). El pH del suelo es el factor ecológico más importante que determina la absorción del Al ya que su solubilidad y disponibilidad incrementa cuando el pH disminuye y viceversa. La mayoría de las especies acumuladoras de Al viven en suelos ácidos y con altas tasas de lixiviación, los cuales se encuentran principalmente en los trópicos, los bosques lluviosos y las sabanas (Jansen *et al.*, 2004).

Las plantas acumuladoras de Al no muestran síntomas de toxicidad en suelos ácidos, en cambio, existe evidencia de que el Al estimula el crecimiento de varias especies acumuladoras, i. e., en *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae) (Matsumoto *et al.*, 1976), *Miconia albicans* (Sw) Triana

(Melastomataceae) (Haridasan, 1988) y *Melastoma malabathricum* L. (Melastomataceae) (Osaki *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997, 1998; Watanabe y Osaki, 2001). Watanabe *et al.*, 2004, en un estudio sobre los efectos benéficos del Al y del citrato en el crecimiento de *M. malabathricum*, encontraron que cuando las plántulas de esta especie crecían en presencia de 0.5 mM de Al, el crecimiento de la raíz era mucho mayor que en ausencia de Al o con 0.2 mM Ca (Figura MT4).



Figura MT4. Fotografía de raíces de *M. malabathricum* tratadas con solución nutritiva (derecha), Solución nutritiva con 0.2 mM CaCl_2 (centro) y Solución nutritiva con 0.5 mM AlCl_3 (izquierda) (Watanabe *et al.*, 2004).

En un estudio en el que se evaluó el efecto de las interacciones Al – Fe y el crecimiento en *M. malabathricum*, se observó que esta especie es sensible a la toxicidad de Fe (el Fe en altas concentraciones induce un estrés oxidativo en la reacción $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$), y que el Al puede inducir la reducción de esta toxicidad, por lo que los autores concluyen que el Al es un elemento esencial para *M. malabathricum* cuando crece en suelo ácidos sulfurosos donde la disponibilidad del Fe es elevada (Watanabe *et al.*, 2006).

Además, las plantas acumuladoras de Al pueden sobrevivir a un rango más amplio de pH en el suelo en comparación con las plantas no acumuladoras, lo cual indica que la acumulación de Al es una estrategia que les brinda una ventaja adaptativa sobre otras plantas, ya que estas plantas no sólo crecen en suelos ácidos sino también en suelos con deficiencia de nutrientes (Haridasan, 1987; Jansen *et al.*, 2004). Incluso, es posible que las especies acumuladoras hayan desarrollado mecanismos más eficientes para utilizar bajas concentraciones de elementos esenciales, aunque la explicación de esta adaptación aun no es del todo clara (Watanabe y Osaki, 2002a).

2.4.1. Mecanismos de Acumulación

Las especies acumuladoras de Al deben de poseer mecanismos que les permitan desintoxicar internamente el Al^{3+} (Ma *et al.*, 2001). Los principales mecanismos que se han estudiado se clasifican en: 1) Formación de un complejo con el ion Al, y 2) Acumulación del Al en el tejido.

2.4.1.1. Formación de complejos quelantes con Al

En las plantas acumuladoras de Al, los ácidos orgánicos juegan un papel importante en la desintoxicación interna del Al y en el transporte de éste metal desde la raíz a las hojas (Morita *et al.*, 2008). Por ejemplo, Ma *et al.* (1997b) en un estudio sobre los mecanismos internos de desintoxicación de Al en la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) demostraron, a través de espectrofotometría de resonancia magnética (^{27}Al -NMR), que en las hojas el Al se encuentra como un complejo Al:citrato, en una relación 1:1. Además, el color azul de los pétalos de *H. macrophylla*, es causado por la formación de un complejo entre una delfinidina-3-glucosidasa, el Al y el ácido 3-cafeoilquinico, en donde el Al estabiliza la interacción entre estos dos componentes orgánicos (Takeda *et al.*, 1985).

En otro estudio con *Fagopyrum esculentum* Moench. cv Jianxi (herbacea acumuladora de Al, < 1500 mgAl/kg), encontraron que el principal complejo que se forma es Al:oxalato, en una relación 1:3 (Ma *et al.*, 1998). En *M. malabathricum*, el Al se ha encontrado como ion libre, además de complejos con oxalato en una relación de 1:1, 1:2 y 1:3 (Watanabe *et al.*, 1998). Excepto por el complejo de oxalato:Al en una relación 1:3, las demás formas son potencialmente tóxicas, por lo tanto en *M. malabathricum*, es posible que el Al sea almacenado en las vacuolas (Ma *et al.*, 2001). Watanabe y Osaki (2001), en un trabajo sobre las forma de translocación del Al de la raíz a las hojas en plántulas de *M. malabathricum* tratadas con 0.2 mM de Al por 3 semanas, encontraron que en la savia del xilema el Al se encuentran formando un complejo Al:citrato (1:1). Además, encontraron que cuando esta especie crece en ausencia de Al, el principal ácido orgánico que se encuentra en la savia es el malato, y cuando crecen en presencia de Al el citrato es el principal ácido en la savia del xilema.

Al igual que *M. malabathricum*, *F. esculentum* también presenta altas concentraciones de Al:citrato en la savia del xilema, aunque la concentración de este ácido orgánico no se ve afectada por la ausencia o presencia del Al (Ma y Hiradate, 2000). Posiblemente la diferencia en el metabolismo de los ácidos orgánicos entre estas dos especies se deba a su capacidad de acumular Al en las hojas (Watanabe y

Osaki, 2002b). En otro trabajo sobre el papel de los ácidos orgánicos en la acumulación de Al y crecimiento de *M. malabathricum*, encontraron que cuando las plántulas eran tratadas con 0.2 mM de Al, el ácido orgánico más abundante en la savia del xilema era el citrato, pero, en las hojas, el oxalato presentó una concentración 4 veces mayor en comparación con el control. En este estudio los autores, tomando en cuenta estudios previos, proponen un modelo en el que resumen el papel de los ácidos orgánicos en *M. malabathricum* (Figura MT5) (Watanabe y Osaki, 2002a).

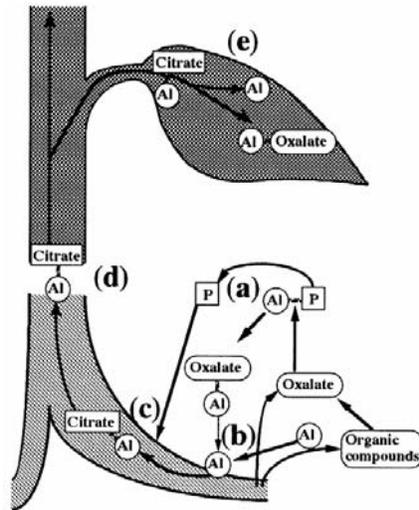


Figura MT5. Diagrama del papel de los ácidos orgánicos en el crecimiento de *M. malabathricum*. (a) El oxalato solubiliza el Al~P insoluble. (b) El complejo Al-oxalato es absorbido por los sitios de intercambio catiónico de la raíz (Watanabe *et al.*, 2001). Las raíces inducen la acidificación de la rizósfera, liberando al Al de los sitios de intercambio catiónico y de la precipitación del complejo Al-oxalato. El Al liberado es absorbido por la raíz. (c) El Al absorbido forma un complejo con el citrato y (d) es transportado a través del xilema hasta las hojas. (e) En las hojas, el Al intercambia el citrato por un oxalato o se disocia en su forma de Al³⁺ (Watanabe y Osaki, 2002a).

También, en un estudio en el cual evaluaron las características de la absorción y acumulación de Al en *M. malabathricum*, comparado con otro catión trivalente como el Lantano (Cloruro de Lantano, LaCl₃), encontraron que el apoplasto de la raíz de esta especie es más afín al Al³⁺ que al La³⁺, y además, cuando es tratada con Al la concentración de citrato aumenta en la región del simplasto de la raíz, en cambio con el La, la concentración de citrato no se ve afectada (Watanabe *et al.* 2005).

Por otra parte, el Al también puede formar complejos con ligandos inorgánicos. Por ejemplo, en un estudio sobre la relación entre la acumulación de Al y Silicio (Si) en hojas de *Faramea marginata* (Rubiaceae), otra planta hiperacumuladora de Al, el principal complejo que forma el Al en las hojas es Al – Si, posiblemente en forma de hidroxialuminosilicatos (HAS) o aluminosilicatos, ya que han

encontrado una relación positiva entre la concentración de Al y la de Si, e incluso la distribución de ambos elementos en el tejido es similar (Britez *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren, que el proceso de acumulación es diferente para cada especie acumuladora de Al, incluso en la respuesta del metabolismo de los ácidos orgánicos pueda ser modificado por la presencia del Al.

2.4.1.2. Acumulación del Al y localización celular

Las plantas acumuladoras de Al presentan mecanismos que les permiten aislar al Al de los sitios sensibles a su toxicidad (por ejemplo, el citoplasma). En diferentes trabajos, la acumulación intracelular del Al se lleva a cabo en células de la epidermis de las hojas de muchas especies acumuladoras de Al. Por ejemplo, en *M. malabathricum*, a través de cortes transversales de hojas teñidas con Pirocatecol violeta (PVC) al 0.02%, el Al fue localizado en las células de la epidermis adaxial y en las células del mesófilo de las hojas (Watanabe *et al.*, 1998). En las hojas de *C. sinensis*, utilizando un microanálisis de dispersión de rayos X, se encontró que el Al es acumulado principalmente en la pared celular exterior de la epidermis adaxial e abaxial, tanto en hojas jóvenes como en maduras. También se observó que había una gran proporción de Calcio (Ca) localizado en la pared celular de la epidermis superior e inferior, y además se podían ver grandes cristales en el mesófilo esponjoso. Los autores mencionan que *C. sinensis* debe de tener un mecanismo de absorción de Ca muy eficiente, el cual le permite absorber el Ca aun cuando esté expuesta a grandes concentraciones de Al^{3+} , ya que en otras especies de plantas la presencia del Al inhibiría la absorción de Ca (Carr *et al.*, 2003).

En *Richeria grandis*, a través de un microanálisis de dispersión de rayos X, el Al también se localizó en las vacuolas y los cloroplastos de las hojas (Cuenca *et al.*, 1991). Watanabe *et al.*, 1998, en un estudio sobre la distribución y especiación química del Al en *M. malabathricum*, encontraron altas concentraciones de Al^{3+} , lo que sugiere que el Al puede estar siendo distribuido a sitios ácidos en las células, como por ejemplo la vacuolas, y por eso es que presenta grandes concentraciones de la forma monoméricas de este metal.

Matsumoto *et al.*, 1976, reporta que las plantas de *C. sinensis* que crecen en condiciones naturales pueden acumular hasta 30 gAl/kg en hojas maduras, aunque solo 0.6 gAl/kg en hojas jóvenes, lo que sugiere que el proceso de acumulación de Al es lento y gradual. Asimismo, en plántulas de *M. malabathricum* tratadas con 0.5 mM de $AlCl_3$ durante 6 semanas, la concentración de Al entre hojas jóvenes y maduras fue de 7 y 10 g Al/kg respectivamente (Watanabe *et al.*, 1997). Sin embargo, en otro

estudio en esta misma especie, la diferencia entre la concentración de Al en hojas jóvenes y maduras fue muy pequeña, por lo que el proceso de acumulación puede variar dependiendo de las condiciones en las que se encuentren los individuos (Watanabe *et al.*, 2004).

En general, existe poca información a cerca del significado biológico y evolutivo de la acumulación del Al. Además, es difícil estimar el costo fisiológico de la desintoxicación del Al en las hojas, la cual implicaría comparar los mecanismos de exclusión, como la exudación de un ligando o la permeabilidad de las células endodérmicas al Al, con los mecanismos de acumulación.

2.5 FAMILIA MELASTOMATACEAE

Reino: Plantae

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Melastomataceae*



Figura MT6. Algunas especies de la Familia Melastomataceae: 1) *Arthrostemma fragile*; 2) *Clidemia* sp; 3) *Conostegia subhirtusa*; 4) *Conostegia xalapensis*.

La familia Melastomataceae (Figura MT6) incluye de 190 géneros y aproximadamente 5000 especies (Almeda, 1993a). Comprende árboles, arbustos, hierbas, lianas y epífitas distribuidas ampliamente alrededor de los trópicos de Asia y América. Las dos terceras partes de las especies están confinadas a la Región Neotropical (Peralta, 2002). Las plantas de esta familia son reconocidas por su venación

acrodromada de las hojas con uno o mas pares de venas primarias laterales fuertemente desarrolladas que corren en un arco convergente desde la base hasta el ápice de la hoja (Figura MT7a).



Figura MT7. Venación acrodromada de hojas jóvenes de *Conostegia xalapensis* (a) y flor de *Arthrostemma fragile* (b).

Las flores son bisexuales, simétricamente radiales, dipostemonas, y los estambres a menudo son alargados y pueden tener apéndices conectivos (Figura MT7b). Cerca de 2150 – 2360 especies en 38 géneros presentan bayas y 2000 – 2200 especies en 112 géneros cápsulas (Clausing y Renner, 2001), no existe ningún género común entre América y los demás continentes (Almeda, 1993a).

En México, se han reportado los siguientes géneros: *Aciotis*, *Acisanthera*, *Adelobotrys*, *Arthrostemma*, *Bellucia*, *Blankea*, *Calyptrella*, *Cambessedesia*, *Centradenia*, *Chaetolepis*, *Clidemia*, *Conostegia*, *Heterocentron*, *Heterotrychum*, *Leandra*, *Maieta*, *Miconia*, *Monochaetum*, *Mouriria*, *Pterolepis*, *Rhynchanthera*, *Schwackaea*, *Stanmarckia*, *Tibouchina*, *Topobea* y *Triolena* (Almeda, 1981, Almeda, 1989; Almeda, 1993a; Almeda, 1993b; Almeda, 1994; Almeda, 1997; Almeda, 2000; Ely y Torres, 2003; Gleason, 1932; Standley, 1924; Standley y Williams, 1963; Todzia, 1995). En el resto de América, se encuentran además los géneros: *Bertolonia*, *Henriettella*, *Lavoisiera*, *Loreya*, *Macrocentrum*, *Microlicia*, *Ossaea*, *Pilocosta*, *Rhexia*, *Tetrazygia* (Almeda, 1989; Almeda, 1997; Clausing y Renner, 2001; Gleason, 1932; y Standley y Williams. 1963).

Se han reportado en la Estación Biológica Tropical Los Tuxtlas, Veracruz: *Aciotis*, *Acisanthera*, *Adelobotrys*, *Arthrostemma*, *Bellucia*, *Centradenia*, *Clidemia*, *Conostegia*, *Heterocentron*, *Leandra*, *Miconia*, *Monochaetum*, *Mourir*, *Ossaea*, *Pterolepis*, *Rhynchanthera*, *Tibouchina*, *Tococa* y *Triolena* (Ibarra y Sínica, 1987). Ramos, *et al.* (1982), en una vegetación secundaria de la zona de Uxpanapa de aproximadamente 15 años de edad reportaron las siguientes especies: *Bellucia* sp., *Clidemia fulvuca*

Gleason, *Clidemia* sp., y *Miconia hyperprasina* Naudim. Las especies reportadas para el estado de Veracruz se muestran en la Tabla MT2.

Tabla MT2. Especies de la familia Melastomataceae de acuerdo al listado de la Flora de Veracruz (Ibarra y Sínica, 1987).

Género	Especie	Género	Especie	Género	Especie
<i>Aciotis</i>	<i>rostellata</i>	<i>Heterocentron</i>	<i>elegans</i>	<i>Miconia</i>	<i>moorei</i>
<i>Aciotis</i>	<i>viscida</i>	<i>Heterocentron</i>	<i>subtriplinervium</i>	<i>Miconia</i>	<i>oinochrophylla</i>
<i>Acisanthera</i>	<i>limnobios</i>	<i>Leandra</i>	<i>cornoides</i>	<i>Miconia</i>	<i>oligotricha</i>
<i>Acisanthera</i>	<i>quadrata</i>	<i>Leandra</i>	<i>longicoma</i>	<i>Miconia</i>	<i>pinetorum</i>
<i>Arthrostemma</i>	<i>alatum</i>	<i>Leandra</i>	<i>melanodesma</i>	<i>Miconia</i>	<i>prasina</i>
<i>Arthrostemma</i>	<i>ciliatum</i>	<i>Leandra</i>	<i>mexicana</i>	<i>Miconia</i>	<i>schlechtendalii</i>
<i>Arthrostemma</i>	<i>fragile</i>	<i>Leandra</i>	<i>subseriata</i>	<i>Miconia</i>	<i>serrulata</i>
<i>Bellucia</i>	<i>axinantha</i>	<i>Miconia</i>	<i>affinis</i>	<i>Miconia</i>	sp.
<i>Bellucia</i>	<i>costaricensis</i>	<i>Miconia</i>	<i>albicans</i>	<i>Miconia</i>	<i>stenostachya</i>
<i>Blakea</i>	<i>wilburiana</i>	<i>Miconia</i>	<i>ampla</i>	<i>Miconia</i>	<i>sylvatica</i>
<i>Centradenia</i>	<i>grandifolia</i>	<i>Miconia</i>	<i>anisotricha</i>	<i>Miconia</i>	<i>tomentosa</i>
<i>Centradenia</i>	<i>inaequilateralis</i>	<i>Miconia</i>	<i>argentea</i>	<i>Miconia</i>	<i>trinervia</i>
<i>Centradenia</i>	<i>salicifolia</i>	<i>Miconia</i>	<i>borealis</i>	<i>Monochaetum</i>	<i>calcaratum</i>
<i>Clidemia</i>	<i>capitellata</i>	<i>Miconia</i>	<i>bubalina</i>	<i>Monochaetum</i>	<i>deppeanum</i>
<i>Clidemia</i>	<i>dependens</i>	<i>Miconia</i>	<i>chrysonaura</i>	<i>Monochaetum</i>	<i>floribundum</i>
<i>Clidemia</i>	<i>deppeana</i>	<i>Miconia</i>	<i>ciliata</i>	<i>Monochaetum</i>	<i>pringlei</i>
<i>Clidemia</i>	<i>fulva</i>	<i>Miconia</i>	<i>dodecandra</i>	<i>Monochaetum</i>	<i>pulchrum</i>
<i>Clidemia</i>	<i>hirta</i>	<i>Miconia</i>	<i>echinoidea</i>	<i>Ossaea</i>	<i>micrantha</i>
<i>Clidemia</i>	<i>laxiflora</i>	<i>Miconia</i>	<i>elata</i>	<i>Pterolepis</i>	<i>trichotoma</i>
<i>Clidemia</i>	<i>octona</i>	<i>Miconia</i>	<i>fulvostellata</i>	<i>Rhynchanthera</i>	<i>grandiflora</i>
<i>Clidemia</i>	<i>petiolaris</i>	<i>Miconia</i>	<i>glagerrima</i>	<i>Rhynchanthera</i>	<i>mexicana</i>
<i>Clidemia</i>	<i>rubra</i>	<i>Miconia</i>	<i>globulifera</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>bourgaeana</i>
<i>Clidemia</i>	<i>sericea</i>	<i>Miconia</i>	<i>gracilis</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>galeottiana</i>
<i>Clidemia</i>	<i>serrulata</i>	<i>Miconia</i>	<i>hemenostigma</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>longifolia</i>
<i>Clidemia</i>	<i>setosa</i>	<i>Miconia</i>	<i>hyperprasina</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>mexicana</i>
<i>Clidemia</i>	sp.	<i>Miconia</i>	<i>holosericea</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>naudiniana</i>
<i>Conostegia</i>	<i>arborea</i>	<i>Miconia</i>	<i>hyperprasina</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>purpusii</i>
<i>Conostegia</i>	<i>brenesii</i>	<i>Miconia</i>	<i>ibaguensis</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>rufipilis</i>
<i>Conostegia</i>	<i>caelestis</i>	<i>Miconia</i>	<i>ibarrae</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>scrabiusscula</i>
<i>Conostegia</i>	<i>icosandra</i>	<i>Miconia</i>	<i>impetioilaris</i>	<i>Tibouchina</i>	<i>urvilleana</i>
<i>Conostegia</i>	sp.	<i>Miconia</i>	<i>insularis</i>	<i>Tococa</i>	<i>chuivensis</i>
<i>Conostegia</i>	<i>speciosa</i>	<i>Miconia</i>	<i>lacera</i>	<i>Tococa</i>	<i>guianensis</i>
<i>Conostegia</i>	<i>subhirsuta</i>	<i>Miconia</i>	<i>laevigata</i>	<i>Topobea</i>	<i>laevigata</i>
<i>Conostegia</i>	<i>superba</i>	<i>Miconia</i>	<i>lauriformis</i>	<i>Triolena</i>	<i>radicans</i>
<i>Conostegia</i>	<i>volcanalis</i>	<i>Miconia</i>	<i>matthaei</i>	<i>Triolena</i>	<i>scorpioides</i>
<i>Conostegia</i>	<i>xalapensis</i>	<i>Miconia</i>	<i>mexicana</i>		
<i>Heterocentron</i>	<i>axillare</i>	<i>Miconia</i>	<i>minutiflora</i>		

3. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

En un estudio anterior sobre la Radiación Adaptativa de la familia Melastomataceae en diferentes estados serales en el Municipio de Zozocolco de Hidalgo, Veracruz, se observó que *Conostegia xalapensis* fue una de las especies con mayor distribución en la vegetación secundaria (Acahual), el Potrero y la Milpa, incluso esta especie se encontró de manera muy abundante en sitios donde las otras especies de esta familia no eran representativas (González-Santana, 2006). Por otro lado, estudios previos sobre las plantas acumuladoras de Al han reportado al género *Conostegia* como planta acumuladora (Chenery, 1948; Jansen *et al.*, 2002b), y otros estudios reportan que el Al puede estimular el crecimiento de especies como *Melastoma malabathricum* L. (Melastomataceae) (Watanabe *et al.*, 1998; Watanabe y Osaki, 2001) y *Miconia albicans* (Sw) Triana (Melastomataceae) (Haridasan, 1988). Como estudio preliminar al presente trabajo y con base a la observación sobre la distribución de *C. xalapensis*, se determinó la concentración de Al total presente en las hojas adultas de *C. xalapensis* colectadas en un potrero del Municipio de Zozocolco de Hidalgo, Veracruz. Los resultados mostraron que *C. xalapensis* presentó $12,491 \pm 459$ mg Al/kg tejido seco. Para confirmar y complementar estos resultados se llevó a cabo un segundo muestreo, en el cual se determinó la concentración de Al total tanto en suelos de diferentes sitios como en hojas jóvenes de *C. xalapensis*. Las hojas tuvieron una concentración de 686 mg Al/kg tejido seco y las concentraciones del suelo fueron: en el potrero de 3,642 mg Al/kg de suelo; en la milpa de 2,143 mg Al/kg de suelo; y en el acahual de 2,078 mg Al/kg de suelo. Los resultados anteriores mostraron que en el Municipio de Zozocolco de Hidalgo, el sitio que presentó mayor concentración de Al total en el suelo fue el potrero, y que *C. xalapensis* presentó concentraciones altas de Al en su tejido tanto en hojas maduras como jóvenes, este hecho aunado a que el potrero fue el sitio con mayor concentración de Al total en el suelo, sugirió que esta especie podría ser “*una planta acumuladora de Al*” y, por lo tanto, presentar mecanismos de tolerancia intrínsecos que le ayudan a contrarrestar los efectos tóxicos de este metal. Con base en estos resultados y con los antecedentes mencionados se planteó la siguiente hipótesis:

***Conostegia xalapensis* presentará mecanismos intrínsecos de tolerancia al Al^{3+} , los cuales le permitirán contrarrestar los efectos tóxicos de este metal e incluso acumularlo en sus tejidos, lo que le permitirá crecer en suelos con altas concentraciones de Al^{3+} .**

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si *Conostegia xalapensis* crece en suelos con altas concentraciones de Al^{3+} , y evaluar el efecto de este metal sobre su crecimiento y sus mecanismos intrínsecos de tolerancia.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

EN PLANTAS EN CONDICIONES NATURALES

1. Determinar la concentración de Al intercambiable en muestras de suelo de potrero y vegetación secundaria (Acahual) y vegetación primaria.
2. Determinar la concentración de Al en hojas de *C. xalapensis* colectadas en campo.

EN PLÁNTULAS EN CONDICIONES DE LABORATORIO

3. Evaluar el efecto del Al en la tasa de crecimiento relativa (RGR) a través de un análisis clásico de crecimiento, en plántulas de *C. xalapensis*.
4. Localizar el Al en hojas y raíces de *C. xalapensis* utilizando cortes histológicos y pruebas histoquímicas.
5. Localizar y cuantificar el Al en hojas de plántulas de *C. xalapensis* con un Microscopio Electrónico de Barrido acoplado a un Espectrofotómetro de Dispersión de Rayos X (MEB-EDS).
6. Evaluar la respuesta del sistema antioxidante al Al^{3+} , midiendo las actividades de las enzimas Catalasa (CAT), Ascorbato Peroxidasa (APX), Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutatión Reductasa (GR).
7. Determinar los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el Radical Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL VEGETAL

Para este estudio se utilizaron hojas y semillas de individuos de *Conostegia xalapensis* (Bonpl) (Melastomataceae) colectados en dos tipos de hábitats (potrero y vegetación secundaria), y también se colectó suelo en el potrero, la vegetación secundaria y la vegetación primaria para la determinación de la concentración de Al^{3+} en el municipio de Zozocolco de Hidalgo, Veracruz, México, los días 29 y 30 de Abril del 2007.

El municipio de Zozocolco de Hidalgo se encuentra ubicado en la zona norte del Estado de Veracruz a una altitud de 2800 msnm. Limita al norte con los municipios de Espinal y Coxquihui, al este, sur y oeste con el Estado de Puebla. El municipio se encuentra situado en la zona central y occidental de Veracruz, sobre la Sierra Madre Oriental, hacia la región de Papantla, siendo su topografía bastante accidentada. Su superficie es regada por el río Tehuantepec y varios arroyos tributarios del río Tecolutla. Su clima es cálido-subhúmedo con una temperatura promedio anual de 22°C; su precipitación pluvial media anual es de 1600 mm (Oficina del Programa de Gobierno, 2002).

La vegetación del municipio está constituida por arbustos de tipo bosque subtropical perennifolio y se encuentran especies como laurel (*Litsea glucesens*), jonote (*Heliocarpus* sp), palo mulato (*Bursera simaruba*), cedro (*Cedrela odorata*), caoba (*Swietenia macrophylla*), chijol (*Piscidia piscipula*), y vegetación secundaria (Acahual) (Oficina del Programa de Gobierno, 2002).

Tiene una superficie total de 10,011 hectáreas, de las que se siembran 3050.3 hectáreas. Los principales productos agrícolas en el municipio que se cosechan son: maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y café (*Coffea canephora*). En el municipio existen 897 unidades de producción rural con actividad forestal, de las cuales 7 se dedican a productos maderables, además, tiene una superficie de 4670 hectáreas dedicadas a la ganadería (Oficina del Programa de Gobierno, 2002).

5.3 COLECTA DE SUELO Y HOJAS

La colecta de suelo y hojas se realizó en 2 Potreros (Potrero Anayal y Potrero Juntas), 2 Vegetaciones secundarias (Acahual Anayal y Acahual Arroyo) y una Vegetación primaria (Figura M1). Aunque no

se realizó un estudio sobre la abundancia de *C. xalapensis* en los diferentes sitios, si se observó que en ambos potreros, *C. xalapensis* fue la más abundante, incluso en el Potrero Anayal solo se encontraron individuos que pertenecen a esta especie. En cambio en la vegetación primaria no se encontró ningún individuo de esta especie.

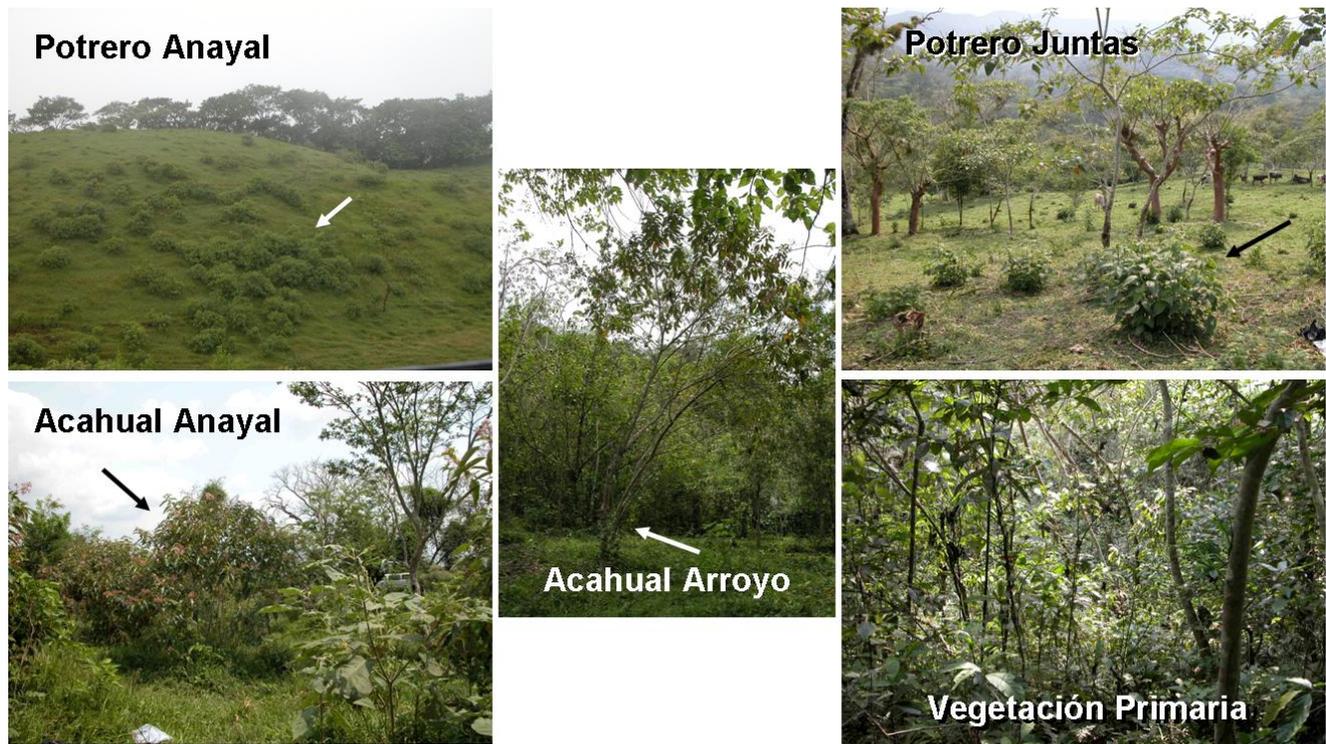


Figura M1. Fotografías de los sitios donde se realizaron las colectas de suelo y hojas de *C. xalapensis*. Las flechas señalan algunos individuos de *C. xalapensis* en cada sitio.

Para determinar la concentración de Al^{3+} y Ca^{2+} intercambiable en el suelo, se colectaron 3 muestras compuestas de suelo de 2 Potreros, 2 Acahuales y de una Vegetación primaria. Para las muestras compuestas se realizaron 3 cuadrantes de aproximadamente 20 m^2 en cada sitio. En cada cuadrante se colectaron 10 núcleos de 15 cm^3 de profundidad, con una separación de 4 m entre cada uno (Figura M2). Una vez colectados se mezclaron y de esta mezcla se tomó 1 kg, la cual correspondió a una muestra compuesta del sitio.

También, se colectaron 3 núcleos debajo de 3 individuos en cada sitio, esto con el fin de hacer una comparación entre las concentraciones obtenidas de la mezcla compuesta del sitio con el suelo circundante a la planta (Figura M2). Las muestras de suelo se almacenaron en bolsas de plástico. En el laboratorio las muestras se secaron a temperatura ambiente. Una vez seco el suelo, este se tamizó con una malla $< 2\text{ mm}$, y se almacenó en frascos de plástico hasta su posterior análisis en el laboratorio.

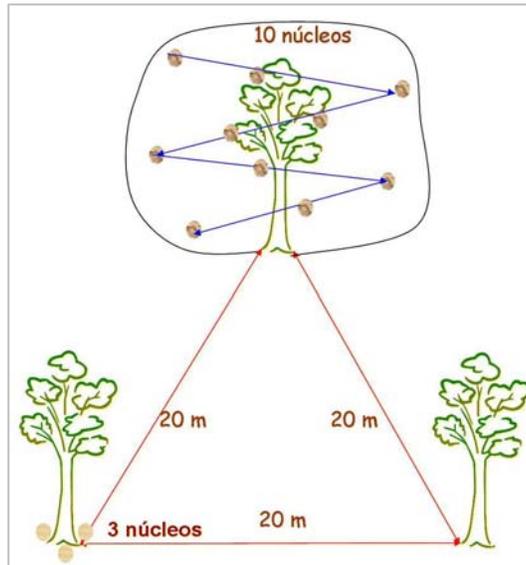


Figura M2. Esquema de la colecta de suelo en campo. Se colectaron 10 núcleos alrededor del individuo con una separación de 4 m entre cada núcleo, y 3 núcleos debajo del individuo. Cada núcleo tuvo una profundidad de 15 cm.

También, se colectaron hojas jóvenes y maduras de un individuo en cada sitio de colecta, esto con el fin de evaluar si la concentración de Al en el tejido cambia con el estado de desarrollo de las hojas (Figura M3). Las hojas colectadas en campo fueron lavadas en el momento con HNO_3 al 1% y enjuagadas con agua destilada para quitar cualquier elemento que pueda alterar la posterior cuantificación del Al en el tejido, el exceso de agua se eliminó con papel, y posteriormente se prensaron. En el laboratorio, las hojas prensadas se secaron a 60°C por 3 días, y después de ese tiempo se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

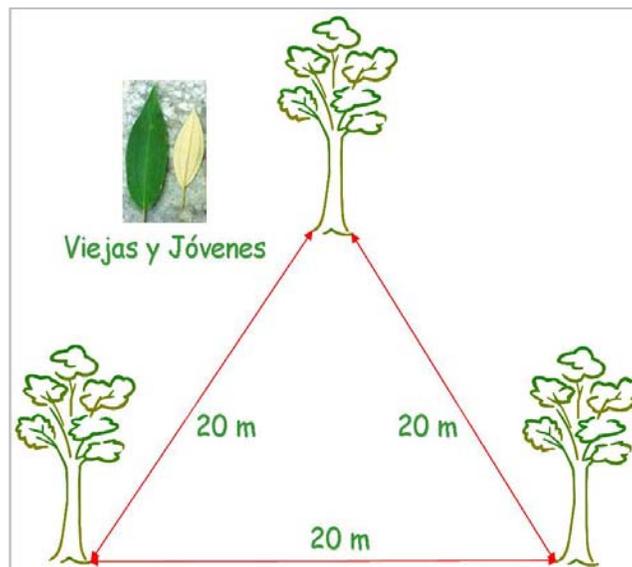


Figura M3. Esquema de la metodología utilizada para la colecta de hojas en campo.

5.4 ANÁLISIS DE SUELO Y DE HOJAS DE *CONOSTEGIA XALAPENSIS* COLECTADAS EN CAMPO

5.4.1 Determinación de pH, conductividad eléctrica, textura y color del suelo

Para la determinación de pH se pesaron 5 gr del suelo seco y tamizado de cada sitio por triplicado, se agregaron 50 ml de H₂O bidestilada en un tubo de centrifuga de plástico de 50 ml, que posteriormente se agitó por 30 min con un Agitador (Incubator Shaker Series 25, New Brunswick scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) a una velocidad de 300 rpm. Después se dejó reposar por 30 min para permitir que las partículas de suelo se sedimentaran, y en el sobrenadante se registró el pH con un potenciómetro 210 HANNA, Rumania.

La conductividad eléctrica de un medio, se define como la capacidad que tienen el medio para conducir la corriente eléctrica, por ejemplo, el agua pura, prácticamente no conduce la corriente, sin embargo el agua con sales disueltas sí. Los iones cargados positiva y negativamente son los que conducen la corriente y la cantidad conducida dependerá del número de iones presentes y de su movilidad. Entre más alto sea el valor de la conductividad, mayor será la concentración de iones intercambiables, y viceversa, sus unidades están dadas en Siemens/m (Sm^{-1}) (Aguilera, 1989). Para determinar la conductividad eléctrica se pesaron 5 g de suelo tamizado de cada sitio, y cada sitio se realizó por triplicado, a cada muestra se le añadieron 25 ml H₂O y se agitaron en un Agitador (Incubator Shaker Series 25 New Brunswick scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) a una velocidad de 300 rpm. Después se le agregó 1% de Hexametáfosfato (NaPO_3)₆ para prevenir la precipitación de CaCO₃, mientras se deja reposar la muestra por 30min. Las mediciones se realizaron con un conductímetro Corning Conductivity meter 441 en el Laboratorio de Análisis Físicos y Químicos del Ambiente en el Instituto de Geografía de la UNAM con la supervisión de la M en C María del Pilar Fernández Lomelín.

La textura se refiere a la proporción de las partículas de arena, limo y arcilla en el suelo. La determinación de la textura permite determinar la superficie en donde se llevan a cabo las reacciones físicas y químicas de suelo, por ejemplo, un suelo con 25% de arcilla será mucho más plástico que un suelo que contenga arriba del 70%, este tipo de suelo está compuesto principalmente de óxidos hidratados de Fe y Al, los cuales son muy impermeables y mal aireados, y aunque pueden retener gran cantidad de agua, no está disponible para las plantas (Aguilera, 1989). Para la determinación de la

textura de los suelos colectados se utilizó la técnica de Tacto, la cual consiste en la manipulación manual del suelo para determinar su textura (Aguilera, 1989).

El color del suelo es una de las características morfológicas más importantes y fácil de determinar permitiendo identificar distintas clases de suelos y también para la separación de horizontes, ya que tiene una estrecha relación con los principales componentes sólidos de este recurso. Además, el color del suelo ha sido asociado con su grado de evolución, su clasificación, el contenido de humus y presencia de ciertos minerales, y con su potencialidad y productividad, por ejemplo un suelo negro se asocia con altos niveles de materia orgánica. Para la determinación del color se utilizó el Sistema Munsell, en el cual se emplea la tabla de colores Munsell (Munsell Color Co., 1980). Estas tablas incluyen todos los matices del rango visible del espectro electromagnético, se utilizan para describir el color de rocas, suelos, plantas, entre otros. La tabla de Munsell describe todos los posibles colores en términos de tres coordenadas: matiz (Hue) que mide la composición cromática de la luz que alcanza el ojo; claridad (Value), el cual indica la luminosidad u oscuridad de un color con relación a una escala de gris neutro; y pureza (Chroma), que indica el grado de saturación del gris neutro por el color del espectro.

5.4.2 Determinación de Al^{3+} y Ca^{2+} intercambiable en el suelo

Para determinar la concentración de Al^{3+} y Ca^{2+} , se pesaron 5 g de suelo tamizado de cada sitio, y cada uno se realizó por triplicado, a cada muestra se le añadieron 25 ml 1M KCl y se agitaron en un Agitador (Incubator Shaker Series 25 New Brunswick scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, U.S.A.) a una velocidad de 300 rpm, durante 30 min y a 37°C. Después, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm (8000 g) por 10 min, y el sobrenadante se filtró con un equipo millipore y un filtro Whatman de 0.45 μ m. Posteriormente la solución se acidificó con HNO_3 hasta obtener un pH < 3.0 (Bertsch y Bloom, 1996), y finalmente se agregó 1 ml de trióxido de lantano (La_2O_3) a una concentración de 1% a cada muestra, esto para evitar la formación de óxidos o compuestos de alta estabilidad como el fosfato de calcio ($Ca(PO_4)_2$), que pudieran interferir con la posterior cuantificación de Ca^{2+} (Suárez *et al.*, 1996). La cuantificación se realizó por triplicado con un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA) (Varian SpectrAA-10 plus, Alemania), a 237.3 nm para el Al^{3+} y 422.7nm para el Ca^{2+} , ambos con un límite de detección de 0.05 mg/kg. Para la cuantificación de Ca^{2+} intercambiable se realizó una dilución 1:10 con H_2O bidestilada, con el fin de que los valores obtenidos estuvieran dentro de los límites de detección de la curva patrón. Estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio de

Análisis Físicos y Químicos del Ambiente en el Instituto de Geografía de la UNAM con la supervisión de la M en C María del Pilar Fernández Lomelín.

5.4.3 Determinación de la concentración de Al en hojas colectadas en campo

Las hojas secas se molieron con un mortero de Ágata hasta obtener un polvo fino. Luego 150 mg del tejido se colocaron en un vaso de teflón para la digestión, y se le añadieron los siguientes reactivos:

1. 2 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30%), dejando reposar al menos 30 min.
2. 1 ml agua bidestilada,
3. 6 ml de 70% ácido nítrico (HNO_3),
4. 2 ml de 38% ácido clorhídrico (HCl),
5. 3 ml 48% ácido fluorhídrico (HF).

Debido a que las hojas colectadas en campo de *C. xalapensis*, presentan una gran pubescencia, la mezcla se dejó reposar por 1 hr para permitir que los ácidos degradaran parte de esta pubescencia. Para la digestión se utilizó un horno de Microondas (CEM MARS X, USA). La Tabla M1 muestra las etapas de temperatura de la digestión, la cual se realizó en la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el apoyo del M en C Manuel Hernández Quiróz:

Tabla M1. Rampas de temperatura para la digestión de hojas de *C. xalapensis* colectadas en campo.

Etapa	Potencia Watts	Potencia %	Tiempo (min)	Presión (PSI)	Temperatura (°C)	Hold (min)
1	1200	100	5	300	120	0
2	1200	100	3	300	130	0
3	1200	100	2	300	150	0
4	1200	100	5	300	175	5
5	1200	100	3	300	175	3

5.5 BIOENSAYO CON PLANTULAS DE *C. XALAPENSIS*

Para el bioensayo se utilizaron las semillas colectadas en campo. Las semillas se extrajeron del fruto manualmente y se lavaron con una solución de hipoclorito al 1% durante 10 min, después se

enjuagaron con agua bidestilada por 10 min. Las semillas se sembraron en cajas de petri con papel filtro húmedo estéril y se colocaron en una cámara de crecimiento (Convicon G30, Canada) a 25°C con un fotoperíodo de 12 x 12 horas, y una humedad relativa de 60%. Cada semana se les agregó agua bidestilada para evitar que se deshidrataran. Una vez que emergieron las primeras hojas verdaderas fueron transplantadas a cajas de petri de plástico con sustrato esterilizado Metro-Mix 200 marca Scott. Aproximadamente 3 meses después se transplantaron a germinadoras con el mismo sustrato regándolas cada 2 días con agua bidestilada. Después de 8 meses de crecimiento se utilizaron 135 plántulas, las cuales fueron transplantadas a recipientes con 1 L de solución hidropónica a pH 4.4 y aireación continua, con la siguiente composición (Aniol, 1984):

Nombre del Compuesto	Fórmula	Concentración final
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	0.20 mM
Nitrato de Potasio	KNO ₃	0.65 mM
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂	0.25 mM
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄	0.01 mM
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.005 mM

Después de 2 semanas de aclimatación a la solución nutritiva, las plántulas se dividieron en tres poblaciones: 1) Control sin AlCl₃, 2) con 0.5 mM y, 3) con 1.0 mM AlCl₃, se utilizaron 45 plántulas para cada tratamiento, distribuidas en 6 réplicas, las cuales tenían de 5 o 7 individuos cada una (Figura M4).

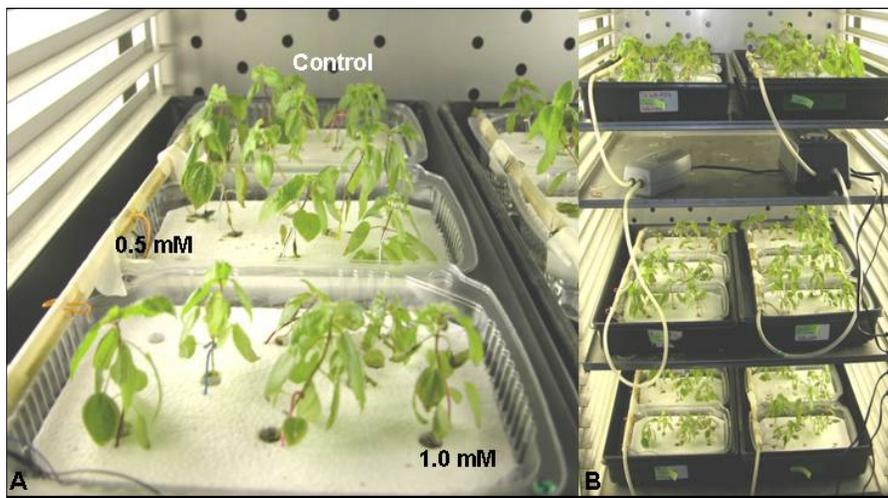


Figura M4. Plántulas de *C. xalapensis* de 8 meses de edad en solución hidropónica a pH 4.4. A) Charola con una réplica de cada tratamiento. B) Distribución de las charolas en la cámara de crecimiento. Los recipientes se colocaron de manera aleatoria.

5.6 CRECIMIENTO DE *C. XALAPENSIS*

Para evaluar el efecto del AI en el crecimiento de *C. xalapensis*, se registró cada 4 días, la longitud de la raíz principal y el número de raíces nuevas de 18 individuos de cada tratamiento y del control. También, se determinó la acumulación de biomasa y se realizó el análisis de crecimiento clásico, para lo cual se realizaron dos cosechas, la primera al inicio del experimento y la segunda después de 24 días. Se utilizaron 7 individuos de cada tratamiento, en donde se registró el peso fresco (Pf) de hojas, raíz y tallo, y el área foliar. Después, las hojas, las raíces y los tallos de cada individuo se colocaron en bolsas de papel cera por separado y se secaron a 65 °C por 3 días, para luego determinar el peso seco (Ps).

Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de biomasa acumulada y el análisis de crecimiento clásico de cada tratamiento. La biomasa se calculó por la diferencia de peso seco (mg), entre el tiempo inicial, t_1 , y el tiempo final, t_2 , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Biomasa} = \overline{dW}_2 - \overline{dW}_1$$

Donde:

\overline{dW}_1 y \overline{dW}_2 = son las medias del peso seco (*Wd* por su nombre en inglés)

Luego se realizó el análisis de crecimiento clásico (Causton y Venus, 1981) el cual requiere datos en la forma de pesos, áreas y volúmenes de los componentes de la planta para interpretar su forma y función. El análisis de crecimiento comprende los siguientes parámetros y componentes:

5.6.1 Tasa de crecimiento absoluta (AGR)

Es el índice más simple del crecimiento de las plantas, describe la tasa de cambio en talla por unidad de tiempo, la cual es generalmente aplicada en base al peso seco total y sus unidades son g día^{-1} .

$$\overline{AGR} = \frac{(\overline{dW}_2 - \overline{dW}_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Donde:

\overline{dW}_1 y \overline{dW}_2 = son la media del peso seco total de las plantas (g),

t_1 y t_2 = son la diferencia en el tiempo (d^{-1}).

5.6.2 Tasa de crecimiento relativa (RGR)

Es la tasa instantánea del incremento en biomasa seca por unidad de biomasa total de la planta, por unidad de tiempo. RGR es uno de los índices ecológicamente más significativos y útiles del crecimiento de una planta, y está definido por la siguiente ecuación:

$$RGR = \frac{dW}{dt} \frac{1}{W}$$

Donde:

dW = peso seco total de la planta (g)

t = tiempo

5.6.3 Tasa promedio de crecimiento relativo (\overline{RGR})

La tasa promedio de crecimiento relativo permite evaluar el crecimiento en un intervalo de tiempo, está dada por la siguiente ecuación ($\text{g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$):

$$\overline{RGR} = \frac{\ln d\overline{W}_2 - \ln d\overline{W}_1}{t_2 - t_1}$$

Donde:

$\ln d\overline{W}_1$ y $\ln d\overline{W}_2$ = Logaritmo natural del peso seco total de la planta (g)

t = intervalo de tiempo

5.6.4 Tasa de asimilación neta (NAR)

Es la ganancia neta en peso por unidad de área foliar (Hunt, 1982). Por lo cual, es una medida de la eficiencia de los órganos asimilatorios para producir nuevo crecimiento. Usualmente comprende el área de la lámina de las hojas más cualquier superficie fotosintética del tallo (Chiariello *et al.*, 1989).

La tasa instantánea de asimilación neta está definida por la siguiente ecuación ($\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$):

$$NAR = \frac{dW}{dt} \frac{1}{A}$$

Para evaluar la Tasa de asimilación en un intervalo de tiempo se utiliza la siguiente ecuación:

$$NAR = \frac{(\overline{dW_2} - \overline{dW_1})(\ln L_{A2} - \ln L_{A1})}{(L_{A2} - L_{A1})(t_2 - t_1)}$$

Donde:

$\overline{dW_1}$ y $\overline{dW_2}$ = medias de los pesos secos

L_{A2} y L_{A1} = áreas foliares,

$\ln L_{A2}$ y $\ln L_{A1}$ = logaritmo natural de las áreas foliares,

t_1 y t_2 = diferencia en el tiempo (d^{-1}).

5.6.5 Proporción de área foliar (LAR)

Se considera como un índice morfológico de la salud de las hojas, es una medida del balance de pago entre los ingresos y los egresos, ya que se refiere al potencial fotosintético y respiratorio de la planta (Hunt, 1990). Se define como la relación entre el área foliar total y el peso seco o biomasa total de la planta, y su valor promedio en el intervalo t_1 a t_2 , está dado por la siguiente ecuación ($m^2 g^{-1}$):

$$LAR = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{W_1}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{W_2}\right)}{2}$$

Donde:

W_1 y W_2 = son las medias de los pesos secos,

L_{A2} y L_{A1} = son las áreas foliares.

5.6.6 Área foliar específica (SLA)

Es una medida de la densidad o de la talla relativa de las hojas (grosor), debido a que está en función del área foliar y el peso seco de las mismas. El valor promedio en el intervalo t_1 y t_2 está dado por la siguiente ecuación ($m^2 g^{-1}$):

$$SLA = \frac{\left(\frac{L_{A1}}{L_{W1}}\right) + \left(\frac{L_{A2}}{L_{W2}}\right)}{2}$$

Donde:

L_{A1} y L_{A2} = son las áreas foliares,

L_{W1} y L_{W2} = son el peso seco de las hojas.

5.6.7 Fracción del peso de las hojas, peso del tallo y peso de la raíz (LWR, SWR y RWR)

Estas fracciones se pueden definir como la proporción del peso seco de cada parte entre el total del peso seco de la planta. Para una planta completa, la suma de todas estas fracciones nos da la unidad, y todas son adimensionales. El valor promedio para cada compartimiento de la planta en el intervalo de tiempo t_1 y t_2 es:

$$\begin{aligned}LWR &= ([L_{W1}/W_1] + [L_{W2}/W_2])/2 \\SWR &= ([S_{W1}/W_1] + [S_{W2}/W_2])/2 \\RWR &= ([R_{W1}/W_1] + [R_{W2}/W_2])/2\end{aligned}$$

Donde:

L_{W1} , L_{W2} , S_{W1} , S_{W2} , R_{W1} y R_{W2} , son las medias del peso seco de las hojas, el tallo y la raíz, W_1 y W_2 , son las medias de los pesos secos.

5.6.8 Cociente alométrico raíz/parte aérea (R/S)

Es un indicador de la asignación de recursos. Teóricamente, un balance en el crecimiento de ambas partes genera un valor igual a 1; en cambio, si se presenta un mayor crecimiento en la parte aérea entonces $R/S < 1$ y viceversa, un crecimiento mayor en la raíz tendrá un $R/S > 1$. Se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$R / S = \text{Peso seco Raíz} / (\text{Peso seco hojas} + \text{Peso seco tallo})$$

5.7 LOCALIZACIÓN DEL AL EN HOJAS Y RAÍCES

5.7.1 Tinción con Hematoxilina (HTX)

La Hematoxilina (HTX) es un colorante común en estudios citogenéticos, y se utiliza para identificar especies sensibles al Al^{3+} . Antes de que la HTX pueda actuar como colorante, está debe ser oxidada a hemateína y unida a un mordante. El ioduro de potasio (KIO_3) es usado como un agente oxidante y el Al en el tejido actúa como un mordante, formando una precipitación púrpura (Havas, 1986). La HTX no se une a los complejos Al-ácido orgánico o al catión solo, pero si a complejos Al-pectina o Al-fosfato (Ownby, 1993).

Para la tinción con HTX, las raíces de 3 individuos de cada tratamiento fueron lavadas con H₂O destilada por 15 min en un matraz erlenmeyer de 250 ml y se agitaron con un agitador (Reciprocal Shaker Lab-Line) para quitar el exceso de la solución nutritiva. Después, las raíces se colocaron en una solución de Hematoxilina (0.2% hematoxilina y 0.02% KIO₃) y se dejaron agitando a la misma velocidad durante 15 min. Posteriormente fueron enjuagadas nuevamente con H₂O destilada por 15 min para quitar el exceso de colorante, y a continuación se tomaron fotografías de las raíces con un microscopio Motic Digital en el Laboratorio de Bioquímica y Farmacia, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM con el apoyo de la Dra Sobeida Sánchez Nieto.

5.7.2 Técnica de tinción con Pirocatecol Violeta (PCV)

El Pirocatecol Violeta (PCV), es un colorante que produce un color azul cuando se forma un complejo quelator con el Al (Watanabe *et al.*, 1998). Para la localización del Al en las hojas y en la raíz con PVC, se dividió la hoja en tres partes, la parte media fue la que se utilizó para los cortes, y en el caso de la raíz se utilizó 1 cm de distancia a partir del ápice (Figura M5, ver flecha). Ambas muestras se congelaron por separado con TMF (Tissue Freezing Medium, gel que embibe muestras para cortes en frío), para posteriormente realizar los cortes en un Criostato¹ en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el apoyo de la M en C María del Pilar Torres García y la Bióloga Eva Muñoz Mancilla. Se realizaron cortes de 20 µm de las hojas y para las raíces se utilizó una navaja de bisturí # 22, con cortes de aproximadamente 40 µm de grosor. Se montaron al menos 5 cortes de cada muestra en portaobjetos cubiertos con una solución de gelatina glicerinizada al 2%, esto con el fin de que la muestra se adhiriera al portaobjetos, para posteriormente realizar la tinción.



Figura M5. Fotografía de plántula de *C. xalapensis*. Las flechas indican las partes de la planta que se usaron para los cortes histológicos con el Criostato.

¹ Está constituido por una cámara fría (con una temperatura interna de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), en cuyo interior está montado un micrótopo.

Para la tinción, con una pipeta pasteur se añadieron unas gotas de 0.02% de PCV disuelto en una solución de 2.5% Hexamina pH 6.2 a cada portaobjetos con las muestras, se dejaron reposar por 15 min. Posteriormente, se lavaron con una solución al 2.5% de Hexamina pH 6.2 sin PCV, se dejaron secar y se cubrieron con un porta objetos. Las muestras se observaron y se tomaron fotografías con un fotomicroscopio Olympus Provis AX70 en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el apoyo del M en C Alejandro Martínez Mena.

5.7.3 Localización del Al en hojas utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido acoplado a un Espectrofotómetro de Dispersión de Rayos X (MEB-EDS)

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) es un instrumento cuyo funcionamiento se basa en el barrido de la superficie de un espécimen, por medio de un haz de electrones por lentes electromagnéticas formadas por el paso de corriente a través de solenoides (bobinas). Después de que el haz de electrones interacciona con la muestra, se generan varios tipos de señales, las cuales son colectadas por un detector específico para cada una de ellas. La técnica de espectrometría por dispersión de energía de rayos X (EDS) se caracteriza por analizar todos los elementos de la tabla periódica con número atómico \geq Be (Berilio, no. atómico 4), la concentración mínima detectada varía desde un 0.1 % en peso a 1% en peso, con una exactitud en el análisis cuantitativo del 2 – 5% para elementos $>$ F (no. atómico 9) y del 5 – 10% para elementos ligeros como el B, C, N, O y F. El análisis cualitativo consiste en identificar los elementos en donde es dirigido el haz de electrones sobre la muestra. En resumen este proceso se efectúa al determinar las energías de los picos presentes en el espectro y, al comparar éstas, con energía conocidas de emisión de rayos X descritas en tablas, se puede saber qué elementos son los que se encuentran en la muestra (González y Noguez, 2006).

Para la localización del Al en las hojas con el MEB-EDS, en la cosecha final se fijaron 3 hojas de un individuo de cada tratamiento en Formol-Ácido acético-Alcohol etílico (FAA). Luego se realizaron cortes de 3 mm para posteriormente llevar a cabo la inclusión en LRWhite siguiendo la metodología de López *et al.*, (2005). Después, las muestras fueron cortadas con un Ultramicrotomo, el cuál utiliza una cuchilla de vidrio para obtener cortes finos de entre 0.05 y 0.06 μm , para ser observados con el microscopio electrónico, y semifinos de 0.5 a 1 μm para observarse con un microscopio óptico, y de esta manera poder examinar la estructura fina de las células y tejidos.

Los cortes se realizaron con un grosor de 8 μm y fueron montados en portaobjetos de 1 x 1 cm. Posteriormente, para localizar y determinar la concentración de Al en el tejido las muestras fueron enviadas a la Facultad de Química, Edificio D, a la unidad de Microscopia de Electrónica de Barrido en donde se analizaron las muestras con un Espectrofotómetro de Dispersión de Rayos X (MEB-EDS) con la supervisión de la M en C Guillermina González Mancera.

5.8 ENSAYOS BIOQUÍMICOS:

Para evaluar la actividad de algunas enzimas del sistema antioxidante de plántulas de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 mM y 1 mM de AlCl_3 después de 28 días de tratamiento, se cosecharon 15 individuos de cada tratamiento separando las hojas y las raíces, inmediatamente después fueron congeladas con nitrógeno líquido y homogenizadas con un mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino, el cual fue almacenado a -70°C hasta su posterior análisis.

5.8.1 Extracción de Proteína Total

La obtención de proteína total se llevó a cabo de la siguiente manera: aproximadamente 100 mg de tejido molido congelado se homogenizó en 1 ml de amortiguador de extracción (HEPES² 50mM, EDTA² 5 mM, DTT³ 1mM, PVP⁴ 1%, Inhibidores de proteasas PMSF⁵ 0.5%) utilizando un Politrón (Tissue Tearor Biospec Product Inc.) a una velocidad de 10 durante 2 min. Después, el homogenizado se centrifugó dos veces a 15,000 rpm a 4°C , posteriormente se volvió a centrifugar con una membrana de celulosa de baja afinidad Amicon (Millipore) para concentrar la muestra. Finalmente se cuantificó la proteína por el método de Bradford (1976).

5.8.2 Actividad de Catalasa (CAT, E. C. 1.11.1.6) por espectrofotometría.

La CAT, es una hemoproteína tetramérica que convierte $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, protegiendo a las células contra el daño causado por la acumulación de H_2O_2 , el cual es producido durante las reacciones redox bajo condiciones normales o por diferentes tipos de estrés (Feierabend, 2005). La actividad de CAT se determinó por el consumo de H_2O_2 a 240 nm, registrando el decremento de la absorbancia cada

² N-2-hidroximetil-piperaina-N'-2-ácido etanosulfónico. ² Ácido etilenodiaminatetracético. ³ Ditiotreitól

⁴ Polivinilpolipirrolidona. ⁵ Fenilmetilsulfonilfloruro.

20 segundos durante 3 min (Jiang y Jianhua, 2002), con al menos 6 repeticiones por cada tratamiento en hojas y en raíces. La mezcla de reacción contenía $\pm 800 \mu\text{l}$ de 50 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.0 (el volumen del amortiguador se fue ajustando de acuerdo al volumen de proteína), 100 μl de H_2O_2 (100 mM) y 50 μg de proteína. La cantidad de sustrato consumido por miligramos de proteína por minuto se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (m / [\text{CE} * \text{mg} * \text{ml}]) * \text{min}$$

Donde:

m = pendiente

min = 60 seg

CE = coeficiente de extinción molar de la CAT, $39.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

mg = miligramos de proteína

ml = volumen de reacción

5.8.3 Actividad de Ascorbato Peroxidasa (APX, E.C. 1.11.1.11) por espectrofotometría.

APX es una proteína que utiliza ácido ascórbico (AsA) como un donador específico para reducir H_2O_2 a H_2O , de acuerdo a la reacción: $2 \text{ Ascorbatos} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ Monodehidroascorbato} + 2\text{H}_2\text{O}$. Para determinar la actividad de APX al amortiguador de extracción de proteína se le añadió 1.0 mM de AsA. La actividad se determinó por el consumo de H_2O_2 a 290 nm registrando el decremento de la absorbancia cada 20 segundos por 2 min (Jiang y Jianhua, 2002), con al menos 6 repeticiones por cada tratamiento en hojas y en raíces. La mezcla de reacción contenía $\pm 800 \mu\text{l}$ de 50 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.0 (el volumen del amortiguador se fue ajustando de acuerdo al volumen de proteína), 10 μl de H_2O_2 10 mM, 50 μl de 10 mM de AsA y 50 μg de proteína. La cantidad de sustrato consumido por miligramos de proteína por minuto se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (m / [\text{CE} * \text{mg} * \text{ml}]) * \text{min}$$

Donde:

m = pendiente

min = 60 seg

CE = coeficiente de extinción molar de APX, $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

mg = miligramos de proteína

ml = volumen de reacción

5.8.4 Actividad de Glutation Reductasa (GR, E.C.1.6.4.2) por espectrofotometría.

La GR es una flavoproteína homodimérica que usa NADPH³ para reducir GSSG⁴ a dos GSH⁵, el cual participa en el ciclo Ascorbato – Glutación para la detoxificación de H₂O₂ (Noctor *et al.*, 2002). La actividad de GR fue determinada por la oxidación de NADPH a 340 nm (con un coeficiente de extinción de 6.2 mM⁻¹cm⁻¹), registrando el decremento de la absorbancia cada 16 segundos por 3 min en una 1 ml de mezcla de reacción la cual contenía 20 µl de Na₂EDTA 100 mM, 50 µl de GSSG, ±890 µl de 50 mM de amortiguador de fosfatos a pH 7.5, ±25 µl proteína (50 µg de proteína) y 15 µl de NADPH (Jiang y Jianhua, 2002), con al menos 6 repeticiones por cada tratamiento en hojas y en raíces. La cantidad de sustrato consumido por miligramos de proteína por minuto se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = (m / [\text{CE} * \text{mg} * \text{ml}]) * \text{min}$$

Donde:

m = pendiente

min = 60 seg

CE = coeficiente de extinción molar de GR, 6.2 mM⁻¹cm⁻¹

mg = miligramos de proteína

ml = volumen de reacción

5.8.5 Actividad de Superoxido Dismutasa (SOD, E.C. 1.11.1.11) por espectrofotometría.

La SOD cataliza la dismutación de O₂⁻ para producir H₂O₂ y O₂. La actividad se determinó registrando la autooxidación de la epinefrina (o formación del adrenocromo [α]) a 480 nm durante 10 min en intervalos de 16 seg, tomando en cuenta únicamente las lecturas posteriores de la fase *lag* (que tiene una duración aproximada de 2 a 3 min) y anteriores a la pérdida del color del adrenocromo. La mezcla de reacción de 500 µl, contenía ±375 µl de solución amortiguadora de carbonatos 50 mM pH 10.2, 100 µl de EDTA 0.5 mM, ±25 µl de proteína y 25 µl de Epinefrina 5 mg/ml (disuelta en HCl 10 mM, pH 2). En la reacción primero se observa que la absorbancia va en aumento pero al cabo de ± 3 min disminuye, es en este periodo que la actividad de la enzima empieza a ser medida, observándose la disminución de la absorbancia durante 10 min. La actividad se calculó con al menos 5 repeticiones por

³ NADPH, β-Nicotinamida adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt, PM 833.4.

⁴ GSSG, Glutathione oxidized form, PM 612.6.

⁵ GSH, Glutathione reduced, PM 818.3.

cada tratamiento en hojas y en raíces, con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = (m / [\text{CE} * \text{mg} * \text{ml}]) * \text{min}$$

Donde:

m = pendiente

min = 60 seg

CE = coeficiente de extinción molar de SOD, $4020 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$

mg = miligramos de proteína

ml = volumen de reacción

5.8.6 Concentración de Radical Superoxido ($O_2^{\bullet-}$) por espectrofotometría.

Para determinar la concentración del $O_2^{\bullet-}$ se tomaron las lecturas de la fase *lag* de la actividad de SOD, en donde la epinefrina es oxidada por el $O_2^{\bullet-}$. A partir de estas lecturas se saca la pendiente (m), y por la ley de Lambert – Beer⁶, se determina la concentración, utilizando la siguiente ecuación:

$$C = m / E$$

Donde:

m = pendiente

E = coeficiente de extinción molar de $O_2^{\bullet-}$, $4020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

5.8.7 Concentración de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) por espectrofotometría.

Para determinar la concentración de H_2O_2 , se homogenizaron 100 mg de tejido molido congelado en 1 ml de amortiguador de fosfatos a pH 6.5, utilizando un politrón a velocidad 10 por 2 min. El homogenizado se centrifugó dos veces a 15,000 rpm a 4°C, para obtener un sobrenadante claro. Posteriormente, el sobrenadante se mezcló con 0.1% de sulfato de titanio en 20% (v/v) H_2SO_4 , en una relación 3:1, se mezcló y se volvió a centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. La intensidad del amarillo del sobrenadante fue medida a 410 nm, el blanco se preparó colocando 750 μl de amortiguador de

⁶ La cual explica que la transmisión y la longitud de la sustancia que la luz atraviesa, es igual a la concentración de la misma.

fosfatos pH 6.5 y 250 μl de sulfato de titanio. Los niveles de H_2O_2 se determinaron usando la siguiente fórmula (Fang *et al.*, 2001) con al menos 6 repeticiones por cada tratamiento en hojas y en raíces:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] = \text{Abs} / \text{CE}$$

Donde:

Abs = absorbancia obtenida

CE = coeficiente de extinción molar del H_2O_2 , $0.28 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar si existían diferencias significativas entre el control y los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM AlCl_3 , los valores obtenidos de la longitud de la raíz, el número de raíces nuevas, la acumulación de biomasa, los componentes del análisis de crecimiento, así como las actividades de CAT, APX, GR, SOD y las concentraciones de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , se realizó un ANOVA de una vía y una comparación de medias con la prueba de Tukey con un valor de $p < 0.05$, con el programa STATISTICA 6.0 (USA).

6. RESULTADOS

6.1 CONCENTRACIÓN DE Al^{3+} , Ca^{2+} , pH, CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA, TEXTURA Y COLOR DEL SUELO.

La concentración de Al^{3+} y Ca^{2+} , pH, la conductividad eléctrica, la textura y el color del suelo colectado en el Potrero Juntas, el Potrero Anayal, el Anayal, el Acahual Arroyo y la Vegetación Primaria, se muestra en la Tabla R1. Los únicos sitios en los que se detectó Al^{3+} (soluble) fueron el suelo del Potrero Anayal y del Potrero Juntas, en el caso del Acahual Anayal, el Acahual Arroyo y la Vegetación Primaria no fue posible cuantificar su concentración ya que sus valores estaban por debajo del límite de detección (< 0.05 mg/kg).

Las muestras que tuvieron la mayor concentración promedio de Al^{3+} , fueron las colectadas debajo de los individuos y las mezclas del Potrero Juntas con 63.18 ± 11.56 y 77.74 ± 12.45 mgAl/kg suelo respectivamente. Las concentraciones de Al^{3+} en los dos Potreros fueron estadísticamente diferentes, pero no hubo diferencias entre el suelo colectado debajo el individuos y la mezcla de los sitios (Tabla R1).

Cuando el suelo comienza a acidificarse ($pH < 5$) el contenido de Ca^{2+} disminuye provocando que el exceso de H^+ inicie la hidrólisis de los silicatos de Al y comience a solubilizarse en su forma tóxica de Al^{3+} , de tal manera que una disminución de la concentración de Ca^{2+} en un suelo ácido, indicaría un aumento en la concentración de Al^{3+} (Marshner, 1995). Por lo tanto, se determinó la concentración de Ca^{2+} en el suelo de los diferentes sitios.

Los resultados mostraron que la menor concentración de Ca^{2+} se presentó en el suelo de los Potreros (Juntas y Anayal), con diferencias significativas entre la concentración del suelo debajo del individuo y de la mezcla del sitio (Tabla R1). El suelo de la vegetación Primaria fue el que presentó la mayor concentración de Ca^{2+} , con diferencias significativas entre el suelo colectado debajo del individuo y la mezcla del sitio, y con las concentraciones de los dos Potreros y los dos Acahuales ($p < 0.05$) (Tabla R1).

Tabla R1. Concentración de Al^{3+} y Ca^{2+} , pH, conductividad eléctrica, textura y color del suelo colectado en los Potreros Juntas y Anayal, en los Acahuales Anayal y Arroyo y en la Vegetación Primaria. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n = 9$. ND, no detectable por el EAA. Letras diferentes indican diferencias significativas con una $p < 0.05$ (* $n = 7$).

Sitio	Muestra de suelo	[Al^{3+}] (mg/kg)	[Ca^{2+}] (mg/kg)	pH	Conductividad Eléctrica (Sm^{-1})	Textura	Color
Potrero Juntas	Individuo	63.18 \pm 11.56^a	16.99 \pm 0.82^c	5.04 \pm 0.09^b	92.21 \pm 3.98^d	Franco Arcillosa	Marrón pálido amarillento
	Mezcla	77.74 \pm 12.45^{a*}	18.71 \pm 0.54^d	5.15 \pm 0.09^b	94.09 \pm 10.41^e	Arcillo Arenosa	Marrón oscuro
Potrero Anayal	Individuo	33.55 \pm 6.52^b	12.02 \pm 0.65^b	4.75 \pm 0.10^c	95.58 \pm 1.89^f	Arcillosa	Marrón oscuro rojizo
	Mezcla	30.22 \pm 4.10^b	12.50 \pm 1.35^b	4.75 \pm 0.06^c	84.63 \pm 1.46^f		Marrón
Acahual Anayal	Individuo	ND	23.96 \pm 1.51 ^a	5.75 \pm 0.13 ^a	218.47 \pm 19.29 ^a	Franco Arcillo arenosa	Marrón oscuro
	Mezcla	ND	24.39 \pm 1.13 ^a	5.92 \pm 0.10 ^a	197.68 \pm 6.92 ^a		Negro marrón
Acahual Arroyo	Individuo	ND	23.95 \pm 0.42 ^a	5.62 \pm 0.21 ^a	176.40 \pm 6.73 ^b	Franco arcillo limosa	Marrón oscuro
	Mezcla	ND	23.35 \pm 1.30 ^a	5.53 \pm 0.16 ^a	146.50 \pm 14.33 ^c		
Vegetación Primaria	Individuo	ND	27.43 \pm 1.38 ^e	5.48 \pm 0.11 ^d	232.36 \pm 32.53 ^g	Franco arcillo arenosa	Marrón oscuro
	Mezcla	ND	24.93 \pm 1.47 ^f	5.65 \pm 0.09 ^d	270.14 \pm 33.21 ^g		

Con respecto al pH, al igual que la concentración de Ca^{2+} , el Potrero Juntas y el Potrero Anayal presentaron los valores de pH más alto, tanto en las muestras de colectadas debajo del individuo como en la mezcla del sitio, con 5.04 ± 0.09 , 5.15 ± 0.09 y 4.75 ± 0.10 , 4.75 ± 0.06 mgAl/kg respectivamente, las cuales además presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, Tabla R1). Estos resultados concuerdan con las altas concentraciones de Al^{3+} encontradas en ambos potreros. La Vegetación Primaria obtuvo los valores de pH más altos en ambas muestras (5.48 ± 0.11 y 5.65 ± 0.09), seguidas por los valores del Acahual Anayal y del Acahual Arroyo, con diferencias significativas ($p < 0.05$, Tabla R1), los cuales coinciden con los valores altos de Ca^{2+} (Tabla R1).

En los potreros Anayal y Juntas la conductividad eléctrica del suelo fue significativamente menor, en comparación con la conductividad del suelo de los Acahuales Anayal y Arroyo, y la Vegetación Primaria, ésta última fue la que presentó el valor más alto con $232.36 \pm 32.53 Sm^{-1}$ debajo del individuo y $270.14 \pm 33.21 Sm^{-1}$ en la mezcla del sitio ($p < 0.05$, Tabla R1). Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas de las muestras de suelo debajo del individuo y de la mezcla del sitio del Potrero Juntas (92.21 ± 3.98 y $94.09 \pm 10.41 Sm^{-1}$) y del Acahual Arroyo (176.40 ± 6.73 y $146.50 \pm 14.33 Sm^{-1}$).

Los resultados de la determinación de la textura mostraron que el Potrero Anayal presentó una textura Arcillosa, la cual se caracteriza por tener una textura fina y formar terrenos muy duros cuando se seca, y el Potrero Juntas tienen una textura Franco arcillosa, la cual tiene poca arena. El Acahual Anayal y el Acahual Arroyo tienen una textura Franco Arcillosa Arenosa y Franco Arcillo Limosa, las cuales también tienen una textura fina pero forma terrones duros cuando están secas, permitiendo el paso del aire y del agua al subsuelo. La Vegetación Primaria presentó una textura Franco Arcillo Arenosa que tiene una mezcla relativamente equilibrada de granos de arena, limo y arcilla, estos suelos son ligeros, aireados, permeables y una capacidad de retención de agua media-alta, que la hace disponible para el crecimiento de las plantas, haciendo de estos suelos los mejores para el crecimiento de la mayoría de las plantas (Aguilera, 1989).

6.2 CONCENTRACIÓN DE AL EN HOJAS DE *C. XALAPENSIS* COLECTADAS EN CAMPO.

La concentración del Al en el tejido de las hojas se determinó en plantas de cada sitio de colecta y por etapa de desarrollo de las hojas, es decir, hojas jóvenes y maduras, esto con el fin de evaluar si la concentración de Al en las hojas depende del estado de desarrollo de las mismas. Las hojas con la mayor concentración promedio de Al fueron las colectadas en el Potrero Anayal ($19,469 \pm 800$ mg Al/kg tejido) y el Acahual Anayal con ($19,170 \pm 2,011$ mg Al/kg tejido) (Tabla R2), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla R3). La concentración promedio de Al en las hojas de las plantas del Acahual Arroyo ($14,996 \pm 638$ mg Al/kg tejido) y del Potrero Juntas ($11,010 \pm 436$ mg Al/kg tejido), presentaron las menores concentraciones de Al en el tejido (Tabla R2). Asimismo, hubo diferencias significativas entre estos sitios y con el Potrero Anayal ($p < 0.05$) y el Acahual Anayal ($p < 0.05$) (Tabla R3).

Tabla R2. Concentración de Al total en hojas de *C. xalapensis* en cuatro sitios. Se analizaron las hojas jóvenes y maduras de un individuo por sitio. Los valores están dados en mg Al/kg tejido, y representan el promedio \pm error estándar. Para hojas jóvenes y maduras, $n = 9$; en el total se tomaron en cuenta $n = 18$.

Etapa de desarrollo de la hoja	Sitio de colecta			
	Potrero Juntas	Potrero Anayal	Acahual Anayal	Acahual Arroyo
Jóvenes	10,352 \pm 810	19,319 \pm 1,148	22,557 \pm 2,508	14,446 \pm 985
Maduras	11,668 \pm 208	19,619 \pm 884	15,361 \pm 2,766	15,546 \pm 828
Total	11,010 \pm 436	19,469 \pm 800	19,170 \pm 2,011	14,996 \pm 638

Tabla R3. Análisis de comparación de medias múltiple de Tukey de la concentración de Al de hojas jóvenes y maduras en cada sitio. Los valores en negritas son significativos ($p < 0.05$).

Sitio de Colecta	Potrero Juntas	Potrero Anayal	Acahual Anayal	Acahual Arroyo
Potrero Juntas	-			
Potrero Anayal	0.000	-		
Acahual Anayal	0.000	0.997	-	
Acahual Arroyo	0.061	0.028	0.050	-

Para determinar si la concentración de Al fue estadísticamente diferente entre hojas jóvenes y maduras, se realizó un análisis de comparaciones múltiples de Tukey, el cual se muestra en la Tabla R4. En este análisis, la comparación se realizó en tres grupos. El primero fue entre las hojas maduras de cada sitio (Tabla R4), en el cual se observó que las hojas maduras del Potrero Anayal tuvieron la mayor concentración de Al, además presentaron diferencias significativas con las hojas maduras del Potrero Juntas ($p = 0.007$). No se obtuvieron diferencias entre las hojas maduras del Acahual Anayal y el Acahual Arroyo.

En el segundo grupo el análisis se realizó entre las hojas jóvenes de las plantas de cada sitio (Tabla R4). En este grupo las plantas del Acahual Anayal fueron las que presentaron la mayor concentración de Al en el tejido de las hojas jóvenes, mostrando diferencias significativas con las plantas del Potrero Juntas ($p = 0.000$) y el Acahual Arroyo ($p = 0.006$), también las plantas del Potrero Anayal fueron estadísticamente diferentes al Potrero Juntas ($p = 0.002$). No se observaron diferencias significativas entre las hojas jóvenes de las plantas del Potrero Anayal y las de los Acahual Anayal y Arroyo.

En el último grupo se comparó la concentración de las hojas jóvenes y maduras, en y entre cada sitio de colecta (Tabla R4). En este análisis las hojas jóvenes y maduras del Potrero Juntas no presentaron diferencias significativas, pero sí hubo diferencias con las hojas jóvenes del Potrero Anayal ($p = 0.011$) y las del Acahual Anayal ($p = 0.000$). Las hojas jóvenes del Acahual Arroyo fueron estadísticamente diferentes a las hojas jóvenes del Acahual Anayal ($p = 0.028$). Únicamente, las hojas jóvenes y maduras del Acahual Anayal presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.029$).

Tabla R4. Análisis de comparación de medias múltiple de Tukey de la concentración de Al entre hojas maduras, hojas jóvenes y jóvenes y maduras por sitio. Los valores en Negritas son significativos ($p = 0.05$).

Sitio de Colecta	Etapa de desarrollo de la hoja	Potrero Juntas	Potrero Anayal	Acahual Anayal	Acahual Arroyo	Potrero Juntas	Potrero Anayal	Acahual Anayal	Acahual Arroyo
		Maduras				Jóvenes			
Potrero Juntas	Maduras	-							
Potrero Anayal		0.007	-						
Acahual Anayal		0.677	0.504	-					
Acahual Arroyo		0.585	0.523	1.000	-				
Potrero Juntas	Jóvenes	0.998	0.001	0.296	0.220	-			
Potrero Anayal		0.011	1.000	0.597	0.618	0.002	-		
Acahual Anayal		0.000	0.851	0.029	0.028	0.000	0.777	-	
Acahual Arroyo		0.884	0.224	1.000	1.000	0.516	0.292	0.006	-

6.3 CRECIMIENTO

6.3.1 Longitud de la Raíz principal

En la longitud de las raíces no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura R4). Sin embargo, sí se puede observar que el tratamiento de 0.5 mM Al fue presentando un mayor incremento en la longitud de sus raíces (14%) en comparación con el control y el tratamiento de 1.0 mM, el cual sólo incrementó la longitud en un 2.9% con respecto al control.

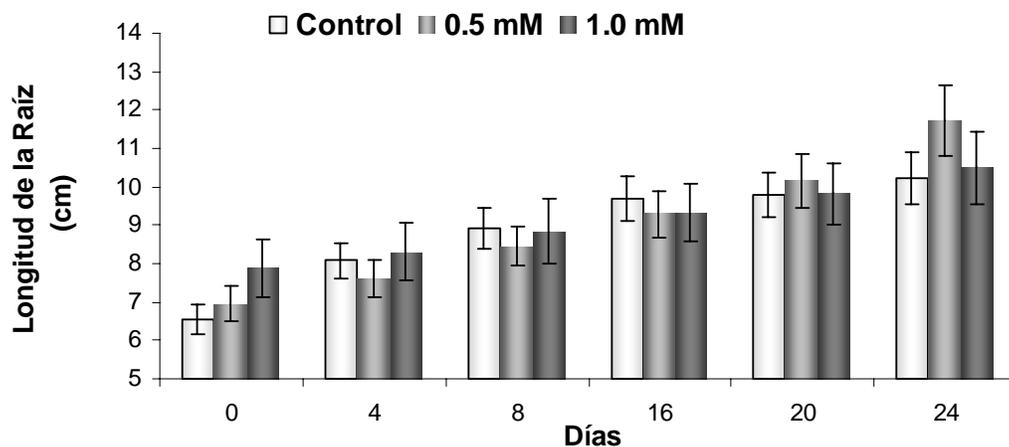


Figura R4. Incremento en la longitud de la raíz principal de plántulas de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 mM y 1.0 mM de $AlCl_3$, después de 24 días. Las mediciones se hicieron cada 4 días. $n = 18$, las barras representan el error estándar.

6.3.2 Formación de Raíces Nuevas

El número de raíces laterales se incrementó con el tiempo tanto en las plántulas del control como en las de los dos tratamientos, no obstante, en las plántulas del control sólo se presentó un incremento del 57% en la formación de raíces, en cambio las plántulas de los tratamientos presentaron un incremento del 147% y 146%, respectivamente (Figura R5). Aunque no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos de Al, si se pudo observar diferencias significativas entre el control y ambos tratamientos.

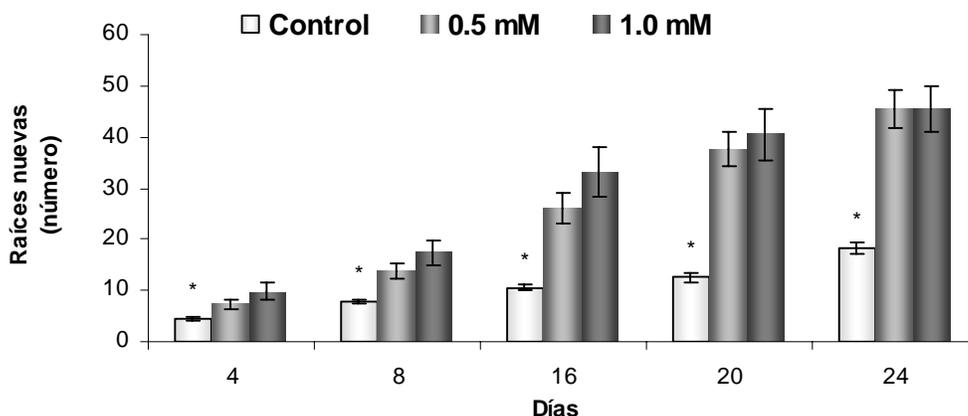


Figura R5. Número de raíces nuevas en plántulas de *C. xalapensis*, tratada con dos diferentes concentraciones de Al. El conteo de las raíces se realizó cada 4 días. $n = 18$, los valores representan el promedio y las barras el error estándar. El asterisco indica diferencias significativas $p > 0.001$.

6.3.3 Biomasa

Con respecto a la acumulación de biomasa, las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al fueron las que presentaron mayor ganancia en biomasa con un 48.66% con respecto a las plántulas del control. En cambio, las plántulas del tratamiento de 1.0 mM Al tuvieron una menor ganancia de biomasa (26.48%) con respecto al control (Tabla R5). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$).

Tabla R5. Acumulación de Biomasa en las plántulas de *C. xalapensis* en cada tratamiento después de 24 días. La biomasa está dada en mg de peso seco. Los valores representan el promedio \pm error estándar, $n = 7$.

Tratamiento	Biomasa Acumulada (mg)			
	Hojas	Raíz	Tallo	Total
Control	25.928 \pm 3.567	7.828 \pm 1.941	4.871 \pm 0.504	38.628 \pm 5.467
0.5 mM Al	33.200 \pm 5.847	18.971 \pm 5.604	5.285 \pm 2.644	57.457 \pm 13.502
1.0 mM Al	14.757 \pm 8.755	8.842 \pm 2.555	3.357 \pm 1.736	26.842 \pm 11.967

6.3.4 Área foliar

El área foliar de las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al fue 25.9% mayor que el de las plántulas del control, en cambio en el tratamiento de 1.0 mM presentó una disminución del área foliar con respecto al control (Tabla R6).

6.3.5 Peso seco de raíz y hojas

Con respecto al peso seco de las partes de la planta, el peso seco de la raíz de las plántulas fue el único que presentó diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{2,18} = 3.739$, $p = 0.044$) (Tabla R6 y Figura R6). Las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al fueron las que presentaron el mayor aumento en las fracciones del peso seco de hojas (33.2%), raíz (114.3%) y total de la planta (49.1%) en comparación a las plántulas del control. También, las plántulas del tratamiento de 1.0 mM Al obtuvieron un aumento en las fracciones del peso seco de hojas (5.2%), raíz (40.7%) y total de la planta (15.8%), pero fue menor en comparación con la plántulas del tratamiento de 0.5 mM, con excepción del peso seco del tallo que fue de 9.771 ± 4.371 mg (29.8% con respecto al control).

6.3.6 Coeficiente Alométrico

De acuerdo con el coeficiente alométrico (R/S), que indica hacia que órganos de la planta son asignados los recursos, tanto las plántulas del control como las de ambos tratamientos presentaron valores menores a 1, por lo tanto, la mayor asignación de recursos fue hacia la parte aérea (hojas y tallo) (Tabla R6).

Tabla R6. Efecto de 0.5 y 1.0 mM de Al en el área foliar, peso seco de hojas, tallo, raíz, total de la planta y coeficiente alométrico R/S de *C. xalapensis*. n = 7, los valores son el promedio \pm error estándar. Los valores entre paréntesis muestran el porcentaje del incremento con respecto al control (%).

Variable	Control	0.5 mM Al	1.0 mM Al
Área foliar (cm ²)	27.507 \pm 2.60	34.645 \pm 3.84 (25.9%)	26.870 \pm 4.98
Peso seco hojas(g)	38.500 \pm 4.36	51.286 \pm 6.93 (33.2%)	40.514 \pm 7.35 (5.2%)
Peso seco tallo (g)	7.528 \pm 1.06	9.457 \pm 2.22 (25.6%)	9.771 \pm 1.65 (29.8%)
Peso seco raíz (g)	12.085 \pm 1.83	25.900 \pm 5.62 (114.3%)	17.00 \pm 2.08 (40.7%)
Peso seco total(g)	58.114 \pm 7.02	86.643 \pm 14.63 (49.1%)	67.286 \pm 10.21 (15.8%)
R/S	0.2583 \pm 0.018	0.3946 \pm 0.048	0.3915 \pm 0.084

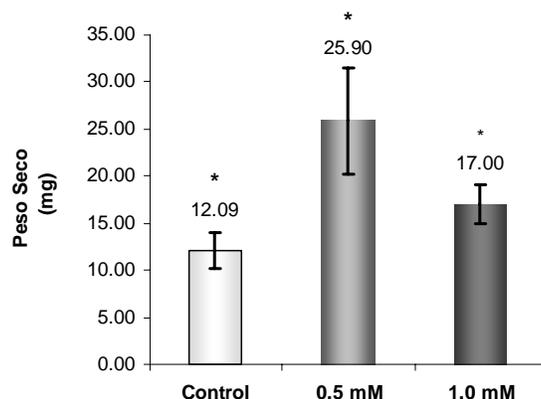


Figura R6. Peso seco de la raíz de las plántulas del control y de los tratamientos. Los valores representan el promedio de $n = 7$, y las barras el error estándar con una $p = 0.05$.

6.3.7 Análisis de Crecimiento

En la tasa de crecimiento absoluta, la cual indica el incremento en la talla de la planta por unidad de tiempo, las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al fueron las que presentaron el mayor incremento ($3.171 \pm 0.736 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$) en comparación con las plántulas del control, y las plántulas del tratamiento de 1.0 mM fueron las más bajas (2.146 ± 0.303 y $1.491 \pm 0.664 \text{ g g}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente) (Tabla R7). En el caso de la tasa relativa de crecimiento (RGR) sí se observaron diferencias significativas entre las plántulas del control y las del tratamiento de 1.0 mM Al ($F_{2,15} = 3.986$, $p = 0.041$) (Figura R7) (Tabla R7).

Tabla R7. Valores de la tasa de crecimiento absoluta (AGR), tasa relativa de crecimiento (RGR), tasa neta de asimilación (NAR), tasa de área foliar (LAR), área foliar específica (SLA) y la proporción del peso de las hojas (LWR), tallo (SWR) y raíz (RWR) en plántulas de *C. xalapensis*, tratadas con 0.5 y 1.0 mM de AlCl_3 . Los valores son los promedio de $n = 7 \pm$ error estándar.

Variable	Control	0.5 mM Al	1.0 mM Al
AGR (g d^{-1})	2.146 ± 0.303	3.171 ± 0.736	1.491 ± 0.664
RGR ($\text{g g}^{-1}\text{d}^{-1}$)	0.0663 ± 0.001	0.0676 ± 0.009	0.034 ± 0.011
NAR ($\text{g cm}^2\text{d}^{-1}$)	0.1272 ± 0.092	0.1333 ± 0.134	0.0683 ± 0.218
LAR (cm^2g)	0.4891 ± 0.014	0.4843 ± 0.037	0.4271 ± 0.019
SLA (cm^2g)	0.7516 ± 0.015	0.7924 ± 0.059	0.6922 ± 0.024
LWR	0.667 ± 0.013	0.621 ± 0.035	0.585 ± 0.033
SWR	0.129 ± 0.009	0.102 ± 0.012	0.146 ± 0.022
RWR	0.204 ± 0.011	0.278 ± 0.025	0.268 ± 0.036

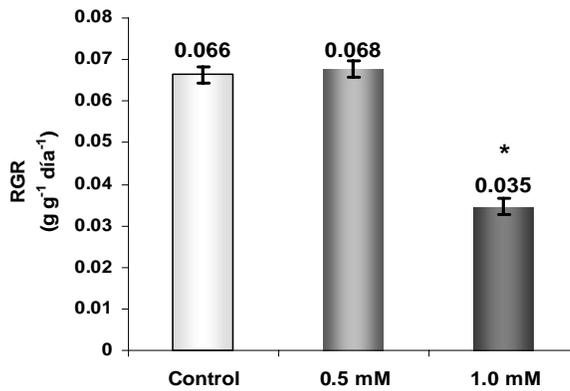


Figura R7. Tasa relativa de crecimiento en las plántulas del control, y las tratadas con 0.5 mM y 1.0 mM AlCl_3 . Los valores representan el promedio de $n = 7$, y las barras el error estándar con una $p = 0.05$.

Sin embargo, en la tasa de asimilación neta (NAR), que nos indica desde el punto fisiológico la eficiencia de los órganos asimilatorios en producir nuevo crecimiento, el tratamiento de 0.5 mM Al fue el más alto, con un valor de $0.133 \pm 0.053 \text{ g cm}^2\text{d}^{-1}$ (Tabla R7). La tasa de área foliar (LAR) fue similar para las plántulas del control y de los tratamiento de 0.5 mM, mostrando una ligera disminución en las plántulas del tratamiento de 1.0 mM Al. Por otro lado, el área foliar específica (SLA) que es la medida de la densidad de la hoja, también fue mayor en las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al ($0.792 \pm 0.157 \text{ cm}^2\text{g}$) (Tabla R7).

Tanto en el control como en ambos tratamientos, de acuerdo al coeficiente alométrico (R/S), la mayor asignación de recursos fue para hojas y tallo con más del 60% del peso seco para el control y ambos tratamientos, y en las raíces solo se asignó un 20%, 28% y 27% en el control y los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM Al, respectivamente (Figura R8).

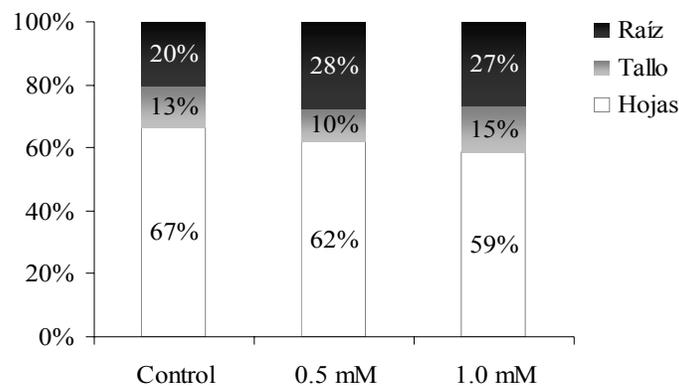


Figura R8. Proporción del peso seco de hojas, tallo y raíz con respecto al peso seco total de plántulas de *C. xalapensis*, control y tratadas con Al.

6.4 LOCALIZACIÓN DE AL EN HOJAS Y RAÍCES

6.4.1 Tinción con Hematoxilina

La Hematoxilina (HTX) cuando está en su forma oxidada Hemateina y es combinada con un mordante, usualmente una sal metálica, tiñe el tejido de un color azul oscuro a negro dependiendo del método de tinción. En esta prueba se pudo observar que las raíces que fueron tratadas con 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 , se tiñieron completamente, observándose mayor coloración en la zona de la cofia, en cambio en el control no se observó ninguna coloración (Figura R9).



Figura R9. Ápices de raíces de plántulas de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 y 1.0 mM de AlCl_3 y del control teñidas con 0.05% de HTX.

6.4.2 Tinción con Pirocatecol Violeta (PCV)

Con respecto a la localización del Al en el tejido, los cortes de hojas y raíces se tiñeron con Pirocatecol Violeta (PCV). El PCV produce un color azul cuando se forma un complejo quelator con el Al. En la Figura R10, se puede observar que en comparación con las hojas del control, las hojas del tratamiento de 0.5 mM y el de 1.0 mM Al presentaron una coloración azul en la cutícula de la hoja tanto en la parte

adaxial como abaxial y en regiones del mesófilo en empalizada y esponjoso. En el caso de las raíces, se puede observar esta misma coloración en los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM Al, particularmente en la región de la epidermis de la raíz (Figura R11).

6.4.3 Localización y Cuantificación de Al en hojas con MED–EDS

También se identificaron los sitios de localización del Al a través de cortes semifinos de hojas y raíces utilizando un MED–EDS. En estos cortes se observó que la pared celular de la epidermis adaxial fue la que presentó el mayor porcentaje de acumulación Al (3.69 %), en comparación con las células del mesófilo esponjoso y el parénquima de empalizada (Figura R12).

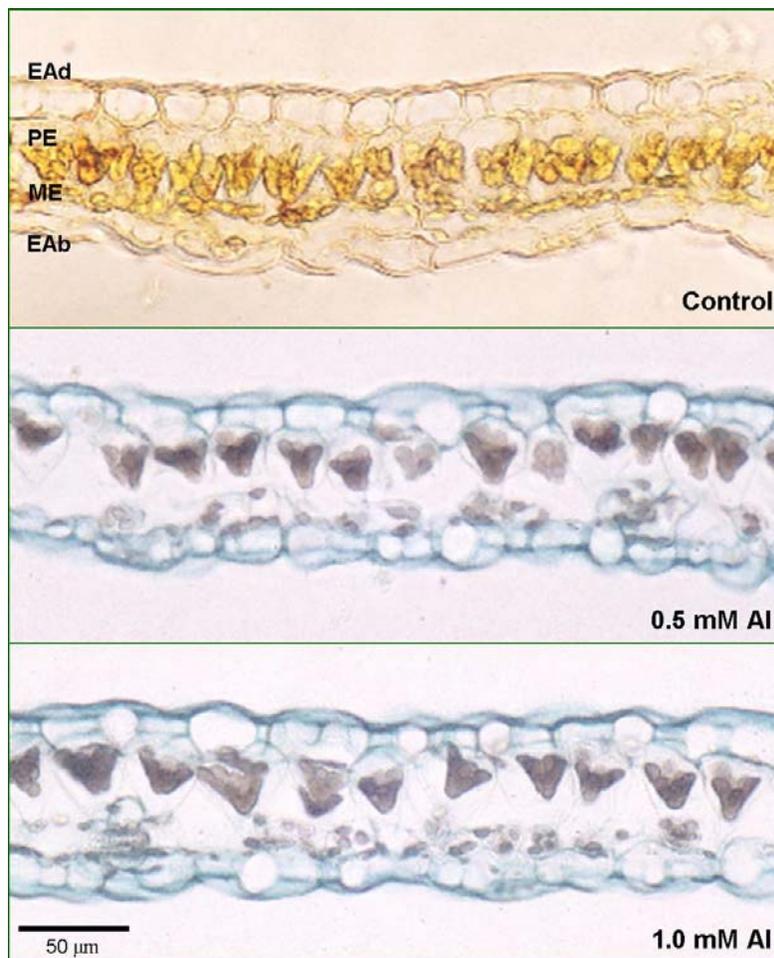


Figura R10. Cortes transversales de hojas de plántulas de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 y 1.0 mM de AlCl_3 y control, teñidas con 0.02% de PCV. La coloración azul indica los sitios donde se encuentra el Al. EAd, epidermis adaxial; PE, parenquima de empalizada; ME, mesófilo esponjoso; EAb, epidermis abaxial. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 125x. La barra indica la escala a 50 μm .

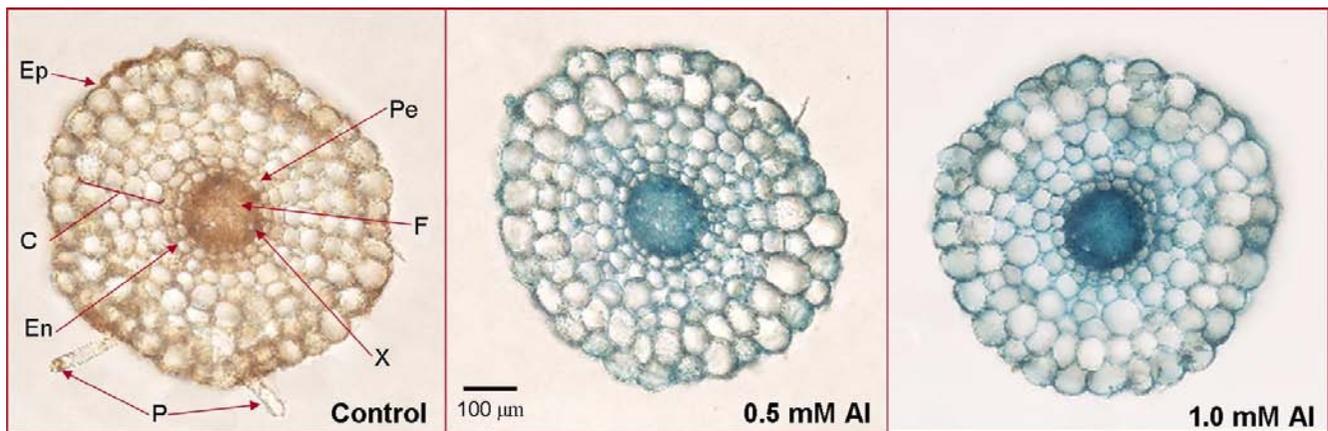


Figura R11. Cortes transversales de raíces de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 y 1.0 mM de AlCl_3 y control, teñidas con 0.02% de PCV. La coloración azul indica los sitios donde se encuentra el Al. Ep, epidermis; C, corteza; En, endodermis; Pe, periciclo; X, xilema; F, floema; P, pelos radicales. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 70.5x. La barra indica la escala a 100 μm .

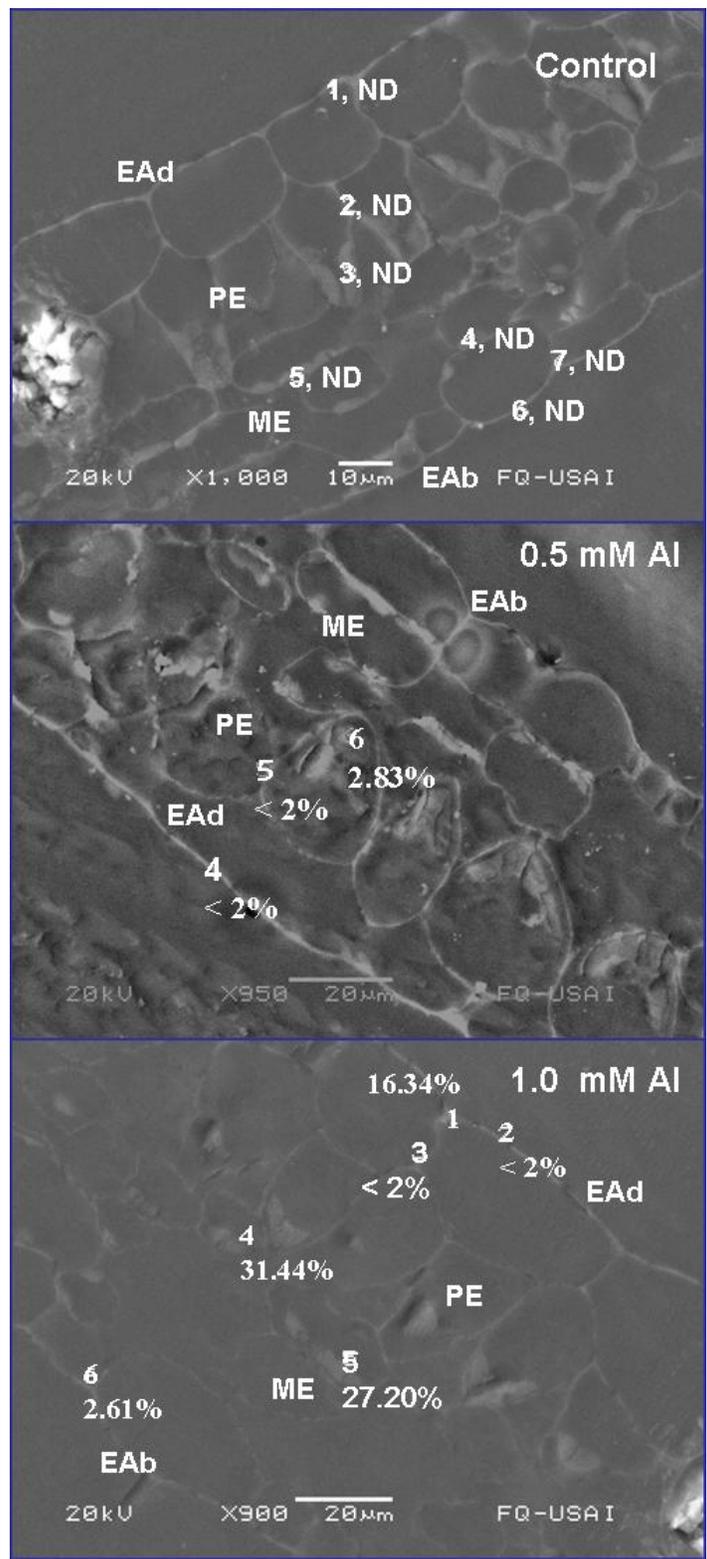


Figura R12. Imagen de cortes transversales de hojas jóvenes *C. xalapensis* con microscopio electrónico de barrido acoplado a un espectrofotómetro de dispersión de rayos X (EDX). Los números corresponden a los sitios donde se dirigió el EDX para cuantificar el porcentaje de Al. ND, no detectado. A) Acercamiento de 10 µm, y B) Acercamiento de 20 µm. EAd, epidermis adaxial; ME, mesófilo esponjoso, PE, parenquima de empalizada, y EAb, epidermis abaxial.

6.5 ACTIVIDAD DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE

6.5.1 Catalasa (CAT)

Con respecto a la respuesta del sistema antioxidante de *C. xalapensis*, la actividad de CAT se determinó tanto en hojas como en raíces de plántulas del control y de los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 . Las hojas de las plántulas del control y el tratamiento de 0.5 mM fueron los que presentaron la mayor actividad de CAT, aunque no se observaron diferencias significativas, y la menor fue con el tratamiento de 1.0 mM, en el cuál hubo diferencias con respecto al control y al tratamiento de 0.5 mM Al ($F_{(2,20)} = 10.772$; $p = 0.000$) (Figura R13).

Por otro lado, la actividad de CAT de las raíces de las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al fue de $1.514 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$, la de la raíz tratamiento con 1.0 mM Al fue de $1.158 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Ambos tratamientos presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($F_{(2,19)} = 4.424$; $p = 0.002$), cuya actividad fue menor ($0.120 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$).

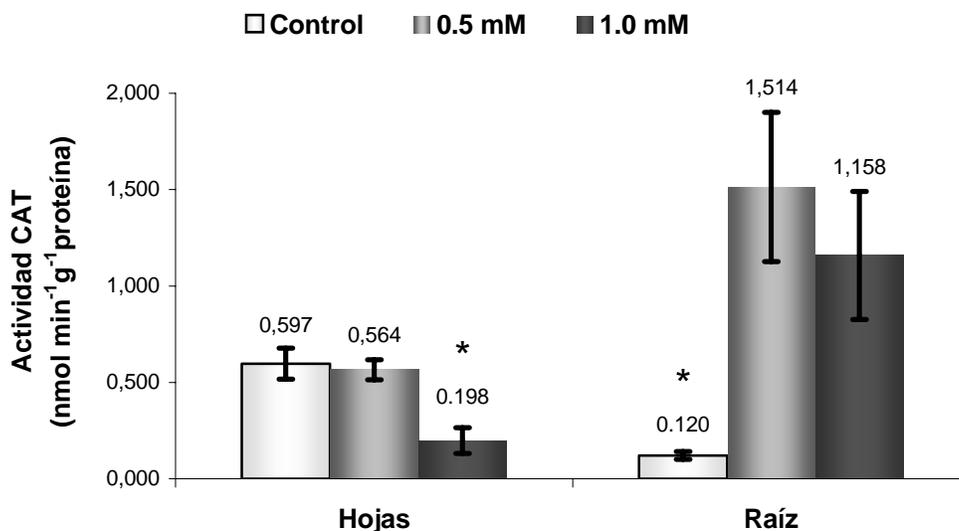


Figura R13. Actividad de CAT en *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 . Los valores representan el promedio ($n = 6$) y las barras el error estándar. Las unidades son $\text{nmol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas en hojas de $p = 0.000$, y en raíz de $p = 0.002$.

6.5.2 Ascorbato Peroxidasa (APX)

En el caso de la actividad de APX, no se observaron diferencias significativas tanto en las hojas como en las raíces de las plántulas del control y de ambos tratamientos. Sin embargo, sí se puede observar que la actividad de APX fue mayor en las hojas que en las raíces, y que el tratamiento de 0.5 mM Al fue el que presentó la mayor actividad tanto en hojas como en raíces (0.019 y 0.008 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectivamente) (Figura R14).

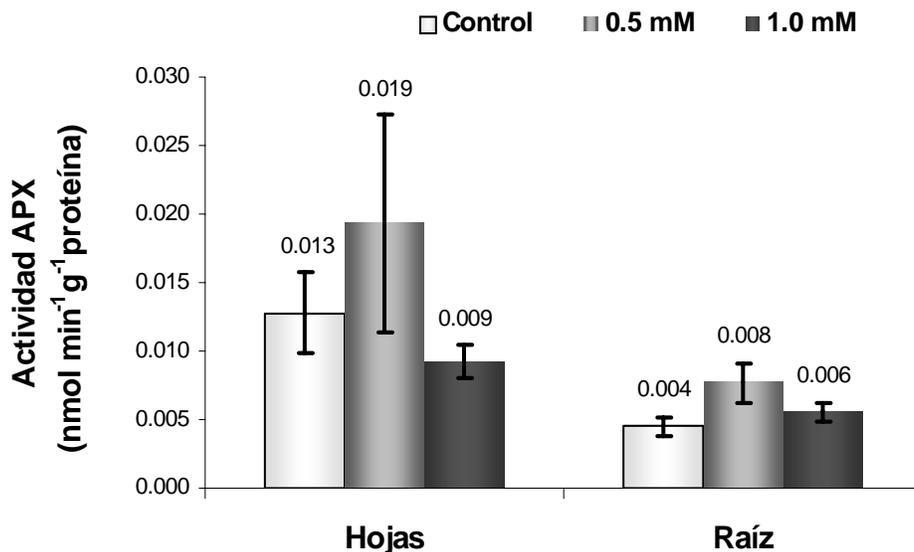


Figura R14. Actividad de APX hojas y raíces de *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 . Los valores representan el promedio ($n = 6$) y las barras el error estándar. Las unidades son $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control en hojas y raíces.

6.5.3 Glutation Reductasa (GR)

La mayor actividad de GR se presentó en las hojas de las plántulas del tratamiento de 0.5 mM Al (2134 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), seguida de la actividad del tratamiento con 1.0 mM (1487 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$), las plántulas del control fueron las que presentaron la menor actividad de GR (742 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Las raíces de las plántulas tratadas con 0.5 mM Al, al igual que en las hojas, fueron las que presentaron la mayor actividad de GR con 1207 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, seguidas por la actividad de las raíces del tratamiento de 1.0 mM con 588 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, y de las raíces del control con 323 $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, las cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(2,11)} = 5.333$; $p = 0.015$) (Figura R15).

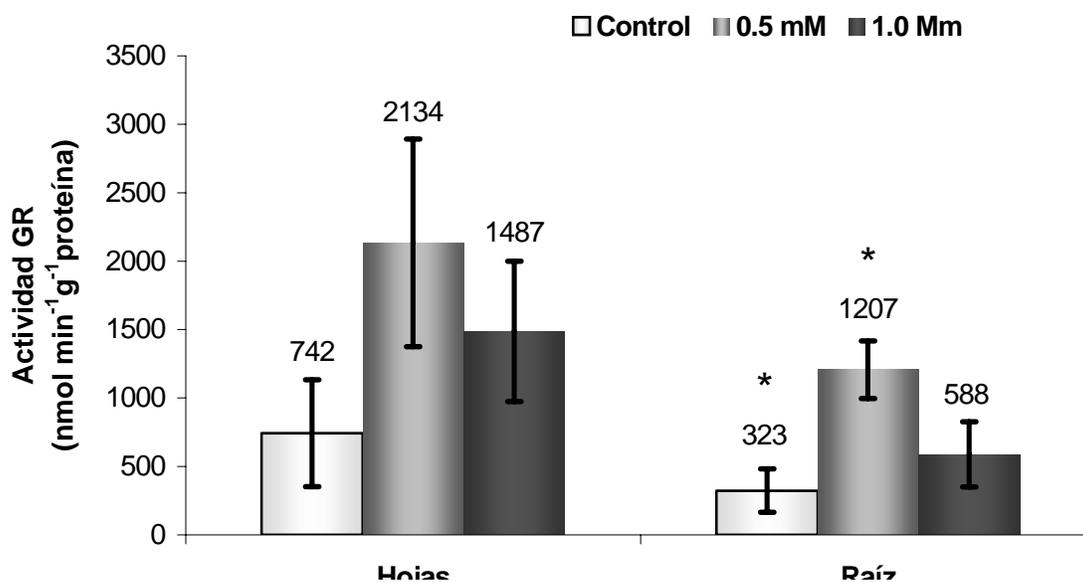


Figura R15. Actividad de GR hojas y raíces de *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 . Los valores representan el promedio ($n = 6$) y las barras el error estándar. Las unidades son $\text{nmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.015$).

6.5.4 Superóxido Dismutasa (SOD)

En el caso de actividad de SOD en las hojas los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM Al (11.045 y 11.582 $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectivamente) fue mayor en comparación con el control (4.313 $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con el control ($F_{(2,9)} = 54.853$; $p = 0.000$). La mayor actividad de SOD se presentó en las raíces de *C. xalapensis*, siendo la más alta la del tratamiento de 0.5 mM con 14.478 $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$, seguida por la actividad del tratamiento de 1.0 mM con 12.567 $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ y del control con 3.514 $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$. Además se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control, el tratamiento de 0.5 mM y de 1.0 mM Al ($F_{(2,9)} = 444.185$; $p = 0.000$) (Figura R16).

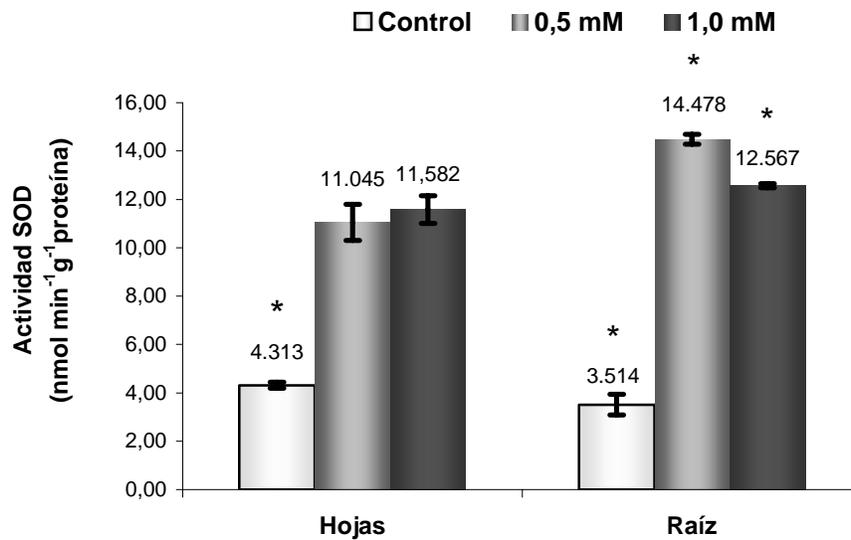


Figura R16. Actividad de SOD hojas y raíces de *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 mM y 1.0 mM de AlCl_3 . Los valores representan el promedio ($n = 6$) y las barras el error estándar. Las unidades son $\text{nmol}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

6.6. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

6.6.1 Concentración de Peróxido e hidrógeno (H_2O_2)

Tanto la CAT como APX, son enzimas encargadas de la conversión de H_2O_2 a H_2O , por lo que la concentración de este radical libre se midió tanto en raíz como en hojas de plántulas de *C. xalapensis*. La mayor concentración de H_2O_2 en hojas se observó en las plántulas del control con $15.006 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en comparación con las de los tratamientos de 0.5 mM y 1.0 mM Al, los cuales obtuvieron 6.091 y $6.228 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente. Por el contrario, la concentración de H_2O_2 en la raíz fue mayor en las plántulas del tratamiento de 0.5 mM ($2.125 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y de 1.0 mM ($2.130 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y las del control fueron menores ($0.746 \mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Figura R17).

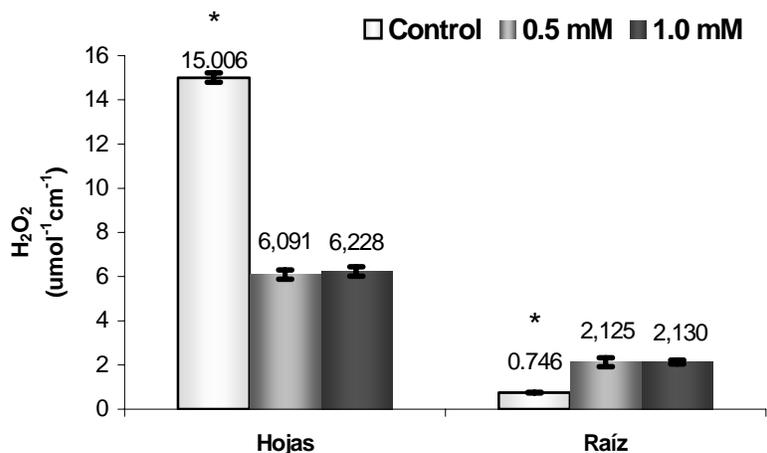


Figura R17. Concentración de H₂O₂ en plántulas de *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 y 1.0 mM de AlCl₃. Los valores representan el promedio (N = 6) y las barras el error estándar. *, indica diferencias significativas ($p = 0.000$).

6.6.2 Concentración del Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Con respecto a la concentración del $O_2^{\bullet-}$ en la hojas, tanto de las plántulas del control como de los tratamientos, presentaron la mayor concentración de $O_2^{\bullet-}$ en comparación con las raíces, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas ($F_{(2,9)} = 1.237$; $p = 0.335$). Por otro lado, en la concentración de $O_2^{\bullet-}$ en las raíces de las plántulas del control y de los tratamientos, sí se observaron diferencias significativas ($F_{(2,9)} = 394.629$; $p = 0.000$), siendo el tratamiento de 0.5 mM el que presentó la mayor concentración (5.442 nmol min⁻¹g⁻¹) seguida por el tratamiento de 1.0 mM (4.453 nmol min⁻¹g⁻¹) y el control (3.122 nmol min⁻¹g⁻¹) (Figura 27).

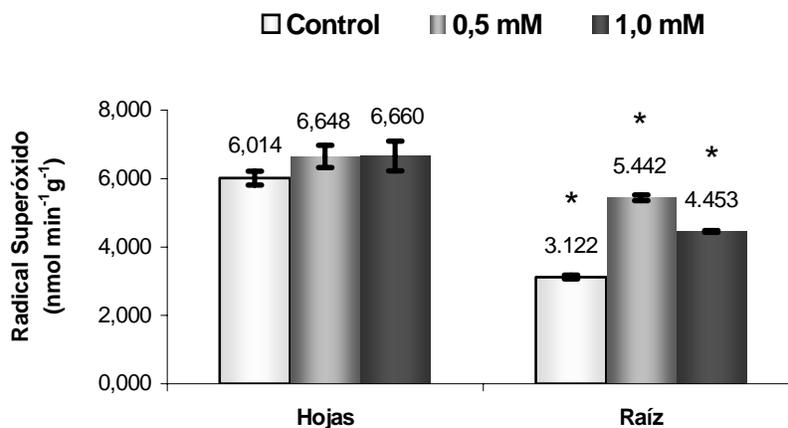


Figura R18. Concentración de $O_2^{\bullet-}$ en plántulas de *C. xalapensis* después de 24 días de tratamiento con 0.5 y 1.0 mM de AlCl₃. Los valores representan el promedio (n = 6) y las barras el error estándar. *, indica diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.000$).

7. DISCUSIÓN

Actualmente existe una gran cantidad de información sobre los efectos tóxicos del Al intercambiable o Al^{3+} en el crecimiento en plantas de interés comercial. Sin embargo, son pocos los estudios que abordan el papel del Al^{3+} en especie acumuladoras como *Camellia sinensis* y especies silvestres como *M. malabathricum*, entre otras. En un estudio sobre la Radiación Adaptativa de la familia Melastomataceae, se encontró que *Conostegia xalapensis* era muy abundante en el potrero donde las otras especies de esta familia no eran representativas (González-Santana, 2006). Los potreros son sitios con gran perturbación, tienen suelos ácidos que inducen la solubilización del Al (Al^{3+}), el cual es tóxico para el crecimiento de la mayoría de las plantas (como H^+ y Al^{3+}), por lo tanto la presencia de *C. xalapensis* en este sitio sugiere que posee mecanismos intrínsecos de tolerancia, que le permiten contrarrestar los efectos tóxicos de este metal. En esta investigación se evaluó la concentración de Al en el tejido de hojas de *C. xalapensis* colectadas en diferentes sitios y la concentración del Al^{3+} presente en el suelo de los mismos, además se realizó un bioensayo con plántulas de 8 meses de edad de *C. xalapensis* en el cual se evaluó el efecto de 2 concentraciones de Al en el crecimiento, su localización en el tejido y la respuesta del sistema antioxidante de estas plántulas.

7.1. CONCENTRACIÓN DE Al^{3+} EN SUELO

Los Potreros son sitios perturbados con menos del 50% de cobertura vegetal destinados al pastoreo del ganado, causando la compactación del suelo, además sus suelos son ácidos y deficientes en materia orgánica, con un alto potencial de escurrimiento y lixiviación, lo que provoca una deficiencia de nutrientes (Aguilera, 1989; Estrada y Coates-Estrada, 1995). En este estudio, el análisis de la concentración de Al^{3+} en los suelos, mostró que tanto el Potrero Anayal como el Potrero Juntas presentaron altas concentraciones de Al^{3+} en comparación con los suelos de los Acahuales y de la Vegetación Primaria, además estas elevadas concentraciones de Al en los potreros se correlacionaron con concentraciones bajas de Ca^{2+} , con valores de pH ácido y con una baja conductividad eléctrica de los mismos, características que se observan en suelos con problemas de toxicidad por Al^{3+} (Aguilera, 1989; Calba *et al.*, 2004). Por ejemplo, un suelo con alta tasa de lixiviación provoca un fuerte lavado de cationes como el Ca^{2+} , disminuyendo la saturación de sales, y otros cationes como el H^+ y el Al^{3+} se vuelven los cationes intercambiables dominantes, el predominio de H^+ en el suelo causa una disminución del pH en los horizontes superiores (0 – 15 cm de profundidad aproximadamente) (Calba

et al., 2004). El pH de la solución del suelo es el principal factor que afecta las dinámicas de Al y Ca en la rizósfera, cuando el pH del suelo disminuye el Al^{3+} aumenta y el Ca^{2+} disminuye. Esto se debe a que el Al^{3+} compite con el Ca^{2+} por los sitios intercambiables de las partículas del suelo (Hayasaki y Okazaki, 2005).

Estos resultados confirman que el suelo de los Potreros están altamente degradados, y que por sus características edáficas, no son aptos para el crecimiento de la mayoría de las plantas, por lo tanto las plantas que crecen en estos sitios deben tener mecanismos que les permitan contrarrestar los efectos del pH ácido, las altas concentraciones de cationes ácidos (Al^{3+}), y también que puedan crecer en suelos con deficiencia de nutrientes o incluso tener mecanismos que les permita aprovechar al máximo los pocos nutrientes que se encuentran en el suelo. Con base en los resultados obtenidos y las observaciones antes mencionadas, *C. xalapensis* podría ser considerada como una especie indicadora de suelos ácidos, ya que esta especie puede crecer en sitios donde la mayoría de las plantas no pueden desarrollarse, e incluso ser la más abundante, como por ejemplo en el Potrero Anayal (Figura M1).

7.2. CONCENTRACIÓN DE AL EN HOJAS DE *C. XALAPENSIS* COLECTADAS EN CAMPO

La concentración de Al en el tejido no solo dependen del sitio donde crecen los individuos sino también por la etapa de desarrollo de las hojas. Tanto las hojas colectadas de los individuos en los Potreros como de los Acahuals presentaron altas concentraciones de Al en su tejido (Tabla R4). La prueba estadística de comparación de medias de Tukey sobre la concentración de Al de las hojas jóvenes y maduras de los diferentes sitios de colecta, indicó que la concentración de Al es diferente dependiendo de la etapa de desarrollo o de la edad de la hoja (Tabla R3). Por ejemplo, las hojas jóvenes del Acahual Anayal presentaron la mayor concentración de Al, en cambio en los demás sitios la mayor concentración de Al se encontró en las hojas maduras (Tabla R1). En otros estudios se ha reportado que la concentración de Al en hojas de *C. sinencis* se correlaciona positivamente con la edad de la hoja, las hojas maduras acumulan hasta 10 veces más Al que las hojas jóvenes (Carr *et al.*, 2003). Otro ejemplo es *Faramera marginata* (Rubiaceae), otra especie acumuladora de Al, en la cual la concentración de Al en su tejido es mayor en hojas maduras que en hojas jóvenes (Britez *et al.*, 2002).

Hay estudios en *M. malabathricum* en los cuales reportan que cuando las plántulas de 1 año son tratadas con 1.0 mM Al, la mayor concentración de Al en el tejido se presenta en las hojas maduras (Watanabe *et al.*, 1997, Watanabe *et al.*, 1998), sin embargo, en otro estudio con esta misma especie

pero con plántulas de 2 meses de edad tratadas con 0.5 mM Al, la mayor concentración de Al se encontró en las hojas jóvenes (Watanabe *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 1997). Ma *et al.* (1997), encontraron que en *Fagopyrum esculentum* Moench cv. Jianxi, que después de 10 días de crecimiento con 50 μ M Al, acumuló 450 mg Al kg^{-1} en las hojas. En algunas plantas acumuladoras de Al se ha observado diferencias significativas en la concentración de Al entre las hojas jóvenes y maduras (Shen y Ma, 2001). En la mayoría de las especies acumuladoras de Al, la concentración entre hojas maduras y jóvenes no muestran diferencias significativas (Watanabe *et al.*, 1997). Estos trabajos sugieren que el Al se podría comportar como un elemento de alta movilidad en las plantas acumuladoras de Al, como es el caso de *F. maginata*, y por esta razón la concentración entre hojas jóvenes y maduras puede ser diferente o similar (Britez *et al.*, 2002).

Por otro lado las características del sitio también pueden afectar la concentración de Al en el tejido de las hojas. Por ejemplo, *F. esculentum* cuando crece en suelos con concentraciones mayores a 155 μ M Al, acumula hasta 10 mg kg^{-1} de peso seco (Sheng *et al.*, 2006). Sin embargo, Osaki *et al.* (2003) en un estudio sobre las características minerales de 166 especies que crecen en diferentes suelos, encontraron que en el caso particular de la concentración de Al en las hojas, ésta no dependía de las características propias del cada suelo ni la concentración de Al^{3+} presentes en los mismos, por lo tanto los autores sugieren que la concentración de Al en el tejido no sólo está determinada por el tipo de suelo en el que crecen sino también por las características propias de los individuos para acumular el Al (Osaki *et al.*, 2003). Los resultados de estos estudios y los reportados en este trabajo sugieren que la concentración de Al en el tejido de las hojas no sólo depende de la etapa de desarrollo de las mismas, sino también de las características fisiológicas del individuo y de las condiciones del suelo en el que crecen. Esto podría explicar porque en las hojas jóvenes del Acahual Anayal presentaron la mayor concentración de Al en el tejido.

7.3. CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *C. XALAPENSIS* EN LABORATORIO

Los suelos ácidos con altas concentraciones de Al^{3+} restringen el crecimiento de la mayoría de las plantas, al inhibir el crecimiento de la raíz, la absorción de nutrientes y alterar las funciones de la membrana plasmática y de la pared celular (Ma *et al.*, 2007), sin embargo, existen varios reportes que indican que el Al tiene un efecto benéfico en el crecimiento de algunas plantas, especialmente plantas que están adaptadas a crecer en suelos ácidos (Watanabe *et al.*, 2005). En el caso particular de *C. xalapensis*, la longitud de la raíz no mostró diferencias significativas entre los tratamientos y el control,

aunque tampoco se observó una disminución del crecimiento de la raíz, sino al contrario, su crecimiento fue estimulando con el tiempo, principalmente con la concentración de 0.5 mM AlCl_3 (Figura R4). Asimismo, la formación de raíces nuevas también se incrementó considerablemente en presencia de Al (Figura R5). Estos resultados concuerdan con lo reportado para otras especies acumuladoras de Al, por ejemplo en *C. sinensis* en la cuál se ha observado una estimulación del crecimiento de la raíz, y de la formación de nuevas raíces cuando crece en solución nutritiva con 0.4 mM de AlCl_3 (Ghanati *et al.*, 2005).

De igual manera, la acumulación de biomasa, el área foliar y el peso seco de hojas, tallo y raíz fue mayor en los tratamientos de Al en comparación con el control, tanto en el control como en los tratamientos, la mayor asignación de recursos fue hacia la parte aérea (Tabla R5 y R6). En otras especies que acumulan Al, se ha observado que la mayor asignación de los recursos se da hacia las hojas, seguida de la raíz y finalmente el tallo (Osaki *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2004), indicando que el Al^{3+} no afecta la producción de materia seca de las especies acumuladoras de Al.

La tasa de crecimiento relativa (RGR) del tratamiento con 0.5 mM AlCl_3 fue muy similar al control, en comparación con el tratamiento de 1.0 mM, lo que indica que aunque no hubo estimulación en el tratamiento con 0.5 mM de AlCl_3 , tampoco se observó una disminución; posiblemente esto se deba a que *C. xalapensis* es una planta de lento crecimiento, por lo que su respuesta a la presencia del Al no se reflejó en los 24 días de tratamiento, tal vez con un mayor intervalo de tiempo se pueda observar mejor el efecto del Al en la estimulación del crecimiento de esta especie. Por ejemplo, en *M. malabathricum* se ha reportado que concentraciones menores a 0.5 mM Al estimulan considerablemente su crecimiento, la producción de materia seca y el número de raíces nuevas (Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2001, Watanabe *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2006), en cambio, cuando es tratada con concentraciones superiores a 0.5 mM se observó una disminución de su crecimiento (Osaki *et al.*, 1997).

Esta estimulación del crecimiento de la planta se ha relacionado con el aumento en la absorción de Fósforo (P) y en algunos casos Potasio (K), ya que se ha reportado que en presencia de Al, la concentración de estos elementos aumenta considerablemente (Osaki *et al.*, 1997). También, este incremento se ve influenciado por el aumento de raíces nuevas, lo que contribuye a incrementar la superficie de absorción de nutrientes (Watanabe *et al.*, 2004; Ghanati *et al.*, 2005). Watanabe *et al.* (2006), en un estudio sobre las interacciones del Al y el Fe en el crecimiento de *M. malabathricum*,

describen un efecto estimulante con 0.5 mM Al en el crecimiento de esta especie, los autores mencionan que esta estimulación se debe a que el Al disminuye los efectos tóxicos causados por el exceso de Fe (0.1 mM sin Al), como por ejemplo el incremento de la concentración de las especies reactivas de oxígeno causadas por las reacciones Fenton (ver cap 2.2.6.).

Aunque el mucílago es considerado como una barrera de protección y lubricación para el ápice de la raíz en la mayoría de las plantas, en *M. malabathricum* el grado de metilación del mucílago secretado por sus raíces contribuye a la absorción del Al³⁺ hacia la planta, incluso cuando hay deficiencias de este metal en el suelo (Watanabe *et al.*, 2008). Los mecanismos por los cuales el Al estimula el crecimiento de las plantas acumuladoras aun no están lo suficientemente investigadas, particularmente porque se han estudiado muy pocas especies, e incluso entre las especies estudiadas los mecanismos de respuestas y acumulación del Al son diferentes.

7.4. LOCALIZACIÓN DEL AL EN EL TEJIDO DE PLÁTULAS DE *C. XALAPENSIS*

La tinción con Hematoxilina (HTX) ha sido utilizada como una técnica para visualizar la acumulación de Al en la superficie de las raíces de las plantas, la localización histoquímica del Al en el tejido de la raíz y para detectar fracturas en las estructura de la raíz (Rincón y Gonzáles, 1992; Ownby, 1993). Las raíces de las plántulas de *C. xalapensis* de los tratamientos de 0.5 y 1.0 mM, al ser tratadas con HTX se tiñeron completamente sin daños en la estructura de la raíz (Figura R9), indicando que las raíces acumulan Al sin daños aparentes. En un estudio sobre la acumulación de Al en dos variedades de trigo, una sensible (Tam 105) y una tolerante (Atlas 66), tratadas con 0.05 mM Al, encontraron que al teñir las raíces de ambas variedades con HTX, las raíces de la variedad sensible se tiñeron intensamente, en comparación con las raíces de la variedad tolerante. Además, en cortes transversales de las raíces, observaron que la acumulación del Al se presentó principalmente en la pared celular, los espacios intracelulares y el núcleo de las células corticales y de los meristemos del ápice de la raíz de la variedad sensible (Rincón y Gonzáles, 1992).

Cançado *et al.* (1999), en un estudio sobre la efectividad de la tinción con HTX para determinar la sensibilidad de dos variedades de maíz a 0.222 mM Al, encontraron que la raíz de la variedad sensible no solo se teñía con la HTX, sino que también se observó una degradación del tejido de la raíz, en cambio en la variedad tolerante, la raíz se tiñó principalmente arriba del ápice, sin mostrar ningún daño en el tejido de la raíz. La presencia de esta área en la variedad tolerante sugiere que hay una mínima

absorción inicial de Al en la raíz, sin embargo esta variedad es capaz de recuperarse y contrarrestar los primeros daños causados por la entrada del Al al tejido.

En esta investigación la respuesta de las raíces de las plántulas de *C. xalapensis* tratadas con Al fue similar a la respuesta de la variedad tolerante de maíz, ya que las raíces de *C. xalapensis* también se tiñeron completamente pero sin ningún daño aparente en el tejido de las mismas (Figura R6). Cabe mencionar, que en las especies acumuladoras no se había realizado ninguna tinción con HTX, por lo tanto este es el primer reporte de la utilización de esta técnica en una especie acumuladora de Al.

Los cortes de las hojas de las plántulas de los tratamientos con 0.5 mM y 1.0 mM Al teñidas con Pirocatecol Violeta (PCV), mostraron una coloración azul tanto en la epidermis adaxial como abaxial, también en células del parénquima en empalizada y el mesófilo esponjoso, aunque con menor intensidad, en cambio el corte de la hoja de la planta control no mostró ninguna coloración (Figura R10). En las raíces *C. xalapensis* tratadas con ambas concentraciones de Al, la coloración azul se observó en todo el tejido, desde la epidermis de la raíz hasta el xilema, las raíces del control no se tiñeron (Figura R11). Aunque los resultados del análisis realizado con el espectrofotómetro de dispersión de rayos X, no son concluyentes, pues el número de repeticiones es mínimo, en los cortes de las hojas de los tratamientos con 0.5 y 1.0 mM se encontró Al tanto en la epidermis adaxial y abaxial, como en células del parénquima de empalizada y del mesófilo esponjoso (Figura R12), los cuales concuerdan con la localización del Al en el tejido al utilizar la tinción con PCV.

Matsumoto *et al.* (1976), utilizaron Aluminon¹ y un análisis de EDS para localizar el Al en hojas de *C. sinencis*, y encontraron que el Al se acumula principalmente en la epidermis de las hojas, particularmente en la epidermis adaxial. En otros trabajos, también han determinado la localización del Al en hojas de *Richeria grandis* (Cuenca *et al.* 1991) y algunas otras especies de la región central de Brazil (Haridasan *et al.*, 1986) obteniendo los mismos resultados. En *M. malabathricum*, cortes de hojas y raíces teñidos con PCV mostraron que en las hojas la pared celular de las células de la epidermis adaxial y del mesófilo fueron las que principalmente se tiñeron, y en las raíces todo el tejido desde la corteza hasta el xilema se tiñó de azul (Watanabe *et al.*, 1998). La epidermis es un sitio común de acumulación de Al en las especies acumuladoras, y debido a que se detectó Al en las células del

¹Aluminon (Aurintricarboxilato de amonio, C₂₂H₂₃N₃O₉), es un colorante usado para detectar la presencia de Al en hojas y en soluciones acuosas. El Aluminon permite evaluar por colorimetría el contenido de Al (Chenery, 1948; Jansen *et al.*, 2000).

mesófilo de las hojas de *M. malabathricum*, los autores sugieren que el Al puede tener algún efecto en la fotosíntesis.

Al igual que *C. sinencis* y *M. malabathricum*, en *F. marginata* el principal sitio de acumulación de Al es la epidermis abaxial y adaxial de las hojas, y la pared celular de las células del parénquima en empalizada y el mesófilo esponjoso. Además, en esta especie se encontró que en cortes transversales del tallo teñidos con PCV, solo la epidermis y la corteza se tiñeron de azul, mientras que la cutícula, el esclerenquima, el floema, el xilema y los espacios del parénquima no se tiñeron (Britez *et al.*, 2002). En este mismo trabajo también se realizó un análisis de EDS, el cual corroboró la localización del Al encontrada con PCV tanto en hojas como en raíces. Carr *et al.* (2003), en un estudio sobre la acumulación y distribución de Al en *C. sinencis*, utilizando un análisis de EDS, encontró que tanto en hojas jóvenes como en maduras, el Al se acumula en la epidermis adaxial y abaxial, particularmente en la pared celular. Este patrón de compartimentación está restringido a áreas fuera del citoplasma, sugiriendo que el Al no participa en los procesos metabólicos de las hojas de *C. sinencis*.

7.5. SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN PLÁNTULAS DE *C. XALAPENSIS*.

Aunque el Al por sí mismo no es un metal de transición y no puede catalizar reacciones redox, se ha observado que induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) provocando un estrés oxidativo en la raíz de las plantas (Cakmak y Horst, 1999; Jones *et al.*, 2006), e incluso promueve la expresión de genes que codifican para enzimas del sistema antioxidante como SOD (Ezaki *et al.*, 2000; Boscolo *et al.*, 2003).

Con respecto a la actividad de las enzimas del sistema antioxidante SOD, CAT, APX y GR en las plántulas de *C. xalapensis* tratadas con 0.5 y 1.0 mM de Al, se encontró que la CAT y SOD fueron las enzimas que presentaron la mayor actividad en las raíces comparadas con las del control (12.6x y 4.1x más, respectivamente, $p < 0.002$), siendo mayor la actividad con el tratamiento de 0.5 mM Al (Figura R13 y R16). La actividad de APX y GR fue mayor en las raíces con el tratamiento de 0.5 mM, pero su actividad comparada con las de CAT y SOD fue menor, las cuales fueron 2x y 3.7x mayor respectivamente (Figura R14 y R15). La mayor actividad de estas enzimas se correlacionó con la disminución de la concentración de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ en las raíces (Figura R17 y R18). Esta respuesta del sistema antioxidante de las células de la raíz se debe a que éstas son el primer sitio que entra en

contacto con el Al^{3+} , y por lo tanto, las plántulas de *C. xalapensis* deben de tener la habilidad de contrarrestar el daño de las ROS que se forman por la presencia del Al en el tejido.

Sharma y Dubey (2007), en un estudio sobre el efecto en la absorción de 0.08 mM y 0.16 mM Al, contenido de ROS y actividad del sistema antioxidante en plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.), encontraron que la concentración de Al en las hojas y raíces y la producción de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$, aumentó conforme la concentración de Al^{3+} era mayor, y que la actividad de las enzimas Glutación reductasa (GR), Catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD), Ascorbato peroxidasa (APX), guaiacol peroxidasa (Guaiacol POX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR), es estimulada cuando las plántulas eran tratadas con 0.08 mM, sin embargo cuando las plántulas son tratadas con una concentración mayor (0.16 mM) la actividad de estas enzimas disminuye, lo que se correlaciona con la disminución del crecimiento de la raíz.

En el caso de especies de plantas tolerantes al Al^{3+} como algunas variedades de maíz, arroz y trigo, se ha reportado un incremento en la actividad de las enzimas CAT, APX, GR, SOD y algunas peroxidases en la raíz (Boscolo *et al.*, 2003; Darkó *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2007). También en el caso de las plantas acumuladoras de Al, como *C. sinencis*, cuando es expuesta a 400 μM Al, la actividad de la CAT es mayor que la de la APX (Ghanati *et al.*, 2005; Yokota *et al.*, 2004). Ghanati *et al.* (2005), menciona que el efecto benéfico del Al en el crecimiento de *C. sinencis*, es en parte, resultado de la degradación de ROS por la actividad de las enzimas antioxidantes, manteniendo la estabilidad de la pared celular y de la membrana plasmática.

Aunque se ha estudiado ampliamente el papel del estrés oxidativo inducido por el Al en la raíz de diferentes especies, es poca la información disponible sobre el papel del estrés oxidativo en las hojas de las plantas tratadas con Al (Sharma y Dubey, 2007). En el caso de la respuesta del sistema antioxidante de las hojas de las plántulas de *C. xalapensis*, se observó, que APX y GR fueron las que presentaron la mayor actividad en comparación con el control, particularmente en el tratamiento con 0.5 mM Al (1.4x y 2.8x mayor). La actividad de SOD en las hojas de ambos tratamientos fue similar, e incluso 2.5 veces mayor que el control ($p = 0.000$) (Figura R16), sin embargo, la actividad de la CAT en las hojas fue menor en los tratamientos, siendo esta disminución más marcada en el tratamiento con 1.0 mM (3x menor, $p = 0.000$), en comparación con el tratamiento de 0.5 mM el cuál fue ligeramente inferior al control (0.9x menor) (Figura R13).

Los cloroplastos y las mitocondrias, que tienen un intenso flujo de electrones, son las principales fuentes de producción de ROS en las células de las plantas (Mittler, 2004). En las raíces, la principal fuente de ROS son las mitocondrias, en cambio en las hojas además de poseer mitocondrias también tienen cloroplastos, por lo que su producción de ROS es mayor en comparación con las raíces. En las hojas de las plántulas de *C. xalapensis* tratadas con Al, se encontró que la concentración de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ fue mayor en comparación con las concentraciones de éstos en la raíces (Figura 17 y 18). Aunque no se observaron diferencias en la concentración de $O_2^{\bullet-}$ en las hojas del control y de los tratamientos, la concentración de H_2O_2 en las hojas de los tratamientos fue considerablemente menor que en las hojas del control (2.4x menor, $p = 0.000$) lo que sugiere que el Al está induciendo la actividad de las enzimas del sistema antioxidante, particularmente de APX y GR, las cuales tienen mayor afinidad al H_2O_2 . Los valores altos de H_2O_2 en el control se pueden deber a que la actividad de las enzimas del sistema antioxidante no se vio estimulada como en los tratamientos con Al, por lo tanto la remoción de este radical no es tan eficiente como en las plantas tratadas con Al. Estos resultados muestran que el incremento en la actividad de las enzimas del sistema antioxidante en *C. xalapensis* en presencia del Al, representan un mecanismo intrínseco de tolerancia que le permite controlar los niveles de ROS inducidos por el Al.

En resumen, este trabajo mostró que *C. xalapensis* puede crecer en sitios perturbados con altas concentraciones de Al^{3+} , -acumula este metal en su tejido sin ningún daño aparente, por lo cual puede ser considerada como una especie acumuladora e incluso como indicadora de sitios con problemas de toxicidad por Al. Además, en plántulas de 8 meses de edad, su biomasa y crecimiento no se ve disminuido, al menos en concentraciones menores a 0.5 mM y el incremento de la actividad de las enzimas del sistema antioxidante es uno de los mecanismos intrínsecos que permite a *Conostegia xalapensis* contrarrestar los efectos tóxicos del Al.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Los suelos de los Potreros fueron los que presentaron el pH más ácido y la mayor concentración de Al^{3+} , en comparación con los suelos de los Acahuales y de la Vegetación Primaria.
- ❖ La mayor concentración de Al en las hojas de *Conostegia xalapensis*, colectadas en campo, se presentó en las plantas del Potrero Anayal.
- ❖ El crecimiento de *C. xalapensis* fue estimulado con la concentración de 0.5 mM $AlCl_3$.
- ❖ *C. xalapensis* puede acumular el Al en hojas, principalmente en la epidermis adaxial y abaxial, y en todo el tejido de la raíz, sin daños aparentes en su estructura.
- ❖ El sistema antioxidante de *C. xalapensis* representa un importante mecanismo intrínseco de tolerancia, ya que la actividad de las enzimas antioxidantes se incrementó, principalmente en las raíces, controlando así el daño de las especies reactivas de oxígeno inducidas por el Al.

Por lo tanto *Conostegia xalapensis* es una especie acumuladora de Al y que posee mecanismos intrínsecos que le permiten acumular el Al en su tejido y contrarrestar los efectos tóxicos de este metal, lo que le permite crecer en suelos ácidos con altas concentraciones de Al^3 .

9. LITERATURA CITADA

- Aguilera, N. 1989. *Tratado de edafología de México, Tomo 1*. Facultad de Ciencias. UNAM. 222 p.
- Ahn S., M. Sivaguru, H. Osawa, G. Chung y H. Matsumoto. 2001. Aluminum Inhibits the H⁺-ATPase Activity by Permanently Altering the Plasma Membrane Surface Potentials in Squash Root. *Plant Physiology*, **126**: 1381 – 1390.
- Almeda, F. 1981. The Mexican and Central American species of *Adelobotrys* (Melastomataceae). *Annals Missouri Botanical Garden*, **68**: 204 – 212.
- Almeda, F. 1989. New species and taxonomic notes on Mexican and Central American Melastomataceae. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, **46**: 209 – 220.
- Almeda, F. 1993a. Melastomataceae. *Flora del Bajío de Regiones Adyacentes*, **10**: 1 – 35.
- Almeda, F. 1993b. *Stanmarkia*, a new genus of Melastomataceae from the volcanic highlands of western Guatemala and adjacent Mexico. *Brittonia*, **45**: 187 – 203.
- Almeda, F. 1994. *Arthrostemma primaevum* (Melastomataceae): A new species endemic to southeastern Mexico. *Brittonia*, **46**: 75 – 80.
- Almeda, F. 1997. Chromosome Numbers and their evolutionary significance in some Neotropical and paleotropical Melastomataceae. *Biollania, Especial Edition*, **6**: 167 – 190.
- Almeda, F. 2000. A synopsis of the Genus *Blankea* (Melastomataceae) in Mexico and Central America. *Novon*, **10**: 299 – 319.
- Aniol, A. 1984. Induction of Aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in the nutrient solution. *Plant Physiology*, **75**: 551 – 555.
- Bertsch P. M., y P. R. Bloom. Aluminum. 1996. bEn: Segoe, S. *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. 677 p.
- Blancaflor, E.B., D.L. Jones y S. Gilroy. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, **118**: 159 – 172.
- Bradford, M. R. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities relations and carbon assimilation. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248 – 254.
- Boscolo, P. R. S., M. Menossi y R. A. Jorge. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, **67**: 181 – 189.

- Britez, R. M., T. Watanabe, S. Jansen, C. B. Reissmann y M. Osaki. 2002. The relationship between Aluminium and Silicon accumulations in leaves of *Farame marginata* (Rubiaceae). *New Phytologist*, **156**: 437 – 444.
- Cackmak, I., y W. J. Horst. 1991. Effect of Aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiological Planarum*, **83**: 463 – 468.
- Calba H., F. Firdaus, P. Cazavieille, C. Théé, R. Poss y B. Jaillard. 2004. The dynamics of protons, aluminium, and calcium in the rhizosphere of maize cultivated in tropical acid soils: experimental study and modeling. *Plant and Soil*, **260**: 33 – 46.
- Campbell, R. 2001. *Ecología Microbiana*. Limusa. México. 268 p.
- Cançado, G. M. A., L. L. Loguercio, P. R. Martins, S. N. Parentoni, E. Paiva, A. Borém y M. A. Lopes. 1999. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). *Theoretical Applied Genetics*, **99**: 747 – 754.
- Carr, H. P., E. Lombi, H. Küper, S. P. McGrath y M. H. Wong. 2003. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Agronomie*, **23**: 705 – 710.
- Causton, D.R. y J. C. Venus. 1981. *The biometry of plant growth*. Edward Arnold, Londres, UK. 304 p.
- Chenery, E.M. 1948. Aluminium in the plant world. Part I., General survey or dicotyledons. *Kew Bulletin*, **2**: 173 – 183.
- Chenery, E.M. 1949. Aluminium in the plant world. Part II, Monocotyledons and gymnosperms. Par III, Cryptogams. *Kew Bulletin*, **4**: 463 – 473.
- Chenery, E.M., y K Sporne. 1976. A note on the evolutionary status of Aluminium-accumulator among dicotyledons. *New Phytology*, **76**: 551 – 554.
- Chiariello, N.R., H.A. Mooney y K. Williams. 1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissues. En: Percy R.W, J. Ehleringer, H.A. Mooney y P.W. Rundel (eds.). *Plant physiological ecology*. Chapman & Hall, Londres, UK. pp 327 – 365.
- Clausen, G., y S. S. Renner. 2001. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. *American Journal of Botany*, **88**: 486 – 498.
- Cruz-Ortega, T. y J.D. Ownby. 1993. A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiologia Plantarum*, **89**: 211 – 219.
- Cuenca, G., R. Herrera y T. Mérida. 1991. Distribution of aluminium in accumulator plants

by X-ray microanalysis in *Richeria grandis* Vahl leaves from a cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environment* **14**: 437 – 441.

- Darkó E., H. Ambrus, E. Stefanovits-Bányai, J. Fodor, F. Bakos y B. Barnabás. 2003. Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant line developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, **166**: 583 – 591.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé y F. Van Breusegem. 2000. Dual action of the active oxygen species Turing plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **57**: 779 – 795.
- Degenhardt, J., P. B. Larsen, S. H. Howell y L. V. Kochian. 1998. Aluminum resistance in the *Arabidopsis* mutant *alr-104* is caused by an Aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiology*, **117**: 19 – 27.
- Delhaize, E., S. Craig, C. D. Beaton, R. J. Bennet, V. C. Jagdish y P. J. Randall. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiology*, **103**: 685 – 693.
- Doncheva S., M. Amenós, C. Poschenrieder y J. Barceló. 2005. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1213 – 1220.
- Dudley, E. C. 1978. Adaptive Radiation in the Melastomataceae along an Altitudinal Gradient in Peru. *Biotropica*, **10**: 134 – 143.
- Ely, F., y Torres, F. 2003. Adaptaciones anatómico-estructurales foliares de *Chaetolepis lindiana* (Naud.) Triana a lo largo de un gradiente altitudinal en el Páramo del Parque Nacional Sierra Nevada de Mérida (Venezuela). *Plántula* **3**: 101 – 116.
- Estrada, A., y R. Coates-Estrada. 1995. *Las selvas tropicales húmedas de México*. La ciencia para todos No. 132. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 194 p.
- Eticha, D., A. Stass y W. Horst. 2005. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 1410 – 1420.
- Ezaki B., R. Gardner, Y. Ezaki y H. Matsumoto. 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology*, **122**: 657 – 665.
- Fang, W. C., J. W. Wang, C.C. Lin y C.H. Kao. 2001. Iron induction of lipid peroxidation and effects on antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, **55**: 75 – 80.
- Feierabend, J. 2005. Catalase in plants: molecular and functional properties and role in stress defense. En: Smirnoff, N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*.

Blackwell Publishing. UK. 101 – 140 pp.

- Foyer C., L. Gomez y P. Van Heerden. 2005. Glutathione. En: Smirnoff, N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Publishing. UK. 1 – 24 pp
- Ghanati, F., A. Morita y H. Yolota. 2005. Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant systems. *Plant and Soil*, **276**: 133 – 141.
- Gleason, H. A. 1932. A synopsis of the Melastomataceae of British Guiana. *Brittonia*, **1**; 127 – 184.
- González G., y E. Noguez. 2006. *Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos*. Departamento de Ingeniería Química Metalúrgica. Facultad de Química, UNAM. México. 97 p.
- González-Santana, I. 2006. *Radiación Adaptativa de la familia Melastomataceae en diferentes estados serales en el Municipio de Zozocolco de Hidalgo, Veracruz, México*. Informe de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco.
- Haridasan M., T. I. Paviani e I. Schiavini. 1986. Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant and Soil*, **94**: 435 – 137.
- Haridasan, M. 1987. Distribution and mineral nutrition of aluminium-accumulating species in different plant communities of the cerrado region of central Brazil. En: San José, J. J., y Montes, R. (eds.). *La Capacidad Bioproductiva de Sabanas*. I.V.I.C., Caracas, Venezuela. 309 – 348 pp.
- Haridasan, M. 1988. Performance of *Miconia alicans* (SW.) Triana, an aluminum accumulating species, in acids and calcareous soils. *Communications of Soil Science Plant Analysis*, **19**: 1091 – 1103.
- Harter, R.D. 2002. *Acid soils of the tropics*. An Echo Technical Note. University of New Hampshire. <<http://echonet.org>>
- Havas, M. 1986. A Hematoxylin staining technique to locate sites of Aluminum binding in aquatic plants and animals. *Water, Air, and Soil Pollution*, **30**: 735 – 741.
- Hayasaki K., y M. Okazaki. 2005. Relationships between the high aluminum concentration and other components in soil solution of acidic soil in Kumagaya, Central Japan. *Soil Science Plant Nutrition*, **51**: 655 – 658.
- Henderson, M. y J. D. Ownby. 1991. The role of root cap mucilage secretion in aluminum tolerance en wheat. *Current Topics in Plant Biochemical Physiology*, **10**: 131 – 141.
- Horst, W.J., N. Schmohl, M. Kollmeier, F. Baluska, M. Sivaguru. 1999. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane – cytoskeleton continuum? *Plant and Soil*, **215**: 163 – 174.

- Hunt, R. 1982. *Plant Growth Curves. The functional approach to plant growth Analysis*. Edward Arnold, London. 248p.
- Hunt, R. 1990. *Basic growth analysis*. Unwin Hyman, Londres, UK. 112p.
- Ibarra M. G. y S. Sinica C. 1987. *Listados florísticos de México*. VII Estación Biológica Tropical Los Tuxtlas, Ver: 1 – 51.
- Jansen, S., E. Robbrecht, H. Beeckman y E. Smets. 2000. Aluminium accumulation in leaves of Rubiaceae: systematic and phylogenetic implications. *Annals of Botany*, **85**: 91 – 101.
- Jansen, S., M. R. Broadley, E. Robbrecht y E. Smets. 2002a. Aluminum hyperaccumulation in Angiosperms: A review of its phylogenetic significance. *The Botanical Review*, **68**: 235 – 269.
- Jansen, S., T. Watanabe y E. Smets. 2002b. Aluminium accumulation in leaves of 127 species in Melastomataceae, with comments on the Order Myrtales. *Annals of Botany*, **90**: 53 – 64.
- Jansen, S., T. Watanabe, S. Dessein, E. Robbrecht y E. Smets. 2004. The evolution of Aluminium accumulation in angiosperms. En: Hemsley A. R., y Poole I (eds). *The Evolution of Plant Physiology: from whole plants to ecosystems*. Elsevier. Amsterdam Holanda. pp 467 – 479.
- Jiang, M y Z. Jianhua. 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal Experimental Botany*, **53**:2401 – 2410.
- Jones, D. L. y L. V. Kochian. 1995. Aluminum inhibition of the inositol 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity?. *Plant Cell*, **7**: 1913 – 1922.
- Jones, D. L. y L. V. Kochian. 1997. Aluminum interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al cytotoxicity. *FEBS Letters*, **400**: 51 – 57.
- Jones, D. L., L. V. Kochian y S. Gilroy. 1998. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures1. *Plant Physiology*, **116**: 81 – 89.
- Jones, D. L., E. B. Blancaflor, L. V. Kochian y S. Gilroy. 2006. Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell Environment*, **29**: 1309 – 1318.
- Kinraide, T. B. 1991. Identity of the rhizotoxic aluminium species. *Plant and Soil*, **134**: 167 – 178.

- Kochian, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **46**: 237 – 260.
- Kochian, L. V., O. A. Hoekenga y M. A. Piñeros. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerant and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 459 – 493
- Kollmeier, M., H. Felle y W. Horst. 2000. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum?. *Plant Physiology*, **122**: 945 – 956.
- Kollmeier, M., P. Dietrich, C. Bauer, W. Horst y R. Hedrich. 2001. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology*, **126**: 397 – 410.
- López, M. L., J. Márquez y G. Murguía. 2005. *Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas: libro de laboratorio*. 2ª ed. Las Prensas de ciencias. UNAM. 178 p.
- Ma, J. F., S. L. Zheng y H. Matsumoto. 1997a. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology*, **38**: 1019 – 1025.
- Ma, J. F., S. Hiradate, K. Nomoto, T. Iwashita y H. Matsumoto. 1997b. Internal Detoxification mechanism of Al in Hydrangea. *Plant Physiology*, **113**: 1033 – 1039.
- Ma, J. F., S. Hiradate y H. Matsumoto. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, **117**: 753 – 759.
- Ma, J. F. y S. Hiradate. 2000. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta*, **211**: 355 – 360.
- Ma, J. F., P. R. Ryan y E. Delhaize. 2001. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS in Plant Science*, **6**: 273 – 278.
- Ma, Q., Z. Rengel y J. Kuo. 2002. Aluminum toxicity in Rye (*Secale cereale*): root growth and dynamics of cytoplasmic Ca²⁺ in intact root tips. *Annals of Botany*, **89**: 241 – 244.
- Ma, J. F., R. Shen, S. Nagao y E. Tanimoto. 2004. Aluminum Targets Elongating Cells by Reducing Cell Wall Extensibility in Wheat Roots. *Plant Cell Physiology*, **45**: 583 – 589.
- Ma, B., J. Wan y Z. Shen. 2007. H₂O₂ production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. *Plant Growth Regulation*, **52**: 91 – 100.
- Marshner, H. 1995. *Mineral Nutrition of higher plants*. 2ª ed. Academic Press. London.

889 p.

- Matsumoto, H., E. Hirasawa, S. Morimura y E. Takahashi. 1976. Localization of aluminium in tea leaves. *Plant and Cell Physiology*, **17**: 627 – 631.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, **7**: 405 – 410.
- Mittler R., S. Vanderauwera, M. Gollery y F. Van Breusegem. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Science*, **9**: 490 – 498.
- Mittler R., y T. L. Poulos. 2005. Ascorbate peroxidase. En: Smirnoff, N. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Blackwell Publishing. UK. 87 – 100 pp.
- Morita, A., O. Yanagisawa, s. Takatsu, S. Maeda y S. Hiradate. 2008. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry*, **69**: 147 – 153.
- Mossor-Pietraszewska T. 2001. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, **48**: 673 – 686.
- Natural Resource and Water Depart. 2006. *Soil Acidification*. Queensland, USA. <http://www.nrw.qld.gov.au/factsheets/pdf/land/145.pdf>
- Naumann A., U. Hunz, H. Lehmann, R. Stelzer y W. J. Horst. 2001. Effect of aluminium on root morphology of *Hydrangea macrophylla*. *Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems*, **2001**: 516 – 517.
- Noctor G., L. Gomez, H. Vanacker y C. H. Foyer. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1283 – 1304.
- Oficina del Programa de Gobierno, 2002. Municipio de Zozocolco de Hidalgo. Gobierno del Estado de Veracruz <<www.zozocolco.gob.mx>>. Consultada en Noviembre de 2005.
- Osaki, M., T. Watanabe y T. Tadano. 1997. Beneficial effect of Aluminum on growth of plants adapted to low pH soils. *Soil Science Plant Nutrition*, **43**: 551 – 563.
- Osaki, M. S. Yamada, T. Ishizawa, T. Watanabe, T. Shinano, S. J. Tuah y M. Urayama. 2003. Mineral characteristics of leaves of plants from different phylogeny grown in various soil types in the temperate region. *Plant Foods for Human Nutrition*, **58**: 117 – 137.
- Osawa H., y H. Matsumoto. 2001. Possible Involvement of Protein Phosphorylation in Aluminum-Responsive Malate Efflux from Wheat Root Apex. *Plant Physiology*, **126**: 411 – 420.

- Ownby, J.D. 1993. Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treatment wheat roots. *Physiological Plantarum*, **87**: 371 – 380.
- Peralta, P. 2002. Las especies del género *Tibouchina* (Melastomataceae) en Argentina. *Darwiniana*, **40**: 107 – 120.
- Piñeros, M. A., J. V. Magalhaes, V. M. C. Alves y L. V. Kochian. 2002. The physiology and biophysics of an aluminum tolerant mechanism base on root citrate exudation in maize. *Plant Physiology*, **129**: 1194 – 1204.
- Piñeros, M. A., y L. V. Kochian. 2001. A Patch-Clamp Study on the Physiology of Aluminum Toxicity and Aluminum Tolerance in Maize. Identification and Characterization of Al³⁺-Induced Anion Channels. *Plant Physiology*, **125**: 292 – 305.
- Puthota V., R. Cruz-Ortega, J. Johnson y J. Ownby. 1991. An ultrastructural study of the inhibition of mucilage secretion in the wheat root cap by aluminium. En Plant-soil interactions at low pH. R.J. Wright *et al.*, (Eds). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 779 – 787 pp
- Quiñones K. 2007. *Organic matter and exchangeable Aluminum interactions in soils cultivated with coffee (Coffea arabica)*. Tesis de Maestría Universidad de Puerto Rico. 127 p.
- Ramírez-Benítez E., L. Chee-González, S. M. T. Hernandez-Sotomayor. 2008. Aluminium induces changes in organic acids metabolismo in Coffea arabica suspensión cells with differential Al-tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **102**: 1631 – 1637.
- Ramos, J. M., M. Delgado, S. Amo del y E. Fernández. 1982. Análisis estructural de un área de vegetación secundaria en Uxpanapan, Veracruz. *Biotica*, **7** (1): 7 – 29.
- Reiter R. J. 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the ageing brain. *The FASEB Journal*, **9**: 526 – 533.
- Rengel Z., y W. H. Zhang. 2003. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist*, **159**: 295 – 314.
- Rincón M., y R. Gonzales. 1992. Aluminum Partitioning in Intact Roots of Aluminum-Tolerant and Aluminum-Sensitive Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Plant Physiology*, **99**: 1021 – 1028.
- Ryan, P. R., M. Skerrett, G. P. Findlay, E. Delhaize y S. D. Tyerman. 1997. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 6547 – 6552.
- Ryan P. R., E. Delhaize, D. L. Jones. 2001. Funtion and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 527 – 560.

- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, **101**: 7 – 12.
- Schildknecht, P.H.P.A., y B. Campos. 2002. A role for the cell wall in Al³⁺ resistance and toxicity: crystallinity and availability of negative charges. *Int Arch Biosci*, **2002**: 1087 – 1095.
- Schmohl N., y W. J. Horst. 2000. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant, Cell and Environment*, **23**: 735 – 742.
- Schmohl N. y W. J. Horst. 2001. Cell – wall composition modulates aluminium toxicity. *Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems*, **2001**: 262 – 263.
- Sharma P., y R. S. Dubey. 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, **26**: 2027 – 2038.
- Shen, R., y J. F. Ma. 2001. Distribution of Aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Jornal of Experimental Botany*, **52**: 1683 – 1687.
- Shen, R., J. F. Ma, M. Kyo y T. Iwashita. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, **215**: 394 – 398.
- Shen R. F., R. F. Chen y J. F. Ma. 2006. Buckwheat accumulates aluminum in leaves but not in seeds. *Plant and Soil*, **284**: 265 – 271.
- Shigeoka S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta y K. Yoshimura. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1305 – 1319.
- Šimonovičova M., L. Tamás, J. Huttová y I. Mistrík. 2004. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biologia Plantarum*, **48**: 261 – 266.
- Sivaguru, M., y W. J. Horst. 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology*, **116**: 155 – 163.
- Sivaguru, M., F. Baluška, D. Volkmann, H. H. Felle y W. J. Horts. 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**: 1073 – 1082.
- Sivaguru M., T. Fujiwara, J. Samaj, F. Baluska, Z. M. Yang, H. Osawa, T. Maeda, T. Mori, D. Volkmann y H. Matsumoto. 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**: 991 – 1005.

- Sivaguru, M., Y. Yamamoto, Z. Rengel, S. J. Ahn y H. Matsumoto. 2005. Early events responsible for aluminum toxicity symptoms in suspension-cultured tobacco cells. *New Phytologist*, **165**: 99 – 109.
- Sivaguru, M., W. J. Horst, D. Ethica y H. Matsumoto. 2006. Aluminum inhibits apoplastic flow of high-molecular weight solutes in root apices of *Zea mays* L. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **169**: 679 – 690.
- Suarez D. L. 1996. Beryllium, Magnesium, Calcium, Strontium and Barium. En: Segoe, S. *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. 677 p.
- Standley, P. C. 1924. Trees and shrubs of Mexico. *Smithsonian Institution U.S. National Musseum*, **23**; 1047 – 1074.
- Standley, P. C. and L. O. Williams. 1963. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, **24**: 407 – 525.
- Taiz L., y E. Zeiger. *Plant Physiology*. 4^a ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.
- Tahara K., M. Norisada, T. Hogetsu y K. Kojima. 2005. Aluminum tolerance and aluminum induced deposition of callose and lignin in the root tips of *Melaleuca* and *Eucalyptus* species. *Journal of Forest Research*, **10**: 325 – 333.
- Takeda K., M. Kariuda y H. Itoi. 1985. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochemistry*, **24**: 2251 – 2254.
- Todzia, C. A. 1995. Melastomataceae. *Flora del Valle de Tehuacan – Cuicatlán*, Fascículo **8**.
- Van Breusegem F., E. Vranová, J. F. Dat y D. Inze. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, **161**: 405 – 414.
- Villavicencio M. A., y B. E. Pérez. 2005. *Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo*. Pachuca, UAEH. 171 pp.
- Vranová E., D. Inzé y F. Van Breusegem. 2002. Signal transduction Turing oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1227 – 1236.
- Wang, Y., A. Stass y W. J. Horts. 2004. Apoplastic binding of Aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology*, **136**: 3762 – 3770.
- Watanabe, T., M. Osaki y T. Tadano. 1997. Aluminum induced growth stimulation in relation to Calcium, Magnesium, and Silicate Nutrition in *Melastoma malabathricum* L. *Soil Science Plant Nutrition*, **43**: 827 – 837.

- Watanabe, T., M. Osaki, T. Yoshihara y T. Tadano. 1998. Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, **201**: 165 – 173.
- Watanabe, T y M. Osaki. 2001. Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, **237**: 63 – 70.
- Watanabe, T, M. Osaki y T. Tadano. 2001. Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. – an Al accumulator plant. *Plant and Soil*, **231**: 283 – 291.
- Watanabe T., y M. Osaki. 2002a. Role of organic acids in aluminum accumulation and plant growth in *Melastoma malabathricum*. *Tree Physiology*, **22**: 785 – 792.
- Watanabe T., y M. Osaki. 2002b. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. *Communications of Soil Science Plant Analysis*, **33**: 1247 – 1260.
- Watanabe, T. S. Jansen y M Osaki. 2004. The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*. *New Phytologist*, **165**: 773 – 780.
- Watanabe, T., S. Misawa y M. Osaki. 2005. Aluminum accumulation n the roots of *Melastoma malabathricum*, an aluminum-accumulating plant. *Canadian Journal of Botany*, **83**: 1518 – 1522.
- Watanabe, T. S. Jansen y M Osaki. 2006. Al – Fe interactions and growth enhancement in *Melastoma malabathricum* and *Micanthus sinensis* dominating acid sulphate soils. *Plant, Cell and Environment*, **29**: 2124 – 2132.
- Watanabe, T., S. Misawa, S. Hirdate y M. Osaki. 2008. Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, **178**: 581 – 589.
- Yamamoto, Y., Y. Kobayashi, H. Matsumoto. 2001. Lipid Peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology*, **125**: 199 – 208.
- Yamamoto Y., Y. Kobayashi, S. Devi, S. Rikiishi y H. Matsumoto. 2002. Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*, **128**: 63 – 72.
- Yang, Z., M. Sivaguru, W. Horst y H. Matsumoto. 2000. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). *Physiological Plantarum*, **110**: 72 – 77.
- Yang Z-M., H. Yang, J. Wang, Y-S. Wang. 2004. Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora*. *Plant Science*, **166**: 1589 – 1594.

- Yokota H., a. Morita y F. Ghanati. 2005. Growth characteristics of Tea plants and Tea fields in Japan. *Soil Science Plant Nutrition*, **51**: 625 – 627.
- Zhang, W. H., P. R. Ryan y S. D. Tyerman. 2001. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiology*, **125**: 1459 – 1472.
- Zhang, W.H., y Z. Rengel. 1999. Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiology*, **26**: 401 – 409.
- Zheng, S. J., X. Lin, J. Yang, W. Liu y C. Tang. 2004. The kinetics of aluminum adsorption and desorption by root cel walls of an aluminum resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar. *Plant and Soil*, **261**: 85 – 90.
- Zheng, S. J., y J. L. Yang. 2005. Target sites of aluminum phytotoxicity. *Biological Plantarum*, **49**: 321 – 331.