



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



ESTRATEGIAS DE RESISTENCIA A ALUMINIO EN DOS VARIEDADES DE *Oryza sativa*: EXCLUSIÓN vs DETOXIFICACIÓN

Memoria para optar al grado de doctor en Biología Vegetal y
Biotecnología presentada por

MAITE ROSELLÓ SERRA

Programa de doctorado en Biología Vegetal y Biotecnología
del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal y
Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Directoras
Charlotte Poschenrieder Wiens
Mercè Llugany Ollé

Dr.Charlotte Poschenrieder Wien

Dr.Mercè Llugany Ollé

Maite Roselló Serra

Bellaterra, Septiembre de 2016

*Papa, no has pogut veure la fi
d'aquest projecte però estàs
més a prop meu que mai,
sempre t'estaré agraida.*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias al Dr. Joan Barceló por darme la oportunidad de entrar en este equipo y por su constante amabilidad que hace que me haga sentir como en casa, siempre desde el sentido de la responsabilidad.

Quiero agradecer a las doctoras Charlotte Poschenrieder y Mercè Llugany su confianza en mí para trabajar en este proyecto, darme todo tipo de facilidades y también por el entusiasmo y la ayuda mostrada durante todos estos años de estudio.

Este agradecimiento lo quiero extender a los miembros de la Unidad de Fisiología Vegetal, tanto a los doctores que lo componen (Josep Allué, Isabel Corrales, Benet Gunsé, Soledad Martos y Roser Tolrà) como a algunos compañeros que actualmente ya son doctores o bien están en el trayecto con los que he compartido grandes momentos. Entre ellos quiero destacar a la Dr. Soledad Martos que me ha ayudado y animado en momentos complicados y las Dr. Catalina Arroyave y Berta Gallego por la paciencia y ayuda. Y también agradecer la ayuda de Rosa Padilla y Salvador Bartolomé en su trabajo como técnicos.

También quisiera dar las a Ferran Sánchez Sanuí, estudiante de Microbiología que ha colaborado desinteresadamente en este estudio.

Y cómo no, a mi familia les agradezco infinitamente toda la atención, apoyo y paciencia que han tenido, pues sin ellos habría estado imposible llegar hasta aquí. Quiero citar especialmente a mis padres por su ayuda y esfuerzo incondicionales, y a Edgar, que no sólo me ha acompañado en este reto sino que siempre ha estado presente en todo momento, ayudándome, animándome y haciéndome sentir querida, como siempre.

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa*) es un cultivo altamente tolerante a Al. Entre otros mecanismos, una mayor expresión de los genes *STAR1* / *STAR2* como también de *Nrat1* y *ALS1* puede al menos en parte ser responsable de la tolerancia inducible por Al en esta especie. Se analizaron las distintas respuestas a Al en dos variedades de arroz Nipponbare y Modan. Todos los marcadores de toxicidad / tolerancia analizados (crecimiento de la raíz, azul de Evans, tinciones con hematoxilina y morin) indicaron una tolerancia a Al superior en la variedad Nipponbare que en Modan. Nipponbare acumuló mucho menos Al en las raíces que Modan. El suministro de aluminio provocó la expresión más fuerte de *STAR1* en Nipponbare que en Modan. En las raíces de Nipponbare se encontró un aumento claramente mayor de la acumulación de ácido abscísico (ABA) inducido por Al que en las raíces de Modan. Se observaron altos niveles de ABA y JA en Nipponbare después de 48 h de exposición a Al. Estos picos coincidieron en el tiempo con el nivel de expresión más alto de *STAR1*. Se propone que ABA y JA puede ser necesario para la remodelación de la pared celular facilitado por el mayor transporte de UDP-glucosa a las paredes a través del complejo *STAR1* / *Star2*. En contraste, en las raíces de Modan la expresión tanto de *NRAT1*, que codifica para una membrana plasmática transportadora de Al, como de *ALS1*, que codifica para un transportador de Al localizado el tonoplasto, mejoraron considerablemente en presencia de Al. Por otra parte, Modan tenía una mayor expresión de *ASR1* inducido por Al, un gen que se ha propuesto para codificar una proteína que actúa como secuestrador de oxígeno reactivo. En conclusión, la estrategia de exclusión de Al de Nipponbare, mediada al menos en parte por *STAR1* y probablemente regulada por ABA, produjo una mejor protección contra la toxicidad de Al que la estrategia de

acumulación y desintoxicación interna de Modan mediada por NRAT1, ALS1 y ARS1.

Índice.

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Características de la especie <i>Oryza sativa</i>	1
1.2	Importancia del arroz	3
1.3	Toxicidad del Aluminio.....	4
1.4	Mecanismos de fitotoxicidad del Al.....	6
1.5	Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo	8
1.6	El aluminio como agente de estrés oxidativo.....	9
1.7	El aluminio y las hormonas vegetales.....	11
1.8	Mecanismos de resistencia al aluminio	12
1.9	Genes implicados en la resistencia a aluminio	14
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1	Material vegetal	21
3.2	Diseño experimental: condiciones de crecimiento y solución nutritiva	21
3.3	Tratamientos y actividad del Aluminio.....	23
3.4	Ensayos de tinción	24
3.4.1	Tinción con hematoxilina	24
3.4.2	Tinción de azul de Evans.....	24
3.4.3	Tinción con morin.....	25
3.4.4	Tinciones para visualizar especies reactivas de oxígeno (ROS)	26
3.4.4.1	Tinción de peróxidos (H ₂ O ₂)	26
3.4.4.2	Tinción de superóxidos (O ₂ ⁻).....	26
3.5	Valoraciones analíticas.....	27

3.5.1	Valoración del crecimiento radicular.....	27
3.5.2	Concentraciones de Al y nutrientes minerales.	27
3.5.3	Determinación de MDA.....	28
3.5.4	Contenidos de ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC).....	28
3.5.5	Extracción de RNA, obtención de cDNA y PCR Cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	31
3.5.6	Estadística.....	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Actividad del aluminio a diferentes pHs.....	33
4.2	Crecimiento de la raíz.....	34
4.3	Estabilidad de la membrana.....	36
4.4	Peroxidación de lípidos en la membrana.....	38
4.5	Acumulación de Aluminio.....	40
4.6	Balance de nutrientes.....	43
4.7	Niveles de ABA, JA, SA, y ACC.....	52
4.8	Expresión de genes relacionados con la tolerancia al aluminio.....	55
5	DISCUSIÓN.....	59
6	CONCLUSIONES.....	75
7	BIBLIOGRAFÍA.....	77

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la especie *Oryza sativa*

El arroz es una planta monocotiledónea de la clase Liliopsida perteneciente a la familia de las gramíneas (Poaceae). Se integra dentro del género botánico *Oryza*, que incluye 23 especies clasificadas en dos grandes grupos; *Latifolia*, con las especies salvajes, y *Sativa*, con las dos especies cultivadas, *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*. Ésta última, de origen africano, se cultiva desde el delta central del Níger hasta Senegal, mientras que *Oryza sativa*, de origen asiático y presente en la mayoría de países orizícolas, es la especie más cultivada, con más de 100.000 variedades descritas y 65.000 registradas en el banco de germoplasma del IRRI (International Rice Research Institut, Filipinas).

La mayoría de los cultivares de arroz se incluyen dentro de dos subespecies o razas de arroz, *Oryza sativa* japónica y *Oryza sativa* índica, basado en una serie de rasgos fisiológicos y morfológicos, tales como tolerancia a la sequía, resistencia al clorato de potasio, la reacción de fenol, altura de la planta y color de la hoja (Oka, 1958; Oka, 1988). Estas dos subespecies están asociadas a diferencias en su hábitat, de manera que los arroces índica normalmente se encuentra en las tierras bajas de Asia y los arroces japónica tropical se encuentran típicamente en las colinas de las tierras altas del sur de China, el sudeste de Asia, y Indonesia, así como en las zonas el arrozeras fuera de Asia (África, América del Norte y América del Sur) (Khush, 1997). La subespecie japónica a su vez se diferencia en las formas tropical (javánica) y templadas (japónica), siendo la forma templada probablemente un derivado de la japónica tropical (Garris et al., 2004).

Los granos de arroz que carecen de latencia germinan inmediatamente después de la maduración. En las variedades latentes, un período de dormición precede a la germinación. La coleorriza envuelve la radícula, que sobresale en primer lugar si la germinación ocurre en un ambiente aireado, mientras que si el grano está sumergido en agua, el coleóptilo emerge por delante de la coleorriza (Fig1).

La raíz seminal primaria (radícula) rompe a través de la coleorriza poco después de que ésta aparece y es seguida por dos o más raíces seminales secundarias, de las cuales se desarrollan las raíces laterales.

Esta planta anual presenta raíces de dos tipos; las raíces seminales, que se originan de la radícula y son de naturaleza temporal y las raíces adventicias secundarias, que tienen una libre ramificación y se forman a partir de los nudos inferiores del tallo joven. Estas últimas sustituyen las raíces seminales. El tallo se forma a partir de nudos y entrenudos alternados, es cilíndrico, fistuloso de 60 a 120 cm de longitud y las hojas son alternas, con una lámina plana y unidas al tallo por una vaina. Las flores son de color verde blanquecino dispuestas en espiguillas constituyendo una panícula de las que se obtiene el grano de arroz.

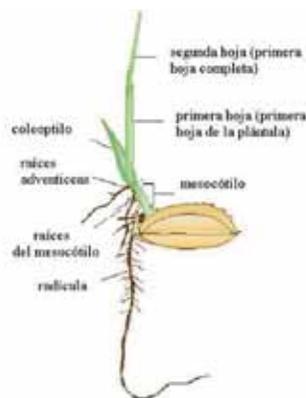


Fig. 1. Esquema de la plántula de arroz mostrando la radícula, el mesocótilo, el coleóptilo y la primera hoja.

Se trata de un cultivo tropical y subtropical, puesto que la mayor producción a nivel mundial se concentra en los climas húmedos tropicales, pero también se puede cultivar en las regiones húmedas de los subtrópicos y en climas templados.

1.2 Importancia del arroz

De acuerdo con el Instituto de Investigación de Arroz Internacional, el arroz (*Oryza sativa* L.) es el alimento básico de más de 3,5 mil millones de personas en todo el mundo, lo que representa alrededor de la mitad de la población mundial (Xu, 2016).

El arroz es el cultivo alimentario más importante en el mundo y una fuente primaria de alimento para más de un tercio de la población mundial, proporcionando el 20% del suministro de energía alimentaria y es el alimento básico predominante para 17 países de Asia, 9 países de Norte y Sur América y 8 países de África. El arroz se siembra en alrededor de 148 millones de hectáreas anuales, siendo el 11% de las tierras cultivadas del mundo y más del 90% del arroz mundial es cultivado y consumido en Asia. Si bien el trigo tiene una superficie ligeramente mayor el arroz es el cultivo de cereales más importante que se consume casi exclusivamente por el hombre (Khush, 1997). En este sentido el estrés abiótico es la principal causa de pérdida de la cosecha mundial, reduciendo los rendimientos medios para la mayoría de los principales cultivos en más de un 50% y causando pérdidas por valor de cientos de millones de dólares cada año debido a la reducción en la productividad de los cultivos y las malas cosechas (Mahajan y Tuteja, 2005).

Además de ser un cultivo básico en todo el mundo el arroz es la especie más resistente a aluminio de entre los cultivos de cereal de grano pequeño (Foy, 1988) y en el ámbito científico

está considerada como modelo de planta monocotiledónea, dado el pequeño tamaño de su genoma (Tyagi *et al.*, 1999). Dichas peculiaridades proporcionan a esta planta un interés notorio en el estudio teórico de sus mecanismos de resistencia a este metal. Si bien poco se sabe acerca de los estrategias de resistencia a Al en el arroz los estudios genéticos de los últimos años han contribuido a dilucidar algunos de los mecanismos.



Arroz > Trigo > Cebada > Centeno

Fig. 2. Imágenes del orden de la tolerancia al aluminio en diferentes especies de cereales.

1.3 Toxicidad del Aluminio

El aluminio (Al) es el metal más abundante en la corteza terrestre, lo que constituye aproximadamente el 7% de la tierra (Wolt, 1994). El aluminio está presente en el suelo en diferentes formas, con un rango de solubilidad diferencial que va desde las formas precipitadas hasta las especies monoméricas solubles ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$). Dentro de este último grupo se ha observado que el octaedro hexahidrato $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, a menudo llamado simplemente Al^{3+} , parece ser la especie rizotóxica más

importante (Kinraide, 1991; Kinraide y Parker, 1990). Esta forma monomérica es solubilizada en la solución de suelos con $\text{pH} < 5.5$, obteniendo la mayor actividad a $\text{pH} \leq 4$ (Fig. 3).

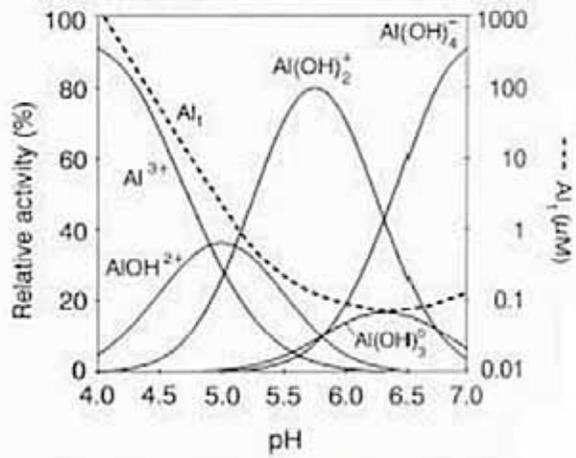


Fig. 3. Actividad relativa de especies monoméricas de Al y concentración total de Al (línea punteada) en función del pH (Kinraide, 1991)

Esta propiedad presente en la forma Al^{3+} supone un problema muy importante en la supervivencia de las especies vegetales, puesto que una gran parte de las tierras a nivel mundial presentan suelos ácidos. En la Fig. 4 se representa la distribución de suelos según la acidez de la superficie terrestre del planeta, donde se aprecia que aproximadamente el 30% y más del 50% de las tierras potencialmente cultivables son ácidas y la mayoría (60%) se encuentran en los trópicos y subtrópicos (von Uexküll y Mutert, 1995).

De esta manera, puede ser perjudicial para muchas plantas, especialmente en algunas que se cultivan ampliamente como el trigo, el arroz, la soja y el maíz. Por ello, la toxicidad del Al es una materia muy estudiada en la investigación agrícola en el mundo. (Jansen *et al.*, 2004, Vitorello *et al.*, 2005)

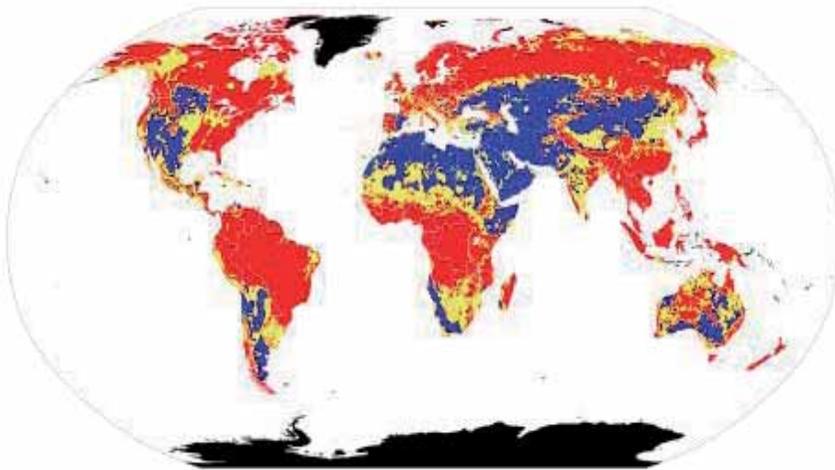


Fig. 4. Distribución de suelos ácidos en el mundo. Rojo: suelos ácidos. Amarillo: suelos neutros. Azul: suelos alcalinos. Negro: sin datos.

1.4 Mecanismos de fitotoxicidad del Al

El grado de toxicidad del Al es muy variable dependiendo de la especie de planta, las condiciones de crecimiento, las concentraciones de Al y la duración de la exposición (Delhaize y Ryan 1995; Kochian *et al.*, 2004).

El aluminio interfiere con una amplia gama de procesos físicos y celulares. Como este metal es muy reactivo, existen muchos puntos potenciales de lesiones debido a las interacciones del complejo de este metal con el apoplasto (pared celular), la membrana plasmática, y las dianas del simplasto (citósol). El Al^{3+} es un ion metálico de la clase A y, por lo tanto, con alta afinidad por ligandos tipo donadores de oxígeno. Así los sistemas biológicos ofrecen múltiples dianas para la toxicidad del Al^{3+} . El aluminio puede unirse a los grupos carboxilo de las sustancias pécticas en la pared celular, a grupos fosfato y sulfato de las membranas

causando cambios estructurales y afectando las propiedades físicas y funcionales de las mismas (Ma *et al.*, 2004a; Poschenrieder *et al.*, 2008). A nivel intracelular, sus dianas incluyen el citoesqueleto de la raíz (Grabski y Schindler, 1995; Blancaflor *et al.*, 1998), transportadores de iones (Huang *et al.*, 1992; Liu y Luan, 2001), constituyentes de los sistemas de señalización (Haug *et al.*, 1994; Jones y Kochian, 1995), el ADN nuclear (Kochian *et al.*, 2005), y otros componentes celulares y enzimas (Jones and Kochian, 1997), muchos de los cuales están cargados negativamente o coordinan cofactores cargados positivamente (Kochian, 1995). Su catión trivalente (Al^{3+}) puede formar complejos muy estables con ligandos orgánicos donadores de oxígeno, como pueden ser los ácidos orgánicos, los ácidos nucleicos y las sustancias fenólicas (Poschenrieder *et al.*, 2008).

El aluminio daña las células del ápice radicular y provoca una inhibición en la elongación de la raíz, lo que da ápices hinchados en la raíz y un nulo o pobre desarrollo de los pelos radiculares. El efecto nocivo sobre el crecimiento longitudinal de las raíces ocurre rápidamente, en minutos (Llugany *et al.*, 1995). Esto da lugar, a más largo plazo a un sistema radicular reducido, dañado y limitado en la absorción de agua y nutrientes minerales (Barceló y Poschenrieder, 2002; Jones y Kochian, 1995). Esto limita fuertemente el rendimiento agronómico (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2004; Delhaize *et al.*, 2012).

El efecto tóxico primario del Al se produce en la zona de transición de la raíz, localizada entre la zona de división celular activa y la zona de elongación celular, es la más sensible a aluminio (Sivaguru y Horst, 1998), causando la inhibición rápida tanto en la expansión de células (Gunsé *et al.*, 1997; Kopittke, 2015) como en la división celular (Vázquez *et al.*, 1999, Doncheva *et al.*, 2005). Una interacción directa del Al con el entrecruzamiento de las cargas negativas de los

pectatos de las paredes celulares puede conducir a la rigidez de la pared celular y una menor expansión celular (Kopittke, 2015). De hecho, la exposición a Al causa una mejora rápida del módulo elástico, es decir, una disminución de la elasticidad en la capa de células más externa en las raíces de maíz sensibles a Al (Gunsé *et al.*, 1997).

1.5 Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo

En condiciones fisiológicas normales, las células producen especies reactivas de oxígeno (ROS) -como los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) - a través de la reducción de oxígeno molecular (Hippeli *et al.*, 1999). Las ROS se generan como subproductos del transporte de electrones que se da a las membranas de mitocondrias, cloroplasto y peroxisomas. Para protegerse del daño oxidativo, las células vegetales han desarrollado una amplia gama de mecanismos de defensa endógenos, ya sea sistemas antioxidantes enzimáticos como no enzimáticos (Howe y Schillmiller, 2002; Mittler, 2002). Los sistemas antioxidantes enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), el ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión reductasa (GR), mientras que los antioxidantes no enzimáticos son compuestos de bajo peso molecular como el ácido ascórbico (ASA) y el glutatión reducido (GSH). La enzima SOD dismuta el (O_2^-) en H_2O_2 y el oxígeno. Las catalasas se sintetizan en los peroxisomas y su duración depende del H_2O_2 generado durante la fotorrespiración y la β -oxidación de ácidos grasos. Las peroxidases, que se encuentran en el citosol, la vacuola, la pared celular y en el espacio extracelular, utilizan el H_2O_2 de la oxidación de diversos sustratos orgánicos e inorgánicos. Por otra parte, la ASA y el GSH pueden directa o indirectamente interactuar con las ROS y mantener la

integridad de las estructuras y las funciones propias de las diversas vías metabólicas (Noctor y Foyer, 1998; Smirnoff, 2000). Además, estos últimos también tienen un papel en la fotosíntesis, la señalización redox y la regulación del crecimiento y por ejemplo, durante la germinación de algunas plantas herbáceas, el contenido de ASA aumenta para hacer frente a un mayor nivel de ROS (Gara *et al.*, 1997, Kranner y Grill, 1993). Ahora bien, se ha demostrado que el estrés ambiental (cambios en la temperatura, sequía, salinidad, temperaturas extremas, deficiencia de nutrientes, exceso de iones metálicos, ...) causa daño molecular a las plantas, ya sea directa o indirectamente a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Richards *et al.* 1998; Mittler, 2002), pues los sistemas antioxidantes reducen eficientemente ROS en circunstancias normales, pero en condiciones de aumento de la producción, el resultado puede ser un estado de estrés oxidativo que conduce a la oxidación de biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN, por ejemplo) (Richter y Schweitzer, 1997) o incluso la muerte celular (Buckner *et al.*, 2000; Jones, 2000). En presencia de iones metálicos como el Fe^{2+} o el Cu^{2+} se puede producir estrés oxidativo por la reacción de Fenton, donde el metal interactúa con el H_2O_2 y produce OH (Schützendübel *et al.*, 2001).

1.6 El aluminio como agente de estrés oxidativo

El aluminio causa disfunción mitocondrial, inhibe la respiración celular, reduce el adenosín trifosfato (ATP) y favorece la producción de ROS. La acumulación de aluminio en la célula, afecta inicialmente la actividad de la membrana mitocondrial interna lo que impide el flujo de electrones y disipa el potencial de membrana, esto conlleva a la muerte celular después una exposición prolongada a aluminio. En células fotosintéticas, los cloroplastos son unos de los

principales organelos celulares de formación de ROS a través de la fotosíntesis; mientras que en células de plantas no fotosintéticas como las células de la raíz y en cultivos celulares no clorofílicos, se ha evidenciado que la cadena transportadora de electrones de la mitocondria es el principal sitio de producción (Yamamoto *et al.*, 2003).

El estrés oxidativo provocado por Al^{3+} también puede inducir la muerte celular, como se ha observado en las puntas de las raíces de cebada (Pan *et al.*, 2001), y en trigo (Delisle *et al.*, 2001) . Los iones Al^{3+} aumentan la peroxidación de los fosfolípidos y proteínas (Yamamoto *et al.*, 1997, 2001 ; Boscolo *et al.*, 2003), y la formación de ROS (anión superóxido, presumiblemente) en tabaco (Yamamoto *et al.*, 2002) y de superóxidos y peróxidos en trigo (Darko *et al.*, 2004), especialmente en genotipos sensibles a Al (Darkó *et al.*, 2004; Tabaldi *et al.*, 2009; Giannakoula *et al.*, 2010).. Sin embargo, aún se desconoce si el ión Al induce directamente ROS incluyendo H_2O_2 pues el ión Al no puede por sí mismo catalizar las reacciones redox. Se ha sugerido que el aumento por el Al de la peroxidación de los lípidos mediada por Fe lleva a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y, finalmente, la muerte celular (Yamamoto *et al.*, 1997). El Al también activa varios genes que codifican las enzimas antioxidantes como la peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa (Richards *et al.*, 1998; Ezaki *et al.*, 1996, 2000), lo que indica mecanismos comunes inducidos por el tratamiento de Al y el estrés oxidativo. Recientemente, se ha sugerido que la formación de ROS es una respuesta secundaria de estrés por Al y el estrés oxidativo no es la principal causa de la inhibición del crecimiento de la raíz inducida por el Al (Yamamoto *et al.*, 2001 ; Boscolo *et al.*, 2003). Añadiendo Fe^{2+} , la acumulación de Al a las células del tabaco modifica la estructura física de la membrana, lo que facilita la propagación de la peroxidación lipídica, iniciada por Fe^{2+} y eventualmente

causando la muerte de la célula (Ono *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1997; Ikegawa *et al.*, 2000).

Se ha visto que el ácido salicílico (SA) tiene un papel importante en la mediación de algunos tipos de estrés bióticos y abióticos inducido por estrés oxidativo en plantas, aunque se desconoce el papel del SA en la mediación de estrés oxidativo inducido por el aluminio (Wang *et al.*, 2004).

1.7 El aluminio y las hormonas vegetales

La rápida inhibición de la división celular en el meristemo apical de la raíz no se debe a un efecto citotóxico general de Al, sino que es debido a un cambio en el patrón celular que conduce a la estimulación de la división celular en la zona de transición distal y al brote de nuevas raíces laterales. Este crecimiento adaptativo de las raíces que pueden ayudar a la planta a crecer en zonas de suelos menos tóxicos está regulada por fitohormonas. En especies sensibles a Al los cambios rápidos en los niveles endógenos de citoquinina y etileno preceden a la inhibición de la elongación de la raíz inducida por Al, ya sea directamente o indirectamente al afectar la homeostasis hormonal de la planta (Gunsé *et al.*, 2000, Massot *et al.*, 2002) y un aumento local de la concentración de auxina es provocada tanto por la reducción del transporte de auxina (Kollmeier *et al.*, 2000, Amenós *et al.*, 2009) como del aumento de la biosíntesis de auxina (Yang *et al.*, 2014). Estudios con *A. thaliana* también indican que la producción de etileno inducida por Al probable actúe como una señal para alterar la distribución de auxina en las raíces mediante la interrupción del transporte polar de auxina, lo que lleva a la detención de la elongación de la raíz (Sun *et al.*, 2010). Otros estudios con células en suspensión de *A. thaliana* han demostrado el papel del aluminio sobre la

biosíntesis y acumulación de ácido salicílico (SA) y la relación positiva de esta fitohormona con la producción de especies reactivas de oxígeno (Kunihiro *et al.*, 2011), mientras que en *Cassia tora* SA inhibió la producción de ROS inducida por Al.

Por otra parte, la exposición a Al reduce las concentraciones endógenas de ácido abscísico (ABA) en las raíces de las plantas de frijol sensibles a Al, resultando plantas más sensibles a la sequía (Yang *et al.*, 2012). Sin embargo la información que se dispone acerca de la señalización del estrés por Al en especies resistentes a Al es considerablemente menor.

1.8 Mecanismos de resistencia al aluminio

Exclusion y mecanismos internos de desintoxicación son las dos estrategias principales que en diferente proporción cooperan en la resistencia a la toxicidad del Al en las plantas. La importancia relativa de ambas estrategias en diferentes especies se refleja en el amplio rango de concentraciones de Al que se puede hallar en las hojas de las plantas que va desde unas pocas decenas de $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ en plantas excluseras hasta decenas de miles en plantas hiperacumuladoras de Al como la planta de té (Matsumoto *et al.*, 1976).

Las plantas tienen varios mecanismos celulares que pueden estar implicados en la detoxificación de metales y, por tanto, en la tolerancia o resistencia al estrés provocado por estos metales. En el caso del Al, algunas especies de plantas o cultivos dentro de la misma especie han desarrollado sofisticados mecanismos de desintoxicación externos, o de exclusión, e internos para hacer frente a la toxicidad de este

metal (Kochian, 1995; Matsumoto, 2000; Barceló y Poschenrieder, 2002 ; Kochian *et al.*, 2004). La principal diferencia entre estos dos tipos se encuentra en el lugar de desintoxicación del aluminio, el simplasto (interno) o el apoplasto (externo). Los mecanismos propuestos para la desintoxicación externa incluyen la inmovilización del aluminio en la pared celular, la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, una barrera de pH inducida por la planta en la rizosfera o en el apoplasto de la raíz e inmovilización del aluminio en la pared celular gracias a la producción de calosa (Jones *et al.*, 2006)., la exudación de ligandos quelantes, la salida de Al por exudación de fosfato (Taylor, 1991; Kochian, 1995). Por el contrario, los mecanismos de detoxificación internos incluyen la quelación en el citosol por los ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato principalmente), proteínas, u otros ligandos orgánicos, la compartimentación en la vacuola (Hall, 2002), y la actividad de enzimas tolerantes a Al.

El mecanismo de exclusión mejor documentado es el eflujo de ácidos orgánicos inducido por el Al en los ápices de raíces de una serie de especies vegetales resistentes (Ma *et al.*, 2001; Kochian *et al.*, 2004). Según las especies esta exudación puede ser inmediatamente (patrón 1 de tipo de exudación) o después de un lapso de tiempo de horas o incluso días después de la exposición (patrón de tipo 2) (Ma *et al.*, 2014). Se ha observado un flujo de salida destacado de malato y/o citrato en los genotipos resistentes a Al de trigo (Ryan *et al.*, 1995; García-Oliveira *et al.*, 2014), sorgo (Magalhaes *et al.*, 2007), y frijol (Rangel *et al.*, 2010), entre otras especies de cultivos importantes. El oxalato parece ser el quelante de Al más importante en exudados de las raíces de algunas especies altamente tolerantes a Al como el trigo sarraceno (Reyna-Llorens *et al.*, 2015).

Sin embargo, ahora hay cada vez más pruebas de que en la muy alta resistencia a Al observada en algunas *Poaceae* como *Brachiaria decumbens* y arroz, la especie más resistente a Al de entre los cultivos de cereales de grano pequeño (Foy, 1988), la liberación de ácidos orgánicos por las puntas de las raíces no es el único ni el principal factor responsable del alto nivel de resistencia (Wenzl *et al.*, 2001; Yamaji *et al.*, 2009). Un rasgo característico de *B. decumbens*, una especie de origen africano hiperresistente a Al, es el desarrollo de pelos de la raíz muy cercano al extremo apical de la raíz y el desarrollo de un exodermis también muy cerca de la punta (Arroyave *et al.*, 2013). El aluminio se acumula en las células de estos pelos radiculares. Esto puede reducir la unión del Al en el apoplasto. Los niveles más altos de ácido clorogénico un inductor conocido de los pelos radicales puede contribuir a esto (Arroyave *et al.*, 2013).

1.9 Genes implicados en la resistencia a aluminio

Indudablemente la identificación de genes involucrados en los mecanismos de tolerancia a Al en plantas, han permitido avances importantes en la obtención acerca de la tolerancia a aluminio. Entre los genes más destacados se encuentran aquellos que codifican transportadores de membrana, factores de transcripción y aquellos que participan en la mitigación del estrés oxidativo, los cuales se detallan más adelante.

Los estudios moleculares y genéticos han contribuido a la identificación de genes asociados con la tolerancia al aluminio. Estos genes incluyen los implicados en la secreción de anión de ácido orgánico ALMT, MATE, las familias de transportadores ABC y factores de transcripción con

elementos cis que están altamente implicados en la expresión de genes de tolerancia a Al (Simões *et al.*, 2012).

Los genes de la familia ALMT codifican por transportadores de malato activados por el aluminio. El primer gen aislado fue *TaALM1* en trigo (Sasaki, 2004) pero también se han encontrado en *A. thaliana*, *AtALM1* (Hoekenga *et al.*, 2006), colza, *BnALMT1* y *BnALMT2* (Ligaba *et al.*, 2006), centeno, *ScALMT1* (Collins *et al.*, 2008), cebada, *HvALMT1* (Gruber *et al.*, 2010) y maíz, *ZmALMT1* (Piñeros *et al.*, 2008) y *ZmALMT2* (Ligaba *et al.*, 2012), aunque en el último caso los dos miembros de la familia ALMT, no se han podido asociar con tolerancia al Al.

La familia MATE (extrusión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos) incluye genes asociados con diversos procesos celulares, incluyendo la tolerancia al aluminio, codificando transportadores de citrato. En sorgo el transportador codificado por *SbMATE* se localizó en la membrana plasmática de células de la punta de la raíz (Magalhaes *et al.*, 2007), al igual que *HvMATE* de cebada (Furukawa *et al.*, 2007). En *Arabidopsis* *AtMATE* opera en conjunción con la exudación de malato mediada por *AtALMT1* (Liu *et al.*, 2009). Se han identificado homólogos funcionales de este gen en trigo, *TaMATE1*, (Ryan *et al.*, 2009), centeno, *ScFRDL2* (Yokosho *et al.*, 2010) y arroz, *OsFRDL4*, (Yokosho *et al.*, 2011).

Dentro de la familia de transportadores ABC (transportador de unión a ATP) se han encontrado en *Arabidopsis* los genes *AtAls1* y *AtAls3*. El primero se localiza en el tonoplasto de las células del ápice de la raíz y en los tejidos vasculares (Larsen *et al.*, 2007) mientras que *AtAls3* se encuentra en la membrana plasmática de las células del floema. Ambos son responsables del movimiento de aluminio fuera de los tejidos sensibles para el secuestro en los tejidos más tolerantes

(Larsen *et al.*, 2005, 2007). En arroz recientemente se ha identificado *OsAls1* como responsable del secuestro de aluminio a la vacuola (Huang *et al.*, 2012). En 2009 Huang y colaboradores identificaron en arroz los genes *STAR1* y *STAR2* sugiriendo sus funciones en la resistencia a aluminio. *STAR1* codifica un dominio de unión a nucleótido y junto a *STAR2*, que codifica un dominio de transmembrana de un tipo transportador ABC, forman un complejo implicado en el transporte de UDP-glucosa provocando una modificación en la pared celular. A través de este mecanismo se impide que el aluminio entre en las células.

De la familia *Nramp* (proteína del macrófago asociada a resistencia natural) se han descrito varios genes en plantas con función transportadora de metales, como los *AtNramp* de *Arabidopsis* (Thomine *et al.*, 2000). De entre ellos se ha localizado en arroz el gen *Nrat1* es un transportador localizado en la membrana plasmática de las células apicales de la raíz que se ha asociado a la resistencia específica a aluminio (Xia *et al.*, 2010).

Los factores de transcripción juegan un papel clave en la detoxificación del aluminio. En *A. thaliana* se conoce el factor de transcripción STOP1 que regula la expresión de *AtMATE1* y *AtALT1* (Liu *et al.*, 2009; Sawaki *et al.*, 2009). En arroz se han encontrado recientemente factores de transcripción que intervienen en esta detoxificación. ART1 es un homólogo de STOP1 localizado en el núcleo de todas las células de la raíz. ART1 regula la expresión de al menos 31 genes implicados en la desintoxicación interna y externa de Al a diferentes niveles celulares (Yamaji *et al.*, 2009), entre los que se encuentran *OsStar1* y *2*, *OsNrat*, *OsFRDL2* (una proteína de la familia MATE) y *OsAls1* (Tsutsui *et al.*, 2012). Por otra parte ASR (maduración inducida por estrés de ácido abscísico) es una familia de factores de transcripción que participan en muchos procesos de la planta y se ha descubierto que ASR5

es un factor localizado en cloroplastos (Arenhart *et al.*, 2012), núcleo y citoplasma (Arenhart *et al.*, 2013) que regula un gran número de genes que responden a aluminio, incluyendo *STAR1* (Arenhart *et al.*, 2014)

2 OBJETIVOS

Tal como se desprende de la introducción, la mayoría de las investigaciones acerca de los mecanismos de señalización del estrés por Al se han realizado en plantas sensibles o moderadamente tolerantes a este metal. En ellas se ha observado que las especies reactivas de oxígeno (ROS), los ácidos jasmónico (JA), salicílico (SA) y algunas hormonas actúan como señalizadores ante la presencia de aluminio. Sin embargo, en especies altamente resistentes, como es el caso del arroz, apenas existe información sobre la señalización y su posible relación con la activación de los mecanismos de resistencia y tolerancia.

Por ello, nuestro objetivo principal es investigar el posible papel de ROS, SA y JA, junto con el ácido abscísico (ABA) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en la señalización de las respuestas diferenciales a Al en las variedades de arroz con diferente grado de resistencia.

Para ello el primer paso es identificar dos variedades de arroz que claramente difieran en la tolerancia al Al basado en respuestas fisiológicas diferenciales una vez expuestas al estrés por Al, seguido de la caracterización de la(s) estrategia(s) de exclusión / detoxificación de Al empleada(s) en cada caso.

Existen estudios que demuestran que la resistencia al Al en la planta de arroz tiene base multigénica, donde intervienen factores de transcripción y genes que codifican para proteínas específicas que intervienen en la exclusión o la compartimentación subcelular del Al. En este sentido nuestro siguiente objetivo es estudiar la expresión diferencial de algunos de estos genes clave para la resistencia a Al en las dos variedades de diferente respuesta fenotípica al estrés e investigar si la base mecánica de los dos genotipos se fundamenta en la exclusión del Al o bien en la detoxificación interna del metal una vez incorporado en los tejidos.

Establecida(s) la(s) estrategia(s) de defensa nuestro último propósito es investigar el papel de ROS, JA, SA y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en la activación de los mecanismos de defensa frente a la toxicidad AI en dos variedades de resistencia elevada, pero desigual.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para realizar este estudio se utilizó como material vegetal una variedad de cada uno de los grupos genéticos de arroz, var. Nipponbare de la sp. Japonica, y var. Modan de la sp. Indica. Las semillas de la var. Nipponbare se obtuvieron de cultivos situados en el Delta del Ebro mientras que las de la var. Modan se consiguieron a través del Servicio de Investigación Agrícola de Aberdeen (Idaho, USA). En este segundo caso se procedió a una producción de semillas con el fin de asegurar el material suficiente para todos los experimentos. Previamente a la germinación, las semillas se esterilizaron superficialmente durante 1h en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) y posteriormente se lavaron tres veces con agua Milli-Q.

3.2 Diseño experimental: condiciones de crecimiento y solución nutritiva

Para la germinación, se colocaron las semillas en placas de Petri en número de 10 semillas por placa situadas equidistantemente. Las placas fueron trasladadas a una estufa con una temperatura de 26-27° C bajo condiciones de oscuridad durante un tiempo entre 3 y 5 días. Las semillas germinadas fueron transferidas a una bandeja de poliestireno expandido (Porexpan) agujereada flotando en recipientes con 6 litros de solución nutritiva modificada de la descrita por Magnavaca y colaboradores (1987) para maíz y sorgo. Las modificaciones en la solución se hicieron para asegurar un suministro suficiente de nutrientes esenciales y para reducir al mínimo las interacciones químicas entre Al y otras especies minerales en la solución de nutrientes con las altas

concentraciones de Al necesarias para causar respuestas diferenciales en las variedades de arroz. Las principales diferencias entre esta solución y la tan utilizada solución de Yoshida en arroz (Yoshida *et al.*, 1976) incluyen una reducción de las concentraciones de fósforo y azufre, que son iones que interaccionan fuertemente con el Al, y el HEDTA como quelante de Fe en sustitución al citrato, el cual tiene más preferencia para unirse a Al que al Fe. Estas modificaciones aseguran un suministro suficiente de nutrientes esenciales necesarios para el arroz y una reducción al mínimo de las interacciones químicas entre el Al y otras especies de minerales en la solución de nutrientes en las altas concentraciones de Al, aumentando sustancialmente la actividad del aluminio (95.7%) respecto la solución Yoshida (59.7%) (Famoso *et al.*, 2010).

Compuesto	Concentración
KCl	1mM
NH ₄ Cl ₃	1.5mM
CaCl ₂	1mM
KH ₂ PO ₄	45μM
MgSO ₄	200μM
Mg (NO ₃) ₂	500μM
MgCl ₂	155μM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	11.8μM
H ₃ BO ₃	33μM
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	3.06μM
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.8μM
Na ₂ MoO ₄ H ₂ O	1.07μM
Fe-HEDTA	77 μM

*Fig. 5. Composición y concentración de nutrientes de la solución Magnavaca (Magnavaca *et al.*, 1987).*

El pH de la solución se ajustó a 4.2. Este valor de pH se seleccionó basado en los resultados de la simulación de

especiación de los iones en la solución a diferentes valores de pH mediante el programa Geochem 2.0 (Parker *et al.*, 1995), que permite determinar la actividad del Al a diferentes pH y la relación entre las especies formadas de los diferentes compuestos de la solución nutritiva (ver apartado 3.3). Esta solución se fue cambiando en periodos de 2 veces por semana.

Cada plántula germinada se disponía en uno de los agujeros de la bandeja y su tallo era sustentado por una espuma. Los cultivos hidropónicos se mantuvieron en una cámara de cultivo bajo condiciones de ambiente controlado de las siguientes características: fotoperíodo 12 h de luz, 12 h oscuridad, radiación fotosintéticamente activa $310 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y la temperatura de noche y de día de 25 y 27 ° C, respectivamente. En la fig. 5 se detalla la composición de la solución nutritiva Magnavaca modificada.

3.3 Tratamientos y actividad del Aluminio

Después de un periodo de creciendo durante 15 días en la cámara bajo condiciones control se sometió las plantas a tratamiento con 0 o 500 μM de Al en forma de AlCl_3 durante 24, 48 y 72 h. Los ensayos para las respuestas al Al se realizaron a pH 4.2, una vez estimada la actividad de este metal a diferentes pHs. Para ello se utilizó el paquete de software GEOCHEM 2.0. Este programa ha sido una herramienta importante en la creación de soluciones de prueba para experimentos de tolerancia al aluminio de la planta (Liao *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2000), pudiendo así estimar las actividades de Al^{3+} y crear soluciones sin disminuir significativamente las actividades de los otros nutrientes, tales como fosfato o sulfato. Muchas de las soluciones de nutrientes que

contienen Al que se utilizan actualmente contienen niveles muy altos de Al porque los cationes Al^{3+} interactúan fuertemente con aniones y, por tanto, no está disponible para la planta (Shaff *et al.*, 2010).

3.4 Ensayos de tinción

Para la realización de los ensayos de tinción se utilizaron 3 individuos de cada variedad para cada uno de los tratamientos (0, 24, 48 y 72 h con Al).

3.4.1 Tinción con hematoxilina

La tinción de hematoxilina es una técnica no invasiva que permite visualizar de forma rápida la presencia de Al a nivel radicular y por tanto ver el grado de exclusión de aluminio en las plantas. La tinción con hematoxilina de las puntas de las raíces de las plantas se realizó de acuerdo a Polle y colaboradores (1978). La visualización de dichas puntas se realizó con una lupa Nikon H550S, intralux 5100 y las fotografías se tomaron con una cámara Nikon Digital Sight D2-5M con una unidad de control Nikon Digital Sight DS-L1, con una resolución de 5 Mp.

3.4.2 Tinción de azul de Evans

Para detectar los posibles daños a las membranas producido por el Al se observó la viabilidad celular de las puntas de las raíces realizando una tinción con azul de Evans. El protocolo que se siguió fue el descrito por Piršelová *et al.*, (2011) con pequeñas modificaciones. Brevemente las raíces fueron sumergidas en 1ml de solución acuosa de azul de Evans 0,25% (p/v) durante 15 min a temperatura ambiente; a

continuación se hicieron tres lavados con 3ml de agua destilada de 10 min cada uno. Las visualizaciones se realizaron con una lupa Nikon H550S, intralux 5100. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon Digital Sight D2-5M con una unidad de control Nikon Digital Sight DS-L1 y una resolución de 5 Mp.

Para la cuantificación se cortaron diez puntas de raíz de 10mm de longitud desde el ápice y se sumergieron en N, N-dimetilformamida durante 1 h a temperatura ambiente, para la desorción de la tinta (Piršelová *et al.*, 2011). La densidad óptica de la solución de desorción se midió a 600 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-2450, Kyoto, Japón).

3.4.3 Tinción con morin

Morin es una tinte histoquímico con una alta especificidad para el Al. En este caso, tras 24 h de exposición a Al se seleccionaron las puntas de las raíces de ambas variedades, a las cuales se les hizo un corte transversal de 10mm desde el ápice que se incluyeron en 6% Bacto Agar (Difco, BD Empresa, Madrid, España). Posteriormente se seccionaron (100 micras) con un vibratomo (Vibratome Serie 1000, TPI Inc., St. Louis, MO, EE.UU.). El complejo Al-Morin presenta fluorescencia verde, con una longitud de onda de excitación de 420 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm. La tinción con morin se realizó según el protocolo de Tice y colaboradores (1992) y posteriormente las secciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot-2, Nikon Instruments, Amsterdam, Países Bajos).

3.4.4 Tinciones para visualizar especies reactivas de oxígeno (ROS)

3.4.4.1 Tinción de peróxidos (H_2O_2)

Esta tinción es capaz de revelar la presencia de peróxidos en los ápices de las raíces. Las raíces se tiñieron con 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) de acuerdo con el protocolo descrito por Sandalio y colaboradores (2008). Las visualizaciones se realizaron con una lupa Nikon H550S, intralux 5100 y por la fluorescencia se dispuso de una fuente ultravioleta Nikon intensilight C-HGFI, con una excitación de 495nm y una emisión de 515nm. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon Digital Sight D2-5M con una unidad de control Nikon Digital Sight DS-L1 y una resolución de 5 Mp.

3.4.4.2 Tinción de superóxidos (O_2^-)

Para la visualización de aniones superóxido se tiñieron las raíces con dihidroetidio (DHE) de acuerdo con el protocolo descrito por Sandalio y colaboradores (2008). Las muestras se observaron con una lupa Nikon H550S, intralux 5100 y por la fluorescencia se dispuso de una fuente ultravioleta Nikon intensilight C-HGFI, con una excitación de 488nm y una emisión de 520nm. Las fotografías se tomaron en una cámara Nikon Digital Sight D2-5M con una unidad de control Nikon Digital Sight DS-L1 y una resolución de 5 Mp.

3.5 Valoraciones analíticas

3.5.1 Valoración del crecimiento radicular

En este caso se escogieron doce plántulas de cada variedad que tras la germinación crecieron durante cinco días con CaCl_2 y posteriormente se les aplicó el tratamiento con AlCl_3 500 μM hasta 72h. Utilizando una cinta métrica, se midieron las raíces principales de las plántulas tratadas con Al y sus controles (sin Al) en intervalos de 24h. Para calcular el crecimiento radicular según el tiempo de exposición a Al se aplicó la fórmula de crecimiento absoluto siguiente:

$$C = L_f - L_i$$

Donde:

C = crecimiento absoluto

L_i = Longitud inicial (justo antes de aplicar el tratamiento)

L_f = Longitud final de cada tiempo de exposición de Al

3.5.2 Concentraciones de Al y nutrientes minerales

Para el análisis de la concentración de Al y de nutrientes minerales en las raíces y partes aéreas de las plantas se tomaron 3 plantas de cada variedad y tratamiento. Se enjuagaron cuidadosamente las raíces con agua destilada, seguido por 10 min de desorción de los elementos del apoplasto mediante un tratamiento con ácido cítrico 1 mM frío y un lavado adicional con agua destilada. Las plantas se dividieron en raíces y parte aérea y el material se secó en una estufa de desecación (60 °C). La digestión ácida (69% HNO_3 : 30% H_2O_2 , 5: 2) se hizo en un sistema de bloque caliente (modelo 154-240, Medio Ambiente Express, Charleston,

Carolina del Sur, EE.UU.). Las concentraciones de los nutrientes fueron analizadas por ICP-OES (modelo Elan 6000, Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.). Para asegurar la calidad del proceso se analizaron en paralelo hojas de *Olea europea* certificadas (BCR 62). La tasa porcentual de recuperación de la concentración de Al respecto al valor certificado fue del 104 ± 3 .

3.5.3 Determinación de MDA

La peroxidación de lípidos se midió como la cantidad de metabolitos reactivos producidos por la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA), tal como se describe por Lin y colaboradores (2009). Se muestrearon raíces de las dos variedades con los distintos tratamientos. Se pesó 1 g de peso fresco de cada una de las muestras y se homogeneizaron en 10 ml de 0,1% (w/v) tricloroacético ácido (TCA). El homogeneizado se centrifugó a 10,000g durante 10 min. A un mililitro de sobrenadante se le añadió 4 ml de 20% de TCA que contiene 0,5% (w/v) TBA. La mezcla se calentó primero a 95°C durante 30 min, a continuación se enfrió rápidamente en hielo y se centrifugó a 10,000 g durante 15 minutos. La absorbancia se midió a 532 nm. Los datos se tuvieron en cuenta después de restar los valores inespecíficos de absorción a 600 nm. La concentración de TBARM se calculó utilizando un coeficiente de extinción de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.4 Contenidos de ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) y ácido 1-aminociclopropano-1- carboxílico (ACC)

Las valoraciones de las concentraciones de SA, JA, ABA y ACC fueron efectuadas utilizando plantas con 15 días de edad que posteriormente se trataron con AlCl_3 500 μM a

diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 h). Para hacer la valoración se tomaron como muestras la raíz y la parte aérea de 3 ejemplares de cada variedad y tratamiento. Las concentraciones se determinaron mediante ICP-ES, modelo Jobin Yvon-VHR 38, Stanmore UK. La valoración se realizó mediante una inyección en cromatografía líquida con ionización electrospray en tándem con la espectrometría de masas (LC-ESI-MS / MS) como fue descrito anteriormente por M. Llugany et al, 2013. Se ha dispuesto del sistema MRM (Multiple Reaction Monitoring) para separar las hormonas de interés del resto de componentes con la misma masa (Fig. 6).

Para la extracción se trituró con mortero y en baño de hielo 250 mg de material vegetal fresco previamente congelado a -20 ° C con 625 ul de solución de extracción (MeOH: H₂O mQ: HOAc ; 90: 9: 1) y 125 ul de 1mg / l de ácido salicílico deuterado SAd6 y 1- aminociclopropano-1- ácido carboxílico deuterado ACCd4 como patrones internos (ambos 98% de átomos D -Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). El homogeneizado se centrifugó a 10600g durante 10 minutos a temperatura entre 0 y 4 ° C. El sobrenadante se reservó en el congelador y se repitió el proceso de extracción dos veces más, añadiendo 750µl de solución de extracción al pellet obtenido en cada centrifugación. Se combinaron los tres sobrenadantes y se secó el contenido centrifugando al vacío y proceder a la lectura inmediata o en caso contrario reservar la muestra en el congelador.

Lectura y cuantificación de las muestras:

Para hacer la lectura, se resuspendió cada muestra en 200 µl de 0,05% HOAc en H₂O: MeCN (85:15 v / v), y finalmente se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45 micras (Corning Costar Spin-X - filtro de tubo de centrífuga Sigma).

Para la cuantificación se utilizaron plantas control con adición de soluciones de SA (99% Fluka, Buchs, Suiza) y ACC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), que van desde 50 hasta 1500 ppb, y soluciones de ABA y (\pm) -JA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) que van desde 5 a 150 ppb y extrayendo como se describe anteriormente para las muestras. Las hormonas se separaron usando un HPLC Agilent 1100 (Waldrom, Alemania) en una columna Discovery C18 2,1 \times 150 MMID, de 5 micras (Supelco, Bellefonte, EE.UU.) a temperatura ambiente y un volumen de inyección de 10 μ l a un flujo de 600 μ l / min de 2 solventes (solvente A: Ácido acético en H₂O MQ, solvente B: Acetonidil). Se utilizó un gradiente lineal con las siguientes proporciones (v / v) de solvente B (t (min),% B): (0, 10), (3, 15), (5, 100), (6, 100), (7, 10), (8, 10), (15, reequilibrio). Los experimentos MS / MS se realizaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 3000 (PE Sciex, Concord, Ontario, Canadá). Todos los análisis se realizaron utilizando la fuente Turbo Ion Spray en modo de iones negativos (137/93 para SA, 209/59 para JA, 263/153 para el ABA y 141/97 para d6SA) y el modo positivo (102/56 por el AAC y 106 / 60 para d4ACC) y la cuantificación se realizó mediante la inyección de las muestras extraídas en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM), debido a que muchos compuestos podrían presentar la misma masa molecular nominal. La identificación se realizó sobre la base del tiempo de retención y la presencia de pico en la traza del MRM en comparación con las de los estándares. Los valores dados son medias de 3 muestras individuales para cada muestra de tiempo y el factor de tratamiento.

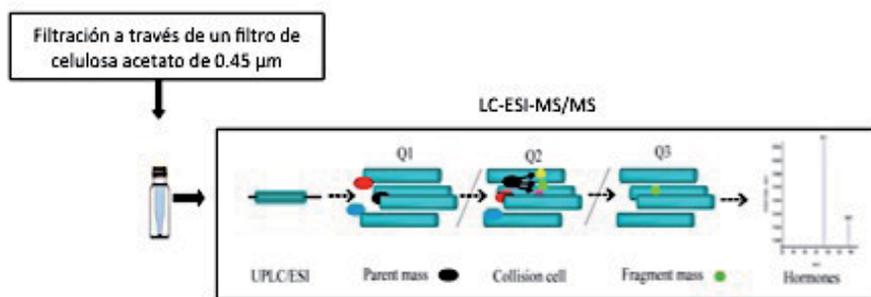


Fig. 6. sistema MRM (Multiple Reaction Monitoring) para separar el JA y SA, ABA y ACC del resto de componentes con la misma masa.

3.5.5 Extracción de RNA, obtención de cDNA y PCR Cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las raíces de arroz se recogieron y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido; el RNA total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen®) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se obtuvieron los cDNA usando el kit de síntesis de cDNA iScript™ (Bio-Rad). Se utilizó 3 µl de cDNA 5 veces diluido de cada muestra para el análisis cuantitativo de la expresión génica con SYBR Green (Bio-Rad). El protocolo de tres pasos para RT-qPCR se resume como sigue: Una primera etapa de 3 min a 98 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 10 s a 58 °C. Las muestras se mantuvieron durante 10 s a 72 °C. Se utilizó una rampa lenta con incrementos de 2 °C por segundo. Luego se calentaron las muestras a 95 °C durante 10 s, seguido de la curva de fusión de 65 °C a 95 °C con incrementos de 0,5 °C durante 5 s. Se hicieron tres repeticiones técnicas de todas las reacciones con 10 µl de cDNA diluido, y los cálculos de genes de expresión se realizaron utilizando el método 2-DDCT (Yang *et al.*, 2014). El gen Actina 1 se utilizó como control interno. Las secuencias de los primers utilizados fueron los siguientes: Actin1, 5'-GACTCTGGTGATGG

TGTCAGC-3' (forward) and 5'-GGCTGGAAGAGGACCTCAGG-3' (reverse); STAR1, 5'-TCGCATTGGCTCGCACC CT-3' (forward) and 5'-TCGTCTTCTTCAGCCGCACGAT-3' (reverse) (Huang *et al.*, 2009); ARS5, 5'-CCAGGACGAGTACGAGAGGT (forward) and 5'-CGATCTCCTCCGTGATCTTG (reverse); ARS1 5'-TGGTGGACTACGACAAGGAGA (forward) and 5'-GCCACCTCCTCCTTCACC (reverse) (Arenhart *et al.*, 2013), Nrat1, 5'-GAGGCCGT CTGCAGGAGAGG-3' (forward) and 5'-GGAAGTATCTGCAAGCAGCTCTGATGC-3' (reverse) (Huang *et al.*, 2012); ALS1, 5'-GGTCGTCAGTCTCTGC CTTGTC-3' (forward) and 5'-CCTCCCCATCATTTTCATTT GT-3' (reverse) (Huang *et al.*, 2012). La eficiencia de los diferentes pares de primers se determinó utilizando la versión de software CFX Manager™ 3.1 Bio-Rad (CA, EE.UU.). Para el análisis de datos de expresión génica relativa se utilizó el método establecido por Livak y colaboradores (2001).

3.5.6 Estadística

Los resultados dados son medias \pm error estándar de al menos tres muestras independientes de cada variedad, tratamiento y tiempo de exposición. A menos que no se indique lo contrario se analizaron por ANOVA multifactorial usando el tratamiento, el tiempo, y la variedad como factores independientes. Los datos fueron verificados para la distribución normal mediante el test de Shapiro-Wilk y si era necesario se transformaron los datos en log antes del análisis ANOVA. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas por la prueba LSD de Fisher. Todos los cálculos se realizaron utilizando Statistica v. 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE.UU.).

4 RESULTADOS

4.1 Actividad del aluminio a diferentes pHs

Se evaluó la actividad de la especie Al^{3+} en la solución Magnavaca a pH 4.0, pH 4.2 y pH 4.5 utilizando el programa Geochem 2.0 (Tabla 1). Los resultados responden a la condición de que el aluminio pueda precipitar en la solución, puesto que es la situación que más se asemeja al medio natural. Como se puede observar los valores muestran una influencia importante del pH sobre la actividad del metal (en negrita).

	Al		
	pH 4.0	pH 4.2	pH 4.5
% como metal libre	5.47	2.67	0.70
% forma complejo con SO^4	0.87	0.44	0.11
% forma complejo con PO^4	13.16	10.12	5.69
% forma complejo con B(OH)^4	68.38	74.71	81.97
% forma complejo con HEDTA	11.78	11.79	11.37
% forma complejo con OH^-	0.35	0.28	0.16
Actividad Al^{3+} libre (μM) en $500\mu\text{M AlCl}_3$	11,71	5,74	1,50

Tabla 1. Porcentaje del ión Al^{3+} formando complejo con distintos aniones y actividad libre de Al^{3+} de acuerdo a las condiciones de la solución nutritiva con Aluminio $500\mu\text{M}$.

4.2 Crecimiento de la raíz.

En ausencia de aluminio la variedad Modan presentó una tasa de crecimiento de la raíz principal mayor que la variedad Nipponbare. Por otro lado, el aluminio inhibió la elongación de la raíz en la variedad de arroz Modan después de 24 h de exposición, alcanzando una reducción de casi el 50% después de 72 h. Sin embargo, en la variedad Nipponbare la influencia del Al en el crecimiento de la raíz fue bastante pequeña (Fig. 7 y 8).

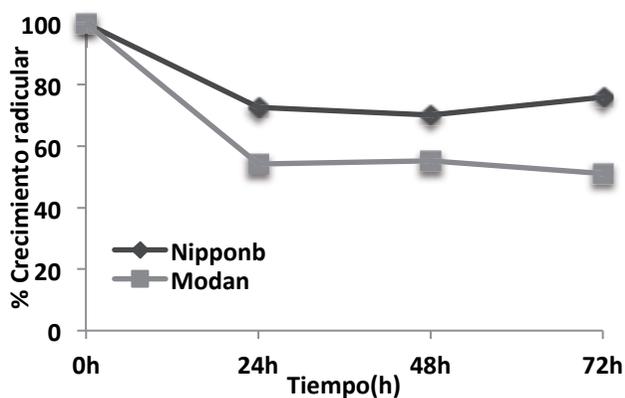


Fig. 7. Porcentaje del crecimiento radicular durante la exposición de las soluciones nutritivas control (sin Al) y con Al 500 μ M en las variedades de arroz Nipponbare y Modan.

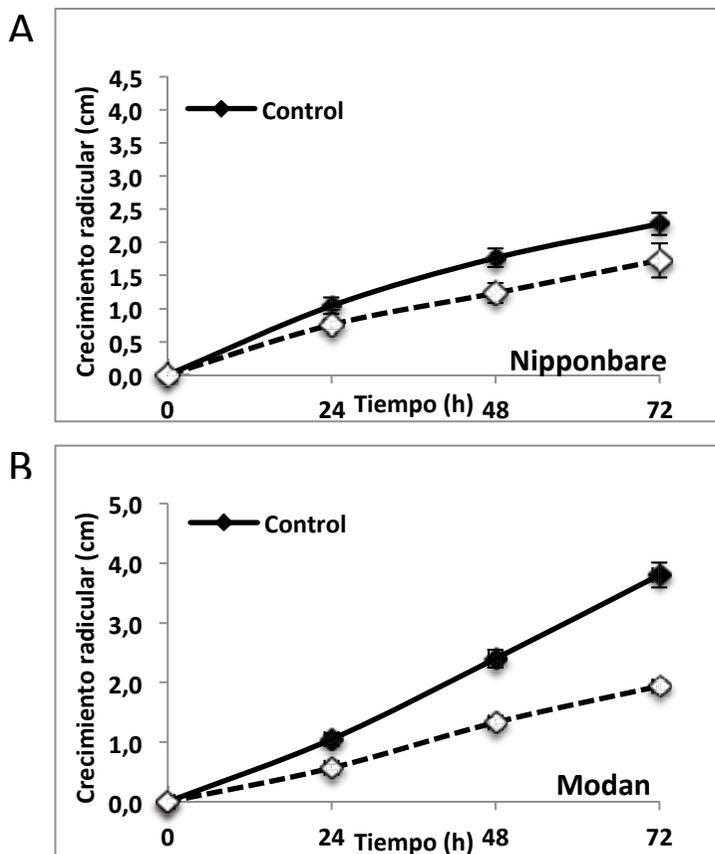


Fig. 8. Crecimiento de la raíz principal por planta (cm) durante la exposición de las soluciones nutritivas control (sin Al) y con Al 500 μ M. (A) variedad de arroz Nipponbare; (B) variedad de arroz Modan. Los datos son medias \pm SE de 10 plantas por variedad (V), el tiempo (T) y tratamiento (TR). ANOVA factorial: V, $p < 0,05$; T, $p < 0,001$; TR, $p < 0,0001$; V \times T, $p < 0,0005$; V \times TR, $p < 0,005$.

4.3 Estabilidad de la membrana

La estabilidad de la membrana a nivel de punta de la raíz evaluada mediante la tinción con azul de Evans fue un indicador menos sensible para el estrés por toxicidad de aluminio que la elongación de las raíces. Como muestran las imágenes de la fig. 8 la mayor intensidad de la tinción se obtuvo en la variedad sensible Modan respecto la variedad resistente Nipponbare, como también se observa en el gráfico en el que se cuantificó el azul de Evans (Fig. 9).

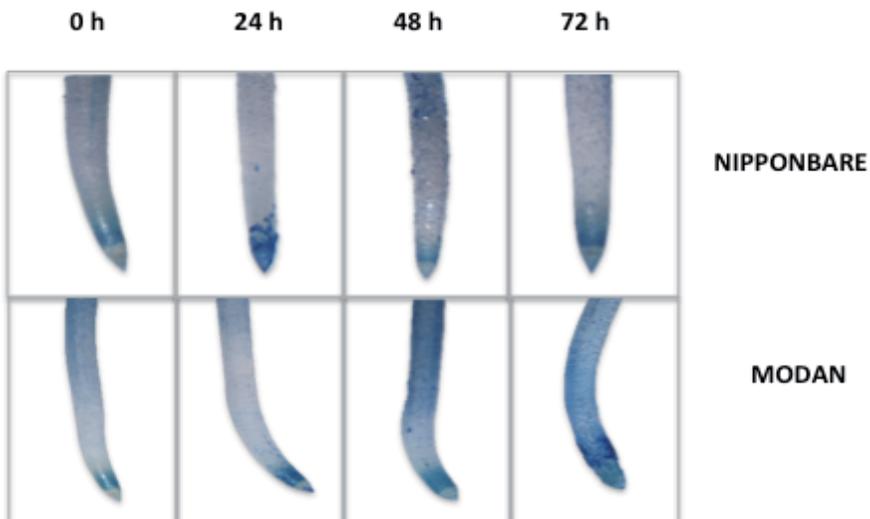


Fig. 9. Estabilidad de la membrana inducida por aluminio en células de la raíz en dos variedades de arroz.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos variedades de arroz sólo después de 48 h de Al exposición cuando en las puntas de las raíces de la variedad Modan se observó una tinción de azul de Evans casi dos

veces más alta que en Nipponbare. En Nipponbare se observó un aumento del 27% de la absorción azul de Evans sólo después de la exposición de 72 h (Fig. 10 y 11).

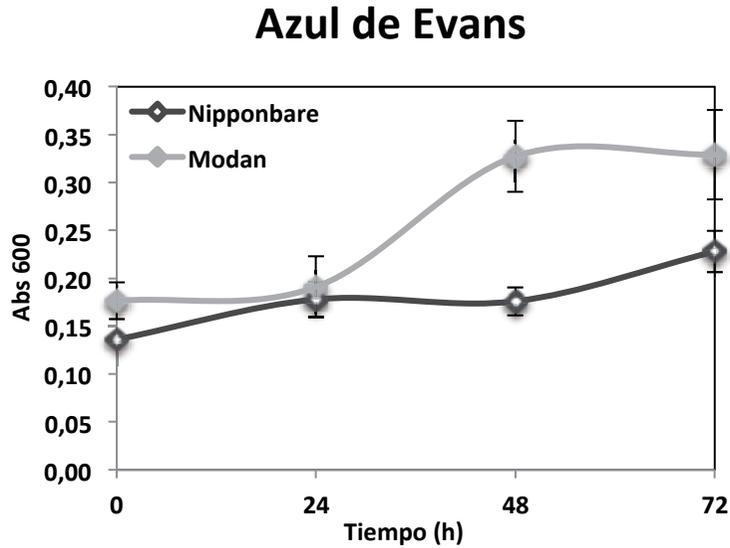


Fig. 10. Estabilidad de la membrana inducida por aluminio en células de la raíz en dos variedades de arroz según la evaluación de la absorbancia de la tinción azul de Evans desorbido de las raíces. Los datos son medias \pm SE de 4 plantas por variedad (V) en el tiempo (T). ANOVA factorial: V, $p < 0,001$; T, $p < 0,001$.

Azul de Evans

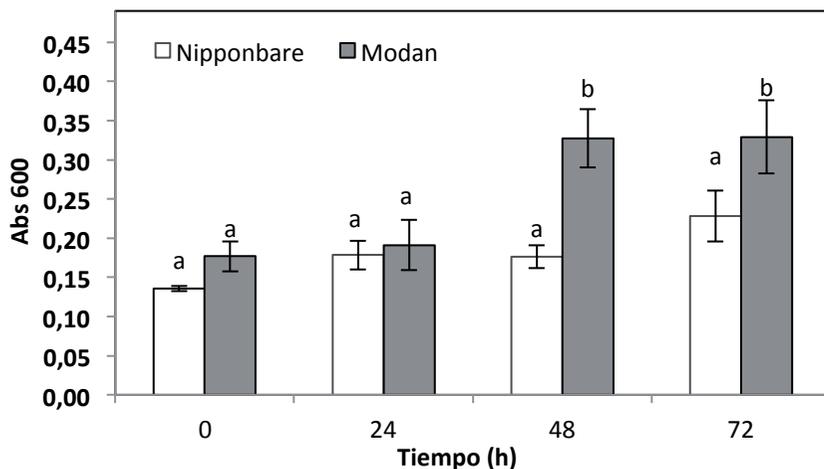


Fig. 11. Absorbancia del azul de Evans desorbido de las raíces en dos variedades de arroz tratadas con aluminio 500 μM a 24, 48 y 72 h.

4.4 Peroxidación de lípidos en la membrana.

Las imágenes con la tinción para detectar peróxidos demostraron que la fluorescencia del 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) se localizó con más intensidad en la variedad resistente Nipponbare que en la sensible Modan. Además, se observó en ambas variedades que el tratamiento de aluminio en distintos tiempos hasta las 72 h no supuso un cambio importante en la presencia de peróxidos respecto las plantas control. Respecto la tinción de superóxidos en la variedad Modan se observó la aparición de dihidroetidio (DHE) a las 48 y 72 h pero al igual que en el caso de los peróxidos ninguna de las variedades mostró diferencias entre las raíces de ambos tratamientos (Fig. 12).

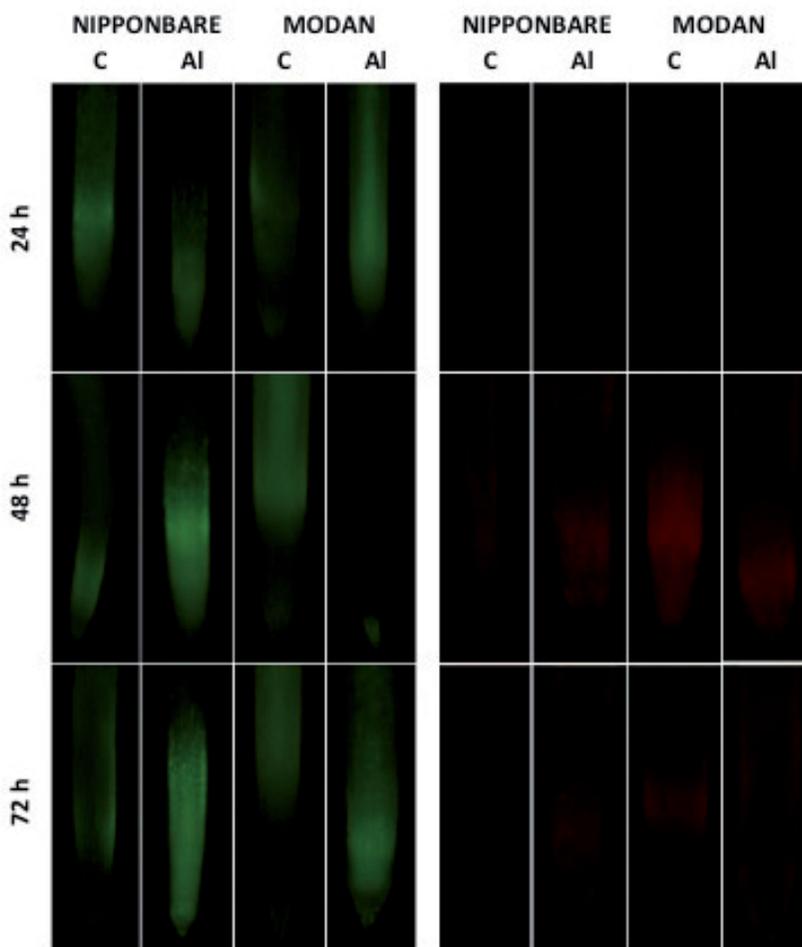


Fig. 12. Presencia de peróxidos (verde) y superóxidos (rojo) en puntas de raíz de plantas de arroz Nipponbare y Modan en ausencia de Al (C) y con aluminio 500 μ M (Al) a 24, 48 y 72 h de exposición.

El malondialdehído (MDA), un producto final secundario de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, se considera un índice útil de la peroxidación de lípidos. Los resultados obtenidos de la cuantificación de MDA corroboraron el efecto que se visualizó en las tinciones de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) y dihidroetidio (DHE).

En las raíces de Nipponbare se encontraron unas concentraciones de MDA un poco más altas que en Modan y se mantuvieron en todos los tiempos de exposición en las dos variedades. Sin embargo no se observó que el tratamiento de Al causara efectos diferenciales en las concentraciones de MDA en ninguna de las dos variedades en ninguna de las exposiciones al metal (Fig. 13).

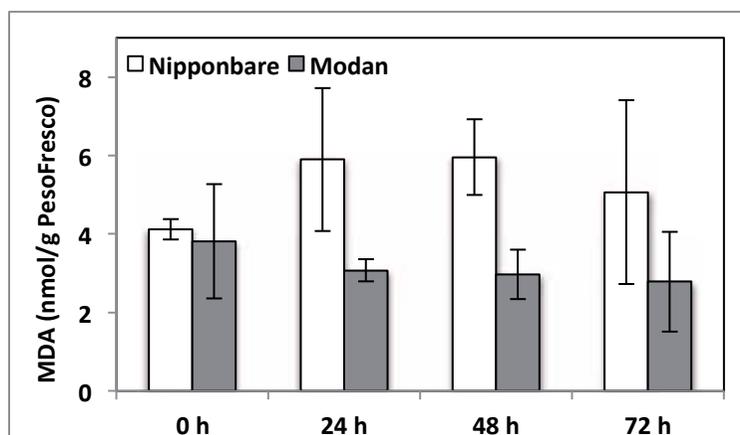


Fig. 13. Concentraciones de malondialdehído en raíz. Los datos son medias \pm SE de 2 muestras independientes de cada variedad (V), tiempo (T) y tratamiento (TR). ANOVA factorial, n.s.; unidireccional ANOVA: V, $p < 0,05$.

4.5 Acumulación de Aluminio

Ambas variedades de arroz diferían altamente en la absorción de Al por las raíces y la translocación hacia las hojas (Fig. 14). Las raíces de Modan acumularon más de $1500 \mu\text{g}$ de Al g^{-1} de peso seco en las raíces después de sólo 24 h de exposición y se observó un aumento de hasta casi $2.000 \mu\text{g}$ Al g^{-1} de peso seco después de 72 h de tratamiento con Al. En contraste, en las raíces de Nipponbare se encontró una concentración de tan sólo $300 \mu\text{g}$ Al g^{-1} de peso seco

después de 24 h de exposición con ningún aumento adicional durante los siguientes dos días (Fig. 14). Modan fue capaz de restringir la translocación de Al hacia la parte aérea sólo durante las primeras 24 h de exposición a Al. A continuación, las concentraciones de Al en las hojas aumentó alcanzando concentraciones 2,5 veces mayor que el valor de fondo correspondiente a las plantas control. En contraste, las concentraciones de Al, no aumentaron en las hojas de Nipponbare durante el tiempo de exposición de hasta 72 h (Fig. 14).

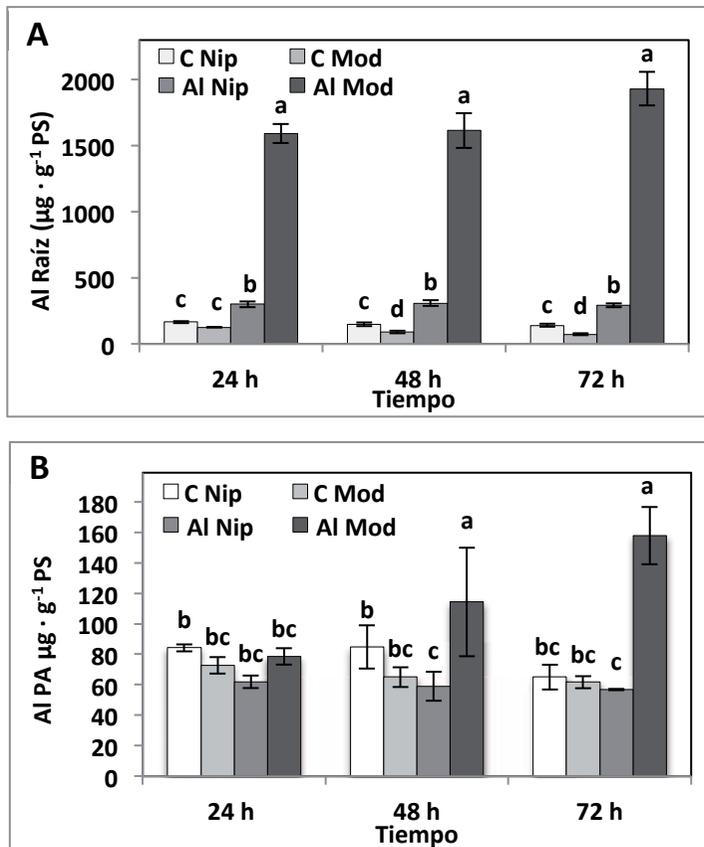


Fig. 14. Concentraciones de Al en raíz (A) y parte aérea (B) en las variedades de arroz Nipponbare y Modan. Para cada órgano de datos son medias \pm SE de 3 muestras independientes de cada variedad (V), el

tiempo (T) y tratamiento (TR). ANOVA factorial de raíces: V, $p < 0,0001$; T, n.s.; TR $< 0,0001$; V \times TR $p < 0,0001$. ANOVA de parte aérea: V, $p < 0,001$, TR, $p < 0,05$; T, $p > 0,05$ n.s. ; V \times TR, $p < 0,0001$; los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

A pesar de que ambas variedades diferían en gran medida en la acumulación de Al en la raíz, las diferencias en la tinción de hematoxilina fueron relativamente pequeñas. En Nipponbare la tinción estaba limitada principalmente en el capuchón de la raíz y tendió a disminuir durante el tiempo de exposición de 72 h. En Modan toda la punta de la raíz que contiene las zonas de división celular, transición y elongación se tiñeron con hematoxilina, con una intensidad que en lugar de disminuir aumentó con el tiempo de exposición (Fig. 15).

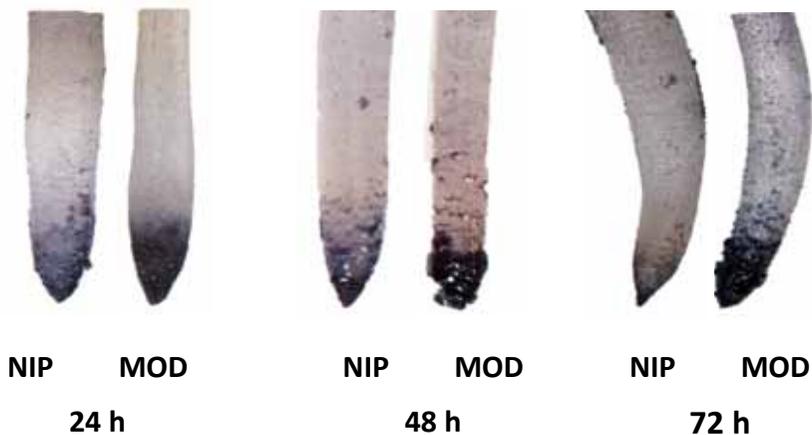
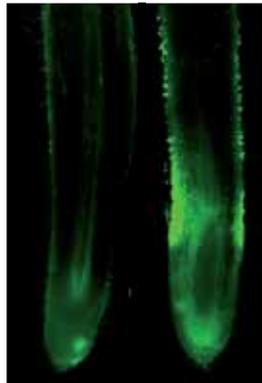


Fig. 15. Tinción con hematoxilina de puntas de raíces de las variedades de arroz Nipponbare (NIP) y Modan (MOD) expuestas a $500 \mu\text{M}$ Al durante un periodo de 24 a 72 h.

Las secciones longitudinales de las puntas de las raíces expuestas durante 24 h a Al y teñidas con Morin también revelaron mayores concentraciones de Al en el interior de las

células de la punta de la raíz de Modan que en los de Nipponbare. En Nipponbare se evidenció una menor tinción Morin en las células de la columela y en las células iniciales de la raíz (Fig. 16).



NIP MOD
24 h

Fig. 16. Imágenes de microscopía de fluorescencia a las 24 h de secciones longitudinales de raíces teñidas con Morin (epifluorescencia verde).

4.6 Balance de nutrientes

Se analizó el balance de nutrientes de las dos variedades en los diferentes tratamientos para comparar el efecto de la variedad y del tiempo de exposición al aluminio sobre la homeostasis de nutrientes y se mostraron los gráficos sobre el contenido de los nutrientes en raíz y parte aérea de las dos variedades observados en ausencia y presencia de aluminio a 24, 48 y 72 h. Los resultados expuestos están clasificados en macronutrientes (Fig. 17) y micronutrientes (Fig. 18). Asimismo, se escogió la exposición más tardía al Al para comparar el efecto de la variedad, tratamiento y la interacción entre ambos sobre el contenido de nutrientes en raíz y parte aérea de las variedades de arroz Nipponbare y Modan (Tabla

1) con el fin de ver el comportamiento del Al, la variedad y la interacción entre ambos sobre la concentración de nutrientes.

Como comentario adicional se observó que en general la mayoría de nutrientes las plantas control de la variedad Modan contenían unas concentraciones superiores a las plantas Nipponbare.

Macronutrientes

K: En las raíces de Nipponbare no se observaron diferencias ni en el tiempo ni en el tratamiento entre las plantas expuestas a Al y las que no, pues los niveles de K fueron similares. En cambio, en las raíces de Modan las plantas control mantuvieron la cantidad de K en el tiempo pero las expuestas a Al marcaron una disminución de K a las 72 h. En cuanto a la parte aérea ninguna de las variedades presentó diferencias significativas en las cantidades de K entre las plantas tratadas con Al y sus controles en ninguna de las exposiciones.

Ca: La variedad Nipponbare mostró una disminución de Ca en la raíz de las plantas expuestas 24 y 72 h a Al respecto a sus plantas control, si bien a las 48 h no se observó diferencias entre tratamientos. En la variedad Modan parece que la cantidad de Ca en la raíz se reduce a las 48h, tanto en las plantas con Al como las control. Sin embargo, a las 72 h se aprecia una disminución de Ca en las plantas con Al respecto las control. Estos valores más bajos con que sin Al se debe a que el Al desorbe el Ca presente en el apoplasto de la raíz. Es interesante ver que en la parte aérea de la variedad Nipponbare se observó una cantidad mayor de Ca en las plantas expuestas 24 y 48 h a Al que las plantas sin Al, aunque las plantas con 72 h de exposición con Al reducen los niveles de Ca comparándolos con las control, que los

mantienen a lo largo del tiempo. En cambio, la variedad Modan presentó en todos los tiempos de exposición una menor cantidad de Ca en las plantas con Al respecto sus respectivos controles.

P: En raíz, comparando las plantas expuestas a Al con las respectivas plantas control las dos variedades no presentaron diferencias significativas, si bien parece observarse una disminución a las 72 h en todos los casos. En la parte aérea el comportamiento cambió entre las variedades. La variedad Nipponbare presentó un descenso a las 72 h en las concentraciones de P pero no hubo diferencias entre las plantas con y sin Al en ninguna de las exposiciones. No obstante, la variedad Modan mostró en todos los tiempos de exposición diferencias significativas entre las plantas con y sin Al. El motivo que explicaría estos valores es que el P se acompleja con el Al en raíz contrariamente a lo que sucede con el Ca se da una inhibición de su translocación hacia la parte aérea.

S: En Nipponbare no se mostraron diferencias entre las plantas sin Al y las expuestas a Al a 24, 48 y 72 h, tanto en raíz como en parte aérea. Sin embargo, Modan a las 24 y 48 h no se observaron diferencias en la raíz entre los niveles de las plantas con y sin Al, pero a las 72 h se aprecia una disminución de S en las plantas con Al que no se da en las plantas control. Respecto a la parte aérea los niveles de S no variaron ni en el tiempo ni por tratamiento, y fueron superiores a los presentes en raíz en todos los casos.

Mg: Hubo un comportamiento diferencial entre variedades. En la variedad Nipponbare no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Mg entre las plantas con y sin Al, ni en raíz ni en hoja. En cambio, en la variedad Modan, las raíces de las plantas control mantuvieron las concentraciones de Mg a lo largo del tiempo, y en todos los

casos fue superior a las expuestas con Al, con diferencias claramente significativas. La disminución fue aún mayor a las 72 h de exposición. En la parte aérea, a las 24 h no hubo diferencias en las cantidades de Mo entre las plantas con Al y sus controles, pero a las 48 y 72 h el Mo disminuyó, con una diferencia significativa respecto a las control, donde se mantuvo la cantidad en el tiempo. Al igual que el S, las cantidades de Mg fueron superiores en la hoja que en la raíz, lo cual parece indicar que la planta de arroz es capaz de translocar estos macronutrientes con facilidad de la raíz a la parte aérea.

Micronutrientes

Fe: Las plantas control Nipponbare mantuvieron los niveles de Fe en el tiempo mientras que en las raíces de las plantas con Al a las 24 h de exposición hubo un pico de Fe, superior al control, que disminuyó hasta que a las 72 h es menor que su control. Es posible que esta conducta se deba a que la supresión del quelante (HEDTA) que va unido al Fe provoque que éste no pueda movilizarse y se mantenga a la raíz temporalmente, hasta que la planta produzca sus propios quelantes para poder absorber el Fe. En cambio en Modan presentó un comportamiento muy diferente, pues en las plantas sin Al se dio una disminución de este nutriente de 24 a 48 h y, en cambio, las plantas con Al presentaron un pico de Fe a las 48 h de exposición. En cuanto a la parte aérea no parece que el Al interfiriera en el contenido de Fe en ninguna de las dos variedades.

Mn: El comportamiento en ambas variedades fue distinto, tanto en raíz como en parte aérea. En la raíz de Nipponbare se mantuvieron los niveles de Mn en el tiempo y sólo existieron diferencias entre plantas con y sin Al a las 72 h, con una disminución de Mn en las plantas con Al. En cambio en Modan las plantas control sí que tuvieron niveles similares

en el tiempo pero sólo las plantas a las 24 h de exposición con Al tuvieron valores semejantes a los control, puesto que a las 48 y 72 h de exposición el contenido de Mn fue superior a sus controles. En la parte aérea Nipponbare no mostró diferencias significativas ni entre tratamientos ni en el tiempo y sin embargo en Modan a las 48 y 72 h de exposición los niveles de Mn, a diferencia de en raíz, disminuyeron claramente en las plantas con Al. El rasgo más relevante fue la gran proporción que encontramos en la parte aérea, lo que podría relacionarse con las condiciones de hipoxia en la que se encuentra la planta, pues una concentración baja de oxígeno provoca que este elemento esté en forma reducida y consecuentemente su disponibilidad en la planta aumente.

Zn: El contenido de zinc en la raíz no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ningún tiempo de exposición, tanto en Nipponbare como en Modan. En cambio, en la parte aérea las pautas difirieron en las dos variedades, si bien en Nipponbare presentó claramente unos contenidos de zinc superiores en las plantas con Al respecto su control en cualquiera de los tiempos de exposición, en Modan se observó una tendencia a disminuir los niveles de zinc en las plantas expuestas a Al a 24, 48 y 72 h.

Cu: En Nipponbare no se observaron diferencias entre tratamientos en ninguno de los tiempos de exposición, ni en raíz ni en hoja. Sin embargo, en la raíz de la variedad Modan las plantas con Al presentaron unos niveles de cobre superiores a los controles en todos los tiempos de exposición. En la parte aérea también hubo una tendencia a aumentar los niveles de Cu a 48 y 72 h en las plantas con Al respecto las plantas control.

Mo: La raíz de Nipponbare no mostró diferencias en los niveles de Mo entre tratamientos en los tiempos ensayados, si bien en la parte aérea se destacó una disminución de Mo a

lo largo del tiempo de exposición con Al, siendo a las 72 h los niveles más bajos. En Modan las raíces presentaron una diferencia significativa entre tratamientos a las 72 h, hecho que se repite en la parte aérea a las 48 y 72 h. El Mo fluctúa en los diferentes tiempos de exposición a Al pero si bien en raíz sólo baja a las 48h, en la parte aérea los valores son bastante menores respecto al control. Probablemente lo que sucede es que el Al dificulta la translocación de este microelemento hacia la parte aérea.

B: No se evidenciaron diferencias significativas en la raíz de Nipponbare entre las plantas con y sin Al hasta las 72 h. Sin embargo la variedad Modan presenta valores de B mucho menores en las raíces de las plantas con Al que las plantas control. La disminución más drástica se vio a las 24 h, aumentando ligeramente a las 48 y 72 h gradualmente. En la parte aérea, Nipponbare tampoco presentó diferencias entre tratamientos, mientras que la tendencia en Modan fue tener menor contenido de B en las plantas expuestas a Al que en las control en cualquiera de las exposiciones.

MACRONUTRIENTES											
µg K/gPS			µg Ca/gPS			µg P/gPS					
Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea			
F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		
4,174	n.s.	0,645	n.s.	7,9218	< 0,05	2,315	n.s.	0,11	n.s.	24,258	< 0,01
0,047	n.s.	6,585	< 0,05	0,0138	n.s.	83,533	< 0,01	1,422	n.s.	2,593	n.s.
6,008	< 0,05	0,155	n.s.	0,0245	n.s.	6,065	< 0,05	3,846	n.s.	0,004	n.s.

µg S/gPS						µg Mg/gPS					
Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea
F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
57,05	< 0,01	1,698	n.s.	104,398	< 0,01	36,997	< 0,01				
25,869	< 0,01	0,313	n.s.	24,982	< 0,01	99,931	< 0,01				
14,957	< 0,01	1,156	n.s.	37,38	< 0,01	19,154	< 0,01				

MICRONUTRIENTES											
µg Fe/gPS			µg Mn/gPS			µg Zn/gPS					
Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea			
F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		
1,5393	n.s.	0,4618	n.s.	0,888	n.s.	7,388	< 0,05	13,576	< 0,01	0,534	n.s.
5,2519	n.s.	28,5826	< 0,01	264,252	< 0,01	174,468	< 0,01	130,01	< 0,01	115,594	< 0,01
8,3285	< 0,05	1,3528	n.s.	32,789	< 0,01	5,57	< 0,05	0,188	n.s.	21,99	< 0,01

µg Cu/gPS											
Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea	Raíz		Parte Aérea			
F	p	F	p	F	p	F	p	F	p		
0,8604	n.s.	28,061	< 0,01	7,3569	< 0,05	37,6059	< 0,01	0,965	n.s.	0,9211	n.s.
4,1098	n.s.	0,526	n.s.	0,4906	n.s.	63,5763	< 0,01	18,2201	< 0,01	1,6366	n.s.
5,6243	< 0,05	64,879	< 0,01	4,0513	n.s.	0,3552	n.s.	7,9903	< 0,05	10,7162	< 0,05

Tabla 1. ANOVA factorial del contenido de nutrientes en raíz y parte aérea de las variedades de arroz Nipponbare y Modan a las 72h de exposición, con un tamaño de la muestra n=3. Los celdas n.s. corresponden a diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0,05$)

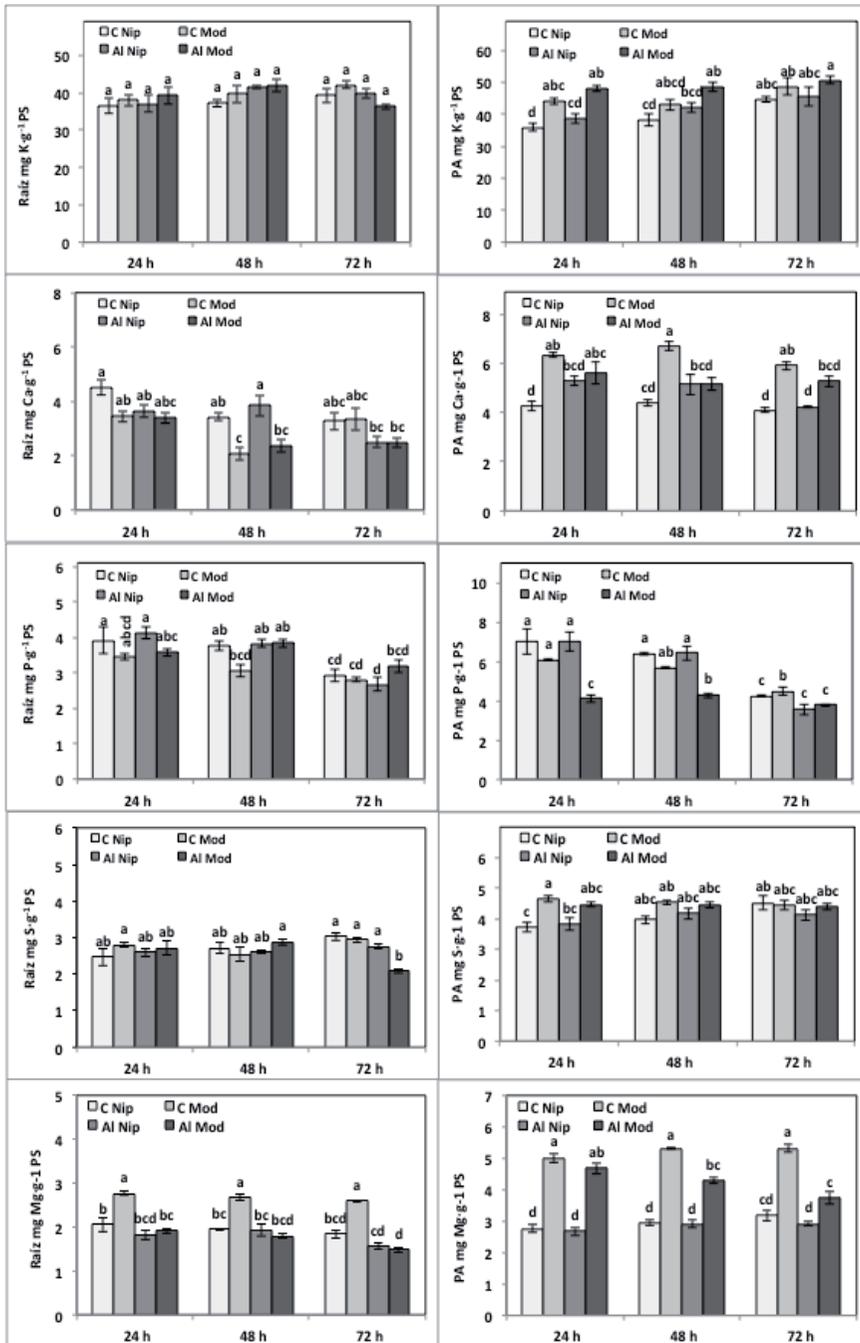


Fig. 17. Concentraciones de macronutrientes en raíz (izquierda) y parte aérea (derecha) en las variedades de arroz Nipponbare y Modan. Para cada órgano los datos son medias \pm SE de 3 muestras independientes de cada variedad (V), tiempo (T) y tratamiento (TR).

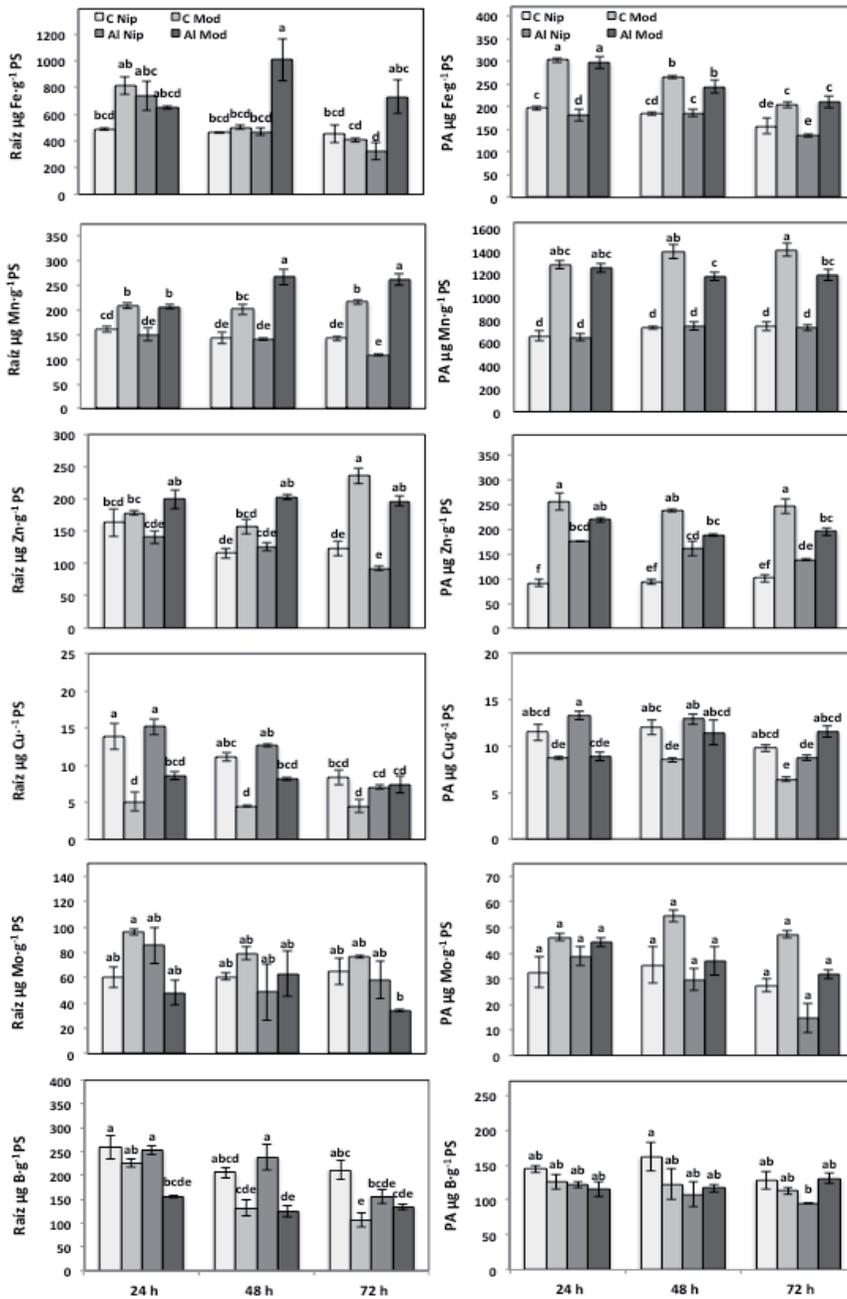


Fig. 18. Concentraciones de micronutrientes en raíz (izquierda) y parte aérea (derecha) en las variedades de arroz Nipponbare y Modan. Para cada órgano los datos son medias \pm SE de 3 muestras independientes de cada variedad (V), tiempo (T) y tratamiento (TR).

4.7 Niveles de ABA, JA, SA, y ACC

El tratamiento Al 48 h aumentó las concentraciones de JA en las raíces en Nipponbare mientras que los niveles tendieron a disminuir después de 72 h. En Modan se observaron variaciones dependientes del tiempo en las concentraciones de JA en raíz tanto en el control en plantas tratadas con Al, pero no se observaron diferencias debidas a la exposición con Al (Fig. 19A). El mismo comportamiento se observó en la parte aérea salvo un aumento de JA a 72h de exposición con Al (Fig. 20A).

Las concentraciones de ácido abscísico en las raíces aumentaron significativamente por el tratamiento de Al en ambas variedades. Sin embargo, se observó un pico del nivel de ABA distintivo en Nipponbare después de 48 h de exposición con un aumento de 4 veces el nivel de ABA endógeno comparando con el control (Fig. 19B). Después de 72 h de exposición con Al las concentraciones de ABA volvieron a los niveles del control. En Modan el aumento del ABA inducido por Al después de 48 h fue sólo 1,8 veces la del control correspondiente. En la parte aérea precisamente las plantas con esta exposición de Al a 48 h tuvieron un comportamiento muy distinto respecto la raíz, pues se mostró un descenso de ABA en las dos variedades (Fig. 20B).

Los niveles de SA de la raíz fluctuaron en el tiempo en ambas variedades pero no se vieron interacciones entre tratamiento y variedad. Sin embargo, en la variedad Modan se notó una disminución de SA a las 24h en las plantas con Al respecto las control, así como a las 72h en las dos variedades (Fig. 19C). En la parte aérea se pudo apreciar en la variedad sensible una disminución de SA en las plantas con Al a las 48h de exposición en comparación con las control y en cambio un aumento a las 72h en la variedad resistente (Fig. 20C). Es destacable la diferencia en las concentraciones de SA entre

los órganos, siendo en la parte aérea doscientas veces las de la raíz.

En cuanto a las concentraciones del precursor de etileno ACC los datos tanto de raíz como de la parte aérea mostraron que el AI no presentó efecto alguna sobre esta hormona y tampoco se observaron interacciones entre tratamiento y variedad (Figuras 19D, 20D).

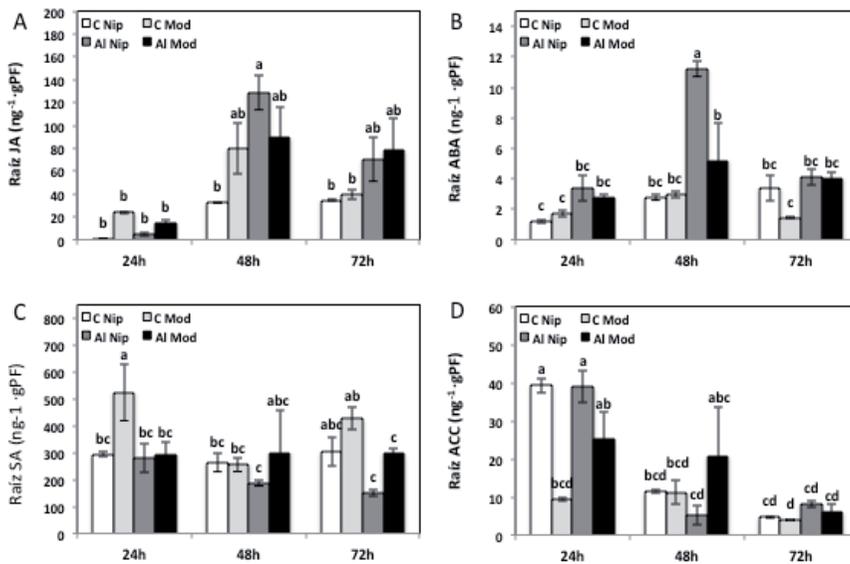


Fig. 19. Concentraciones de jasmonato (A), ácido abscísico (B) ácido salicílico (C) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (D) en las raíces de las variedades de arroz Nipponbare (tolerante) y Modan (sensible) expuestas a solución de nutrientes con y sin (control) AI. Los datos son medias \pm SE de 3 muestras independientes de cada variedad (V), tiempo (T) y tratamiento (TR). ANOVA para datos ABA: V, $p = 0,054$ n.s.; T, $p < 0,001$; TR, $p < 0,0001$; $V \times T \times TR$, $p < 0,02$; ANOVA para datos JA: V, $p < 0,001$; T, $p < 0,001$; TR, $p < 0,001$; $V \times TR$, $p < 0,005$; ANOVA para datos SA: V, $p < 0,03$; T, $p = 0,22$ n.s.; TR, $p < 0,05$; $V \times T \times TR$, $p = 0,3$ n.s.; ANOVA para datos ACC: V, $p = 0,13$ n.s.; T, $p <$

0,0001; TR, $p = 0,23$ n.s.; $V \times TR$, $p = 0,46$ n.s.; Los valores seguidos por distintas letras son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

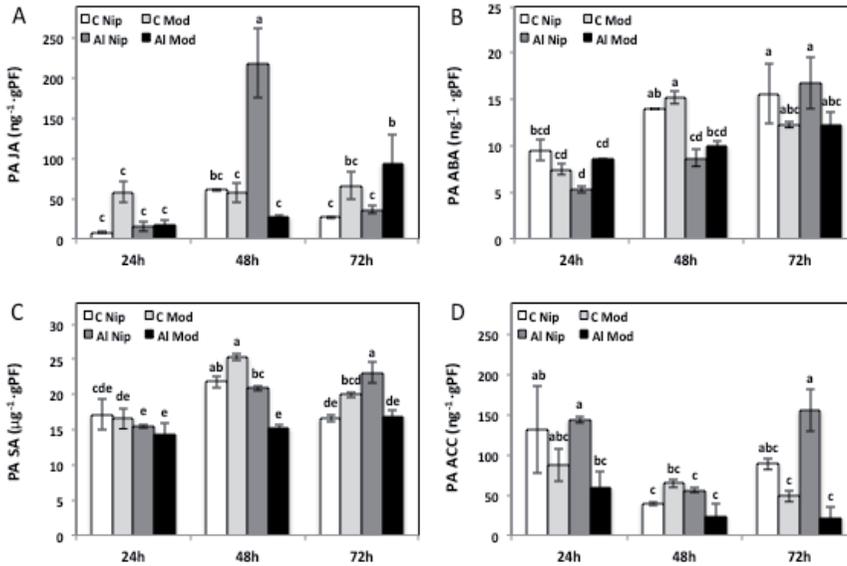


Fig. 20. Concentraciones de jasmonato (A), ácido abscísico (B) ácido salicílico (C) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (D) en la parte aérea de las variedades de arroz Nipponbare (tolerante) y Modan (sensible) expuestas a solución de nutrientes con y sin (control) AI. Los datos son medias \pm SE de 3 muestras independientes de cada variedad (V), tiempo (T) y tratamiento (TR). ANOVA para datos JA: V, $p = 0,93$ n.s.; T, $p < 0,0001$; TR, $p = 0,06$; $V \times T \times TR$, $p < 0,01$; ANOVA para datos ABA: V, $p = 0,5$ n.s.; T, $p < 0,0001$; TR, $p < 0,001$; $V \times TR$, $p = 0,37$ n.s.; ANOVA para datos SA: V, $p = 0,15$ n.s.; T, $p < 0,0001$; TR, $p < 0,05$; $V \times T \times TR$, $p < 0,05$; ANOVA para datos ACC: V, $p < 0,01$; T, $p < 0,01$; TR, $p = 0,98$ n.s.; $V \times TR$, $p = 0,76$ n.s.;

4.8 Expresión de genes relacionados con la tolerancia al aluminio.

La expresión del factor de transcripción *Art1* no se vio afectada por la presencia de aluminio en ninguna de las dos variedades, manteniéndose en todos los tiempos de exposición con niveles de expresión similares a las plantas el metal (Fig. 21).

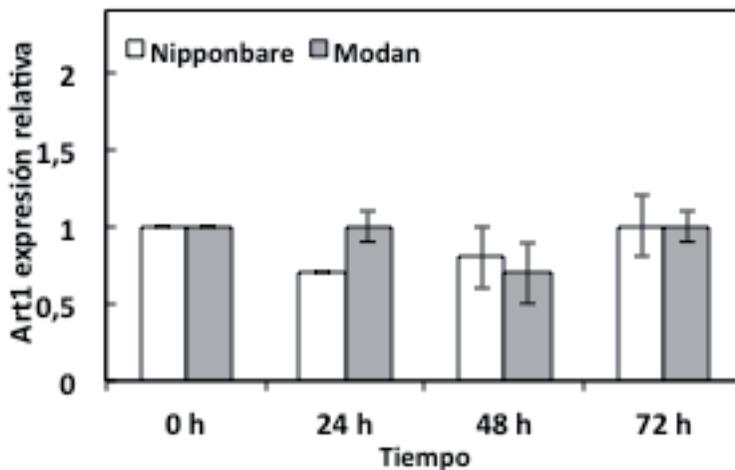


Fig. 21. Expresión relativa de *Art1* en las raíces de *Nipponbare* y *Modan* tratados con Al, determinado por RT-PCR cuantitativa. Se muestra la expresión relativa a los controles sin Al suministro. Los datos son medias \pm SE ($n = 3$); Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Asimismo el aluminio aumentó ligeramente la expresión del factor de transcripción *Asr5* en ambas variedades de arroz. Sin embargo, no se observaron diferencias varietales (Fig. 22A). En contraste, la exposición a Al aumentó la expresión de *Asr1* hasta 6 veces en la variedad sensible Al *Modan*, pero no en *Nipponbare* (Fig. 22B). Durante el período experimental el suministro de Al tuvo poca influencia en la expresión de *Star1*

en las raíces de la variedad de arroz Modan, mientras que en Nipponbare la expresión de este gen se aumentó, especialmente después de las 48 h de exposición (Fig. 22C).

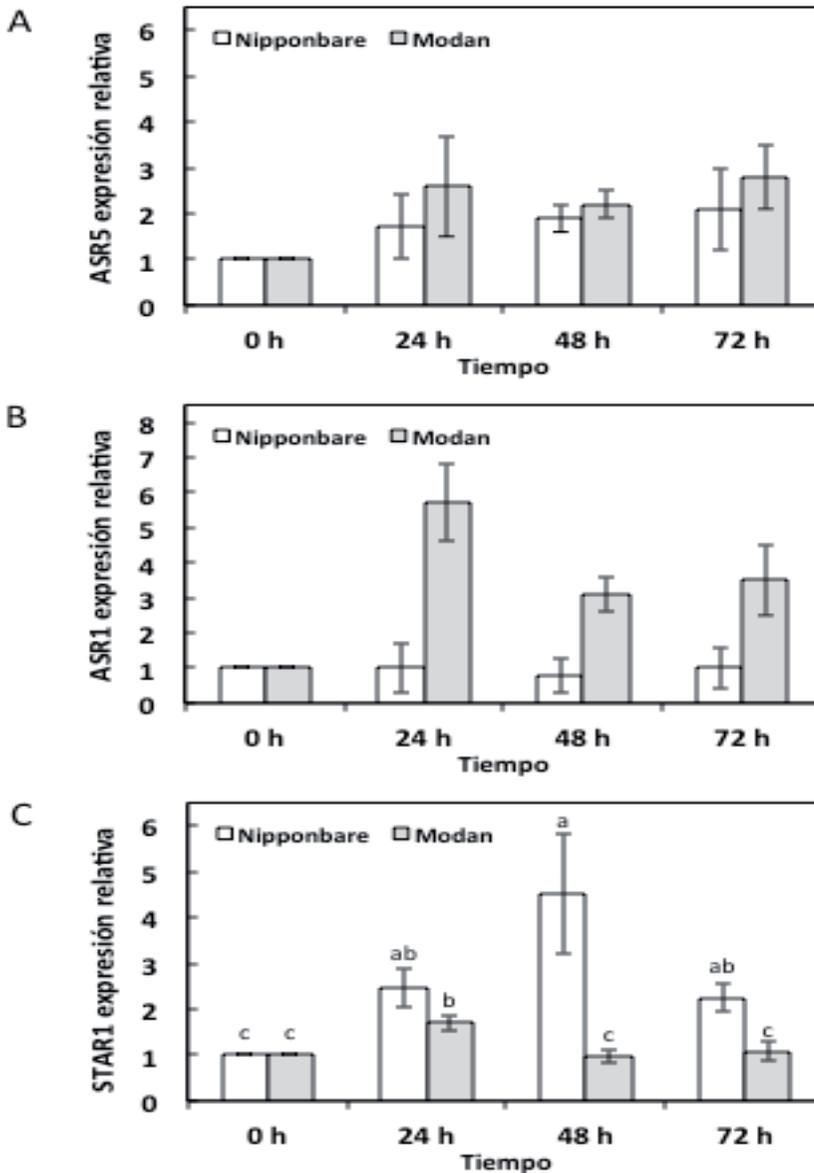


Fig. 22. Niveles de expresión relativa de los genes *Asr5* (A), *Asr1* (B), y *Star1* (C) en las raíces de *Nipponbare* y *Modan* tratados con Al, determinado por

RT-PCR cuantitativa. Se muestra la expresión relativa a los controles sin suministro de AI. Los datos son medias \pm SE ($n = 3$). Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

En ambas variedades el AI incrementó la expresión del gen *Nrat1*. Sin embargo, la sobreexpresión fue más alta (aumento de 6 veces) después de las 24 h de exposición a AI en Modan (Fig. 23A). Finalmente la expresión de *Als1* aumentó considerablemente por el tratamiento AI en la variedad Modan, contrariamente Nipponbare no presentó cambio alguno en la expresión en ninguna de las exposiciones con AI (Fig. 23B).

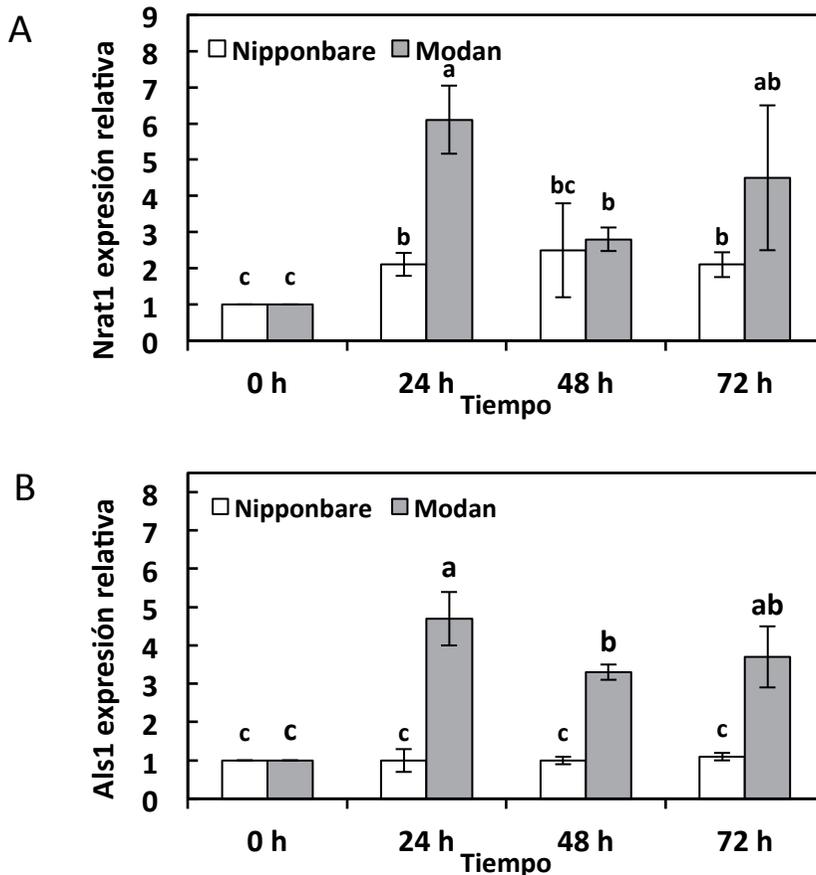


Fig. 23. Expresión relativa de los genes *Nrat1* (A) y *Als1* (B) en las raíces de Nipponbare y Modan tratados

con AI, determinado por RT-PCR cuantitativa. Se muestra la expresión relativa a los controles sin suministro de AI. Los datos son medias \pm error estándar (n = 3). Los valores seguidos por letras diferentes son estadísticamente distintos ($p < 0,05$).

5 DISCUSIÓN

El arroz es una de las especies de cultivos más tolerantes al Al (Ma *et al.*, 2002). Este estudio confirma la alta tolerancia al Al de este cereal, puesto que la mayoría de las plantas de cultivo son muy sensibles al Al³⁺ y muestran una reducción del crecimiento radicular del 50% a actividades de Al inferiores a 5 µM (Poschenrieder *et al.*, 2009) y sin embargo los efectos nocivos descritos en este trabajo para la variedad sensibles se produjeron con una concentración 100 veces superior (500 µM Al). Dentro de esta extraordinaria resistencia del arroz se han observado grandes diferencias entre variedades, siendo las variedades japónica las que suelen ser más tolerantes respecto las variedades índica (Famoso *et al.*, 2011). Esto también se observó en este trabajo, donde la variedad japónica Nipponbare claramente era más tolerante que Modan, una variedad índica.

La disminución del crecimiento de la raíz en Modan de hasta el 50% a las 72h frente a la de la variedad Nipponbare, de poco más de un 20%, nos indica un menor efecto del aluminio en esta última (Fig. 8). Asimismo, la mayor viabilidad de la membrana celular en los ápices de Nipponbare, (Fig.10 y 11) confirman la mayor sensibilidad a Al en la variedad Modan.

Comparando las concentraciones de Al de las raíces y partes aéreas de ambas variedades se demostró que la base de la estrategia de resistencia al Al en Nipponbare es la de evitar la absorción de Al por las raíces y restringir eficientemente el transporte de éste hacia la parte aérea (Fig. 14). Por contra, en Modan se encontró una absorción rápida del Al en las raíces. La capacidad de almacenamiento del Al en la raíz de Modan al parecer consiguió saturarse después de 24 h de exposición como se indica el hecho de no haber ningún aumento adicional de la concentración de Al en la raíz después de 48 h de exposición y el fracaso para evitar la acumulación de Al en la parte aérea (Fig. 14). Las imágenes

de las tinciones con hematoxilina (Fig. 15) y morin (Fig. 16) demuestran gráficamente la diferencia en la absorción del Al por las raíces.

Un indicador de la alta tolerancia al Al en estas plantas de arroz es su capacidad de mantener la homeostasis de los nutrientes esenciales a pesar del alto suministro de Al y el bajo pH de la solución nutritiva. En este punto también encontramos diferencias entre las dos variedades estudiadas en algunos nutrientes que nos sugieren un efecto diferencial del Al. Varios estudios han revelado que niveles elevados de Al pueden perturbar la absorción de nutrientes, la acumulación y la repartición (traslocación) en plantas tales como cacao (Baligar y Fageria, 2005), sorgo y maíz (Akhter *et al.*, 2009); (Giannakoula *et al.*, 2008), *Citrus grandis* (Jiang *et al.*, 2009), cebada (Guo *et al.*, 2007) y arroz (Marín-Garza *et al.*, 2010) entre otros. Como era de esperar la conocida resistencia a Al de la variedad Nipponbare se vio reflejada en el balance de nutrientes que no se vieron afectados por el Al. Sin embargo, en Modan se observó la perturbación en los niveles de sólo algunos de los elementos por el efecto del Al propios de especies y/o variedades sensibles a este metal que a continuación se detallan.

El calcio es un elemento con funciones tanto estructurales como no estructurales en la planta. Así pues, el Ca promueve el alargamiento y la división celular, forma compuestos de pectato de Ca de la lámina media que da estabilidad a la pared celular, participa en la regulación estomática, en procesos hormonales y enzimáticos e incluso puede proteger a la planta frente hongos y bacterias. Uno de los efectos tóxicos del Al en el crecimiento y el desarrollo de la planta se ha atribuido a la interrupción de la homeostasis del Ca por el Al. El hecho de que el Al inhibe la absorción del Ca por las raíces, bloquea los canales de Ca voltaje-dependientes y afecta a la concentración de Ca en el citosol; apoyan este

punto de vista (Rincón-Zachary, 2010). Este fuerte impacto del Al en los niveles citoplasmáticos de Ca altera las vías de señalización dependientes de Ca (Rengel, 1992). En este sentido Nipponbare, y sorprendentemente también Modan, mostraron un comportamiento propio de una especie tolerante al Al, puesto que el tratamiento de AlCl_3 500 μM no reportó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de Ca en las raíces de ninguna de las dos variedades. Debido a que el calcio es un macronutriente no móvil éste se transloca lentamente de la raíz a la hoja, donde se va acumulando, lo cual explicaría que las cantidades en hojas y tallos fueran superiores a las de la raíz. En estos órganos sin embargo el aluminio parece tener una influencia en la variedad sensible Modan, pues en todos los tiempos de exposición con Al la tendencia es la de disminuir. Estos resultados concuerdan con estudios recientes realizados con arroz (Marín-Garza *et al.*, 2010) y *Urtica pilulifera*, donde atribuyen el descenso al transporte de iones calcio a través de canales en algunas partes específicas de la planta (Dogan *et al.*, 2014). La resistencia a Al en ciertas variedades de trigo, cebada y soja se ha asociado con su capacidad para hacer frente a la deficiencia de Al inducida por Ca o con una translocación de Ca limitada (Fageria *et al.*, 1988). Por el contrario, Edward y Horton (1977) señalaron que la toxicidad del aluminio en melocotón no estaba relacionada con la inhibición de la translocación de Ca. Parece que, en algunas especies y variedades, el transporte eficiente de Ca constituye un mecanismo complementario de la resistencia de aluminio. Por otra parte, las altas concentraciones de Ca en la solución a ratios apropiados de Al/Ca podrían aumentar el contenido de clorofila, una indicación de efecto alivio de en frijol mungo (Yang y Chen, 2001).

El magnesio (Mg) es esencial en la fotosíntesis y la fijación de CO_2 , puesto que es básico en la estructura de la molécula de clorofila, y actúa como activador en un gran número de

enzimas. También es fundamental en los procesos de fosforilación de la planta, promoviendo la transferencia, conversión y acumulación de la energía en procesos como la fotosíntesis, la producción de hidratos de carbono y proteínas. Otros mecanismos donde interviene el Mg son la carga del floema, la separación y la utilización de fotoasimilados, la generación de especies reactivas del oxígeno, y la fotooxidación en los tejidos de las hojas (Cakmak y Yazici, 2010). Junto con el calcio, el magnesio es un elemento alcalinotérreo también importante para el crecimiento de la raíz y su deficiencia inhibe claramente el crecimiento de ésta (Cakmak *et al.*, 1994). El aluminio crea un cambio de potencial en la membrana que afecta la entrada de estos dos cationes divalentes en las células de la raíz (Kuhn *et al.*, 1995) y por las características químicas el efecto sobre el magnesio es mayor que sobre el calcio (van Praag *et al.*, 1997). En este caso el aluminio presente en la variedad Modan desplazó el magnesio provocando la disminución significativa de este macronutriente en todos sus órganos.

El potasio (K) es un nutriente sobre el cual el aluminio tiene distintos efectos. Diversos estudios han revelado una afección del Al sobre el potasio en varias especies vegetales, tales como *Urtica pilulifera* (Dogan *et al.*, 2014); soja (Kuswanto, 2014) y arroz (Macedo *et al.*, 2008) entre otros. Igualmente hay información sobre genotipos resistentes a Al que mostraron mayor absorción, afluencia, y el transporte de potasio que los genotipos sensibles (Mariano y Keltjens., 2005). Además, se ha mostrado que en ciertos casos la absorción de K a bajas concentraciones de Al puede ser aún mayor que en las soluciones sin Al (Rengel y Robinson, 1989). Otros trabajos no hallaron diferencias en los niveles de K entre variedades que difieren en la tolerancia al Al, tal como es el caso de la cebada (Ali *et al.*, (2011) o del cacao (Ribeiro *et al.*, 2013). En este trabajo las dos variedades estudiadas no muestran diferencias por efecto del Al en ninguno de los

órganos. Posiblemente esto se deba a que la captación de este catión monovalente sea menos inhibida por el Al que los cationes divalentes como el Ca y el Mg (Rengel y Robinson, 1989).

El fósforo (P) forma parte de moléculas energéticas como el ATP y el NADPH. Es clave en la fotosíntesis, respiración y todo el metabolismo energético, así como también interviene en la síntesis y transporte de hidratos de carbono. Tiene un papel estructural como enlace fosfodiéster de ácidos nucleicos y fosfolípidos y se encuentra también en azúcares fosfato, pectatos de la pared celular y fitatos en semillas. Este macronutriente que normalmente se ve muy afectado por el Al en plantas sensibles, se mantuvo bastante estable en la raíz en ambas variedades, aunque se observó una disminución de los niveles de P en la parte aérea en presencia de Al en la variedad sensible Modan que no se encontró en la tolerante Nipponbare. Marín-Garza et al. (2010) mostraron un efecto similar con variedades de arroz que diferían en la tolerancia a Al. Estos resultados podrían explicarse porque el P, contrariamente a lo que sucede con el Ca, se acompleja con el Al y produce una precipitación de fosfatos de aluminio en los espacios intercelulares de la raíz, provocando una inhibición de su translocación hacia la parte aérea.

In planta el azufre (S) es un macronutriente presente en varias biomoléculas, como lípidos de membrana, heteropolisacáridos y proteínas como co-enzimas (Co-A, biotina, ácido lipoico). También se encuentra en aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina. Es esencial en la formación de clorofila y tiene un papel muy destacado en la regulación de las reacciones de óxido-reducción en el citoplasma y el citosol, sobre todo a través del glutatión. Además forma parte de las fitoquelatinas –proteína rica en cisteína-, con función protectora frente a metales pesados y también es clave en la activación de ácidos orgánicos. Poco

se ha reportado acerca de la acción del Al sobre el azufre. El sulfato fácilmente actúa de ligando del Al y es sabida la baja toxicidad del sulfato de aluminio. Los resultados de este estudio concuerdan con investigaciones recientes que mostraron un efecto negativo del Al en la absorción de este macronutriente en variedades de cebada con distinta tolerancia a Al (Ali *et al.*, 2011), puesto que el genotipo sensible Modan sufrió una disminución de S en presencia de Al a las 72 h.

El hierro (Fe) es el micronutriente que generalmente se encuentra en mayor cantidad. Actúa como grupo prostético, catalizando la biosíntesis de clorofila, pues activa los enzimas de este proceso. Interviene en reacciones de óxido-reducción, tanto en proteínas no-hémicas con enlace Fe-S (ferredoxina y enzimas reductasa, nitrogenasa y sulfato nitrato reductasa) como en hemoproteínas, donde se incluyen citocromos y enzimas antioxidantes (catalasa, peroxidasa, superóxido-dismutasa,...). Existen investigaciones con arroz que relacionan la presencia de la placa de hierro en la superficie de la punta de la raíz con una disminución de la adsorción de Al (Chen *et al.*, 2006). Sin embargo, el hecho de que en este estudio se realizara una desorción del Al con ácido cítrico eliminaría esta relación entre Al y Fe. El aumento de Fe que se apreció en presencia de Al en el genotipo Modan a partir de las 48 h podría contribuir a la aparición de iones superóxido en la raíz que no se aprecia en la variedad Nipponbare.

El zinc (Zn) es un nutriente que pese a sus bajos niveles en la planta está presente en más de ochenta sistemas enzimáticos, como distintas deshidrogenasas, superóxido dismutasa, anhidrasa carbónica,... estableciendo los denominados dedos de Zn (Berg y Shi, 1996). Algunas de sus funciones son la activación de enzimas, la síntesis y conservación de auxinas, la síntesis de proteínas y la defensa

contra radicales superóxidos. En 1996 Groom y colaboradores describieron en arroz la secuencia del gen *rboA*. El producto *RbohA* es más similar a *gp91 phox*, que es la principal subunidad catalítica del enzima oxidasa presente en mamíferos, un enzima que desempeña un papel central en la defensa contra los patógenos al provocar un estallido oxidativo al generar iones superóxido extracelulares por la oxidación de NADPH. En este trabajo se observaron unos niveles de Zn en raíz mucho mayores en Modan que en Nipponbare, tanto en control como en presencia de Al y esto podría reducir el efecto del Al sobre la producción de aniones superóxido. En un trabajo muy reciente de Lin y colaboradores, (2015) se ha reportado la inhibición de la explosión oxidativa dependiente de Zn^{2+} inducida por Al^{3+} tanto en las células de monocotiledóneas (arroz) como de dicotiledóneas (tabaco), lo cual indica que la presencia de Zn^{2+} a concentraciones fisiológicas puede proteger las células mediante la prevención de la generación de superóxido inducida por Al^{3+} y la muerte celular. El transporte de Zn de la raíz a la parte aérea se ve reducido en presencia de Al en Modan, mientras que en Nipponbare no existe diferencias entre las plantas con y sin Al. Existen estudios en cacao donde se muestra que el Al reduce la traslocación de Zn y otros micronutrientes hacia las hojas (Baligar y Fageria., 2005).

El boro (B) tiene un papel estructural muy importante, pues el 95% se encuentra en la pared celular. Interviene en la síntesis de compuestos fenólicos como la lignina y también se relaciona con el transporte de azúcares facilitando su paso a través de la membrana. Otros procesos donde participa son la división y el crecimiento celular, la germinación y la regulación hormonal entre otros. Aunque Blevins y Lukaszewski (1998) proponen que la toxicidad de Al podría ejercer su efecto tóxico mediante la inducción de una deficiencia de boro estudios con plántulas de *Citrus grandis*

demonstraron que la inhibición del crecimiento inducida por Al no está causada por la deficiencia de B inducida por Al, sino por la alteración que provoca el B en la especiación y/o compartimentación subcelular del Al (Jiang et al., 2009). Se ha sabido que la función primaria del B está relacionada con la formación de paredes celulares primarias, donde el grado de reticulación de un polisacárido péctico (RG-II) puede contribuir a una red más estable de las paredes celulares con tamaños de poro reducido (O'Neill et al., 2004), evitando así que el Al entre en contacto con objetivos sensibles en la membrana plasmática y/o el simplasto (Corrales et al., 2007). Además, se ha sugerido que el B reduce los sitios de unión para el Al en las paredes celulares, atenuando de este modo la toxicidad por Al (Yu et al., 2008; Stass et al., 2007). En este sentido la disminución de B que mostró la variedad Modan a las 24 h explicaría su ineficacia para la exclusión de Al de la raíz, hecho que no ocurriría en la variedad resistente Nipponbare. Corrales y colaboradores (2007) observaron que el boro atenúa el daño inducido por Al de la integridad celular en las puntas de raíces, posiblemente se daba a través de la estimulación de respuestas antioxidantes en las raíces estresadas con Al, pero esta estrategia no parece ser efectiva en el presente estudio.

El molibdeno (Mo) participa en reacciones redox y está presente en las enzimas nitrato-reductasa, que cataliza la reducción de nitratos y la nitrogenasa, implicada en la fijación del nitrógeno atmosférico. El Mo es esencial como cofactor en la biosíntesis de la fitohormona ácido abscísico (Nambara y Marion-Polle, 2005) y participa también en la conversión del fósforo inorgánico a orgánico. Hay poca información sobre el Mo en plantas estresadas por Al. Se han caracterizado concentraciones de Mo bajas en raíz y altas en tallo en variedades de tomate sometidas a Al (Simon et al., 1994). La concentración de Mo en la raíz del genotipo Modan sufrió un descenso en presencia de Al, mientras que este

micronutriente casi no se veía afectado. Por el contrario, las concentraciones de Mo en la parte aérea si disminuyeron en las plantas con Al en las dos variedades. Estos datos sugieren un papel inhibitorio del Al en la absorción de Mo por la raíz.

El cobre (Cu) está presente en proteínas y enzimas implicadas en reacciones de óxido-reducción, enzimas de la vía del ácido ascórbico, citocromos. Aun siendo el nutriente que se encuentra en menor cantidad desarrolla varias funciones en la planta, como la fotosíntesis (formando parte de la plastocianina) y el metabolismo nitrogenado y glucídico y es esencial en el balance de bioelementos que regulan la transcripción, entre otras. El comportamiento de este micronutriente fue distinto en ambas variedades en presencia de Al, tanto en raíz como en tallo y hojas, aumentando en el genotipo sensible Modan y reduciendo en Nipponbare. Se mostraría un efecto de sinergia del Al con el cobre como ya vieron recientemente Merino y colaboradores (2014) con variedades de arroz que difieren en la tolerancia con el Al.

Como se ha comentado anteriormente las altas concentraciones de Zn de Modan podrían ser la causa por la cual no se apreció un aumento de MDA inducido por el Al (Fig. 13). Esto indica que la muerte celular inducida por Al en la variedad de arroz sensible a Al Modan no estaba mediada por la peroxidación de lípidos. Se han reportado resultados similares para el maíz donde el estrés oxidativo inducido por Al tampoco fue igualada por el aumento de las concentraciones de MDA (Boscolo *et al.*, 2003). La rigidez de la pared celular causada por la unión del Al en el apoplasto puede dar cuenta de las grietas en la pared celular y el aumento de tinción con azul de Evans (Matsumoto y Motoda, 2012). Este mecanismo de interrupción de la célula se considera que es responsable de las lesiones primarias en las raíces afectadas por toxicidad del Al (Kopittke., 2015). La

rigidez de la pared celular puede ser producto de alguno o de ambos de los siguientes procesos; un entrecruzamiento directo de los pectatos de la pared celular, de la formación de especies reactivas del oxígeno inducida por Al.

La expresión potenciada en Modan del gen ASR1, un supuesto secuestrador de ROS o chaperona (Kim *et al.*, 2012), se puede considerar como una respuesta de defensa contra el aumento de la muerte celular inducida por Al que contribuye a la desintoxicación de la elevada carga celular con Al, junto con los altos niveles de Zn, en la variedad Modan. Por otra parte, el Al provocó un fuerte aumento de la expresión NRAT1 y ALS1 en Modan. NRAT1 es un transportador de Al situado en la membrana plasmática, mientras que ALS1 está situado en el tonoplasto. Se ha planteado la hipótesis de que NRAT1 es eficaz en la recuperación de Al tóxico de la pared celular después de liberarlo al citoplasma. El Al simplástico a su vez es secuestrado por ALS1 para ser transportado hacia la vacuola (Huang *et al.*, 2012). La observación de que la sobreexpresión de NRAT1 en Arabidopsis confiere tanto una mayor absorción de Al como una mayor tolerancia apoya la opinión de que NRAT1 juega un papel importante en la tolerancia al aluminio (Li *et al.*, 2014). El hallazgo en nuestro estudio que la expresión de NRAT1 aumentó en la variedad sensible a Al Modan, pero no en la tolerante Nipponbare no debe ser considerado un argumento contra el papel de NRAT1 en la tolerancia al Al. De hecho las raíces de Modan son capaces de mantener una tasa, aunque reducida, de la elongación de la raíz (Fig. 8), a pesar de la enorme acumulación de Al en la raíz (Fig. 14). Como el Al había sido desorbido de las raíces con ácido cítrico antes del análisis Al es poco probable que la gran diferencia en la concentración de Al fuera debida a la precipitación del Al en la superficie o por una unión masiva de Al en el apoplasto de las raíces de Modan. Probablemente la mayoría del Al es transportado dentro de las células de la raíz

de Modan. Esta hipótesis es apoyada también por la relativamente baja tinción de hematoxilina y la intensa tinción Morin de las puntas de las raíces en Modan (Fig. 16). En este contexto, ha de tenerse en cuenta que la hematoxilina se cree que tiñe principalmente el Al unido a la pared celular, en contraste con Morin que revela principalmente el Al citoplasmático (Ownby, 1993, Eticha *et al.*, 2005). Sin embargo, la cooperación en Modan entre NRAT1 de recuperar parte del Al de las paredes celulares y la canalización de Al en la vacuola por parte de ALS1, junto con la reducción del estrés oxidativo inducido por Al de ARS1 no fue tan eficaz para evitar estrés por toxicidad de Al como la estrategia de exclusión en Nipponbare mediada por STAR1.

Investigaciones recientes sugieren que la proteína ASR5 puede actuar como un factor de transcripción que regula múltiples genes implicados en la tolerancia al Al en arroz (Arenhart *et al.*, 2013). Entre otros ASR5 se une al promotor STAR1 activando la transcripción de este gen que codifica para una proteína transportadora, que junto con Star2 forma un complejo responsable del transporte de UDP-glucosa a la pared celular (Arenhart *et al.*, 2013). Esta exportación está involucrada en el enmascaramiento de los sitios de unión a Al y la consecuente reducción de la toxicidad de Al en variedades resistentes (Huang *et al.*, 2009). El análisis por RT-qPCR aquí no reveló diferencias varietales en el aumento de expresión de ASR5 inducida por Al, pero sí que hubo claramente una mayor expresión inducida por Al de STAR1 en la variedad tolerante Nipponbare a las 48 h de exposición a Al. En la variedad sensible Modan el tratamiento con Al sólo tuvo una pequeña influencia (1,7 veces después de 72 h de exposición) sobre la expresión STAR1 (Fig. 22A).

En relación al gen *art1* se expresa constitutivamente en las raíces y su expresión no es inducida por el tratamiento con Al (Tsutsui *et al.*, 2012), de ahí que no se haya visto aumentada

la expresión de este gen en ninguna de las dos variedades (Fig. 21) en presencia de Al. Sin embargo, ART1 es un factor de transcripción que regula hasta 31 genes que codifican proteínas que intervienen en la desintoxicación del Al, entre las que se incluyen STAR1, STAR2 y NRAT1 (Yamaji et al., 2009).

La activación génica diferencial debido a la exposición Al en Nipponbare y Modan abre la pregunta sobre las diferencias en las señales de transducción del Al entre ambos cultivares. En una primera aproximación aquí consideramos el SA, el precursor de etileno ACC, el JA, y el ABA. En *Arabidopsis thaliana* la producción de ROS inducida por Al y la muerte celular parece estar mediada por el SA (Kunihiro et al., 2011), mientras que el SA bloqueó la producción de ROS inducida por Al en *Cassia tora* y alivió la toxicidad del Al en *Coffea arabica* (Wang et al., 2004; Muñoz-Sánchez et al., 2013). Se ha encontrado que un pico rápido transitorio de etileno después de 15 minutos de exposición a Al precede a la inhibición del crecimiento de la raíz en el frijol (Massot et al, 2002), mientras que no se han observado diferencias en la señalización de etileno entre cultivares de trigo con diferentes tolerancias a Al (Tice et al., 1992). En este caso, la falta de interacciones significativas variedad-tratamiento para diversas concentraciones de ACC, un precursor de la biosíntesis de etileno, no apoya un papel para esta fitohormona en la señalización diferencial de Al en el arroz dentro del marco de tiempo analizado en nuestro experimento. En el informe de Kunihiro y colaboradores (2011) describieron un bucle de señalización de SA y de la expresión del gen *AtrbohD* dependiente de SA que conduce a una producción prolongada de ROS y el desarrollo de la muerte celular en las células de *Arabidopsis* expuestas a Al. En este trabajo la no observación de un aumento de la concentración de SA en presencia de Al podría explicarse por una doble acción inhibitoria de la formación de ROS, ya sea a través del Zn sobre las NADPH

oxidadas como por la proteína secuestradora de ROS, ASR1. En la Fig. 24 se muestra un esquema sobre los mecanismos de las estrategias de los dos genotipos estudiados en presencia de Al.

Investigaciones anteriores han relacionado el estrés oxidativo inducido por Al y el aumento de la síntesis de lignina con la señalización de JA en puntas de raíces de *C. tora*, una especie de planta que se adapta bien a las condiciones de suelos ácidos (Xue *et al.*, 2008). Aquí, el Al aumentó las concentraciones de JA en las raíces y hojas de Nipponbare, especialmente después de 48 h de exposición. De acuerdo con los resultados de la tinción con Evans blue y del contenido de MDA este aumento de JA no puede ser atribuido ni a la peroxidación lipídica inducida por Al ni a la muerte celular masiva. Otros estudios están en curso para ver si este estallido de JA aquí también está relacionado con el aumento de la lignificación a nivel local, lo que puede contribuir a la exclusión de Al de la punta de la raíz.

Entre las fitohormonas de señalización de estrés que aquí se analizaron, el ABA exhibió las interacciones más distintivos de tratamiento y variedad (Fig. 19B). Los niveles más bajos de ABA endógeno en las puntas de raíces expuestas a Al durante 24 h se han relacionado con una mayor susceptibilidad a sequía en plantas de frijol sensibles a Al (Yang, *et al.*, 2012). En contraste, en nuestras variedades de arroz se observó un aumento de las concentraciones de ABA en raíces después de 48 h de exposición, tanto en la variedad tolerante Nipponbare como en la sensible Modan. Sin embargo, la concentración alcanzada fue dos veces mayor en Nipponbare que en Modan (Fig. 19B). En Nipponbare el incremento de los niveles de ABA en raíz coincidió en el tiempo con la fuerte sobreexpresión de STAR1. También en *Fagopyrum esculentum*, una dicotiledonea muy resistente a la toxicidad del Al se ha encontrado que el ABA activa la expresión de

genes de resistencia a AI (Reyna-Llorens et al., 2015). Así, en genotipos resistentes, el ABA podría jugar un papel central en la señalización del estrés en genotipos resistentes llevando finalmente a una activación de mecanismos de resistencia.

Comparando una variedad de un arroz japónica tolerante a AI y una variedad Indica sensible se ha observado una mayor expresión de ASR5 en la variedad japónica después de 8 h AI exposición, mientras que la expresión STAR1 fue sobreexpresado en ambas variedades (Arenhart et al., 2013). En nuestro experimento a largo plazo se observó el comportamiento opuesto; no hay diferencias entre los cultivares en la expresión de ASR5, pero sí una mayor expresión STAR1 inducida por el AI en Nipponbare (japónica) que en Modan (Indica) (Fig. 22A). Se han caracterizado cinco ASR genes. En el tomate la mayoría de ellos están regulados por ABA, pero no ASR3 / ASR5 (Arenhart et al., 2013). En el arroz se ha encontrado que la expresión de ASR5 aumenta por AI y la sequía y está infraexpresado por la radiación UV. No hay información sobre si el gen ASR5 en arroz responde o no a ABA (Arenhart et al., 2013). Nuestros resultados dan apoyo circunstancial sobre un papel del ABA en la expresión de STAR1. Sin embargo, esto no parece ocurrir a través de ASR5, puesto que no se observaron diferencias en la expresión de ASR5 correspondientes a cultivares

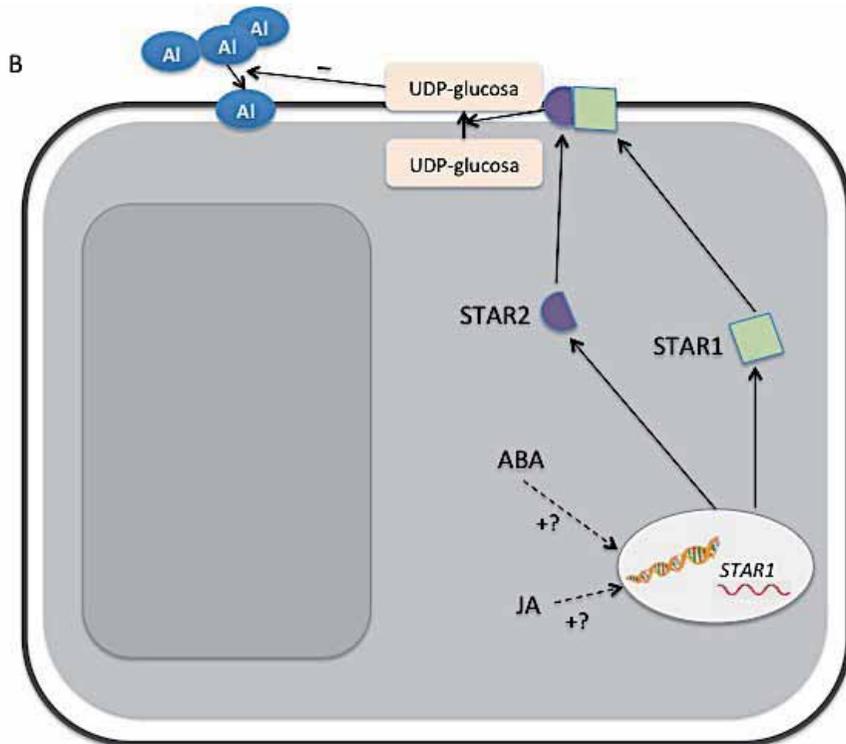
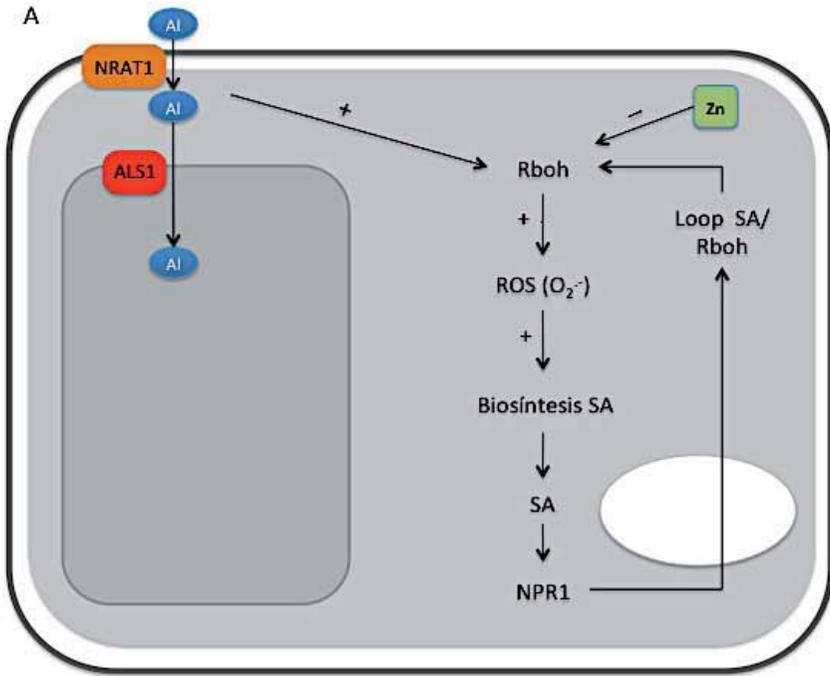


Fig. 24. Esquema de las distintas estrategias en las células de raíz de las variedades de arroz Modan (A) y Nipponbare (B) ante un estrés por Al. Modan realiza un mecanismo de detoxificación a través del transporte *Nrat1* que transporta el Al de la pared celular (PC) al citoplasma (gris claro) y *Als1* que lo envía a la vacuola (gris oscuro). En cambio, Nipponbare consigue impedir el paso del Al a la PC gracias a un cambio conformacional de la pared por el eflujo de UDP-glucosa activado por el complejo STAR1/STAR2. El ABA y el JA posiblemente actúen como señalizadores para activar la expresión de STAR1 en el núcleo (blanco).

Existen relativamente pocos estudios donde se relacionen diferencias varietales en las variaciones de tolerancia al estrés dependiente del tiempo de exposición y las concentraciones endógenas de hormonas de señalización de estrés. Dentro de una variedad de cítricos se ha demostrado que se requiere una acumulación transitoria de JA para la biosíntesis de ABA (de Ollas *et al.*, 2013). Picos transitorios de JA y ABA endógenos se han relacionado con la activación de la transcripción de genes de defensa durante la interacción entre *A. thaliana* y un hongo endofítico (Vahabi *et al.*, 2015). Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que relaciona picos transitorios de concentración de ABA y JA en respuesta a Al en una variedad de arroz tolerante a Al. La alta concentración transitoria de las llamadas hormonas del estrés en la variedad tolerante corresponde a la fase de alarma que se requiere para la activación de mecanismos de defensa inducible. Una vez que las defensas son efectivas una rápida rotación de la señal restaura las concentraciones rebajándolas.

6 CONCLUSIONES

Ante los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye que:

- Las estrategias de resistencia a aluminio que presentan los genotipos de arroz estudiados superan en gran medida a las que se establecen en muchas otras especies vegetales.
- En presencia de aluminio la estrategia de exclusión de este metal que posee la variedad resistente Nipponbare supera a la de detoxificación interna de la variedad Modan. Ello se traduce en un menor descenso en el crecimiento de la raíz y una mejor homeostasis de los nutrientes en la variedad Nipponbare.
- Los altos niveles de zinc constitutivos y la sobreexpresión de la proteína ASR1 en presencia de aluminio, que actúa como chaperona, permite que la variedad sensible Modan no presente un estallido oxidativo que genere una peroxidación de lípidos de membrana en las células de la raíz.
- El SA no actúa como señalizador del estrés por Al en la variedad de arroz sensible Modan; esto contrasta con el comportamiento de especies más sensibles al Al en las que se había descrito un incremento de los niveles de SA en respuesta al estrés por Al.
- El ABA y el JA parecen tener un papel importante como señalizadores del estrés por aluminio en la variedad tolerante Nipponbare. El aumento de ABA a las 48h podría estar ligado al aumento de la sobreexpresión del gen *Star1*, gen implicado en el cambio de

conformación de la pared celular que impide la absorción del aluminio en las células de la raíz. Esto abre las puertas a una nueva línea de investigación para profundizar en este campo.

- *Nrat1* y *Als1* son los genes implicados en la detoxificación del aluminio en el genotipo Modan, transportando el aluminio de la pared celular al citoplasma y de éste hacia la vacuola.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Akhter, A., Khan, S.H., Hiroaki, E., Tawaraya, K., Rao, I.M., Wenzl, P., Ishikawa, S., and Wagatsuma, T. (2009). Greater contribution of low-nutrient tolerance to sorghum and maize growth under combined stress conditions with high aluminum and low nutrients in solution culture simulating the nutrient status of tropical acid soils. *Soil Science and Plant Nutrition* 55, 394–406.
- Ali, S., Zeng, F., Qiu, B., Cai, S., Qiu, L., Wu, F., and Zhang, G. (2011). Interactive effects of aluminum and chromium stresses on the uptake of nutrients and the metals in barley. *Soil Science and Plant Nutrition* 57, 68–79.
- Amenos, M., Corrales, I., Poschenrieder, C., Illes, P., Baluska, F., and Barcelo, J. (2009). Different Effects of Aluminum on the Actin Cytoskeleton and Brefeldin A-Sensitive Vesicle Recycling in Root Apex Cells of Two Maize Varieties Differing in Root Elongation Rate and Aluminum Tolerance. *Plant and Cell Physiology* 50, 528–540.
- Arenhart, R.A., Margis, R., and Margis-Pinheiro, M. (2012). The rice ASR5 protein: A putative role in the response to aluminum photosynthesis disturbance. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1263–1266.
- Arenhart, R.A., De Lima, J.C., Pedron, M., Carvalho, F.E.L., Da Silveira, J.A.G., Rosa, S.B., Caverzan, A., Andrade, C.M.B., SchüNemann, M., Margis, R., et al. (2013). Involvement of ASR genes in aluminium tolerance mechanisms in rice: ASR genes and aluminium tolerance in rice. *Plant, Cell & Environment* 36, 52–67.
- Arenhart, R.A., Bai, Y., Valter de Oliveira, L.F., Bucker Neto, L., Schunemann, M., Maraschin, F. dos S., Mariath, J., Silverio, A., Sachetto-Martins, G., Margis, R., et al. (2014). New Insights into Aluminum Tolerance in

Rice: The ASR5 Protein Binds the STAR1 Promoter and Other Aluminum-Responsive Genes. *Molecular Plant* 7, 709–721.

- Arroyave, C., Tolrà, R., Thuy, T., Barceló, J., and Poschenrieder, C. (2013). Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. *Environmental and Experimental Botany* 89, 11–18.
- Baligar, V.C., and Fageria, N.K. (2005a). Aluminum influence on growth and uptake of micronutrients by cacao. *JOURNAL OF FOOD AGRICULTURE AND ENVIRONMENT* 3, 173.
- Baligar, V.C., and Fageria, N.K. (2005b). Soil aluminum effects on growth and nutrition of cacao. *Soil Science & Plant Nutrition* 51, 709–713.
- Baligar, V.C., and Fageria, N.K. (2005c). Soil Aluminum Effects on Growth and Nutrition of Cacao. *Soil Science and Plant Nutrition* 51, 709–713.
- Barcelo, J., and Poschenrieder, C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48, 75–92.
- Berg, J.M., and Shi, Y. (1996). The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271, 1081.
- Blancaflor, E.B., Jones, D.L., and Gilroy, S. (1998). Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology* 118, 159–172.
- Blevins, D.G., and Lukaszewski, K.M. (1998). Boron in plant structure and function. *Annual Review of Plant Biology* 49, 481–500.

- Boscolo, P.R., Menossi, M., and Jorge, R.A. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62, 181–189.
- Buckner, B., Johal, G.S., and Janick-Buckner, D. (2000). Cell death in maize. *Physiologia Plantarum* 108, 231–239.
- Cakmak, I., Hengeler, C., and Marschner, H. (1994a). Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1251–1257.
- Cakmak, I., Hengeler, C., and Marschner, H. (1994b). Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. *Journal of Experimental Botany* 45, 1245–1250.
- Cakmak, I., Yazici, A.M., and others (2010). Magnesium: a forgotten element in crop production. *Better Crops* 94, 23–25.
- Chen, R.F. (2006). Response of Rice (*Oryza sativa*) with Root Surface Iron Plaque Under Aluminium Stress. *Annals of Botany* 98, 389–395.
- Collins, N.C., Shirley, N.J., Saeed, M., Pallotta, M., and Gustafson, J.P. (2008). An ALMT1 Gene Cluster Controlling Aluminum Tolerance at the Alt4 Locus of Rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 179, 669–682.
- Corrales, I., Poschenrieder, C., and Barceló, J. (2008). Boron-induced amelioration of aluminium toxicity in a monocot and a dicot species. *Journal of Plant Physiology* 165, 504–513.
- Darkó, É., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, É., Fodor, J., Bakos, F., and Barnabás, B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in

vitro microspore selection. *Plant Science* 166, 583–591.

- Delhaize, E., and Ryan, P.R. (1995). Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiology* 107, 315.
- Delhaize, E., Ma, J.F., and Ryan, P.R. (2012). Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends in Plant Science* 17, 341–348.
- Delisle, G., Champoux, M., and Houde, M. (2001). Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant and Cell Physiology* 42, 324–333.
- Dogan, I., Ozyigit, I.I., and Demir, G. (2014). INFLUENCE OF ALUMINUM ON MINERAL NUTRIENT UPTAKE AND ACCUMULATION IN *URTICA PILULIFERA* L. *Journal of Plant Nutrition* 37, 469–481.
- Doncheva, S. (2005). Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56, 1213–1220.
- Edwards, J., and Horton, B. (1977). Aluminum-induced calcium deficiency in peach seedlings. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.:(United States)* 102.
- Eticha, D. (2005). Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany* 56, 1351–1357.
- Ezaki, B., TsugUa, S., and Matsumoto, H. (1996). Expression of a moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in tobacco cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminum ion stress. *Physiologia Plantarum* 96, 21–28.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., and Matsumoto, H. (2000). Expression of aluminum-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology* 122, 657–666.

- Fageria, N.K., Ballgar, V.C., and Wright, R.J. (1988). Aluminum toxicity in crop plants. *Journal of Plant Nutrition* 11, 303–319.
- Famoso, A.N., Clark, R.T., Shaff, J.E., Craft, E., McCouch, S.R., and Kochian, L.V. (2010). Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. *PLANT PHYSIOLOGY* 153, 1678–1691.
- Famoso, A.N., Zhao, K., Clark, R.T., Tung, C.-W., Wright, M.H., Bustamante, C., Kochian, L.V., and McCouch, S.R. (2011). Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. *PLoS Genetics* 7, e1002221.
- Foy, C.D. (1988). Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 19, 959–987.
- Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda, K., and Ma, J.F. (2007). An Aluminum-Activated Citrate Transporter in Barley. *Plant and Cell Physiology* 48, 1081–1091.
- Gara, L., Pinto, M. de, and Arrigoni, O. (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100, 894–900.
- Garcia-Oliveira, A.L., Martins-Lopes, P., Tolrá, R., Poschenrieder, C., Tarquis, M., Guedes-Pinto, H., and Benito, C. (2014). Molecular characterization of the citrate transporter gene *TaMATE1* and expression analysis of upstream genes involved in organic acid transport under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* 152, 441–452.
- Garris, A.J. (2004). Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169, 1631–1638.

- Giannakoula, A., Moustakas, M., Mylona, P., Papadakis, I., and Yupsanis, T. (2008). Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. *Journal of Plant Physiology* 165, 385–396.
- Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., and Yupsanis, T. (2010). Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany* 67, 487–494.
- Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I., and Marín-Garza, T. (2014). Concentración de micronutrientos y crecimiento de raíz en variedades de arroz expuestas a aluminio. *Revista Fitotecnia Mexicana* 37, 243–248.
- Grabski, S., and Schindler, M. (1995). Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. *Plant Physiology* 108, 897–901.
- Gruber, B.D., Ryan, P.R., Richardson, A.E., Tyerman, S.D., Ramesh, S., Hebb, D.M., Howitt, S.M., and Delhaize, E. (2010). HvALMT1 from barley is involved in the transport of organic anions. *Journal of Experimental Botany* 61, 1455–1467.
- Gunse, B., Poschenrieder, C., and Barcelo, J. (1997). Water transport properties of roots and root cortical cells in proton- and Al-stressed maize varieties. *Plant Physiology* 113, 595–602.
- Gunsé, B., Poschenrieder, C., and Barceló, J. (2000). The role of ethylene metabolism in the short-term responses to aluminium by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. *Environmental and Experimental Botany* 43, 73–81.
- Guo, T.R., Zhang, G.P., and Zhang, Y.H. (2007). Physiological changes in barley plants under combined

toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 57, 182–188.

- Hall, J. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1–11.
- Haug, A., Shi, B., and Vitorello, V. (1994). Aluminum interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Archives of Toxicology* 68, 1–7.
- Hippeli, S., Heiser, I., and Elstner, E.F. (1999). Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 167–178.
- Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Piñeros, M.A., Cançado, G.M., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., et al. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 9738–9743.
- Howe, G.A., and Schilmiller, A.L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230–236.
- Huang, C.-F., Yamaji, N., Chen, Z., and Ma, J.F. (2012a). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice: ABC transporter for Al tolerance. *The Plant Journal* 69, 857–867.
- Huang, C.-F., Yamaji, N., Chen, Z., and Ma, J.F. (2012b). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice: ABC transporter for Al tolerance. *The Plant Journal* 69, 857–867.
- Huang, C.F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., and Ma, J.F. (2009). A Bacterial-Type ABC

Transporter Is Involved in Aluminum Tolerance in Rice. *THE PLANT CELL ONLINE* 21, 655–667.

- Huang, J.W., Shaff, J.E., Grunes, D.L., and Kochian, L.V. (1992). Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiology* 98, 230–237.
- Ikegawa, H., Yamamoto, Y., and Matsumoto, H. (2000). Responses to aluminium of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 503–514.
- Jansen, S., Watanabe, T., Caris, P., Geuten, K., Lens, F., Pyck, N., and Smets, E. (2004). The Distribution and Phylogeny of Aluminium Accumulating Plants in the Ericales. *Plant Biology* 6, 498–505.
- Jiang, H.-X., Tang, N., Zheng, J.-G., Li, Y., and Chen, L.-S. (2009). Phosphorus alleviates aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis in *Citrus grandis* seedlings. *Physiologia Plantarum* 137, 298–311.
- Jones, A. (2000). Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science* 5, 225–230.
- Jones, D.L., and Kochian, L.V. (1995). Aluminum inhibition of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminum toxicity? *The Plant Cell* 7, 1913–1922.
- Jones, D.L., and Kochian, L.V. (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., Blancaflor, E.B., Kochian, L.V., and Gilroy, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment* 29, 1309–1318.

- Khush, G.S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. In *Oryza: From Molecule to Plant*, (Springer), pp. 25–34.
- Kim, I.-S., Kim, Y.-S., and Yoon, H.-S. (2012). Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells* 33, 285–293.
- Kinraide, T.B. (1991). Identity of the rhizotoxic aluminium species. In *Plant-Soil Interactions at Low pH: Proceedings of the Second International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH*, 24–29 June 1990, Beckley West Virginia, USA, R.J. Wright, V.C. Baligar, and R.P. Murrmann, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 717–728.
- Kinraide, T.B., and Parker, D.R. (1990). Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum to four dicotyledonous species. *Physiologia Plantarum* 79, 283–288.
- Kochian, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology* 46, 237–260.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., and Piñeros, M.A. (2004). HOW DO CROP PLANTS TOLERATE ACID SOILS? MECHANISMS OF ALUMINUM TOLERANCE AND PHOSPHOROUS EFFICIENCY. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459–493.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., and Hoekenga, O.A. (2005). The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. *Plant and Soil* 274, 175–195.
- Kollmeier, M., Felle, H.H., and Horst, W.J. (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.

- Kopittke, P.M., Moore, K.L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B.J., Blamey, F.P.C., Menzies, N.W., Nicholson, T.M., McKenna, B.A., Wang, P., et al. (2015). Identification of the Primary Lesion of Toxic Aluminum in Plant Roots. *Plant Physiology* 167, 1402–1411.
- Kranner, H., and Grill, D. (1993). Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiologia Plantarum* 88, 557–562.
- Kuhn, A.J., Bauch, J., and Schröder, W.H. (1995). Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant and Soil* 168, 135–150.
- Kunihiro, S., Hiramatsu, T., and Kawano, T. (2011). Involvement of salicylic acid signal transduction in aluminum-responsive oxidative burst in *A. thaliana* cell suspension culture. *Plant Signaling & Behavior* 6, 611–616.
- Kuswanto, H. (2014). Nutrient uptake of soybean genotypes under aluminum toxicity. *Italian Journal of Agronomy* 9, 136.
- Larsen, P.B., Geisler, M.J., Jones, C.A., Williams, K.M., and Cancel, J.D. (2005). ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 41, 353–363.
- Larsen, P.B., Cancel, J., Rounds, M., and Ochoa, V. (2007). *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225, 1447–1458.
- Li, J.-Y., Liu, J., Dong, D., Jia, X., McCouch, S.R., and Kochian, L.V. (2014). Natural variation underlies

alterations in Nramp aluminum transporter (NRAT1) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 6503–6508.

- Liao, H. (2006). Phosphorus and Aluminum Interactions in Soybean in Relation to Aluminum Tolerance. Exudation of Specific Organic Acids from Different Regions of the Intact Root System. *PLANT PHYSIOLOGY* *141*, 674–684.
- Ligaba, A., Katsuhara, M., Ryan, P.R., Shibasaka, M., and Matsumoto, H. (2006). The BnALMT1 and BnALMT2 Genes from Rape Encode Aluminum-Activated Malate Transporters That Enhance the Aluminum Resistance of Plant Cells. *PLANT PHYSIOLOGY* *142*, 1294–1303.
- Ligaba, A., Maron, L., Shaff, J., Kochian, L., and Piñeros, M. (2012). Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux: ZmALMT2 mediates malate efflux. *Plant, Cell & Environment* *35*, 1185–1200.
- Lin, C., Hara, A., Comparini, D., Bouteau, F., and Kawano, T. (2015). Zinc-Dependent Protection of Tobacco and Rice Cells From Aluminum-Induced Superoxide-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Plant Science* *6*.
- Lin, C.-W., Lin, C.-Y., Chang, C.-C., Lee, R.-H., Tsai, T.-M., Chen, P.-Y., Chi, W.-C., and Huang, H.-J. (2009). Early signalling pathways in rice roots under vanadate stress. *Plant Physiology and Biochemistry* *47*, 369–376.
- Liu, K., and Luan, S. (2001). Internal aluminum block of plant inward K⁺ channels. *The Plant Cell* *13*, 1453–1466.
- Liu, J., Magalhaes, J.V., Shaff, J., and Kochian, L.V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families

- function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal* 57, 389–399.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
 - Llugany, M., Poschenrieder, C., and Barceló, J. (1995). Monitoring of aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Physiologia Plantarum* 93, 265–271.
 - Llugany, M., Martin, S.R., Barceló, J., and Poschenrieder, C. (2013). Endogenous jasmonic and salicylic acids levels in the Cd-hyperaccumulator *Noccaea* (*Thlaspi*) *praecox* exposed to fungal infection and/or mechanical stress. *Plant Cell Reports* 32, 1243–1249.
 - Ma, J.F., Ryan, P.R., and Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6, 273–278.
 - Ma, J.F., Shen, R., Zhao, Z., Wissuwa, M., Takeuchi, Y., Ebitani, T., and Yano, M. (2002). Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant and Cell Physiology* 43, 652–659.
 - Ma, J.F., Shen, R., Nagao, S., and Tanimoto, E. (2004). Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology* 45, 583–589.
 - Ma, J.F., Chen, Z.C., and Shen, R.F. (2014). Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant and Soil* 381, 1–12.
 - Macêdo, C.E., and Jan, V.V. (2008). Effect of aluminum stress on mineral nutrition in rice cultivars differing in aluminum sensitivity. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 12, 363–369.

- Magalhaes, J.V., Liu, J., Guimarães, C.T., Lana, U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y.-H., Schaffert, R.E., Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., Shaff, J.E., et al. (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39, 1156–1161.
- Magnavaca, R., Gardner, C., and Clark, R. (1987). Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, (Springer), pp. 255–265.
- Mahajan, S., and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.
- Mariano, E.D., and Keltjens, W.G. (2005). Long-Term Effects of Aluminum Exposure on Nutrient Uptake by Maize Genotypes Differing in Aluminum Resistance. *Journal of Plant Nutrition* 28, 323–333.
- Marín-Garza, T., Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I., Muñoz-Orozco, A., Tavitas-Fuentes, L., Hernández-Aragón, L., and Santacruz-Varela, A. (2010). Respuestas fisiológicas y nutrimentales de variedades de arroz a la concentración de aluminio. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33, 37–44.
- Massot, N., Nicander, B., Barceló, J., Poschenrieder, C.H., and Tillberg, E. (2002). A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation* 37, 105–112.
- Matsumoto, H. (2000). Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. In *International Review of Cytology*, (Academic Press), pp. 1–46.
- Matsumoto, H., and Motoda, H. (2012). Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible

association with oxidative stress. *Plant Science* 185-186, 1–8.

- Matsumoto, H., Hirasawa, E., Morimura, S., and Takahashi, E. (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.
- Muñoz-Sanchez, J.A., Chan-May, A., Cab-Guillén, Y., and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2013). Effect of salicylic acid on the attenuation of aluminum toxicity in *Coffea arabica* L. suspension cells: A possible protein phosphorylation signaling pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry* 128, 188–195.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165–185.
- Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Oka, H.I. (1958). Intervarietal variation and classification of cultivated rice. *Ind J Genet Plant Breed* 18: 79–89.
- Oka, H.I. (1988) Origin of cultivated rice. Japanese Scientific Society Press/Elsevier, Tokyo, Amsterdam.
- De Ollas, C., Hernando, B., Arbona, V., and Gómez-Cadenas, A. (2013). Jasmonic acid transient accumulation is needed for abscisic acid increase in citrus roots under drought stress conditions. *Physiologia Plantarum* 147, 296–306.
- O'Neill, M.A., Ishii, T., Albersheim, P., and Darvill, A.G. (2004). RHAMNOGALACTURONAN II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology* 55, 109–139.

- Ono, K., Yamamoto, Y., Hachiya, A., and Matsumoto, H. (1995). Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. *Plant and Cell Physiology* 36, 115–125.
- Ownby, J.D. (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. *Physiologia Plantarum* 87, 371–380.
- Pan, J., Zhu, M., and Chen, H. (2001). Aluminum-induced cell death in root-tip cells of barley. *Environmental and Experimental Botany* 46, 71–79.
- Parker, D.R., Norvell, W.A., and Chaney, R. (1995). GEOCHEM-PC—a chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. *Chemical Equilibrium and Reaction Models* 253–269.
- Piñeros, M.A., Cançado, G.M.A., Maron, L.G., Lyi, S.M., Menossi, M., and Kochian, L.V. (2008). Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 - an anion-selective transporter: Cloning and characterization of an ALMT1-type transporter in maize. *The Plant Journal* 53, 352–367.
- Piřselová, B., Kuna, R., Libantová, J., Moravčíková, J., and Matusířková, I. (2011). Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. *Molecular Biology Reports* 38, 3437–3446.
- Polle, E., Konzak, C., and Kattrick, J. (1978). Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science* 18, 823–827.
- Poschenrieder, C., Gunsé, B., Corrales, I., and Barceló, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance

in plants. *Science of The Total Environment* 400, 356–368.

- Poschenrieder, C., Amenós, M., Corrales, I., Doncheva, S., and Barceló, J. (2009). Root Behavior in Response to Aluminum Toxicity. In *Plant-Environment Interactions: From Sensory Plant Biology to Active Plant Behavior*, F. Baluška, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 21–43.
- Van Praag, H.J., Weissen, F., Dreze, P., and Cogneau, M. (1997). Effects of aluminium on calcium and magnesium uptake and translocation by root segments of whole seedlings of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). *Plant and Soil* 189, 267–273.
- Rangel, A.F., Rao, I.M., Braun, H.-P., and Horst, W.J. (2010). Aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. *Physiologia Plantarum* 138, 176–190.
- Rengel, Z. (1992). Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytologist* 121, 499–513.
- Rengel, Z., and Robinson, D.L. (1989). Competitive Al³⁺ inhibition of net Mg²⁺ uptake by intact *Lolium multiflorum* roots I. Kinetics. *Plant Physiology* 91, 1407–1413.
- Reyna-Llorens, I., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barcelo, J., and Cruz-Ortega, R. (2015). Both aluminum and ABA induce the expression of an ABC-like transporter gene (FeALS3) in the Al-tolerant species *Fagopyrum esculentum*. *Environmental and Experimental Botany* 111, 74–82.
- Ribeiro, M.A.Q., Almeida, A.-A.F. de, Mielke, M.S., Gomes, F.P., Pires, M.V., and Baligar, V.C. (2013). ALUMINUM EFFECTS ON GROWTH, PHOTOSYNTHESIS, AND MINERAL NUTRITION OF CACAO GENOTYPES. *Journal of Plant Nutrition* 36, 1161–1179.

- Richards, K.D., Schott, E.J., Sharma, Y.K., Davis, K.R., and Gardner, R.C. (1998). Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116, 409–418.
- Richter, C., and Schweizer, M. (1997). Oxidative stress in mitochondria. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 34, 169–200.
- Rincon-Zachary, M., Teaster, N.D., Sparks, J.A., Valster, A.H., Motes, C.M., and Blancaflor, E.B. (2010). Fluorescence Resonance Energy Transfer-Sensitized Emission of Yellow Cameleon 3.60 Reveals Root Zone-Specific Calcium Signatures in *Arabidopsis* in Response to Aluminum and Other Trivalent Cations. *PLANT PHYSIOLOGY* 152, 1442–1458.
- Ryan, P., Delhaize, E., and Randall, P. (1995). Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. *Functional Plant Biology* 22, 531–536.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J., and Delhaize, E. (2009). A Second Mechanism for Aluminum Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* 149, 340–351.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., and del Río, L.A. (2008). Imaging of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide In Vivo in Plant Tissues. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 397–409.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., Delhaize, E., and Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 37, 645–653.
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., Fujita, M., Shinozaki, K., Shibata, D., Kobayashi, M., et al. (2009). STOP1 Regulates Multiple

Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities. *PLANT PHYSIOLOGY* 150, 281–294.

- Schützendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., and Polle, A. (2001). Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *PLANT PHYSIOLOGY* 127, 887–898.
- Shaff, J.E., Schultz, B.A., Craft, E.J., Clark, R.T., and Kochian, L.V. (2010). GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant and Soil* 330, 207–214.
- Shen, R. (2003). Form of Al changes with Al concentration in leaves of buckwheat. *Journal of Experimental Botany* 55, 131–136.
- Silva, I.R., Smyth, T.J., Raper, C.D., Carter, T.E., and Ruffy, T.W. (2001). Differential aluminum tolerance in soybean: an evaluation of the role of organic acids. *Physiologia Plantarum* 112, 200–210.
- Simões, C.C., Melo, J.O., Magalhães, J.V., and Guimarães, C.T. (2012). Review Genetic and molecular mechanisms of aluminum tolerance in plants. *Genetics and Molecular Research* 11, 1949–1957.
- Simon, L., Smalley, T.J., Jones, J.B., and Lasseigne, F.T. (1994). Aluminum toxicity in tomato. Part 1. growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition* 17, 293–306.
- Sivaguru, M., and Horst, W.J. (1998). The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology* 116, 155–163.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical*

Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 355, 1455–1464.

- Stass, A., Kotur, Z., and Horst, W.J. (2007). Effect of boron on the expression of aluminium toxicity in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 131, 283–290
- Sun, P., Tian, Q.-Y., Chen, J., and Zhang, W.-H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany* 61, 347–356.
- Tabaldi, L.A., Cargnelutti, D., Gonçalves, J.F., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Maldaner, J., Rauber, R., Rossato, L.V., Bisognin, D.A., Schetinger, M.R.C., et al. (2009). Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. *Chemosphere* 76, 1402–1409.
- Taylor, G.J. (1991). Current views of the aluminum stress response; the physiological basis of tolerance.
- Taylor, G.J., McDonald-Stephens, J.L., Hunter, D.B., Bertsch, P.M., Elmore, D., Rengel, Z., and Reid, R.J. (2000). Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiology* 123, 987–996.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4991–4996.
- Tice, K.R., Parker, D.R., and DeMason, D.A. (1992). Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiology* 100, 309–318.
- Tsutsui, T., Yamaji, N., Huang, C.F., Motoyama, R., Nagamura, Y., and Ma, J.F. (2012). Comparative

Genome-Wide Transcriptional Analysis of Al-Responsive Genes Reveals Novel Al Tolerance Mechanisms in Rice. *PLoS ONE* 7, e48197.

- Tyagi, A.K., Mohanty, A., Bajaj, S., Chaudhury, A., and Maheshwari, S.C. (1999). Transgenic Rice: A Valuable Monocot System for Crop Improvement and Gene Research. *Critical Reviews in Biotechnology* 19, 41–79.
- Von Uexküll, H., and Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171, 1–15.
- Vahabi, K., Sherameti, I., Bakshi, M., Mrozinska, A., Ludwig, A., Reichelt, M., and Oelmüller, R. (2015). The interaction of *Arabidopsis* with *Piriformospora indica* shifts from initial transient stress induced by fungus-released chemical mediators to a mutualistic interaction after physical contact of the two symbionts. *BMC Plant Biology* 15.
- Vázquez, M.D., Poschenrieder, C., Corrales, I., and Barceló, J. (1999). Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology* 119, 435–444.
- Vitorello, V.A., Capaldi, F.R., and Stefanuto, V.A. (2005). Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 129–143.
- Wang, Y.-S., Wang, J., Yang, Z.-M., Wang, Q.-Y., Lu, B., Li, S.-Q., Lu, Y.-P., Wang, S.-H., and Sun, X. (2004). Salicylic acid modulates aluminum-induced oxidative stress in roots of *Cassia tora*. *ACTA BOTANICA SINICA-ENGLISH EDITION*- 46, 819–828.
- Wenzl, P., Patino, G.M., Chaves, A.L., Mayer, J.E., and Rao, I.M. (2001). The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. *Plant Physiology* 125, 1473–1484.

- Wolt, J.D. (1994). Soil solution chemistry: applications to environmental science and agriculture. (John Wiley and Sons).
- Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., and Ma, J.F. (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 18381–18385.
- Xu, Q., Yuan, X., Wang, S., Feng, Y., Yu, H., Wang, Y., Yang, Y., Wei, X., and Li, X. (2016). The genetic diversity and structure of indica rice in China as detected by single nucleotide polymorphism analysis. *BMC Genetics* 17.
- Xue, Y.J., Tao, L., and Yang, Z.M. (2008). Aluminum-Induced Cell Wall Peroxidase Activity and Lignin Synthesis Are Differentially Regulated by Jasmonate and Nitric Oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9676–9684.
- Yamaji, N., Huang, C.F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y., and Ma, J.F. (2009). A Zinc Finger Transcription Factor ART1 Regulates Multiple Genes Implicated in Aluminum Tolerance in Rice. *The Plant Cell* 21, 3339–3349.
- Yamamoto, Y., Hachiya, A., and Matsumoto, H. (1997). Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* 38, 1333–1339.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., and Matsumoto, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* 125, 199–208.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., and Matsumoto, H. (2002). Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the

Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *PLANT PHYSIOLOGY* 128, 63–72.

- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Devi, S.R., Rikiishi, S., and Matsumoto, H. (2003). Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. In *Roots: The Dynamic Interface Between Plants and the Earth*, (Springer), pp. 239–243.
- Yang, Y.-H., and Chen, S.-M. (2001). Physiological effects of aluminum/calcium ratios on aluminum toxicity of mungbean seedling growth. *Journal of Plant Nutrition* 24, 585–597.
- Yang, Z.-B., Eticha, D., Albacete, A., Rao, I.M., Roitsch, T., and Horst, W.J. (2012). Physiological and molecular analysis of the interaction between aluminium toxicity and drought stress in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany* 63, 3109–3125.
- Yang, Z.-B., Geng, X., He, C., Zhang, F., Wang, R., Horst, W.J., and Ding, Z. (2014a). TAA1-Regulated Local Auxin Biosynthesis in the Root-Apex Transition Zone Mediates the Aluminum-Induced Inhibition of Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 2889–2904.
- Yang, Z.-B., Geng, X., He, C., Zhang, F., Wang, R., Horst, W.J., and Ding, Z. (2014b). TAA1-Regulated Local Auxin Biosynthesis in the Root-Apex Transition Zone Mediates the Aluminum-Induced Inhibition of Root Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 2889–2904.
- Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. (2010). Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Functional Plant Biology* 37, 296–303.
- Yokosho, K., Yamaji, N., and Ma, J.F. (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice: An Al-inducible MATE gene. *The Plant Journal* 68, 1061–1069.

- Yoshida, S., Forno, D., Cock, J., and Gomez, K. (1976). Routine procedure for growing rice plants in culture solution. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice* 61–66.
- Yu, M., Shen, R., Xiao, H., Xu, M., Wang, H., Wang, H., Zeng, Q., and Bian, J. (2009). Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*). *Plant and Soil* 314, 87–98.