



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE FISIOLÓGIA VEGETAL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA

Vº Bº
Los directores de la Tesis

Dr. Juan Barceló Coll

Dr. Benet Gunsé Forcadell

Tesis presentada por
TERESA GARZÓN LÓPEZ
para optar al grado de
Doctora en Ciencias



Juan Barceló Coll, Catedrático de Fisiología Vegetal y **Benet Gunsé Forcadell**, Profesor Titular de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN:

que la Licenciada **Teresa Garzón López**, ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona, el trabajo que para optar al grado de Doctora en Ciencias (Sección Biología) presenta con el título:

***ESTUDIO DE LA COMPARTIMENTACIÓN CELULAR EN PLANTAS MODELO
SOMETIDAS A ESTRÉS POR ALUMINIO***

considerando concluida la presente memoria, autorizamos su presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste, firmamos el presente certificado a 27 de Octubre de 2003.

Juan Barceló Coll

Benet Gunsé Forcadell

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Doctor Juan Barceló Coll, catedrático y director de la Unidad de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona y al Doctor Benet Gunsé Forcadell, profesor titular de Fisiología Vegetal de la misma Facultad, ambos directores de este trabajo.

El presente trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a una Beca predoctoral concedida por el Comissionat per a Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya, así como a los proyectos DGICYT PB 97-0163-CO2-01: *Mecanismos adaptativos de la raíz al estrés iónico*, II Pla de Recerca de Catalunya 2000SGR 00066 y 2001SGR 00200 : *Ayuda a grupos de investigación consolidados*, DGICTY, BFI2001-2475-CO2-01: *Exclusión, detoxificación y compartimentalización como mecanismos básicos de resistencia al estrés iónico en plantas* y al proyecto ICA4-CT-2000-30017: *Maize for sustainable cropping systems on tropical acid soil from molecular biology to field cultivation*.

También quiero agradecer a todas las personas que forman parte de este Laboratorio por su ayuda tanto en el aspecto técnico como en el personal, entre todos muy especialmente a Benet por su ayuda, interés y apoyo en el trabajo. Gracias a Rosa y a Marc, además de como parte del equipo técnico del laboratorio, como amigos.

El agradecimiento más especial a mi familia, a mis padres y a mis hermanos que en esto, como en todo, han sido mi más importante y querida ayuda.

Gracias a mis amigos, Alex, Reyes, Leti, Quim y Varis. Y a Tati.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	El aluminio y la importancia de su estudio	1
1.2	Características físico-químicas del aluminio	2
1.2.1	<u>Especiación del aluminio en solución acuosa</u>	3
1.2.2	<u>Química del aluminio y pH</u>	4
1.3	Distribución del aluminio en la raíz	5
1.4	Aluminio en el apoplasto	6
1.4.1	<u>Pared celular</u>	7
1.4.2	<u>Membrana plasmática</u>	8
1.5	Transporte del aluminio	10
1.6	Traslocación del aluminio dentro de la planta	12
1.7	Alteraciones del aluminio en el simplasto	12
1.7.1	<u>Alteraciones en la transmisión de señales (fosfatidil inositol trifosfato)</u>	13
1.7.2	<u>Alteraciones en el citoesqueleto</u>	14
1.7.3	<u>Alteraciones en la funcionalidad del calcio</u>	15
1.7.4	<u>Formación de callosa</u>	17
1.7.5	<u>Efecto sobre el ADN</u>	18
1.8	Alteraciones nutritivas	19
1.8.1	<u>Interacción aluminio/calcio</u>	19
1.8.2	<u>Interacción aluminio/potasio</u>	20
1.8.3	<u>Interacción aluminio/hierro</u>	21
1.8.4	<u>Interacción aluminio/fósforo</u>	22
1.9	Tolerancia al aluminio	23
1.9.1	<u>Genética de resistencia al aluminio</u>	24

1.9.2	<u>Cambio del pH rizosférico</u>	25
1.9.3	<u>Mucílago</u>	25
1.9.4	<u>Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)</u>	26
1.9.5	<u>Compartimentalización</u>	27
1.9.6	<u>Exudación de ácidos orgánicos</u>	27
2	OBJETIVOS	31
3	MATERIAL Y MÉTODOS	35
3.1	Experimentos realizados	35
3.2	Muestra biológica	36
3.3	Condiciones de cultivo y tipos de tratamiento	37
3.4	Mediciones realizadas	38
3.4.1	<u>Actividad del aluminio libre</u>	38
3.4.2	<u>Medida del crecimiento</u>	38
3.4.3	<u>Técnicas de fluorescencia</u>	39
3.4.3.1	<i>Tinción vital</i>	39
3.4.3.2	<i>Visualización de la variación del calcio citoplasmático</i>	41
3.4.4	<u>Análisis del contenido vacuolar</u>	43
3.4.4.1	<i>Micromanipulación</i>	43
3.4.4.2	<i>Microanálisis mediante Rayos X</i>	46
3.4.4.2.1	<i>Preparación de los microcapilares</i>	46
3.4.4.2.2	<i>Almacenamiento de las muestras</i>	47
3.4.4.2.3	<i>Análisis por rayos X</i>	49
3.4.2.3	<i>Análisis de ácidos orgánicos mediante electroforesis capilar</i>	50
3.4.2.3.1	<i>Obtención de muestras</i>	51
3.4.2.3.2	<i>Preparación y análisis de las muestras</i>	52
3.5	Tratamiento estadístico	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Crecimiento	55
4.1.1	<u><i>Phaseolus vulgaris</i></u>	55
4.1.2	<u><i>Zea mays</i></u>	56

4.2	Tinción vital	58
4.2.1	<u><i>Phaseolus vulgaris</i></u>	58
4.2.2	<u><i>Zea mays</i></u>	59
4.3	Evolución del calcio citoplasmático	61
4.4	Microanálisis del contenido vacuolar	62
4.4.1	<u>Microanálisis de K y P</u>	62
4.4.2	<u>Microanálisis de ácidos orgánicos</u>	64
5	DISCUSIÓN	67
6	CONCLUSIONES	81
7	BIBLIOGRAFIA	83

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El aluminio y la importancia de su estudio

El aluminio es el metal más abundante y el tercer elemento en abundancia en la corteza terrestre, donde compone aproximadamente el 8 % en peso. El químico danés Hans Christian Oersted aisló el aluminio por primera vez en 1825, por medio de un proceso químico que utilizaba una amalgama de potasio y cloruro de aluminio. Entre 1827 y 1845, el químico alemán Friedrich Wöhler mejoró el proceso de Oersted utilizando potasio metálico y cloruro de aluminio. Wöhler fue el primero en medir la densidad del aluminio y demostrar su ligereza, y en la exposición de París de 1855 exhibió el aluminio puro (Massot *et al.* 1991).

En la naturaleza, el aluminio se encuentra solamente en forma oxidada. En solución acuosa el ión hidroliza las moléculas de agua formando hidróxidos.

Ya en 1918, este metal se había relacionado con diferentes procesos patológicos importantes, tanto en el hombre como en otros grupos de animales (Haung, 1984). El aluminio ha sido implicado en numerosos estudios como agente neurotóxico, provocando la degeneración de fibrillas nerviosas, lo cual ha sido observado en zonas del cerebro donde la concentración de aluminio era muy elevada. También se ha relacionado al Al con enfermedades como el Alzheimer y Parkinson (Crapper McLachlan, 1986).

También a principios de siglo se comenzó a estudiar el aluminio en relación a su fitotoxicidad. El estudio de esta relación, últimamente ha cobrado gran importancia debido a dos importantes razones: en primer lugar porque diversos metales, entre ellos el aluminio, se han descrito como fuertes limitadores del crecimiento de las plantas provocando, por tanto, fuertes pérdidas económicas (Foy *et al.*, 1978, Poscherieder *et al.*, 1992)), y en segundo lugar, porque los vegetales como productores primarios son la vía de entrada a la cadena alimentaria para el hombre, tanto directamente como a través de la carne de los herbívoros que éste consume.

El aluminio, considerado ya uno de los más fuertes reductores del crecimiento vegetal en suelos ácidos (Foy *et al.*, 1978), incrementa mucho su disponibilidad en zonas de pH por debajo de 5, o bien en suelos orgánicos con un pH próximo a 7 (Hargrove, 1986). Así, el pH del suelo es uno de los factores más importantes que determinan la disponibilidad del metal. Ciertas estimaciones indican que un 40% del

terreno cultivable del planeta y quizá un 70% del suelo utilizado para la producción de alimentos, son zonas ácidas y, por tanto, sujetas a la toxicidad por este metal (Haug, 1984). En zonas ácidas, el aluminio es uno de los factores más importantes que determinan las especies de plantas y su distribución.

Existen zonas del planeta que presentan de forma natural un pH ácido como las zonas tropicales y subtropicales. En nuestro país correspondería a las regiones del norte de la península. Esta situación se puede ver agravada por la manipulación antropogénica, como el uso de fertilizantes y acidificantes o la utilización de fuentes de energía fósil como el carbón y petróleo que liberan una gran cantidad de NO_x y SO_2 , los cuales, en presencia de sustancias oxidantes, dan lugar a ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido nítrico (HNO_3). Estos dos ácidos determinan la acidificación tanto del agua (el pH del agua de lluvia en equilibrio con el CO_2 del aire se halla alrededor de 5.8), como del suelo. Como consecuencia hay una mayor disponibilidad para la planta de aluminio y otros metales que pueden resultar tóxicos. Una de las expresiones de esta acidificación es la muerte de los bosques provocada por la llamada lluvia ácida que aqueja a grandes extensiones básicamente de coníferas de Estados Unidos, Canadá y Europa. Estudios realizados por Mohnen en diferentes zonas de los Estados Unidos arrojan unos valores de pH de la lluvia alrededor de 3.6 (Mohnen, 1988). Actualmente hay datos experimentales que indican una mayor complejidad del fenómeno, causado probablemente por una acción conjunta de contaminación atmosférica, acidez de la lluvia y factores climatológicos (Poschenrieder y Barceló, 1985).

Añadido a los problemas anteriormente expuestos, hay que tener en cuenta que al mismo tiempo que aumenta la disponibilidad de ciertos elementos al disminuir el pH, disminuye la de otros que son esenciales para el desarrollo de la planta, como pueden ser Mg y Ca (Poschenrieder *et al.*, 1992)

1.2 Características físico-químicas del aluminio

El aluminio es un elemento sólido en condiciones normales, de color blanco plateado, dúctil, y muy maleable. Cristaliza en forma cúbica.

Lo podemos encontrar libre o combinado en la naturaleza. Es un metal trivalente, pertenece al grupo III A del tercer periodo de la tabla periódica y tiene un peso atómico de 25.98 y un número atómico de 13. Debido a su baja densidad ($2.699 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a 20°C), no se incluye en el grupo de metales pesados.

Su baja electronegatividad hace que sea un potente reductor, capaz de reducir a un gran número de óxidos metálicos además del agua, el CO_2 y el CO . (Martín, 1988).

Para aumentar la dureza de este elemento, normalmente se utilizan aleaciones con otros metales, tales como el Cu , Si , Mg y Zn , las cuales tienen numerosas aplicaciones industriales.

La química del aluminio es bastante compleja. Debido a su alta carga iónica y su pequeño radio atómico, es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble, y se han descrito una larga variedad de quelaciones y reacciones de hidrólisis.

1.2.1 Especiación del aluminio en solución acuosa

El aluminio se encuentra en forma de Al (III) altamente hidratado en solución acuosa.

Las soluciones acuosas de las sales de aluminio son ácidas debido a la hidrólisis del Al . Este ión de poco volumen y mucha carga, ejerce un fuerte campo eléctrico que atrae a los electrones, alejándolos de las moléculas de agua vecinas que se convierten en dadoras de protones (Martín, 1988).

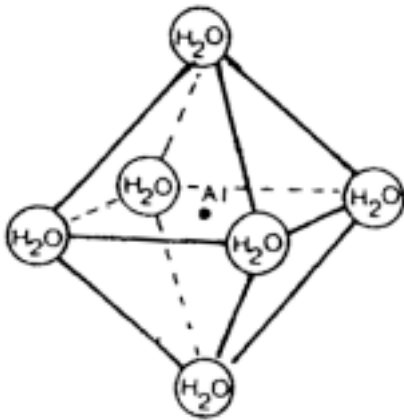
Es un ión altamente hidratado que se comporta como un metal duro con una considerable afinidad por bases fuertes y grupos cargados negativamente ($\text{RO}^- > \text{C}_6\text{H}_5\text{O}^- \gg -\text{COO}^-$). Esta afinidad, que se da en grupos bien conocidos como efectivos agentes quelantes para el Al (III) y otros metales trivalentes (Fe^{3+} , Ga^{3+} , In^{3+}), se pueden clasificar por orden decreciente según su afinidad al aluminio como glicoles, catecoles, hidroxiacidos alifáticos e hidroxiacidos aromáticos. Otros agentes quelantes para este tipo de metales trivalentes y que contiene estos grupos son el ácido cítrico, tartárico, glucónico, etc. Una importante consideración para definir a estos efectivos ligandos donadores es la competencia con hidrogeniones en solución acuosa, ya que sufren constantes protonaciones. Se considera, pues, que los más efectivos son los compuestos que contienen grupos hidroxil o fenil. También se han descrito compuestos inorgánicos capaces de quelar el aluminio como los grupos fluorhidrico y sulfato.

En general, y a pesar de que las formas queladas del aluminio se han considerado como formas no tóxicas para el aluminio, no existe un acuerdo unánime sobre este punto.

1.2.2 Química del aluminio y pH

La fuerte tendencia del aluminio a formar formas hidrolíticas y la elevada insolubilidad del Al(OH)_3 , presentan grandes interferencias para medir las constantes de estabilidad de los complejos de Al(III) .

El aluminio es un elemento anfótero que puede actuar como catión $\text{Al(H}_2\text{O)}^{3+}$ en medio ácido y como anión en medio básico. El punto de pH al cual se da la variación es 5. Cuando el pH es inferior a 5 el ión se encuentra mayoritariamente en forma de complejo hexahidrato octaédrico. Cuando disminuye el pH las cargas de protones van disminuyendo y las cargas positivas del aluminio fuerzan la hidrólisis de las moléculas de H_2O .

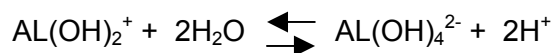
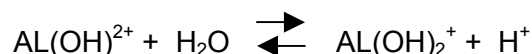


Hexahidrato de aluminio.

.En estudios en los que se determina la forma de aluminio predominante a cada valor de pH se observa que cuando se encuentra en un medio muy ácido, el aluminio se presenta en forma iónica (Al^{3+}), o bien en forma de monómero, Al(OH)_2^+ y Al(OH)^{2+} . A valores entre 3.5-5.0 aumentan mucho los polímeros de hidróxidos de aluminio llegando a una concentración máxima. Cuando el pH ya es superior a 5, tanto las formas monoméricas como los polímeros de hidróxidos disminuyen

mucho e incrementan los niveles de hidróxidos de aluminio altamente básicos que son muy insolubles y precipitan fácilmente por lo que son muy poco disponibles para la planta y, por tanto, no tienen mucho efecto sobre ésta.

Las reacciones que encontramos son las siguientes:



A pH neutro el aluminio se encuentra en la forma insoluble $\text{Al}(\text{OH})_3$ (gibbsite).

Según Wagatsuma y Kiyuda (1987), las formas iónicas polimerizadas son las mejor absorbidas por las plantas. Plantas tratadas con polímeros de aluminio presentaron los síntomas típicos de toxicidad por aluminio, mientras que en los tratamientos con aluminio en forma monomérica y $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, no se reconoció ningún síntoma característico de la toxicidad por aluminio.

La toxicidad por aluminio difiere marcadamente con la forma química de aluminio con la que trabajemos. La toxicidad más acusada por Al se ha visto que se produce a valores de pH bajos, donde predominan las formas poliméricas de hidróxidos de aluminio. De todas formas, el margen de pH donde podemos detectar la máxima toxicidad por aluminio depende tanto de la especie con la que trabajemos como con la variedad empleada.

1.3 Distribución del aluminio en la raíz

Para entender la toxicidad por aluminio sobre los vegetales, es necesario elucidar su localización tanto a nivel de tejido como a nivel celular, lo cual constituye una de las mayores controversias y dificultades encontradas en la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo sobre este tema. Existen numerosos lugares de acción potenciales del aluminio, cuya identificación ayudaría a la selección de genotipos con mayor resistencia a este metal.

Como la inhibición de la elongación de la raíz es uno de los primeros síntomas visibles en la planta tras la aplicación externa de aluminio, éste órgano es uno de los más estudiados a la hora de analizar la distribución y efectos del aluminio (Llugany et al 1995). La mayoría de estudios indican que la concentración de aluminio en la raíz depende de la diferente sensibilidad de las plantas al aluminio y que la disminución del crecimiento se relaciona con el contenido de éste en la raíz, ya que muchas plantas más tolerantes poseen mecanismos de exclusión del metal (Yamamoto *et. al.* 1994).

En general, se acepta que el aluminio se acumula en los ápices de las raíces, incluyendo la caliptra y las zonas meristemáticas y de elongación, como han mostrado estudios realizados por diversos autores (Delhaize *et al.* 1993, Sasaki *et al.* 1997), aplicando técnicas de tinción con hematoxilina en diferentes variedades de trigo. A partir de estos estudios se ha observado una característica acumulación de aluminio en la epidermis y en las células externas del córtex. El aluminio como catión polivalente en condiciones ácidas tiene la capacidad para unirse fuertemente a las

cargas negativas de la capa de Donnan. Usando espectrometría de masas, Lazoft *et al.* (1996) demostraron que el aluminio se acumula preferentemente en las células de la capa externa de la raíz, con una rápida absorción en los primeros 30 minutos seguida de una disminución del radio de absorción. Tras 18 horas de tratamiento, el aluminio se podía observar también en las capas más internas de la raíz siempre en una concentración menor.

1.4 Aluminio en el apoplasto

Información acerca de la distribución subcelular del aluminio en las puntas de las raíces nos ayudaría a establecer la relativa importancia del simplasto y el apoplasto en la toxicidad y en su compartimentación en la resistencia o tolerancia a este metal. Debido a la rapidez con que el aluminio produce la disminución del crecimiento radicular, muchos autores han definido el apoplasto como primer punto de ataque del metal y han determinado que entre un 30 y un 90 % del total del aluminio es absorbido y se emplaza en el apoplasto. El hecho de que la inhibición se produzca en minutos junto con la hipótesis de que el aluminio penetra en la célula muy lentamente ha llevado a la teoría de que el catión se acumula tanto en la pared como en la membrana celular. El grado con el que el aluminio se une depende de la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) de la raíz, resultante de las cargas negativas de las pectinas, proteínas y fosfolípidos de la pared celular y de la membrana plasmática. Estas cargas crean un gradiente de potencial eléctrico que determina la unión y la distribución iónica en el apoplasto. Plantas con poca electronegatividad (poca presencia de cargas negativas en su superficie) suelen ser más resistentes. Varios estudios muestran como una baja C.I.C. en la raíz caracteriza a plantas adaptadas a suelos con elevada cantidad de aluminio (Blamey *et al.* 1990). Sin embargo no parece que haya variación en la concentración de aluminio en la parte aérea entre las plantas sensibles y las tolerantes debido a esta diferencia de C.I.C. (Kennedy *et al.* 1986).

Sin embargo, los mecanismos de acción del aluminio todavía no han sido todavía claramente definidos. Las principales dificultades encontradas en este propósito son la baja sensibilidad de las técnicas disponibles para la detección del metal y la difícil separación del aluminio simplástico y apoplástico para su análisis (Barceló y Poscherieder, 2002).

1.4.1 Pared celular

Muchas investigaciones han descrito cómo la mayor parte del aluminio se encuentra en el apoplasto. (Rengel, 1996). Sin embargo, las técnicas para determinar la absorción de aluminio y la cantidad de aluminio en el simplasto son todavía muy limitadas.

El conocimiento relacionado con la dinámica de la pared celular de las células en crecimiento todavía es bastante limitado, al igual que los mecanismos de interacción de los componentes de la pared celular y el aluminio, de manera que la síntesis de la pared celular y la toxicidad por aluminio solo puede ser especulada. Diferentes estudios de Rengel en 1996 indican que más del 95% del aluminio asociado a las raíces de las plantas se encuentra en la pared celular y que el aluminio es el responsable del rápido e irreversible desplazamiento del calcio de la pared. Observaciones ultraestructurales llevadas a cabo por Vázquez *et al.* (1999) muestran que en plantas de maíz tratadas con Al se produce un engrosamiento de la pared celular y una alteración en los cationes tanto a nivel apoplástico como simplástico durante las primeras 4 horas de exposición al metal en la variedad tolerante C525 M. Este engrosamiento de la pared celular puede ser debido a un desplazamiento de los iones de calcio de la misma.

El aluminio es un gran competidor del calcio, ya que tiene preferencia por donantes de electrones que contienen O₂. Las paredes celulares contienen una gran variedad de lugares cargados negativamente, de los cuales el más importante es el ácido galacturónico que forma cadenas lineales altamente ramificadas dando lugar a las pectinas. Los principales polisacáridos pécticos son: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II y arabinogalactano. El homogalacturonano forma un gel rígido e insoluble en presencia de calcio. Es posible entonces que el aluminio con una mayor capacidad de unión a las pectinas que el calcio se una produciendo un aumento en la rigidez de la pared impidiendo la expansión celular. Estudios realizados al respecto con plantas de maíz demuestran que células con mayor cantidad de pectinas presentan una mayor sensibilidad al aluminio (Schmohl *et al.* 2000). La unión del aluminio a otros constituyentes de la membrana como enzimas, extensinas o xiloglucanos probablemente no afecte a las propiedades físicas de la pared pero sí a su funcionalidad. Existen evidencias de que la modificación de la carga iónica de la membrana afecta a la absorción de otros cationes (Rengel, 1990) y aniones (Nichol *et al.*, 1993). Es posible también que el aluminio afecte la extrusión de microfibrillas de

celulosa debido al aumento de la rigidez de la membrana plasmática evitando el movimiento de las proteínas relacionadas con este proceso de extrusión, o quizás interactuando con las microfibrillas directamente.

La acumulación de aluminio en la pared varia dependiendo de la fuente de aluminio suministrada, no varia con el pH de la solución y el tiempo de saturación depende de la especie. En estudios llevados a cabo por Taylor *et al.* (2000) con *Chara corallina*, la pared celular muestra saturación al cabo de tres horas. Esta saturación había sido definida en la mayoría de los casos como de 30 minutos (Mc Donalds-Stephens *et al.* 1995), de manera que la interacción de este metal con la pared celular puede que incluya algo más que un simple intercambio pasivo de cationes.

1.4.2 Membrana plasmática

El aluminio no solo afecta rápidamente a la pared celular, sino también a las características de la membrana plasmática.

Dada la dificultad para la desorción de cationes polivalentes de la pared celular, se espera que el transporte del aluminio a través de la membrana plasmática sea lento y que aquélla actúe como barrera de la entrada del metal al simplasto. Muchos de los primeros trabajos (Wagatsuma *et al.*, 1987) señalaban que sólo tras una exposición prolongada al aluminio, éste penetraba a través de la membrana plasmática, actuando de esta manera como barrera a la entrada del metal al citosol. Sin embargo recientes estudios han probado que esta sugerencia no es del todo correcta y han demostrado la presencia de aluminio en el citosol en periodos cortos de tiempo (Lazoft *et al.* 1994).

En pocos minutos, el aluminio induce la inhibición del crecimiento radicular a la vez que la absorción de potasio (y también de NO_3^-) (Horst *et al.* 1992). Otras investigaciones (Kochian *et al.*, 1991b), han señalado cómo en plantas expuestas a tratamientos con aluminio el flujo de los cationes (Ca^{2+} , NH_4^+ y K^+) se reduce y el flujo de los aniones (NO_3^- y PO_4^{3-}) aumenta, explicando esta modificación a través de un mecanismo dónde el aluminio se uniría a los fosfolípidos de membrana formando una capa cargada positivamente que impediría o dificultaría el transporte de los cationes y facilitaría el de los aniones. Estas divergencias en los estudios, aunque no aclararían esta distorsión en los flujos iónicos, señalan una vez más las alteraciones producidas por el aluminio en la membrana.

Una de las primeras consecuencias identificada en la toxicidad por aluminio, fue la reducción en la absorción de calcio (Rengel, 1992). El calcio actúa como mensajero secundario en la transducción de señales desde el medio exterior que rodea la planta a elementos del metabolismo de ésta (Triwavas y Gilroy, 1991) y se encuentra implicado sobretodo en la expansión celular. Diversos estudios han demostrado cómo el aluminio puede bloquear los canales de calcio en la membrana plasmática evitando la entrada de calcio al simplasma (Piñeros *et al.*, 1995).

Otro indicador muy sensible de la interacción del aluminio con la membrana es la inducción de la síntesis de 1,3 β -glucano (callosa). La formación de callosa es una respuesta de la planta a cualquier tipo de estrés, incluyendo el mecánico, biofísico, químico y biológico, capaz de afectar a la integridad o funcionalidad de la membrana plasmática (Schreiner, 1992; Stone, 1984).

El aluminio puede unirse a la carga negativa de las cabezas de fosfolípidos, al enlace fosfodiéster de la fosfatidil serina o bien a las proteínas de membrana como la calmodulina. La carga negativa de la membrana, debida a la presencia de fosfolípidos, ha hecho que esta estructura haya sido descrita por gran número de autores como el primer punto de ataque del aluminio, así como de otros metales (Haung, 1984).

Zhao *et al.* (1987) encontraron que el aluminio se unía a la membrana plasmática e incrementaba la permeabilidad de las células de la raíz de *Quercus rubra* a la urea, metil-urea y etil-urea y disminuía la permeabilidad a los lípidos y el agua. Esto sugiere que el aluminio aumenta la compactación de los fosfolípidos de membrana. La consecuencia de un aumento en la rigidez de la membrana puede afectar al metabolismo, tanto en el simplasto como en el apoplasto. Con respecto al apoplasto se ha especulado que en células de mamíferos la toxicidad por aluminio es causada por un aumento en la peroxidación de los lípidos, causado directamente por el empaquetamiento de éstos (Oteiza, 1994). Diversos estudios han demostrado que el aluminio aumenta la fusión liposomal en comparación con otros cationes, como, por ejemplo, el calcio (Oteiza, 1994).

El aluminio puede unirse fuertemente a las proteínas asociadas de membrana. Sin embargo, estudios llevados a cabo no han podido demostrar que esto tenga un efecto negativo en la conformación de la proteína o en su funcionalidad (Jones & Kochian, 1995). Sin embargo, el aluminio puede afectar a la membrana de una manera muy específica, ya que como mostraron Gunsé *et al.*, (2000), los enzimas responsables de la síntesis del etileno (ácido 1-aminociclopropano 1-carboxílico sintasa y ácido 1-

aminociclopropano-1 carboxílico oxidasa, (ACC sintasa y ACC oxidasa respectivamente) localizadas en la membrana no fueron afectadas (al menos funcionalmente) en dos variedades de maíz, una sensible y otra tolerante, después de un tratamiento con aluminio. De estos resultados no podemos concluir que el aluminio no afecte a la membrana, pero sí podemos afirmar que al menos no interacciona en la zona donde se encuentran estas enzimas, ya que no se encontró variación en la producción de etileno.

1.5 Transporte del aluminio

La falta de marcadores radiactivos de aluminio y pruebas de fluorescencia es una de las principales razones que dificultan el estudio del transporte del aluminio al interior celular. Además, parece que una gran fracción de este aluminio permanece en el apoplasto, lo que dificulta la medición de la aparente pequeña cantidad de catión que penetra. Por esta razón, parece que la mayoría de estudios llevados a cabo a este respecto se encuentran sobreestimados al no existir un mecanismo de desorción del aluminio apoplástico 100% eficiente.

Se cree que la absorción de aluminio es típicamente bifásica con una rápida absorción no lineal seguida de una fase lineal más lenta (Zhang & Taylor, 1989). Aunque esta interpretación lineal sugiere un transporte a través de la membrana, otros estudios han demostrado que esta fase puede incluir aluminio no intercambiable unido a la pared celular y que la modificación de ciertas condiciones experimentales puede minimizar la contribución de aluminio unido a la pared celular a esta fase lineal de absorción (Archambault *et al.*, 1996).

Las pruebas disponibles actualmente sugieren que el transporte del aluminio es un proceso lento. Evidencias de que el aluminio cruza la membrana plasmática se extraen de estudios como los realizados con *Chara corallina* por Taylor *et al.* (2000) en los que hallaron que, tras una larga exposición al metal (5-7 días), las concentraciones de aluminio en el interior celular eran del rango de 5-70 μM . En estos estudios en los que se extrae la pared celular por microcirugía evitando mediciones ambiguas del metal, se encuentra que el transporte a través de la membrana se produce tras solo 30 minutos de exposición y además éste no es afectado por los modelos predichos de aluminio en solución dependientes del pH, de manera que la absorción del metal podría estar relacionada con transportadores ligados a la concentración de protones. Sin embargo, el mecanismo por el que el aluminio cruza la membrana no ha sido todavía

identificado. Las rutas por las que el aluminio penetra son totalmente especuladas, pero merece la pena su consideración.

Debido a la gran carga negativa en el interior de la membrana, es también posible que el transporte se produzca por mecanismos de gradiente de potencial electroquímico. Sin embargo, debido a la fuerte interacción del aluminio con los lípidos de membrana es probable que este transporte sea muy bajo.

Haug (1985) señaló tres vías de entrada al aluminio:

- Por simple permeabilidad a través de la membrana.
- A través de estructuras lipídicas micelares inducidas por el propio aluminio.
- A través de transportadores unidos a fosfolípidos de la membrana o a otros agentes quelantes.

Respecto a este último punto, en animales ha sido especulado que el aluminio penetra por el sistema de transporte del hierro. Aunque es poco probable en dicotiledóneas donde el hierro es absorbido en forma Fe^{2+} (Kochian, 1991), es posible que esto suceda en plantas monocotiledóneas donde el hierro se absorbe en forma de complejo Fe^{3+} -sideróforo. Se produce una liberación por parte de la planta de fitosideróforos (aminoácidos no proteinógenos), los cuales forman complejos muy estables con el hierro. Como segundo componente de esta estrategia hay un transportador constitutivo de la membrana y muy específico, el cual transfiere el Fe (II) unido a los fitosideróforos al citoplasma. En plantas dicotiledóneas este transportador no existe; sin embargo, en situaciones de deficiencia de hierro, hay una respuesta en la que aumenta la actividad de una reductasa en la membrana plasmática de las células de la rizodermis. La actividad de esta reductasa es estimulada por un pH bajo provocada por los protones bombeados por una ATP-asa de la misma membrana y reduce la forma de Fe (III) a Fe (II). El Fe (III) se une a agentes quelantes secretados por células de la raíz antes de ser reducido. Existe un transportador en la membrana para este hierro reducido. Así, en ambos casos se podría pensar en un transporte del aluminio muy parecido a estos dos casos. Sin embargo, ciertos estudios han puesto de manifiesto que la absorción de aluminio no requiere energía como en el caso del hierro (Wagatsuma, 1983, Taylor, 2000). El flujo de aluminio a través de una bomba específica es poco probable debido a la elevada concentración de protones en el exterior y la poca actividad de Al^{3+} en el citoplasma. La posibilidad de que el transporte se produzca a través de los canales de calcio es plausible ya que el aluminio inhibe la

absorción de calcio bloqueando el canal (Huang, *et al.*, 1992). Liu *et al.* 2000), demuestran como el aluminio penetra al interior de células guarda de *Arabidopsis* a través de los canales de calcio. También se ha sugerido la penetración del aluminio a través de los canales de magnesio, ya que también su transporte al interior celular es inhibido debido al similar diámetro de ambos cationes (MacDiarmid and Gardner, 1996).

1.6 Translocación del aluminio dentro de la planta

Es interesante observar cómo en diferentes plantas acumuladoras de aluminio existen diferentes complejos de aluminio para la translocación de éste en el xilema.

Diferentes muestras de xilema de diferentes plantas acumuladoras han sido analizadas para examinar las diferentes formas de translocación del aluminio. Así, se ha visto como la translocación en plantas de té se hace en forma de Al-F. Watanabe *et al.* (2001) muestran cómo la translocación desde la raíz a la parte aérea en plantas de *Melastoma malabathricum* se realizaba en forma de Al-citrato (1:1) en plantas cuyas semillas crecieron en soluciones de aluminio y en forma de Al-malato en plantas cuyas semillas no habían crecido en soluciones de aluminio. Esto sugiere que *M. malabathricum* aumenta la síntesis de citrato en presencia de aluminio, formado un complejo Al-citrato cuya estabilidad es superior al complejo Al-malato. Estudios realizados con *Fagopyrum esculentum*, muestran cómo también la forma de translocación del aluminio es en forma de citrato principalmente y la aplicación de aluminio no afecta a la concentración de citrato y malato en el apoplasto (Ma, *et al.*, 1997).

1.7 Alteraciones del aluminio en el simplasto

Después de las investigaciones que han mostrado que la acumulación de Al en el simplasto de las células de la punta de la raíz se produce sólo 30 minutos después de iniciado el tratamiento (Lazoft *et al.*, 1994, 1996b), las cuestiones se centran en los lugares donde actúa el aluminio. Incluso en variedades resistentes a la toxicidad por aluminio, se encuentra acumulación de éste a nivel vacuolar (Vazquez, 1999). Ernst (1998) establece la compartimentación como principal medida para la tolerancia de las plantas. Por tanto, hay que tener en cuenta que quizá los efectos producidos no sean solamente debidos a mecanismos desencadenados por toxicidad en el apoplasto, sino también en el simplasto o una mezcla de ambos.

Una vez el aluminio ha cruzado la membrana plasmática se produce un cambio muy marcado en las condiciones químicas; entre estas, la más importante es la diferencia de pH, de 4.5 en el apoplasto a 7.0 en el citoplasma. Estudios realizados con modelos de especiación química señalan que el catión en ausencia de ligandos orgánicos a este pH precipitaría en su mayoría en forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$ o en forma de fosfatos de aluminio, de manera que el aluminio libre (Al^{3+}) en el citoplasma se encontraría en un rango de concentración del orden de 10^{-12} molar (Martin, 1992). Debido a la elevada concentración de componentes orgánicos en el simplasma, se calcula que la mayoría del aluminio se encuentra acomplejado con moléculas orgánicas. Ohman y Martin (1994), en estudios basados en modelos de equilibrio químico, han determinado que el citrato sería la molécula que mayoritariamente quelaría el aluminio. Sin embargo, una proporción pequeña pero potencialmente significativa se uniría a ligandos orgánicos que contienen fósforo como el ATP, GTP, etc. y solutos con múltiples grupos carboxílicos como péptidos, proteínas, etc. Es poco probable que estos complejos sean citotóxicos; sin embargo, permitirían el transporte libre del metal en la célula y en la planta hasta su unión a otros ligandos orgánicos más afines (Jones *et al.*, 1995).

1.7.1 Alteraciones en la transmisión de señales (fosfatidil inositol trifosfato)

Uno de los lugares definidos con más afinidad sería el lípido fosfatidil inositol difosfato (PIP2) que se encuentra en la membrana plasmática y está relacionado con la transducción de señales y en la regulación del citoesqueleto. Parece que el aluminio posee una capacidad de unión a este enzima muy superior al calcio y mayor que a los ácidos orgánicos (Kochian, 1995). A pesar de que esta señal origina una cascada de mensajeros secundarios (Ca^{2+} , IP3), se cree que el lugar donde interfiere el aluminio sería en el primer paso en la formación de IP3. Además, se muestra cómo el aluminio puede afectar la funcionalidad del enzima fosfolipasa C, sustituyendo al calcio en los lugares de unión a dicho enzima.

El aluminio actuaría activando el metabolismo del inositol fosfato (Lee, 1991), por lo que el aumento de calcio en el citoplasma descrito por varios estudios podría ser causa de esta activación y consecuente liberación de calcio desde la vacuola

1.7.2 Alteraciones en el citoesqueleto

Otro de los síntomas visibles de la toxicidad del aluminio sería la distorsión del patrón de extensión celular, sugiriendo que la regulación del citoesqueleto puede ser uno de los lugares de ataque del aluminio, ya que la formación de actina en plantas es regulada por la profilina y la concentración de ésta depende de su unión a la PIP2. Sin embargo, no está claro que el hecho de la unión del aluminio a la PIP2 provoque un trastorno en la dinámica de la actina (Darnowsky *et al.* 1996). Otros estudios realizados por Grabsky *et al.* en 1995, han mostrado cómo el aluminio provoca una rápida y dramática rigidificación de la red de actina. Estos autores especularon que esta rigidificación podría deberse a una unión del aluminio al ADP o al ATP, a su interferencia con la F-actina o a su interacción con la profilina, como ya habían señalado anteriores estudios. Estudios recientes (Frantzios *et al.*, 2000) han demostrado cómo tratamientos con aluminio en plantas de *Triticum turgidum* L provocan una alteración en la estructura y una disfuncionalidad en los procesos mitóticos y en el aparato citocinético, principalmente alterando los procesos de formación y destrucción de los microtúbulos. Según estos mismos autores los daños producidos por el metal a este nivel serían los siguientes:

1. Produciría un retraso en la despolimerización de los microtúbulos en todas las fases del ciclo celular.
2. Alteraría la capacidad de los microtúbulos para formar sistemas bipolares durante la mitosis.
3. Afectaría a los microtúbulos en la separación de cromosomas durante la metafase.
4. Trastornaría la polimerización de tubulina, ya que se observa una formación atípica de microtúbulos en la exposición de las plantas al aluminio.

Todos estos fenómenos se observaron en todos los diferentes tratamientos con aluminio. Los tres primeros se observaron tras periodos cortos de exposición, sin embargo el último se observó solo en células sometidas a tratamientos de una duración de 4 horas o más.

Los principales efectos por los que el aluminio puede producir estas alteraciones en la estructura y funcionalidad de los microtúbulos son:

- Inhibición de la actividad de la calmodulina: el aluminio posee una capacidad de unión a la calmodulina tres veces superior al calcio, lo cual provocaría un cambio conformacional de la proteína que inhibiría su capacidad para activar otras enzimas (Siegel y Haug, 1983).
- Inhibición de la señal del fosfatidil inositol trifosfato (Kochian, 1995).
- Alteración de la homeostasis del calcio (Rengel, 1996).

Teniendo en cuenta que la concentración de aluminio en el simplasto no sería muy elevada, los efectos a corto plazo de este catión no tendrían por qué esperarse en el simplasto y podrían por tanto originarse ya en el apoplasto, donde el aluminio se une y acumula con gran rapidez. La cada vez más evidente existencia de un continuum pared celular-membrana plasmática-citoesqueleto en las células de las plantas sugiere que estos efectos adversos en el citoesqueleto podrían ya originarse desde el exterior celular (Horst *et al*, 1999).

1.7.3 Alteraciones en la funcionalidad del calcio

El calcio actúa como mensajero secundario en la transducción de diferentes señales desde el medio exterior que rodea la célula a elementos del metabolismo de la misma, siendo estas señales iniciadas por el inositol trifosfato (Trewavas y Gilroy, 1991).

Aunque ya se ha señalado cómo el aluminio trastorna la homeostasis del calcio bloqueando los canales desde el exterior de la célula, se argumenta también que una vez en el citoplasma es capaz de bloquear estos mismos canales internamente. Se cree que la distorsión de la homeostasis del calcio es uno de los primeros síntomas de la toxicidad por aluminio. Una disminución de la concentración de calcio citosólico tras un tratamiento con aluminio fue manifestado en 1998 por Jones *et. al.* en células tabaco. Sin embargo, estudios más recientes como los llevados a cabo por Ma *et al.* (2002) mediante microscopía confocal muestran un aumento en las concentraciones de calcio en el citosol de células radiculares de *Secale cereale* a medida que aumentan las concentraciones de tratamientos con aluminio. Las concentraciones de calcio eran mayores en plantas intactas que en protoplastos al ser sometidos a igual tratamiento, lo cual podría deberse a una interacción de diferentes especies catiónicas de aluminio con la pared celular. Una relación semejante había sido ya señalada en investigaciones llevadas a cabo por Zhang *et al.* (1999) con plantas de trigo. De cualquier manera, el aumento o disminución del calcio citosólico podría alterar los

procesos metabólicos dependientes de calcio, los cuales están directa o indirectamente relacionados con la regulación de la división celular y la elongación (Delhaize *et al.* 1995).

La actividad del calcio es muy elevada en el simplasma ya que la mayoría de los suelos (a excepción de los extremadamente ácidos) contiene alta cantidad de este elemento. Para introducirlo al interior de la célula existe una ATP-asa (Evans *et al.* 1990). También se encuentran canales en la bicapa lipídica que dan lugar a un transporte pasivo hacia el interior de ésta. La distorsión de los niveles de calcio puede explicar muchos síntomas observados por toxicidad del aluminio (Rengel y Zhang, 2003), ya que el calcio está implicado en muchos procesos, puesto que actúa como mensajero secundario juntamente con la calmodulina activando y desactivando ciertos enzimas. La calmodulina es un polipéptido de 17 KDa y cuatro puntos de unión con el calcio y la unión del calcio a la proteína es necesaria para su actividad, ya que determina su conformación. Se calcula que el aluminio tiene una afinidad diez veces mayor que el calcio en cuanto a la unión con la calmodulina (Larkin, 1987) y parece que disminuye un 30% la región α -hélice (Siegel y Haung, 1983).

Según ciertos estudios en los que todavía se señala la lenta penetración del aluminio en la célula (Rengel, 1992), u otros estudios en los que se señala que la concentración del aluminio una vez transportado al interior celular no sería suficientemente alta (Martin, 1992), la idea de que la toxicidad del aluminio se dé por esta vía se encuentra en controversia y no se consideraría como causa primaria de toxicidad (Jones *et al.* 1997), ya que además habría que tener en cuenta otros componentes que también podrían unirse al aluminio como son el citrato y grupos fosfato.

Otros autores, trabajando en los efectos del aluminio sobre la germinación de granos de polen y su reversión con quelantes (Ma *et al.* 1999, 2000), consideran que existe calmodulina apoplástica extracelular implicada en la transducción de señales al interior de la célula que podría resultar afectada por la presencia de Al en solución.

También el calcio se relaciona con procesos mitóticos, citocinesis y crecimiento polar. Uno de los efectos más estudiados del aluminio es que el cese del crecimiento radicular coincide con la desaparición de figuras mitóticas. La replicación de DNA ocurre durante la fase S del ciclo celular y va seguida de la mitosis. Si bloqueamos esta primera fase no se da la segunda. La proteína relacionada con esta dependencia es la p34^{cdc2} (Broek *et al.*, 1991). Esta proteína es activada por desfosforilación de los

residuos de fosfotirosina y fosfotreonina. Este proceso de activación es muy probable que requiera un incremento del calcio citosólico (Marmé, 1989), por lo tanto, esta distorsión en la replicación celular puede ser uno de los efectos indirectos de la interferencia del aluminio en la homeostasis del calcio. Estos estudios fueron realizados suponiendo que en las primeras etapas el aluminio no se encuentra en el interior celular, sin embargo, si tenemos en cuenta los últimos resultados sobre este efecto, cabría la posibilidad de que esta proteína fuese, también, afectada directamente por el aluminio. También la falta de calcio puede provocar problemas en la formación del huso durante la profase y en la necesaria despolimerización de los microtúbulos en la metafase o principio de la anafase para la separación de las cromátidas (Wolniak, 1988).

1.7.4 Formación de callosa

Un aumento en el calcio citosólico sería un prerrequisito para la formación de callosa (1,3, β -glucano), cuya producción puede relacionarse a cualquier tipo de estrés al que la planta esté sometida, ya sea físico, químico, bioquímico o biológico (Kauss, 1985). La formación de este β -glucano es muy sensible al estrés producido por aluminio y, al igual que la disminución del crecimiento radicular, se ha considerado uno de los parámetros que determinan la sensibilidad de las respuestas de las plantas a los diferentes tratamientos por aluminio, siendo su formación proporcional al grado de estrés al que ésta se halle sometida (Llugany *et al.*, 1994, Massot *et al.*, 1999). Horst (1995) apuntó la acumulación de callosa en plantas de soja en tratamientos tan bajos de aluminio como de 5 μ M, después de tan solo 10 minutos de tratamiento.

La callosa es sintetizada por una (1-3) β -D-glucano sintasa localizada en la membrana plasmática y activada por iones calcio. Uno de los prerrequisitos para la inducción de la formación de callosa es un aumento en la concentración de calcio citosólico, lo cual podría deberse a la liberación de calcio de los lugares de unión a la pared celular producida por la sustitución de aluminio. Sin embargo, el calcio puede no ser la única señal que active la producción de callosa y una alteración en la estructura de la membrana plasmática podría ser también importante (Jacob, 1985). Ya que la callosa es liberada por la membrana plasmática al apoplasto, se encuentran aposiciones alrededor de los plasmodesmos en la pared celular de las plantas tratadas con aluminio, lo cual ha sido considerado como una especie de sello que impediría la entrada de agua y el transporte a través de los plasmodesmos (Yim *et al.* 1998). Este

hecho ha sido considerado también como un mecanismo de defensa de la planta frente al proceso de pérdida de pared celular (Eklund *et al.* 1990).

1.7.5 Efecto sobre el ADN

A pesar del hecho de que la acumulación del aluminio en vacuolas o la quelación puedan ser factores que determinen cierta tolerancia al aluminio, no todo el aluminio es eficientemente detoxificado, por tanto, puede interferir con elementos celulares como el ADN.

Se ha demostrado que el aluminio inhibe la división celular y se asocia al ADN en diferentes plantas (Aimi *et al.*, 1964, Morimura *et al.* 1978). Una de las razones más plausibles por las que el aluminio se uniría al núcleo celular sería que éste es uno de los órganos celulares con mayor carga negativa debido a los grupos fosfatos que contiene, por lo que el aluminio podría ser transportado al núcleo celular a través de sus poros (Naora *et al.* 1961)

Se ha observado que en plantas tratadas con Al, el número de células en mitosis disminuye a las dos horas de tratamiento, es muy bajo a las 4 horas (Tepper *et al.*, 1989) y se reduce significativamente a las 5 horas (Horst *et al.*, 1983) o a las 6 horas de exposición al aluminio (Clarkson 1965).

El aluminio tiene capacidad de unirse al DNA tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunos autores afirman que el aluminio se une a la cromatina disminuyendo su actividad. El 73% del aluminio encontrado en el núcleo se encontraba unido a la cromatina, y de este 73% se halló que el 94% de este catión se encontraba unido al DNA. Esta preferencia del aluminio por el DNA frente al resto de proteínas asociadas al material genético fue demostrado también *in vitro* (Matsumoto y Morimura, 1977). A partir de investigaciones posteriores de estos mismos autores (Matsumoto y Morimura, 1978), se dedujo que el aluminio se unía al ácido ADN a través del grupo fosfato de forma similar a otros cationes como Mg, Ca y Mn. El aluminio puede unirse también a otros ácidos nucleicos como el ARN ribosómico y el transferente, aunque con menos afinidad (Matsumoto y Hirasawa, 1976). Esta unión del aluminio al ADN puede provocar cambios estructurales que dificulten la expresión celular, ya que ésta se encuentra regulada por varios factores incluyendo la estructura de la cromatina. En algunos estudios se ha detectado ya acumulación de aluminio tras solo 5 minutos de exposición (Bennet *et al.*, 1985), lo que corrobora el hecho que señalan ciertos estudios en referencia a una rápida capacidad para penetrar en la célula.

A pesar de esta capacidad de unión no se sabe con certeza si es esto lo que inhibe la división celular. Sampson *et al.* (1965) encontraron replicación del ADN incluso 48 horas después de haberse iniciado el tratamiento en *Hordeum vulgare*, a pesar de que el número de figuras mitóticas se había reducido a cero a las 24 horas de exposición. Además, Wallace y Anderson (1984) vieron que se producía antes la inhibición del crecimiento radicular que inhibición de la replicación del ADN, sugiriendo que la interferencia con el ADN no sería la causa por la que se inhibe, al menos al principio, la elongación de la raíz. Por tanto, parece que lo que mejor explicaría la interferencia en la división celular sería la influencia que ejerce el aluminio sobre la homeostasis del calcio, ya que éste, como se ha comentado anteriormente, influye sobre la proteína P34^{cdc2} y sobre la anafase.

1.8 Alteraciones nutritivas

Uno de los efectos mas conocidos del aluminio es el desorden nutritivo que provoca. La toxicidad por aluminio normalmente disminuye la concentración de ciertos elementos en las plantas. La disminución de la absorción catiónica puede ser correlacionada con la inhibición del crecimiento radicular, ya que sobre todo cationes como el K^+ cuya acumulación contribuye a la expansión celular ven afectada su absorción en presencia de Al. Sin embargo, esta interferencia depende de la especie estudiada como del genotipo. Así, parece ser que mientras los contenidos de N, K, Mg, Fe y Mn permanecen casi inalterados, el contenido en P y Ca es altamente afectado en los tratamientos con aluminio.

Estudios con plantas hiperacumuladoras de aluminio revelan que la acumulación de aluminio en las hojas restringe la acumulación de otros elementos minerales en las hojas, lo cual sugiere que plantas que acumulan aluminio han desarrollado mecanismos eficientes para usar bajas concentraciones de otros elementos esenciales para crecer en suelos ácidos (Osaka, 1998).

No solo la absorción de calcio parece que es alterada, sino también su translocación en el interior de la planta (Huang *et al.*, 1992).

1.8.1 Interacción Al - Ca.

Como se ha señalado anteriormente uno de los primeros síntomas definidos en la toxicidad por aluminio es el producido debido a los procesos, tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática, por los que el metal bloquea la entrada de calcio.

Es bien conocido el efecto antagonista del calcio en la toxicidad por aluminio. Una elevada cantidad de Ca evita la entrada de éste en la raíz y la inhibición del crecimiento radicular (Matsumoto et. Al. 1996). El calcio actúa también de manera antagonista en cuanto a la permeabilidad de la membrana.

La controversia acerca de si el aluminio aumenta o disminuye la concentración de calcio intracelular se refleja en la disparidad de los estudios realizados y sus resultados, indicando algunos una disminución de éste a través del bloqueo de los canales (Rengel, 1992) y otros un aumento de la concentración citosólica del catión (Ma, 2002). De ésta manera, la toxicidad por aluminio respecto al calcio no se produciría a través del bloqueo de los canales. Debido a la baja correlación existente entre la inhibición del crecimiento radicular y la reducción del influjo de calcio en *Arabidopsis* encontrada por Schofield *et al.* (1998), se concluyó que la toxicidad por aluminio no era causada por una limitación en la disponibilidad de calcio. A través de diferentes estudios llevados a cabo por los mismos autores tampoco se apoya la hipótesis de que el aluminio desplaza al calcio en los lugares de unión de éste en el citoplasma, por lo que el posible desplazamiento del calcio y sustitución de éste por aluminio en la pared celular puede ser suficiente para producir alteraciones en el normal desarrollo celular.

1.8.2 Interacción Al - K.

El potasio es el único catión monovalente esencial para las plantas. Aunque la mayoría de las plantas requieren cantidades relativamente elevadas de potasio, ningún metabolito vegetal que requiera este elemento ha sido aislado. Debido a que no se cree necesaria una cantidad tan elevada tan solo para un papel catalítico, se ha sugerido por diversos investigadores la necesidad del potasio para mantener un ambiente iónico apropiado y para preservar la estructura celular tridimensional necesaria. Parece que también está implicado en el transporte a través del floema. (Barceló *et al.*, 2003).

En cuanto a la absorción de K, Lance y Pearson (1969) observaron que disminuía la absorción de este elemento en plantas de algodón, lo cual ha sido corroborado por investigaciones llevadas a cabo en arroz por Foy *et al.* (1978). Sin embargo, experimentos realizados por Lee en 1971 demuestran el efecto contrario. En estudios realizados en *Zea mays* en 1985 por Cumming *et al.* (1986), parece que se encuentra más afectado el transporte de K que su absorción. La inhibición ocurre rápidamente y

puede ser parcialmente reversible una vez se retira el tratamiento de aluminio (Schroeder, 1994), apoyando la hipótesis de un bloqueo exterior por parte del aluminio de los canales de potasio.

Estudios más recientes (Liu *et al.* 2001) siguen apuntando la inhibición de la absorción de potasio por parte del aluminio en células guarda de *Arabidopsis*, a través de un bloqueo interno. Estos estudios demuestran que la inhibición de la absorción de potasio es proporcional a la concentración de aluminio aplicada; así, una concentración de 10 μM de aluminio inhibe aproximadamente el 50% de la absorción de potasio y una concentración de 50 μM inhibiría la absorción de potasio por célula en un 79%. Parece, además, que esta inhibición de los canales de potasio estudiados no es externa y que se produce una vez el aluminio ha penetrado al interior de la célula, sugiriendo que ciertos componentes, ya sean de la membrana plasmática o del citosol, son requeridos para esta acción del aluminio. Esta interacción sería específica, ya que, a pesar de que el aluminio sea capaz de unirse a un gran número de moléculas en la membrana plasmática, se comprobó que este efecto era específico al estudiar otros cationes como el La^{3+} o el Gd^{3+} produciéndose efectos muy diferentes a los obtenidos con los tratamientos con aluminio.

Sin embargo, existen también estudios (Malkanathi *et al.*, 1985) en cultivos de cebada en los que se produce una estimulación en la absorción de potasio en las raíces al ser tratadas las plantas con 200 μM de aluminio.

1.8.3 Interacción Al - Fe.

El hierro funciona como componente estructural (citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa y ferredoxina) y cofactor enzimático en las plantas. Aproximadamente el 75% del hierro celular se encuentra en los cloroplastos y el Fe es esencial también para la síntesis de clorofila (Barceló *et al.*, 2003).

El tratamiento de las raíces de las plantas con aluminio reduce la concentración de hierro y produce síntomas típicos de clorosis (Otsuka, 1969). Dichos síntomas fueron aliviados con la adición de elevadas concentraciones de hierro a la solución.

Como se menciona anteriormente, la absorción de hierro se caracteriza por estar constituida por dos estrategias (I y II). La I, característica de la mayoría de las dicotiledóneas y no gramíneas y la II, típica tan solo de gramíneas. Esta última requiere la exudación de fitosideróforos. Con respecto a esto Chang *et al.* (1998) encontraron que la biosíntesis de éstos y la exudación podían ser inhibidas por

tratamientos con aluminio en plantas de trigo. Sin embargo, la solubilización del hierro y su absorción no eran alteradas. Además, esta inhibición se producía a altas concentraciones de aluminio (20 μM) y tras 24 horas de tratamiento, de manera que no parece que sea el aluminio el que directamente bloquee el transporte de hierro al interior celular y sea más una consecuencia secundaria de los efectos producidos por éste.

1.8.4 Interacción Al - P.

La forma en la que el fósforo se encuentra en el suelo depende del pH de éste; así, se favorece la absorción de éste elemento cuando las condiciones son ácidas, encontrándose entonces mayoritariamente en forma H_2PO_4^- . El fosfato no necesita ser reducido en el interior de la célula para ser incorporado a compuestos orgánicos. Forma parte de los ácidos nucleicos, adenosin-fosfatos (AMP, ADP, ATP) y piridín nucleótidos (NADP) por lo que participa en las reacciones energéticas, procesos anabólicos y transferencia de características hereditarias. Su deficiencia provoca severas alteraciones del metabolismo y por tanto del desarrollo vegetal (Marschner, 1986, Barceló, 2003).

Uno de los síntomas observados en las plantas expuestas a tratamientos con aluminio es una pigmentación más oscura, un verde más intenso que Lee y Pritchard (1984) relacionaron con una deficiencia de fósforo. Los niveles de fósforo interno varían bastante en función de la especie estudiada. En ciertas variedades de trigo y tomate la tolerancia al aluminio coincide con la habilidad para tolerar bajos niveles de P en la solución nutritiva. Lee y Pitchard (1984), observaron disminuciones significativas en el contenido en fósforo en todos los órganos estudiados de *Trifolium repens*. En general, en el rango de pH entre 4.5 y 7, se observa una fuerte interacción entre Al y P, incrementándose así la cantidad de fósforo inmovilizado en la raíz y disminuyendo el fósforo disponible en la parte aérea, donde se dan los mencionados síntomas por deficiencia de P. El aluminio concentra la cantidad de fósforo en la raíz y lo disminuye en la parte aérea (Cuming *et al.*, 1986).

En estudios más recientes acerca de la distorsión de los niveles de fósforo, las indicaciones sobre el comportamiento de éste siguen siendo las mismas. Así, Façanha *et al.* (2002), estudiando plantas de maíz los efectos producidos por los fluoruros de aluminio (supuestamente ligeramente menos tóxicos que el AlCl_3) en la absorción de fosfato, indican que aquéllos promueven una disminución de la absorción y este efecto

es antagonizado aumentando la concentración de fosfato. Esto sugiere un lugar de unión común para los fosfatos y los fluoruros de aluminio en un transportador de alta afinidad por el fosfato. A su vez, se ensayó la inhibición de la ATP-asa de la membrana plasmática por parte de los fluoruros de aluminio, observándose que estos complejos también inhibían gran parte de su acción, necesaria para la adquisición de fósforo, ya que éste es absorbido por la planta a través de un proceso cotransporte con requerimiento de energía generada por un gradiente de protones creado por esta H^+ -ATP-asa.

Estudiando plantas hiperacumuladoras, sin embargo, se ha señalado ciertos efectos beneficiosos del aluminio sobre el aumento del crecimiento de la planta. Esta mejora en el crecimiento fue acompañada por un aumento de las concentraciones de fósforo en los tejidos (Osaki *et al.*, 1997).

1.9 Tolerancia al aluminio

Las respuestas del sistema radicular y en general, de toda la planta, frente a la toxicidad por aluminio, varía considerablemente dependiendo de la especie e incluso dependiendo de la variedad que estemos estudiando (Barceló y Poschenrieder, 2002).

La respuesta de las plantas frente a cualquier estrés se divide en estrategias de evitación y estrategias de tolerancia, lo cual es aplicable también al estrés por aluminio.

Entre los mecanismos de evitación se encuentran:

- Exclusión de moléculas de bajo peso molecular para la quelación del aluminio apoplástico.
- Modificación del pH rizosférico.
- Unión del aluminio a la pared celular.
- Disminución de la permeabilidad de la membrana a la penetración de aluminio.
- Unión del aluminio al mucílago asociado al ápice de la raíz.

Entre los mecanismos de tolerancia:

- la quelación del aluminio con moléculas orgánicas en el interior celular
- Unión del aluminio a proteínas en el citoplasma

- Compartimentación celular del aluminio.

Hasta el momento no existen estudios que apoyen la mayoría de estos mecanismos y han sido principalmente especulados.

Debido a que la inhibición del crecimiento radicular es uno de los primeros efectos observados en la toxicidad por aluminio, este factor se viene usando ampliamente como indicador de la tolerancia al metal (Howeler y Cadavid, 1976; Baligar *et al.*, 1990), aunque los mecanismos mediante los que sucede esto no son todavía bien conocidos. Teniendo en cuenta este factor se han clasificado diferentes variedades de maíz según su tolerancia (Llugany *et al.*, 1995). Otro factor que también se tiene en cuenta es la acumulación de callosa, que es casi directamente proporcional a la cantidad de aluminio (Zhang *et al.*, 1994, Massot *et al.*, 1999)

1.9.1 Genética de la resistencia al aluminio

La mayoría de los estudios sobre la resistencia al aluminio se han centrado en los últimos años en el estudio de variedades de trigo debido a la creciente demanda de los agricultores de variedades con mejorada resistencia a la toxicidad por aluminio (Carver, 1995).

Es en trigo dónde se ha observado que las variedades moderadamente tolerantes al aluminio deben su resistencia a unos pocos genes y que las variedades que presentan una mayor tolerancia al aluminio, como en la variedad Atlas 66, la resistencia parece estar controlada por un conjunto complejo de genes. El amplio rango de tolerancia al aluminio que presentan las diferentes variedades de trigo ha permitido el estudio de la variabilidad de genes involucrados en los diferentes mecanismo de resistencia (Carver, 1995).

La tolerancia al aluminio está genéticamente controlada, al menos parcialmente, por lo que es posible el desarrollo de variedades con una elevada tolerancia al aluminio utilizando técnicas de manipulación citogenéticas. Por esta razón es importante el estudio de cuáles son los cromosomas implicados en estos mecanismos.

Se han localizado algunos de los genes que intervienen en los mecanismos de tolerancia. Así, Anion (1984), describió que en la variedad de trigo “Chinese Spring”, con una tolerancia media al aluminio, los genes implicados se encontraban en los brazos de los cromosomas 6AL, 7AS, 2DL, 3DL, 4DI, y 4DB y en el cromosoma 7D. Sin embargo, los procesos fisiológicos que controlan estos genes son todavía

desconocidos. Estudios recientes llevados a cabo por Ma (2000), con diferentes líneas de triticale (híbrido sintético de trigo y centeno), demostraron que el brazo corto del cromosoma 3R era el portador de genes relacionados con la exclusión de citrato y malato. En estudios realizados con diferentes líneas, (ST22, en la que se sustituyeron estos genes y ST2 donde no se había dado ninguna sustitución) se observó como la inhibición del crecimiento radicular era mayor en ST22 al igual que se producía una menor liberación de ácidos orgánicos, directamente implicados con la tolerancia a la toxicidad por aluminio. También se comprobó la especificidad de estos genes estudiando el efecto de otros metales.

1.9.2 Cambio del pH rizosférico

Uno de los mecanismos sugeridos por los que la planta parece defenderse frente a los efectos tóxicos del aluminio es la inducción de un aumento del pH en la rizosfera, ya que la solubilidad del catión es fuertemente dependiente del pH de la solución. De esta manera, si se aumenta el pH se disminuye la solubilidad del aluminio y por tanto se reducen los efectos.

Existen muchos reportes que señalan una clara correlación entre el aumento de pH producido en la rizosfera y la tolerancia. Blamey, en 1983, encontró que un aumento en el pH de 4.2 a 4.6 disminuía en un 26 % la solubilidad del aluminio. Diferencias en la tolerancia de dos variedades de *Arabidopsis* basada únicamente en este hecho fue descrita por Degenhardt *et al.* (1998). Sin embargo, existen otros estudios en los que no se puede establecer una correlación tan clara entre el cambio de pH y la tolerancia (Miyasaka *et al.*, 1986). Es probable que las plantas mantengan zonas de diferente pH en la zona del mucílago y que no sea detectado.

1.9.3 Mucílago

El meristemo y la parte del ápice de la raíz, que parecen ser los sitios primarios del ataque del Al, están recubiertos por una capa de mucílago de un grosor de 50 μm a 1 mm. El mucílago consiste en grandes moléculas de peso molecular igual o superior a 2×10^6 Da. En su composición forman una mezcla compleja en la que predominan los hidratos de carbono. Abundantes azúcares son la glucosa, galactosa y arabinosa. y en menor cantidad, y característicos del mucílago, se hallan los ácidos urónicos. Entre las diferentes funciones que se atribuyen al mucílago, están la de crear un nicho protegido para multiplicación de las bacterias y para la acumulación de exudados

solubles de la raíz, y su participación en la transferencia de nutrientes a las raíces, ya que las cargas negativas podrían jugar un papel en el intercambio catiónico directo entre las micelas del suelo y las raíces. Estas mismas cargas negativas son las que podrían proteger la raíz frente al aluminio, excluyéndolo y manteniéndolo en el apoplasto. Así, en estudios llevados a cabo por Horst *et al.* en 1982, cuando el mucílago se retiraba periódicamente de la raíz el crecimiento radicular se inhibía considerablemente frente a tratamientos con aluminio, lo que señala su carácter protector contra la toxicidad por aluminio. Sin embargo, como han mostrado tinciones con hematoxilina, no parece que el mucílago se una al aluminio, si no que se difundiría muy lentamente a través de este, además de la presencia de ácidos orgánicos en el mismo, quelarían al metal antes de que llegara a la superficie celular (Henderson *et al.*, 1991).

1.9.4 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

La unión de aluminio en el apoplasto parece ser debida a la presencia de cargas negativas en este último. Plantas con poca electronegatividad, medida en forma de CIC, (poca presencia de cargas negativas en su superficie) suelen ser más resistentes.

Varios estudios muestran como una baja CIC en la raíz caracteriza a plantas adaptadas a suelos con elevada cantidad de aluminio (Blamey *et al.*, 1990). La unión del aluminio a la membrana plasmática es uno de los mayores factores de toxicidad por aluminio. Esta capacidad de unión de la membrana plasmática al aluminio es debida a la presencia de grupos fosfato y carboxilo cargados negativamente. Sin embargo, no parece que en la parte aérea haya variación en la concentración de Al entre las plantas sensibles y las tolerantes debido a esta diferencia en su CIC. Kennedy *et al.* (1986), encontraron que variedades de algodón que presentaban una CIC más baja que otras variedades, acumulaban más aluminio. Parece que existe una cierta influencia de este factor y la tolerancia al aluminio, pero todavía no se ha establecido una relación clara. Sin embargo, estudios de medidas de la negatividad de las superficies celulares de diferentes plantas con diferente tolerancia al aluminio, llevados a cabo por Wagatsuma *et al.* (1995), encontraron que las plantas más tolerantes poseen un potencial de membrana más negativo que las más tolerantes. Si este mecanismo se establece como mecanismo de tolerancia, una diferencia en la composición lipídica de las membranas celulares de las diferentes plantas con

diferente tolerancia debería ser encontrada. Sin embargo, en estudios realizados con *Triticum aestivum* no se encuentra una diferencia en la composición lipídica entre plantas tolerantes y sensibles (Zhang *et al.*, 1997). Esto puede ser debido a que el pH de la raíz puede variar enormemente de una zona a otra y, además, varía según el estado de desarrollo de ésta. (Grauer, 1992)

La unión de zonas no sensibles en el apoplasto se ha propuesto como un sistema de resistencia a los metales pesados (Turner, 1970). Poco es conocido sobre estas zonas respecto al aluminio, tanto a nivel de la pared celular como a nivel de la membrana que pueden determinar diferencias en la tolerancia.

1.9.5 Compartimentación.

El aislamiento del aluminio en lugares donde la planta no es sensible a sus efectos se ha considerado también un mecanismo de tolerancia. Es común que el aluminio se haya localizado en muchas células epidérmicas de la hoja en especies hiperacumuladoras. En estas células no se realiza la fotosíntesis y se corresponde con el lugar donde se acumulan otros metales (Zn, Ni) en plantas acumuladoras (Küpper *et al.* 1999).

Watanabe (1998) observó aluminio monomérico en el interior de las hojas de *Melastoma malabathricum*, sugiriendo en su estudio que el aluminio se encontraba en los lugares ácidos de la célula como la vacuola. También Cuenca (1991) indicó por análisis de rayos X que el aluminio alcanzaba las vacuolas y los cloroplastos en *Richeria grandis*, otra especie hiperacumuladora.

1.9.6 Exudación de ácidos orgánicos

Todas las investigaciones acerca de la toxicidad por aluminio señalan que éste debe interactuar con la punta de la raíz para producir los primeros efectos de disminución del crecimiento. Ryan y colaboradores (1993), mostraron como en trigo y en maíz se inhibía su crecimiento radicular al ser expuestos a concentraciones tóxicas de aluminio en los primeros 5mm de la raíz. En estudios realizados comparando variedades de trigo resistentes y tolerantes al aluminio se encontró que las variedades más sensibles acumulaban mucha más cantidad de aluminio en la raíz que las variedades más tolerantes frente a un mismo tratamiento con aluminio, mientras que no se encontraba ninguna diferencia en la zona de maduración de la raíz (Rincón *et al.*, 1992). Centrándose en este punto, se ha llevado a cabo una gran cantidad de

investigaciones, proporcionando evidencias de uno de los aparentemente más importantes mecanismos de resistencia al aluminio: la exudación de moléculas de bajo peso molecular al apoplasto (Barceló y Poschenrieder, 2002).

El aluminio es muy tóxico para las plantas y se une, como hemos indicado antes, a la membrana plasmática, a la pared celular, y al ADN u otros componentes intracelulares una vez está en el citoplasma. Dentro de los mecanismos que la planta desarrolla para evitar este estrés, la reducción de su acción tóxica mediante la quelación de este ión con diferentes compuestos en el apoplasto de la raíz, es uno de ellos. Las diferentes moléculas exudadas a la rizósfera protegerían las partes sensibles de la raíz quelando el ión tóxico de aluminio (Al^{3+}) formando complejos no tóxicos para la planta. Sin embargo, este mecanismo, no solo se desarrolla en el apoplasto, pues la planta también puede quelar el aluminio intracelularmente para evitar que éste se una a componentes vitales celulares.

Uno de los principales candidatos a la quelación del aluminio son los ácidos orgánicos, que la planta sintetiza en gran cantidad en la fotosíntesis. El primer ejemplo de sustancia quelante para el aluminio fue determinado por Miyasaka *et al.* (1998) trabajando con plantas de judía sometidas a estrés por aluminio. En este caso las raíces de las variedades más tolerantes al estrés liberaban 70 veces más citrato que en ausencia de aluminio; por el contrario, las más sensibles solo liberaban 10 veces más citrato en presencia de aluminio que las controles.

El papel de los ácidos orgánicos en la tolerancia por aluminio ha sido ampliamente estudiado. Así, se han reportado también estudios con trigo, en los que se ha demostrado que variedades más tolerantes exudan hasta 5 o 10 veces más malato que las más sensibles (Delhaize *et al.*, 1993). En estos mismos estudios se estableció que la exudación de malato era específica para el aluminio y que además se producía en la parte terminal de la raíz (entre los 5 y 10 mm desde el ápice). Ryan *et al.* (1995), trabajando con más de 36 variedades de trigo con diferente tolerancia al aluminio, encontraron una clara correlación entre la liberación de malato y la tolerancia al metal. Se ha señalado, que esta estimulación por parte del aluminio no produce, en general, una estimulación de la formación *de novo* de malato, ya que no se encuentra diferencia en la actividad en la fosfoenol piruvato carboxilasa y en la NADP-malato deshidrogenasa entre las variedades más tolerantes y las más sensibles (Ryan *et al.* 1995), de manera que parece que la característica determinante para la tolerancia al aluminio parece ser más la capacidad de exudación que la formación de malato.

Una implicación de los canales aniónicos ha sido sugerida por diversos autores. Los canales aniónicos descritos en la membrana plasmática de células de diferentes plantas, están relacionados con importantes procesos, entre ellos, la regulación de la turgencia celular, el movimiento de los estomas, la adquisición de nutrientes, y el control del potencial de membrana. El malato se encuentra en forma de anión divalente en el citoplasma y el movimiento de malato fuera de la célula se produciría a través de un proceso pasivo debido a la elevada diferencia de potencial negativo a través de la membrana. Delhaize *et al.* (1995) propusieron el eflujo de malato a través de un canal aniónico en la membrana plasmática que era estimulado por la presencia de aluminio. Se sugirieron distintos modelos funcionales del canal:

- El aluminio interactúa directamente con una proteína del canal causando un cambio en la conformación aumentando la abertura y conductancia del canal.
- El aluminio interactúa con la membrana misma o con un receptor específico produciendo una activación del canal a través de una serie de mensajeros secundarios.
- El aluminio penetra en el citoplasma produciendo una estimulación desde el citoplasma a través de un mensajero secundario o uniéndose a una proteína del canal desde el interior. Varios inhibidores de los canales iónicos producían también una inhibición de la exudación de malato implicando el hecho de que esta exudación se producía a través de los canales iónicos en las zonas apicales de la raíces de plantas tolerantes de trigo (Ryan *et al.*, 1995).

Parece ser, además, que esta estimulación de la exudación de malato es acompañada también por una estimulación de un eflujo de iones potasio. El aluminio parece que bloquea parcialmente el canal de entrada de potasio, regulando así el cambio en el potencial de membrana producido por la exudación de ácidos orgánicos (Gassmann *et al.* 1994). El potasio produce una despolarización de la membrana similar a la que producirían tratamientos con aluminio, sin embargo, no se produce una exudación de malato, por lo que este hecho puede ser parte del proceso, pero no ser suficiente para la estimulación de la exudación del ácido (Papernik *et al.* 1997).

La exudación de malato parece típica en plantas de trigo; sin embargo, parece característica la exudación de citrato en plantas de maíz, pero no es exclusivo de éstas. La exclusión de ácido cítrico por parte de la especie tolerante *Cassia tora*

también se ha observado en tratamientos con 50 μM de $AlCl_3$ durante las primeras 4 horas de tratamiento, lo que sugiere la actuación de unos mecanismos de inducción (Ma *et al.*, 1997b).

Otro de los ácidos orgánicos encontrados en los mecanismos de tolerancia desarrollados por las plantas frente al aluminio es el Oxálico. En plantas de trigo con alta tolerancia al aluminio se encontró una rápida exudación de ácido oxálico tras su exposición a tratamientos con $AlCl_3$. Esta exclusión, al igual que en estudios anteriores, se producía en los últimos 10 mm de la raíz (Zheng *et al.* 1998).

Sin embargo, ciertos autores han señalado la exudación de ácidos orgánicos como una parte integrada a un mecanismo mucho más amplio de tolerancia a la toxicidad por aluminio. No está claro si las cantidades de ácidos orgánicos liberados por las plantas sería un mecanismo adecuado para la clasificación de los diferentes genotipos en cuanto a la mayor o menor tolerancia al aluminio. Además, un mecanismo constitutivo de exudación de ácidos orgánicos supondría un gasto energético muy elevado para la planta. No existe tampoco un patrón general en términos de cantidad, duración y especie exudada por la planta ni una explicación o evidencia clara de la estimulación o la forma en que el aluminio desencadenaría este proceso. Sin embargo, merecería la pena considerar este mecanismo como parte importante de la resistencia de las plantas frente a este estrés y evaluar la importancia que tendría dentro de cada especie o variedad, determinando si, en ciertos casos, puede llegar a ser totalmente determinante y factor condicionante para la supervivencia de la planta en condiciones de elevada disponibilidad del metal.

2 OBJETIVOS

El presente trabajo se inscribe dentro de una línea de investigación sobre los efectos fitotóxicos de distintos metales, iniciada por el Dr. Barceló y la Dra. Poschenrieder y que ha tenido su continuidad a lo largo de numerosos proyectos, tanto a nivel nacional como internacional. La evolución de las investigaciones sobre los efectos fitotóxicos de los metales ha evolucionado desde los estudios nutricionales iniciales a nivel de planta entera u órgano, pasando por estudios hormonales e hídricos, hasta el nivel actual en el que se intentan desentrañar los mecanismos inmediatos y primarios ya a nivel celular y de orgánulos que provocan la exposición a los metales. Actualmente nos hallamos en esta tercera fase, puesto que muchos de los efectos observados visualmente son consecuencia mediata de efectos tempranos que provocan distorsiones en el metabolismo o transporte de nutrientes y mensajeros de forma que alteran el vegetal como conjunto. La prevención de dichos efectos inmediatos a la exposición al contaminante son cruciales para la prevención de la aparición de males mayores que, una vez manifestados visualmente, ya no tengan remedio. En este sentido, la presión demográfica hace que la agricultura intensiva se extienda hacia zonas con alto riesgo de toxicidad para los vegetales cultivados, como es el caso de los suelos ácidos, principalmente en las zonas tropicales del planeta, o la aparición de la lluvia ácida en muchos de los países desarrollados. Ello conlleva la exposición de las plantas de cultivo a condiciones potencialmente más peligrosas que en tiempos pretéritos.

Actualmente, el conocimiento de las bases moleculares del funcionamiento genético de los seres vivos, permiten la manipulación de los mismos de forma que puedan obtenerse organismos resistentes a diferentes condiciones adversas y, a la vez, más productivos desde el punto de vista del rendimiento de los cultivos. Sin embargo, para realizar una modificación en este sentido es fundamental conocer qué mecanismos metabólicos son los responsables del ámbito de actuación sobre el que queremos incidir y para ello es necesario conocer a fondo los mecanismos responsables de dicha actuación, pues la cada vez mayor conciencia ecologista y el conocimiento de los potenciales riesgos que la manipulación genética pueden acarrear hacen que debamos ser muy cautos a la hora de realizar estas modificaciones.

Es por ello que en este trabajo se han escogido dos especies cultivables como objeto de estudio (*Phaseolus vulgaris* y *Zea mays*), y como agente tóxico, el aluminio.

Ambas especies de vegetales son bien conocidas en nuestro laboratorio y constituyen a la vez dos especies muy importantes desde el punto de vista económico y alimentario. Por otra parte, el aluminio es un contaminante que cada vez toma mayor importancia, tal y como se ha discutido más arriba.

El objetivo de este trabajo, como ya hemos comentado más arriba, consiste en el estudio de los mecanismos inmediatos a nivel celular que provoca la exposición de los vegetales al aluminio. En este sentido, nos hemos centrado en la raíz, puesto que es el primer órgano que se halla expuesto al contacto con el contaminante, y dentro de ella, en las primeras capas celulares, por la misma razón por la que escogimos dicho órgano. Así mismo, se escogieron variedades sensibles y tolerantes al metal para poder comparar los mecanismos implicados en dicha resistencia.

Puesto que este trabajo es consecuencia del trabajo de investigación que constituyó la tesina de licenciatura, los resultados preliminares obtenidos en ella han servido de guía para la confección de esta serie de experimentos ampliados que constituirán el presente trabajo. En este sentido, el precedente trabajo mostró muy claramente que uno de los primeros efectos que permitían observar las diferencias de comportamiento entre diferentes variedades frente a la exposición al aluminio era el crecimiento, pero muy claramente se marcaban diferencias en cuanto a los efectos sobre la permeabilidad de la membrana, por lo cual decidimos profundizar más en este aspecto y desarrollar un método que nos permitiera ver de forma rápida y clara estas diferencias de comportamiento a partir de cuantificaciones que hicieran más fiable la interpretación de los resultados obtenidos mediante técnicas de tinción vital.

Evidentemente, la distorsión en la funcionalidad de la membrana debe llevar consigo alteraciones en otros aspectos de la funcionalidad metabólica. Es por ello que, teniendo en cuenta la importancia que tiene el calcio sobre la transmisión de señales intracelulares y su relación con la membrana celular, se pensó que probablemente la cascada de señales debida al sistema Ca-calmodulina pudiera verse afectada. Así pues, se decidió estudiar la evolución de los niveles intracitoplasmáticos de Ca como posible mecanismo de alteración celular que tuviera como consecuencia la respuesta o no a las condiciones adversas. También se decidió analizar los contenidos de diferentes nutrientes y ácidos en la vacuola puesto que, a partir de investigaciones llevadas a cabo tanto dentro como fuera de nuestro laboratorio, es sabido que la exudación de ácidos orgánicos es un mecanismo muy importante en la detoxificación del aluminio en la rizosfera por parte de especies tolerantes al metal. En este sentido,

se escogieron diferentes nutrientes relacionados con la homeostasis de la vacuola y del citoplasma como el malato (implicado en mecanismos de defensa por quelación y mantenimiento de la homeostasis relacionada con el pH citoplasmático), el K (posible contraión en el movimiento de ácidos orgánicos), el nitrato (importante nutriente e implicado en los mecanismos de homeostasis del pH citoplasmático, y el P (por su importancia en la química del Al).

A partir de los datos obtenidos en todos estos análisis, queremos intentar dar una imagen más precisa de los efectos inmediatos del aluminio sobre la planta, ya a nivel celular, a la vez que somos conscientes de que los resultados obtenidos probablemente abrirán las puertas a nuevos experimentos que permitirán un conocimiento más profundo de los mecanismos implicados no tan solo en este tipo de estrés sino que probablemente se hallen relacionados con otros tipos de condiciones adversas.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Experimentos realizados.

Los experimentos llevados a cabo fueron:

1. Medición del crecimiento radicular longitudinal en plantas sometidas a tratamientos control y suplementadas con aluminio 50 μM . En este experimento se utilizaron tanto plantas de *Phaseolus vulgaris* como de *Zea mays*.
2. Estudio de los daños de la membrana usando tinción vital. Se usó una combinación de diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio y se representaron los patrones de luminosidad a lo largo del eje axial de la raíz de los dos colorantes uno frente al otro, comparándose los diferentes comportamientos de las variedades estudiadas. Esta técnica, comparada con las medidas de crecimiento de la raíces frente a tratamientos con aluminio y control muestra una coherencia y una nueva técnica para determinar los distintos grados de tolerancia de una planta al aluminio según los efectos en la membrana. Realizado tanto en *Phaseolus vulgaris* como de *Zea mays*.
3. Evolución del calcio intracitoplasmático en *Zea mays*. Se utilizó Fura-3 y microscopía láser confocal.
4. Medida de la evolución del contenido vacuolar en *Zea mays*. Este experimento se dividió en dos partes.
 - 4.1. Análisis del contenido vacuolar de fósforo y potasio mediante análisis de microscopía de rayos X.
 - 4.2. Análisis del contenido vacuolar de nitrato y malato, mediante electroforesis capilar.

Un resumen de los diferentes experimentos se halla en la siguiente tabla.

Experimento	Especie	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Zea mays</i>
Medida del crecimiento		
Tinción vital		
Evolución del Ca intracitoplasmático		
Evolución del contenido vacuolar		

Tabla 1.- Resumen de los experimentos realizados en el presente trabajo y su relación con las especies vegetales utilizadas en el mismo. En gris oscuro se muestra el tipo de experimento aplicado a cada especie.

3.2 Muestra biológica.

El material vegetal empleado consistió tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, aunque el grueso de este trabajo y la aplicación de las técnicas más avanzadas se corresponden con las monocotiledóneas. En concreto, el material vegetal empleado fue el siguiente:

- Dicotiledóneas: *Phaseolus vulgaris* L. Pertenece a la subclase de las Rosidae y al superorden de las Fabaceas, caracterizadas por un carpelo único y que dan una legumbre polispérmica. Las variedades utilizadas fueron:
 - a. *Contender*. Procedencia europea. Sensible al aluminio respecto al crecimiento radicular (Massot *et al.* 1999).
 - b. *Superba*. Procedencia europea. Tolerante al aluminio respecto al crecimiento radicular (Massot *et al.* 1999).
 - c. *Carioca*. Procedente del Brasil. Tolerante a suelos ácidos y al aluminio (Gepts, 1988).

d. *Preto*. Procedente del Brasil. Variedad comercial brasileña. Tolerancia desconocida (Gepts, 1988).

- Monocotiledóneas: En todos los experimentos realizados se escogieron dos variedades de *Zea mays* L. (familia Gramineae, orden de las graminales). Dichas variedades fueron las siguientes:
 - a. *Bakero*. Suministrada por semillas Fitó, Barcelona. Origen francés. Definida como de menor tolerancia al aluminio en experiencias anteriores (Garzón, 2001).
 - b. *Sikuani*. Suministrada por CORPOICA (Colombia). Tolerante a suelos ácidos. Definida como tolerante al aluminio y a la acidez (Múltiples autores, C.E. 1996).

3.3 Condiciones de cultivo y tipos de tratamiento.

Tanto las condiciones de cultivo como los tratamientos efectuados fueron los mismos para todos los experimentos.

Las semillas se hicieron germinar en placas de PVC recubiertas de papel de filtro húmedo. Para ello, se dispusieron horizontalmente y se colocaron unas capas de espuma de poliuretano previamente empapadas en agua, las cuales se recubrieron con papel de filtro. Sobre estas capas de papel de filtro, y en la zona que posteriormente correspondería al borde superior del montaje, se situaron las semillas. Éstas se recubrieron con otra lámina de papel de filtro humedecida y dicha operación se repitió dos veces hasta obtener tres capas de semillas separadas por láminas de espuma de poliuretano y papel de filtro. Finalmente, el montaje se recubrió con otra lámina de plástico rígido y se afianzó el conjunto mediante cinta adhesiva a la vez que se presionaban los bordes para obtener un conjunto estable y rígido.

El montaje así obtenido se sumergió por la parte opuesta a las semillas en una cubeta llena hasta una altura de 5 cm con agua y fue depositado en la misma cámara de cultivo en la que se realizarían los tratamientos. Una vez germinadas las semillas (entre 6 u 8 días dependiendo de la variedad), fueron transplantadas a cubetas de polietileno de 5 litros de capacidad (3 plantas por cubeta). Se realizó un cultivo hidropónico según las condiciones detalladas a continuación y la solución nutritiva se mantuvo en constante aireación durante todo el tratamiento.

La composición de solución nutritiva empleada fue la siguiente, expresada en

µmoles por litro: CaSO₄, 200; CaCl₂, 200, MgSO₄, 100; KNO₃, 400; MnSO₄, 5; ZnSO₄, 0.38; CuSO₄·7H₂O, 0.16; Fe-EDTA, 10; NaH₂PO₄, 4; NH₄NO₃, 300; H₃BO₃, 8; NH₄Mo₇O₂₄, 0.06.

Los tratamientos se realizaron en una cámara de cultivo en las siguientes condiciones:

	Día	Noche
Fotoperíodo	16 h	8 h
Temperatura	24 h	18 h
Humedad relativa	50%	80 %
Intensidad lumínica	330 µE	0

En todos los experimentos se realizaron dos tratamientos, uno control y otro al que se le suministró Al 50 µM, en forma de AlCl₃·5H₂O, correspondiente a una actividad de Al³⁺ igual a 14 µM según los cálculos realizados mediante el programa GEOCHEM (Parker *et al.* 1987). El pH de ambos tratamientos se mantuvo durante toda la experiencia a 4.2 y la solución se mantuvo en continua aireación.

3.4 Mediciones realizadas

3.4.1 Actividad del aluminio libre.

La actividad del aluminio libre en la solución nutritiva utilizada se calculó con el programa GEOCHEM versión 2.0 para PC (Parker *et al.* 1987).

3.4.2 Medida del crecimiento.

Por cada tratamiento, especie y variedad se escogieron 6 plantas de las cuales se midió la longitud radicular a las 0, 4 y 24 h de iniciado el experimento. Las medidas se realizaron sobre un papel milimetrado cubierto por una lámina de vidrio sobre la que se apoyaban las raíces. Utilizando estos datos se calculó la tasa de crecimiento radicular aplicando la siguiente fórmula:

$$T = \frac{L_t - L_i}{t}$$

Donde:

T = Tasa de crecimiento.

L_t = Longitud medida al final del período de tiempo considerado (t).

L_i = Longitud inicial.

3.4.3 Técnicas de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia se ha convertido en una de las herramientas más importantes para análisis celulares tanto estructurales como dinámicos en los últimos 25 años. Estas técnicas, sin embargo, están sujetas a numerosas limitaciones ya que la calidad de las imágenes disminuye a medida que profundizamos en la muestra, debido a las emanaciones de luz que provienen de planos superiores o inferiores al plano enfocado o estudiado. Para evitar este problema y debido al creciente interés de los estudios en estructuras vivas tanto en biología animal como vegetal se encuentra cada vez más extendido el uso de la microscopía confocal, la cual evita la interferencia de las radiaciones provenientes de elementos de fuera de foco.

3.4.3.1 *Tinción vital.*

La viabilidad de las puntas de las raíces fue observada mediante una doble tinción con yoduro de propidio (SIGMA 247-081-0) y diacetato de fluoresceína (SIGMA 209-877-6), siguiendo el método de Koyama et al 1995 y Suzuki y Mihura, 1999.

El diacetato de fluoresceína (FDA), es un éster no polar que puede permear a través de las membranas de las células vivas y ser hidrolizado por esterasas en el interior celular produciéndose fluoresceína. Ésta, al ser excitada por luz azul (490 nm) emite una radiación fluorescente de longitud de onda correspondiente a la zona verde del espectro. Por otra parte, la membrana celular es impermeable al yoduro de propidio, de forma que éste solamente penetra en aquellas células que tienen alterada la semipermeabilidad de la membrana por presentar daños en ésta. Dada su afinidad por los ácidos nucleicos, el yoduro de propidio se liga a éstos y el complejo resultante emite una fluorescencia de color rojo al ser excitado por una luz de 490 nm. De esta forma, las células supuestamente dañadas pueden ser visualizadas por la tinción roja de sus núcleos (figura 1).

Se cortaron las puntas de las raíces de una longitud de 5 mm desde el ápice, tiñéndose 3 puntas de cada tratamiento y variedad (Bakero y Sikuaní). Para ello, se

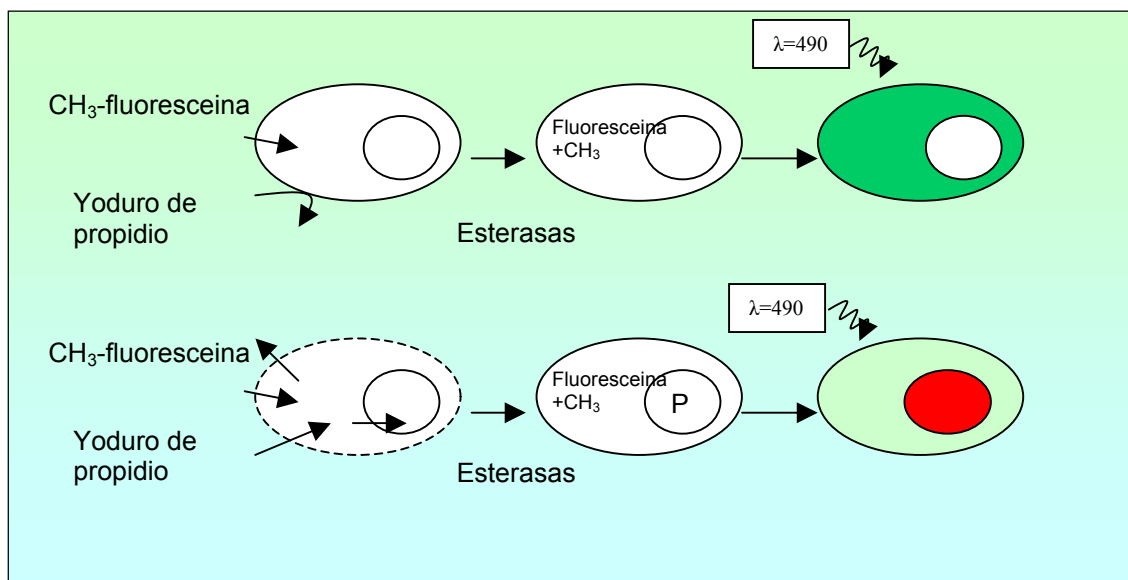


Figura 1.- Esquema del funcionamiento de la técnica de tinción vital. En la fila superior una célula cuya membrana no está dañada incorpora diacetato de fluoresceína pero no yoduro de propidio. En la línea inferior, una célula con la membrana dañada incorpora tanto diacetato de fluoresceína como yoduro de propidio, pero la señal más evidente es la del propidio unida a las cadenas de ADN en el núcleo

utilizaron portaobjetos excavados dónde se colocaron las raíces y se dejaron en primer lugar, durante 1 minuto en la solución de fluoresceína ($5\mu\text{M}$) y posteriormente durante 3 minutos en la preparación de yoduro de propidio ($3\mu\text{M}$). Las preparaciones de las muestras se montaron en agua destilada y en portas excavados para evitar el aplastamiento del órgano vegetal. La visualización de las muestras se llevo a cabo mediante epifluorescencia, utilizando un microscopio Nikon Optiphot 2 equipado con lámpara de mercurio. Se utilizó un filtro UV-1A (filtro de excitación: $365/10\text{ nm}$, espejo dicroico: 400 nm y filtro barrera a 400 nm).

Las fotografías fueron tomadas mediante un cuerpo de cámara fotográfica convencional (Nikon microreflex UFX-DX) y utilizando una película Kodak Gold con una sensibilidad de 200 ASA. Se tomó una foto de cada ápice radicular de cada variedad y tratamiento y posteriormente, éstas se digitalizaron en formato Kodak Photo CD para su posterior estudio y análisis.

El análisis de cada una de estas imágenes se llevo a cabo mediante el programa Image-Pro Plus v. 3.0 separando los canales de color proporcionados por los colorantes; rojo para el Ioduro de propidio y verde para el diacetato de fluoresceína. Dichas imágenes se trataron por separado. Se determinó la luminosidad en cada fotografía a través de la línea axial de cada raíz y se expresaron los resultados

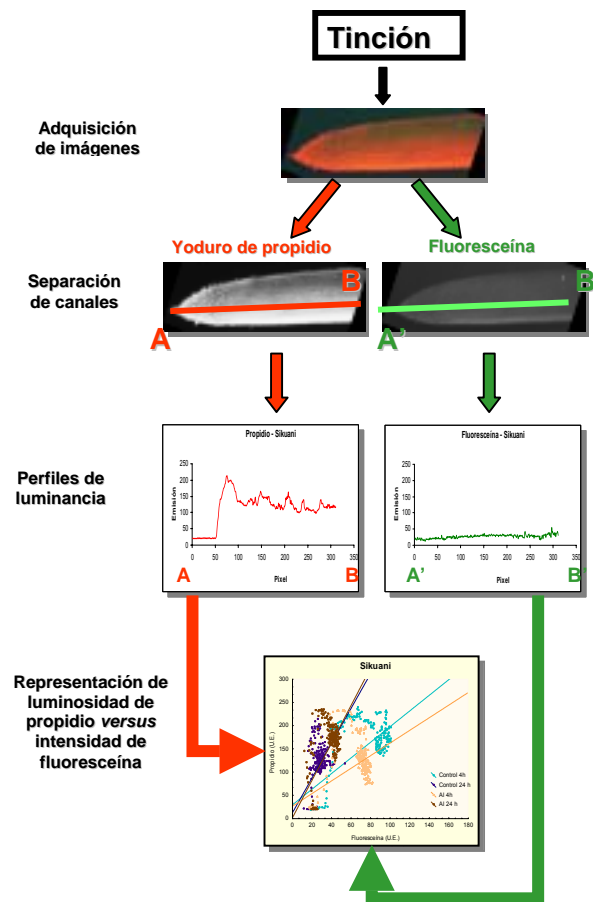


Figura 2.- Representación esquemática del protocolo utilizado para obtener los perfiles de tinción vital correspondientes a cada fluorocromo y su posterior representación gráfica.

mediante gráficos donde se representaba en el eje de ordenadas las variaciones en la luminancia del diacetato de fluoresceína y en el de las abscisas la variación en la luminancia del yoduro de propidio de los diferentes tratamientos y variedades obteniendo de cada uno de ellos sus respectivas rectas de regresión. El proceso se halla esquematizado en la figura 2.

3.4.3.2 Visualización de la variación del calcio citoplasmático.

En estudios con calcio, tanto el Fluo-3 como el Calcium green han sido mayoritariamente favorecidos ya que su excitación es compatible con la línea de excitación de 488 nm del láser de argón del microscopio confocal; desafortunadamente, ambos componentes presentan el problema de ser de excitación sencilla, de manera que dificultan la asociación o descripción de las variaciones de la fluorescencia con variaciones en el comportamiento del calcio. Sin embargo, se ha

comprobado que durante períodos cortos de tiempo, donde no se dan grandes cambios en la estructura celular, las variaciones observadas en la fluorescencia se pueden relacionar con bastante confianza a cambios en el comportamiento del calcio.

Para el seguimiento del calcio intracelular en los diferentes tratamientos estudiados se usó la tinción con Fluo-3. El Fluo-3 (F-14218, Molecular Probes) es un fluoróforo específico para el calcio que posee una gran fluorescencia al unirse a éste, rindiéndose una emisión a 526 nm al ser excitado por una longitud de onda de 506 nm. Desde que fue introducido en 1989 ha revelado un gran número de procesos en los que actúa el calcio. La tinción se aplicó, al igual que la anterior a puntas de raíces de unos 7 mm de longitud de las mismas variedades de *Z. mays* (Bakero y Sikuaní) y la visualización del calcio intracelular se llevo a cabo mediante microscopia confocal.

El protocolo de preparación y tinción seguido fué el desarrollado por B. E. Nichol y L. A. Oliveira (1995).

Se preparó una concentración de 50 μM de Fluo-3 en medio de incubación (medio de crecimiento tamponado). Para cada raíz se prepararon 0.2 mL en un eppendorf tomando 10 μL de Fluo-3 1mM y depositándolos en un eppendorf añadiendo posteriormente 190 μL de medio procurando depositarlo muy cerca del fondo y agitando después el contenido para asegurarse su homogeneidad. A continuación las raíces se tiñeron por separado en el interior del eppendorf durante 15 minutos. La operación se realizó dos veces más trasladando cada raíz a un eppendorf nuevo con agua destilada y se mantuvieron sumergidas durante 15 minutos en cada uno para lavar el exceso de Fluo-3 que pudiera quedar en las paredes. De esta forma se minimizó la emisión parásita debida a la presencia de calcio apoplástico.

Las puntas teñidas y lavadas se depositaron en un cubreobjetos y se fijaron con sendas bandas de resina adhesiva (Blu-Tack, Bostik Findley, S.A., Rubí, Barcelona) una en el extremo apical y otra lo más cerca posible de la zona de corte. Una vez fijadas, se dio la vuelta al cubreobjetos y se procedió a su montaje en un pocillo de portaobjetos excavado en el que previamente se había depositado solución nutritiva control o suplementada con 50 μM de cloruro de aluminio a pH de 4.2. El exceso de solución se absorbió cuidadosamente para evitar la formación de burbujas de aire en el montaje y se procedió al sellado de la preparación mediante la aplicación de laca de secado rápido a los bordes del cubreobjetos. Inmediatamente, las muestras fueron observadas mediante microscopía laser confocal.

El microscopio de barrido confocal utiliza métodos electrónicos de imagen que permiten enfocar un plano escogido de una muestra eliminando la luz que proviene de fuera de focos superiores e inferiores a ese plano. Generalmente el microscopio utiliza una óptica fluorescente, pero en lugar de iluminar toda la muestra a la vez se enfoca un pequeño punto a una profundidad determinada. Hay un diafragma en el detector en el lugar que es el confocal con el punto luminoso enfocado que es precisamente donde los rayos luminosos del punto estudiado están enfocados.

El microscopio confocal usado (Leica TCS4D, Leica, Heidelberg) para la visualización de nuestras muestras permite el barrido, mediante un láser de argón-kriptón a 488nm. Se usó un filtro de emisión LP 515. Las muestras se tomaron a intervalos de 5 minutos durante media hora a un primer nivel del córtex.

Una vez tomadas las muestras de luminosidad para los intervalos estudiados, las imágenes obtenidas se procesaron mediante el programa Image Pro Plus v 3.0. Para ello se procedió a identificar 20 células por muestra y a crear una máscara que permitiera identificarlas a lo largo de las series de tiempo. A partir de esta máscara se realizó la medición de la luminosidad total de cada célula tanto al inicio como al final del tratamiento, y los resultados se expresaron en forma de variación porcentual de la luminosidad entre los intervalos escogidos. Dado que las mediciones mostraron que la luminosidad variaba linealmente con el tiempo, se decidió utilizar únicamente los valores proporcionados al principio y al final del experimento (0 y 30 minutos), de forma que los valores representados en el gráfico corresponden a la variación de la luminosidad en ese período de tiempo, expresados en forma de porcentaje respecto al tiempo inicial.

3.4.4 Análisis del contenido vacuolar.

3.4.4.1 *Micromanipulación.*

Cada una de las raíces se colocó en un soporte especialmente diseñado para una correcta iluminación de la muestra. Las raíces se cortaron y se fijaron en el soporte de cristal que permitía la entrada de luz por la parte inferior, el cual se encontraba sobre otro soporte de altura regulable para facilitar el cambio de posición a la hora del muestreo (Fotografía 1). Las técnicas de micromanipulación empleadas consistían en la obtención de muestras de células a una distancia de entre 5 y 7 mm del ápice, mediante la inserción de microcapilares llenos de aceite de parafina saturado de agua,

en el interior celular. Como se observa en la foto el capilar se sostenía por un micromanipulador y todo el proceso se llevó a cabo bajo un microscopio óptico de un aumento máximo de 200x (Leica WILD M3Z).

La extracción de las muestras se hizo usando una modificación de la “pressure probe” (Hüsken, D et al., 1978) y tanto la extracción de muestras como posterior análisis a través de Rayos X, se llevo a cabo en la School of Biological Sciences, University of Wales, UK.

Los microcapilares se construyeron a partir de capilares de borosilicato (1B100-3, World Precision Instruments, USA) de 1mm de diámetro externo y 0.58 mm de diámetro interno. Para la obtención de la punta se usó un estirador de microcapilares (Modelo 700C, David Kopf Instruments, Tujunga, C.A., USA). Las dimensiones y la forma de la punta pueden ser alteradas variando los parámetros del aparato. La apertura de las puntas utilizaba variaba en un rango de 1-3 μm . Estas puntas se almacenaban y se preparaban para ser silanizadas

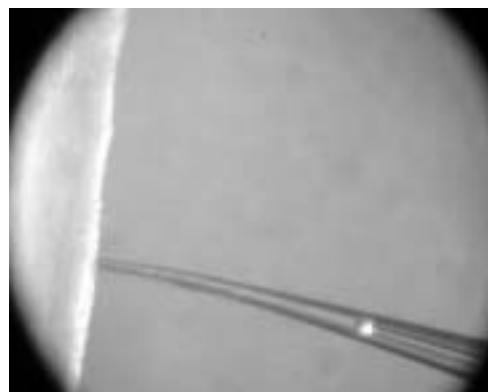
Cuando la extracción de la muestra se realiza, como en nuestro caso, bajo un medio acuoso (las puntas de las raíces se colocaban en un soporte a la altura del microcapilar, colocado éste en el micromanipulador y bajo solución nutritiva), para evitar que mientras durase la extracción de muestras las células perdiesen la turgencia, los capilares deben silanizarse de manera que la posibilidad que parte de esta solución entre en el capilar contaminando la muestra disminuye. El protocolo



Fotografía 1. *Izquierda.* Visión de conjunto del sistema de micromanipulación empleado. *A la derecha* se observa el micromanipulador que lleva fijado el microcapilar. *Derecha.* Se observa un detalle del sistema de fijación de la raíz.

seguido para la silanización de las puntas es el siguiente:

1. Se colocaron los capilares en una base de aluminio quedando las puntas hacia arriba.
2. Se introdujeron en un vaso de precipitados, tapándolo con papel de aluminio y dentro de un horno a 200 °C, donde permanecieron allí un mínimo de 2 horas.
3. Después de transcurridas las dos horas se inyectó entre 50 y 100 μ l de dimetil-diclorosilano (Sigma) a través del papel de aluminio al vaso de precipitados y se introdujo de nuevo en el horno. El vapor del dimetil-diclorosilano es irritante para las mucosas, de manera que todo el proceso se lleva a cabo debajo de una campana de extracción de humo. Los capilares pueden permanecer allí indefinidamente, pero antes de ser utilizados deben haber estado un mínimo de media hora a 200°C.
4. El capilar lleno aceite de parafina saturado de agua se introducía en el interior del tejido a una altura de unos 7 mm de las puntas de la raíces y a la profundidad de la primera capa de células del córtex. La presión del aceite de parafina en el interior del capilar tiene que ser ligeramente superior a las células que van a ser muestreadas. Para ello, se diseñó un montaje en el cual el capilar se comunicaba con un tubo bifurcado en Y. Una de las ramas se hallaba conectada a una jeringa cuya presión podía ser controlada manualmente, mientras que la otra rama se hallaba podía abrir al exterior mediante una válvula electromecánica accionada con el pie. Antes de realizar la punción, se cerraba la válvula electromecánica y se ejercía presión sobre el émbolo de la jeringa para mantener el aceite de parafina dentro del capilar a una presión ligeramente superior a la de la célula. Una vez introducido el capilar en la célula, se liberaba la presión del sistema abriendo la válvula electromecánica y poniendo el sistema en contacto con la presión exterior. Esto permitía al contenido vacuolar fluir libremente hacia el capilar gracias a la presión de turgencia interna. En la fotografía 2 puede apreciarse uno de estos meniscos. En nuestro caso, y debido a la poca cantidad de muestra obtenida en cada punción, la incapacidad de manejar



Fotografía 2. Detalle de un capilar insertado en una célula. Puede observarse la interfase hacia el centro del mismo

esas cantidades y la limitación de la electroforesis capilar para el análisis y detección de concentraciones tan pequeñas, recurrimos a tomar muestras de más de una célula, siempre de la misma capa. Por lo tanto, las muestras extraídas en nuestra experiencia no pertenecen a una sola célula sino a un grupo de células de la misma zona del córtex de la raíz.

Las extracciones, tanto en los controles como en los tratamientos, se realizaron en tres momentos diferentes:

1. A las 0 horas (tras 24 horas de ser colocadas en hidropónico)
2. A las 4 horas.
3. A las 24 horas.

3.4.4.2 *Microanálisis mediante Rayos X.*

Siguiendo en la misma línea de investigación con las mismas variedades de maíz y centrándonos en el órgano que primeramente parece afectado por la toxicidad producida por aluminio, se llevaron a cabo análisis de diferentes elementos en el contenido vacuolar de células situadas en el ápice radicular a través de diferentes técnicas de micromanipulación y microscopía de rayos X

Esta técnica microscópica se basa en el hecho que los diferentes elementos emiten rayos X de características específicas al ser bombardeados por electrones. El espectro de emisión de rayos X obtenido al bombardear una zona de las muestras puede utilizarse tanto para identificar diferentes elementos como, a partir de su intensidad, cuantificarlos. Para ello es necesario preparar patrones de concentración conocida que nos permitan relacionar las intensidades de emisión de la muestra problema con los patrones.

Se extrajeron muestras de células de puntas de raíces de Bakero y de Sikuni a 0, 4 y 24 horas, tanto de tratamientos control como de tratamientos a 50 μM de Al_3Cl en cultivos hidropónicos en continua aireación y en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. De estas muestras se determinó la variación del contenido de potasio y fósforo a través de los distintos tratamientos y a través del tiempo mediante la técnica EDAX.

3.4.4.2.1 *Preparación de los microcapilares.*

A pesar de que los microcapilares usados se preparaban inicialmente de la misma

forma, tanto en este tipo de análisis como en la electroforesis capilar, existen unas ligeras variantes para cada una de las técnicas. En este caso, se usaron dos tipos de microcapilares. El primer capilar se utilizó para extraer una cantidad de muestra suficiente para preparar alícuotas que se usarían posteriormente en el análisis. En esta primera toma de muestras, el volumen extraído no fue medido puesto que la única función de estos capilares fue obtener una cantidad de muestra suficiente y superior a la que se usaría más tarde en la cuantificación. El segundo tipo de pipeta es una pipeta constreñida necesaria para saber el volumen exacto de muestra, de estándares y del compuesto de referencia usado para medir la concentración de los elementos que nos interesan.

.Las pipetas constreñidas se obtuvieron a partir de los microcapilares preparados según lo descrito anteriormente. Una vez hecha la punta del microcapilar se utiliza una microforja, donde se coloca éste. Esta microforja consta de un filamento que se calentaba y cuya temperatura podía ser controlada variando la corriente eléctrica que pasaba a su través. La punta del microcapilar se situaba cerca de este filamento pudiéndose variar la forma en función del calentamiento provocado en el vidrio por el filamento incandescente. Se acerca la punta del microcapilar al filamento incandescente y se deja pasar la corriente a través de él. La fusión del vidrio provoca que la punta se doble por acción de la gravedad. Mediante el empleo de un microscopio es posible seguir todo el proceso y corregir la posición del capilar de forma precisa hasta obtener el perfil adecuado. La constricción provocada en el punto de dobles se utilizó de referencia para conocer el volumen de la muestra, como si de una pipeta se tratase. Estos capilares deben ser capaces de manejar volúmenes de un orden de pico litros.

3.4.4.2.2. *Almacenamiento de las muestras.*

Una vez extraída la muestra se volvía a succionar aceite de parafina en el capilar manteniendo la válvula de comunicación con el exterior cerrada y ejerciendo una presión negativa mediante la jeringa. De esta forma, la muestra quedaba totalmente rodeada de aceite. Este procedimiento podía ser repetido varias veces en un mismo capilar y así almacenar distintas muestras sin que hubiera interferencia entre ellas. Una vez finalizado el proceso, los capilares se almacenaban en el interior de placas de Petri fijados con inmovilizados con “blu-tak”, cuidando de mantener las puntas con una ligera inclinación hacia arriba para evitar que pudieran romperse si entraban en

contacto con el fondo de la placa, y se introducían en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde se almacenaban hasta el momento de ser depositadas en las rejillas para microscopía electrónica a fin de realizar el análisis mediante EDAX..

Las rejillas utilizadas eran rejillas dobles de cobre (200/100 Agar Scientific Ltd.) Dicho metal de soporte no interfería en nuestros análisis. Las rejillas se cubrieron con una membrana de pioloformo (19244, Ted Pella, Inc. Redding, C.A.). Las rejillas se hallaban divididas en dos mitades, con mallas de diferente densidad en cada una de ellas. Una de las mallas constaba de 100 orificios mientras que la densidad de la otra era del doble (200 orificios).

Las rejillas se colocaban en un portaobjetos modificado al cual se le había adherido un anillo de metacrilato que formaba un recipiente que se llenaba de aceite de parafina donde se sumergía la rejilla. La inmersión de la rejilla en el aceite de parafina tiene por objeto asegurar que la muestra nunca entra en contacto con el aire para así evitar la posible evaporación de la misma, lo cual es especialmente importante si tenemos en cuenta que los volúmenes a manejar son del orden de picolitros. Todos los pasos sucesivos de manipulación de la muestra hasta su secado definitivo se realizaron dentro de este baño de aceite de parafina.

La muestra se depositó en la parte de la rejilla donde el espaciado de los orificios y, por ende, su diámetro, era mayor. Para ello el capilar conteniendo la muestra descongelada se montó en el micromanipulador con el mismo esquema ya descrito. Para depositar la muestra, se cerró la electroválvula y se aplicó presión al sistema hasta que la muestra fluyó y se depositó sobre la membrana de pioloformo. En esta fase de la manipulación hay que tener mucho cuidado que el capilar no toque la membrana de pioloformo, pues ésta es muy frágil y podría romperse al contacto con la punta del capilar. Una vez depositada la gota de la muestra, se cambió el capilar por una pipeta constreñida y gracias a ella se tomó un volumen conocido de solución o patrón que se depositó en uno de los orificios de la otra mitad de la rejilla, poniendo buen cuidado de anotar la posición exacta del mismo para futuras referencias. Como patrón interno se añadió a la gota un volumen idéntico de nitrato de rubidio (Sigma) disuelto en manitol saturado. La concentración de rubidio en la solución debe ser similar a la máxima concentración de elemento esperada así que en nuestro experimento se usó una concentración de Rb de 200mM. Para ello se usó la misma pipeta con la que se depositaron las muestras, para que la razón de volúmenes entre la muestra y la solución de Rb fuera de 1 a 1. La concentración del elemento a medir

se determinó mediante proporcionalidad entre la señal del Rb y la del elemento, previa calibración del sistema mediante los patrones correspondientes. Los estándares usados para hacer la recta de calibración fueron: 0, 50, 100, 150 y 200 mM KH_2PO_4 disuelto en agua.

Para realizar el secado de las rejillas previo a su posterior análisis en el microscopio electrónico se desplazó el aceite de parafina por un disolvente orgánico de elevada volatilidad e inmiscible en agua. En nuestro caso se usó hexano (HiPerSolv Grade). Todo el proceso se realizó dentro de una vitrina de seguridad con un sistema de extracción de vapores orgánicos para evitar respirar el hexano.

La rejilla se tomó por la mitad en la que se hallaban los orificios mayores (que una vez utilizados eran inservibles para el análisis) y se introdujo en un recipiente con hexano. Sin soltar la rejilla se agitó ésta muy suavemente en el interior del solvente orgánico durante unos segundos. El proceso se repitió una segunda vez en otro recipiente con hexano y finalmente se transfirió a uno con isopentano. Finalmente se secaron la muestras al aire durante unos segundos y se almacenaron en cápsulas de gelatina, donde pueden permanecer indefinidamente antes de ser analizadas en el microscopio de rayos X.

3.4.4.2.3 *Análisis por rayos X.*

El microscopio utilizado fue un Hitachi S 520 Scanning electron microscope con analizador de Rayos X LINK Qx2000).

En el sistema empleado, las rejillas se depositaban formando un ángulo de 45° con el filamento del cátodo, y se aplicó un potencial de 14 kV durante aproximadamente 1 minuto, durante el cual se integraron las señales pertenecientes a P y K. Tanto los patrones como las muestras problema fueron sometidas al mismo tratamiento, de forma que a partir de las rectas de calibración se pudieron obtener las concentraciones de ambos elementos.

A partir de las señales obtenidas a partir de los patrones se preparó una curva de calibración con los estándares, que se utilizó para la interpolación de las muestras problema. Los resultados obtenidos representan la media de seis valores para cada muestra.

3.4.4.3 *Análisis de ácidos orgánicos mediante electroforesis capilar.*

En los últimos años la electroforesis capilar se ha introducido como una técnica de gran importancia en análisis fitoquímicos, debido a su gran sensibilidad y posibilidad de análisis de varios compuestos al mismo tiempo. A pesar de ello existen muy pocas publicaciones o referencias acerca de la utilización de esta técnica aplicada al análisis de contenido celular en plantas.

La electroforesis capilar está basada en el mismo proceso que cualquier otra electroforesis, es decir, un proceso de migración de especies cargadas sometidas a la acción de un campo eléctrico. A diferencia de la electroforesis convencional, en este caso no se utiliza una matriz polimérica que sirva de sustrato a las partículas en migración, sino un capilar lleno de electrolito y sometido a un campo eléctrico dentro del cual migran los diferentes iones objeto de análisis. La separación de los

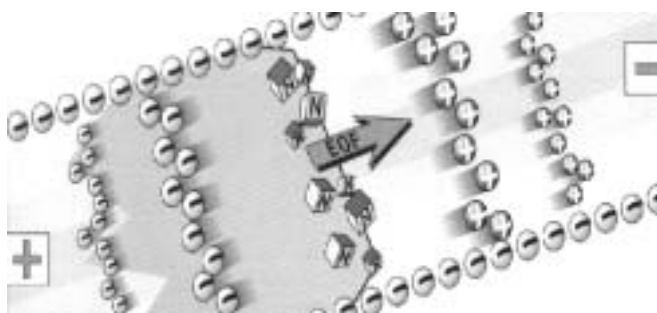


Figura 3.- Esquema del flujo de iones en la electroforesis capilar.

compuestos, como en cualquier otra electroforesis, se basa en la diferente carga y tamaño de los mismos.

Gracias a la aplicación de un campo eléctrico, las moléculas migran por el interior del capilar y llegan al otro extremo. Los aniones migran hacia el polo positivo y los

cationes hacia el polo negativo y la velocidad del proceso dependerá del volumen de la molécula, la carga, y la interacción con la fase estacionaria. Como se observa en la figura 3, paralelamente al flujo electroforético, existe un flujo electroosmótico (EOF), que es un flujo de la disolución de electrolito originada por la ionización de la pared interna del capilar. El capilar suele ser de vidrio o sílice, por lo que existen grupos silanoles terminales que están en contacto con la disolución y que a pH básico pueden disociarse creando cargas negativas. En algunos casos, estas cargas negativas provienen de la adsorción de iones del electrolito en la pared del capilar. Las cargas negativas atraen a los iones positivos formando una capa de cationes fijados a la pared del capilar. Esta primera capa no es suficientemente densa para neutralizar la carga negativa, por lo que se crea una segunda capa de cationes (N) que, al estar más alejada de la pared del capilar es móvil. Ambas capas forman una doble capa difusa de cationes. Por lo tanto, al aplicar el potencial, esta capa móvil de cationes se

desplazará hacia el cátodo y, al estar solvatados, empujará a la disolución hacia el mismo.

La técnica de la electroforesis capilar se usó aplicada al análisis de micromuestras de contenido celular; concretamente, al análisis de ácidos orgánicos (citrato, malato y oxalato) y otros aniones (nitrate), en plantas sometidas a los mismos tratamientos con aluminio que los descritos hasta el momento. Ésta técnica permite el análisis de muestras celulares con un volumen mínimo de 5 μL usando medidas espectrofotométricas en la zona del ultravioleta.

3.4.2.3.1 *Obtención de muestras.*

Las micromuestras celulares se obtuvieron mediante la técnica de micromanipulación explicada anteriormente. El material de trabajo escogido fueron las mismas variedades de *Zea mays*, utilizadas a lo largo de este trabajo: Bakero y Sikuni.

Al igual que en el experimento anterior, las muestras vacuolares se extrajeron de las puntas de las raíces a una distancia de entre 7 y 10 mm desde el ápice, en plena zona de elongación, Asimismo, también se extrajeron muestras de varias células para cada planta, y tanto las condiciones de cultivo y tratamientos (control y 50 μM Al, pH 4,2) como los tiempos de recogida de muestras, fueron los mismos (0, 4 y 24 h). Las muestras se almacenaron en el congelador hasta su uso.

Las muestras se obtuvieron mediante punción de microcapilares obtenidos por estiramiento a partir de capilares de borosilicato de 1 mm de diámetro interior previamente silanizados. Para obtener las micropipetas se utilizó un estirador de pipetas (Modelo 700C, David Kopf Instruments, Tujunga, C.A., USA) mediante el mismo protocolo usado anteriormente.

Con el fin de evitar la contaminación por parte de la solución donde se encontraba la raíz sumergida, al igual que en la toma de muestras explicada previamente, el capilar se llenó de aceite de parafina saturado con agua y se introdujo en el tejido de la raíz.

La toma de muestras presentó una variante respecto al experimento anterior, pues en este caso, se calculó directamente la cantidad de alícuota obtenida, obteniendo el volumen de la muestra en el capilar midiendo la longitud que ocupaba ésta y el diámetro a esta altura del capilar a través de una lupa binocular (Kombistereo Wild

M3Z, Wild Leitz, Suiza) de 40 aumentos, previamente calibrada. De ésta forma pudo ser determinado el volumen exacto de muestra para cada extracción.

3.4.2.3.2 *Preparación y análisis de las muestras.*

Una vez extraídas las muestras, el contenido vacuolar obtenido se introdujo directamente en un vial tipo PCR (144709, Beckman Coulter, Inc.) sin desmontar el capilar del sistema de micromanipulación. Para ello, el vial se hallaba adosado al sistema de fijación de la muestra de forma que bastaba un ligero movimiento de desplazamiento para hacer coincidir la punta del capilar con la boca del vial. Una vez alineado, se depositó la gota en el vial que previamente se había llenado con 5 μ L de agua MilliQ (Milli Q-Plus, Millipore, Francia). Este volumen representa el mínimo imprescindible para asegurar una inyección fiable y repetitiva en el sistema que se empleó. Estas muestras se almacenaron en el congelador a -20°C hasta su análisis en la electroforesis capilar.

Previamente al análisis se realizaron pruebas para determinar los límites de detección del sistema de electroforesis capilar y se obtuvo que para el tipo de muestras empleado los aniones detectables con suficientes garantías analíticas eran malato y nitrato.

Los estándares utilizados para las rectas de calibración del sistema fueron los siguientes: Nitrato (1.00441.1000, Merck, Alemania) 0 a 150 μM ; malato (02290, Fluka Chemika) 0 a 300 μM disueltos en agua Mill-Q.

Tanto los estándares como las muestras se inyectaron en los capilares del equipo previo acondicionamiento de éstos según el siguiente protocolo:

- Agua destilada: 10 minutos.
- Ácido clorhídrico 0.1 M: 10 minutos.
- Hidróxido sódico 0.1 M: 10 minutos.
- Agua destilada: 8 minutos.
- Tampón de acondicionamiento: 15-30 minutos.

Además, entre muestras se realizaba también un acondicionamiento para asegurarnos el buen funcionamiento del capilar:

- Hidróxido sódico 0.1 M: 1 minuto
- Agua destilada: 2 minutos.

- Tampón de acondicionamiento: 3 minutos.

El tampón de acondicionamiento usado en nuestro caso para la determinación de los compuestos estudiados contenía: 2.5 mM de ácido piromelítico (B 400-7, Aldrich, Steinheim, Alemania), 15 mM de Tris-(hidroximetilaminometanol) (8382-8500, Merck, Alemania) y 1 mM de DoTAOH (26, 876-3, Aldrich, Steinheim, Alemania).

Tras este acondicionamiento se procedió a la inyección de la muestra, la cual duraba 5 segundos. El tiempo de separación en nuestro caso se fijó en 12 minutos. Las muestras se inyectaron a través de microcapilares de 75 micrómetros de diámetro interno y 360 de diámetro externo y una longitud aproximada de entre 60 y 65 cm recubierto de una resina polimérica y en cuyo extremo se eliminó ésta para dejar paso a la luz utilizada en la detección. Se aplicó una diferencia de potencial de 20 KV.

Los análisis se llevaron a cabo en un sistema de Electroforesis capilar P/ACE System MDQ, Beckmann (Alemania) con un sistema detector lambda 1000 UV, bajo las siguientes condiciones:

Tipo de capilar	Sílice fundida
Diámetro interno del capilar (mm)	0,075
Diámetro externo del capilar (mm)	0,360
Longitud del capilar (cm)	60 (50 hasta el detector)
Potencia aplicada (kV)	20 (polaridad inversa)
Tiempo de separación (min)	12
Tipo de detector	U.V. (deteccion directa)
Longitud de onda del detector (nm)	245
Temperatura muestras(°C)	11

Tanto las muestras como los estándares se pasaron por el mismo capilar. Los datos captados por el detector UV (electroforetogramas) se registraron fueron digitalizados y a partir de la integración de los picos correspondientes a los diferentes analitos se obtuvo la recta de calibración mediante los estándares externos y se procedió a la interpolación de los valores de las áreas obtenidas en las diferentes muestras.

3.5 Tratamiento estadístico.

Las diferencias tanto entre los tratamientos como a lo largo del tiempo fueron analizadas mediante análisis de la varianza con dos factores de variación utilizando el programa STATISTICA v. 4.0. El mismo programa se utilizó en los análisis de regresión.

4 RESULTADOS

4.1 Crecimiento

4.1.1 *Phaseolus vulgaris*

Como ya se comprobó en el trabajo de investigación de primer año (Garzón, T, 2000) y como se confirma ahora, al comparar las dos especies estudiadas la más afectada parece ser *P. vulgaris*.

En *P. vulgaris*, las tasas de crecimiento presentan un comportamiento muy dispar que oscila entre 0.05 cm h^{-1} y 0.20 cm h^{-1} . En todas ellas el crecimiento observado en los tratamientos con aluminio tiende a tener una tasa menor que en las plantas control. Sólo en Preto parece existir una cierta recuperación en el tratamiento a 24 horas.

Las variedades tropicales (Preto y Carioca) presentaron, en general, un crecimiento más bajo que las europeas (Contender y Superba). Además, en todas ellas se observa una tendencia a una disminución del crecimiento al aplicarse los tratamientos con aluminio.

La variedad Carioca (gráfico 1), en la que se observa un patrón parecido entre las plantas control y las plantas tratadas con aluminio la tasa de crecimiento disminuye bruscamente cuando el tratamiento tanto control como con aluminio se prolonga por 24 horas. A diferencia con la variedad Preto, donde se observa una tendencia a recuperar la tasa de crecimiento con el tiempo, en la variedad Carioca la tendencia es inversa y en ambos tratamientos con aluminio presenta una disminución significativa respecto a su control correspondiente. No sucede así en Preto (gráfico 1), donde el comportamiento es diferente en cuanto a que la tasa de crecimiento se mantiene en los controles tras 24 horas y no se observa una disminución significativa en el crecimiento de las raíces sometidas a tratamiento con aluminio tras 24 horas. En esta variedad, parece que existe una recuperación del crecimiento ya que sí se observa esta disminución a las 4 horas.

Dentro de las variedades europeas, las cuales presentan un comportamiento más acusado, la variedad Contender (gráfico 1) es la que parece más resistente, ya que no disminuye su crecimiento en los tratamientos con aluminio después de 4 horas, aunque sí lo hace de manera brusca tras 24 horas de tratamiento. El crecimiento de los controles se mantiene sin variación significativa durante todo el tratamiento. De la

misma manera, Superba (Gráfico 1), no presenta variaciones significativas en su crecimiento a lo largo del tratamiento control, pero sí existe una disminución significativa en el crecimiento de las plantas sometidas al aluminio, tanto respecto a sus controles como entre ellas. La disminución porcentual de la tasa de crecimiento respecto a su control a las 24 horas es mayor en Contender que en la variedad Superba.

4.1.2 *Zea mays*

En maíz el comportamiento no se muestra tan variable ni dentro de los mismos tratamientos ni entre tratamientos, e incluso no se observan diferencias significativas en algunos de los casos entre tratamientos control y tratamientos con aluminio.

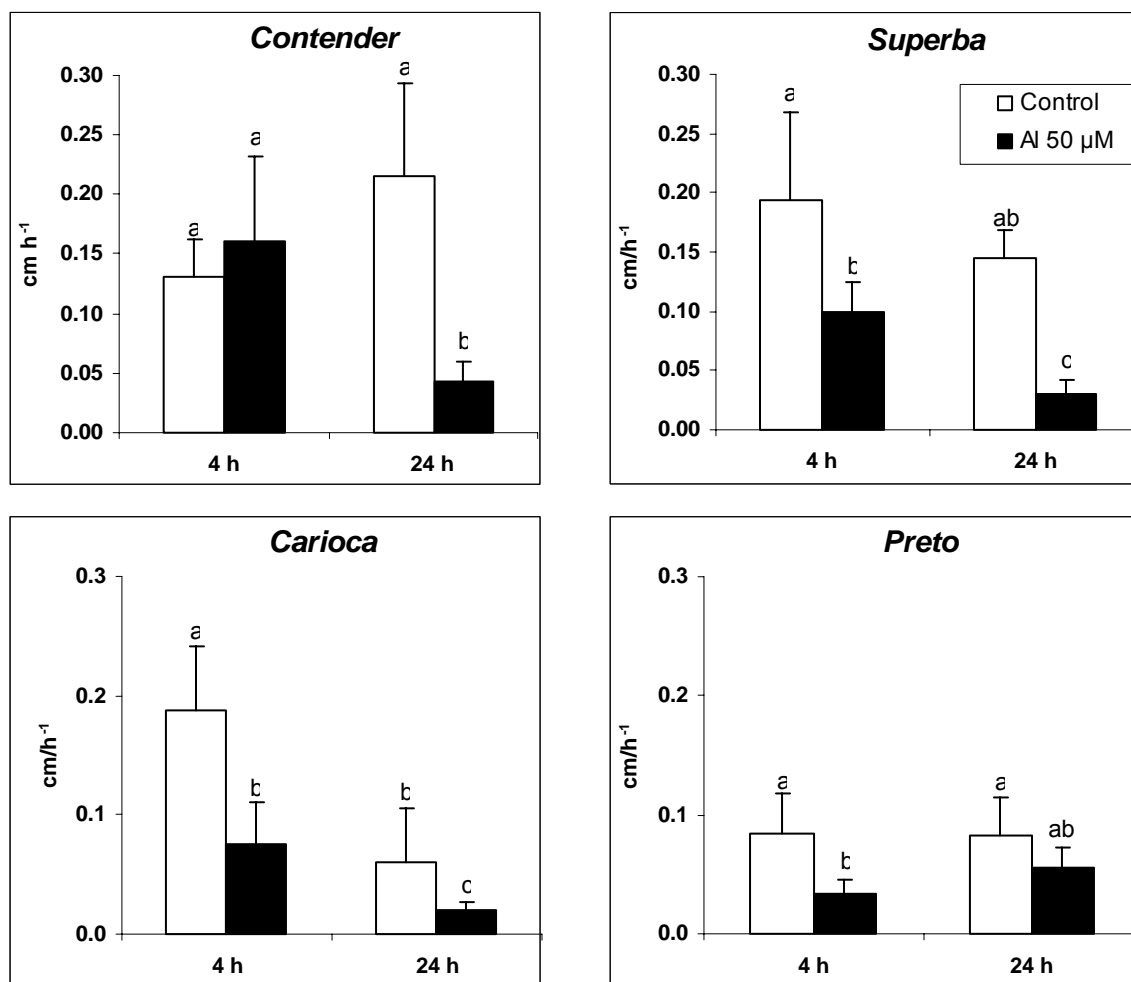


Gráfico 1.- Efecto del tratamiento con 50 µM de aluminio en las tasas de elongación de las raíces de las diferentes variedades de *Phaseolus vulgaris* L. a las 4 y 24 horas. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Las medias con distinta letra presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

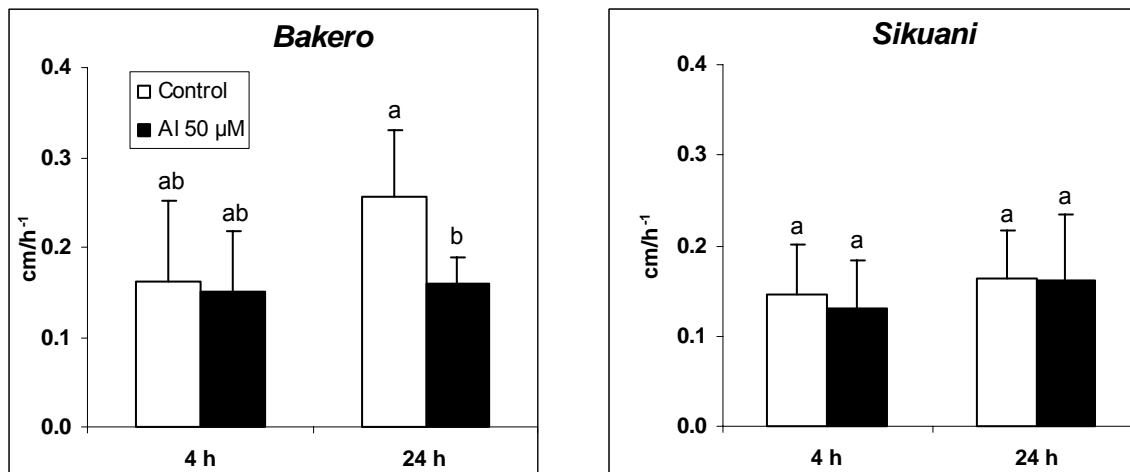


Gráfico 2.- Efecto del tratamiento con 50 μM de aluminio en las tasas de elongación de las raíces de las diferentes variedades de *Zea mays* L. a las 4 y 24 horas. Las barras representan medias \pm s.d. ($n=3$). Las medias con distinta letra presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

En ambas variedades de maíz se observa un comportamiento constante y con variaciones poco acusadas tanto dentro de los tratamientos como entre ellos.

En la variedad Bakero (gráfico 2), a pesar de observarse una disminución del crecimiento en el tratamiento a 4 horas no parece que esta diferencia sea significativa, tanto respecto a su control como respecto a su tasa de crecimiento a las 4 horas de iniciado el tratamiento, sin embargo, esta disminución del crecimiento se hace más acusada tras 24 horas y sí se observa una diferencia significativa respecto al tratamiento control a la misma hora.

En la variedad Sikvani (Gráf. 2), a pesar de que se observa una ligera disminución del crecimiento de las raíces expuestas a tratamientos con aluminio, ésta no es significativa respecto a los controles ni a 4, ni a 24 horas de tratamiento y las tasas de crecimiento de todos los tratamientos se mantienen constantes entre 0.13 y 0.16 cm^{-1} .

4.2 Tinción vital

4.2.1 *Phaseolus vulgaris*

La representación de los perfiles de tinción vital presenta diferente comportamiento según la variedad que tratemos. Atendiendo a las pendientes de las rectas de regresión, podemos agrupar el comportamiento observado en dos categorías: la primera categoría serían aquellos en los que se diferencia claramente la división del comportamiento de las plantas control por un lado y los grupos sometidos a tratamiento con aluminio por otro lado, independientemente del tiempo de exposición a los tratamientos, mientras que la segunda categoría correspondería a aquellos tratamientos en los que las diferencias aparecen como consecuencia del tratamiento

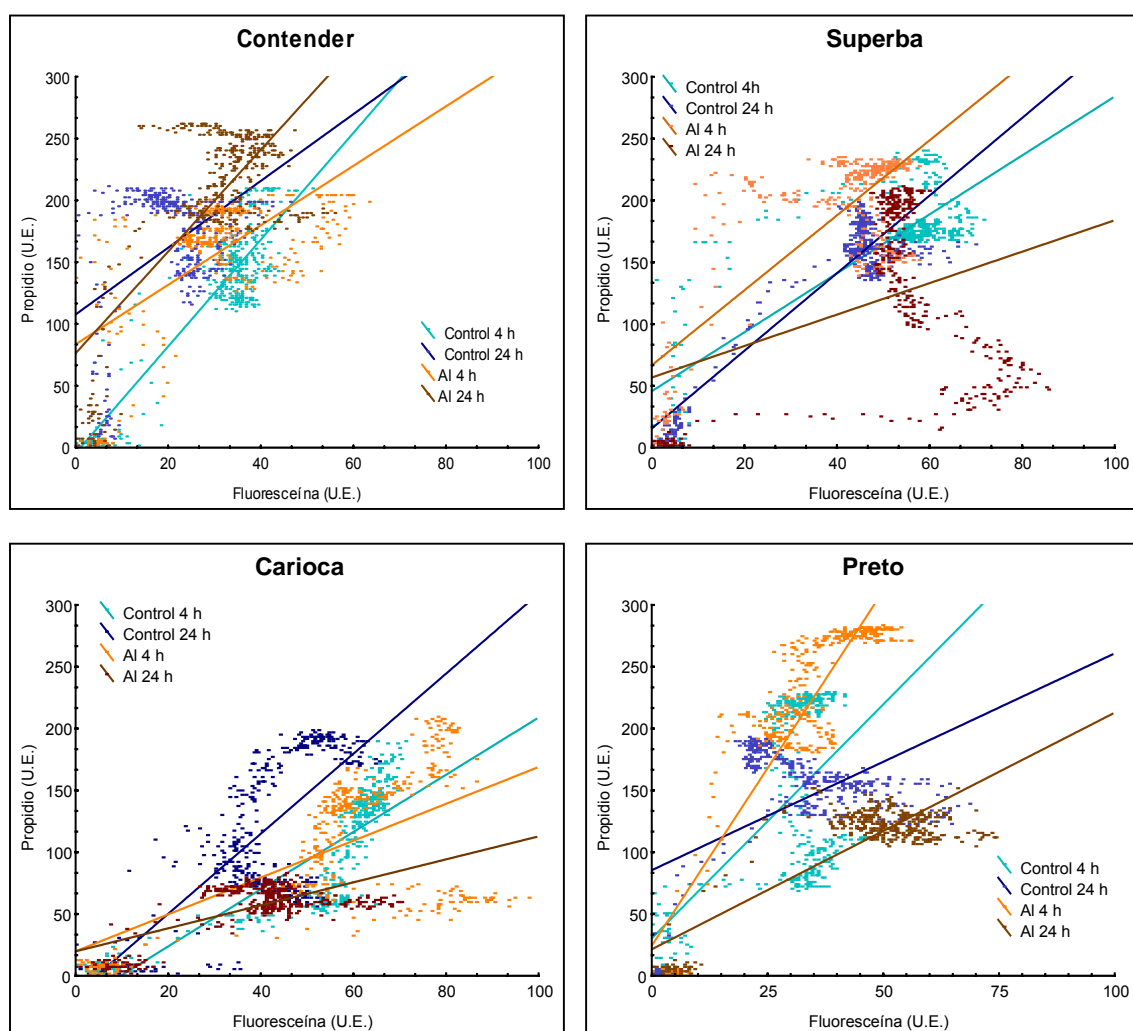


Gráfico 3.- Representación de la luminosidad de la fluoresceína frente a la de yoduro de propidio en las cuatro variedades de *Phaseolus vulgaris* L. Se representan las regresiones lineales para cada tratamiento. Las pendientes de las líneas muestran las diferencias en el comportamiento de las distintas variedades.

con aluminio y de forma independiente del tiempo de exposición al mismo. Al primer grupo pertenecerían las variedades Contender, Superba y Carioca (gráfico 3). En estas variedades se observa una variación en el comportamiento de los perfiles con el tiempo a la vez que con la exposición al aluminio.

A diferencia de las tres variedades anteriores, Preto presenta una pauta comportamiento diferente al resto; mientras que en el resto de variedades las pendientes se agrupan en *clústers* bastante homogéneos, en la variedad Preto se observan dos grupos compuestos el primero por las muestras tomadas a 4 horas y el segundo por las muestras tomadas a 24 horas, independientemente del tratamiento al que han sido sometidas. De esta manera, como puede observarse en el gráfico 3, Preto muestra un patrón muy marcado en el que la variación de comportamiento es debida al tiempo y no al tratamiento.

4.2.2 *Zea mays*.

Tal como muestran los perfiles de tinción vital para estas dos variedades (gráfico 4), se observa una diferencia incluso mayor en su comportamiento y que coincide con el comportamiento de las variedades de judía en cuanto a que las pendientes de las dos variedades se agrupan en diferentes grupos según su tolerancia o sensibilidad al aluminio. La variedad europea (Bakero) presenta dos claros grupos en las pendientes; uno representa el grupo control y en el otro estarían agrupadas las plantas sometidas a tratamientos con aluminio. En Sikuni, sin embargo, las diferencias son más

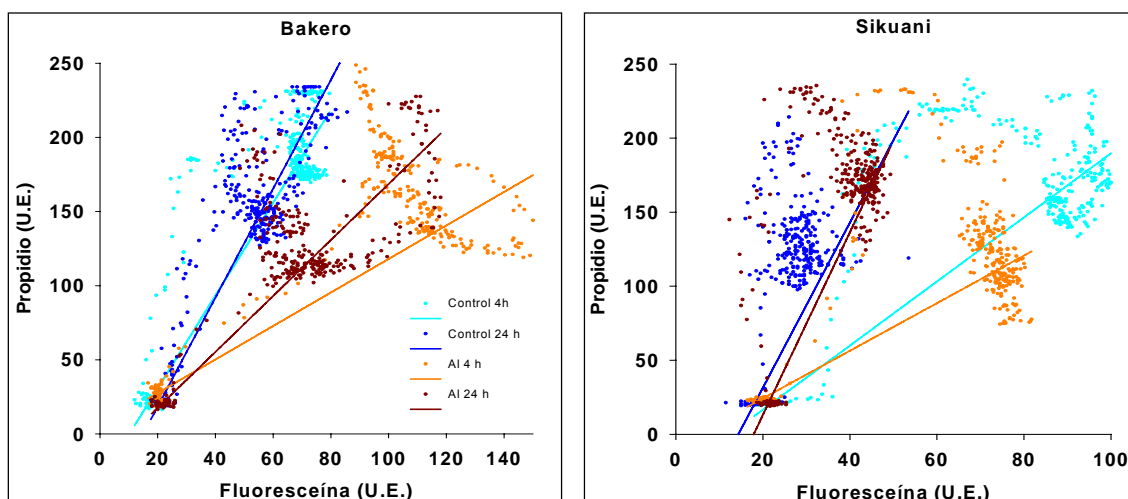


Gráfico 4.- Representación de la luminosidad de la fluoresceína frente a la de yoduro de propidio en las dos variedades de *Zea mays* L. Se representan las regresiones lineales para cada tratamiento. Las pendientes de las líneas muestran las diferencias en el comportamiento de las distintas variedades.

importantes y los dos grupos observados se dividen según los diferentes tiempos independientemente de los tratamientos. Así, el primer grupo estaría compuesto por los perfiles de las raíces tomados a las 4 horas y el segundo por los perfiles tomados a las 24 horas. Éste comportamiento es igual al observado en la variedad más resistente de *Phaseolus vulgaris* (Preto), en la cual las diferencias observadas no están directamente relacionadas con la exposición al aluminio.

4.3. Evolución del calcio citoplasmático.

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio del incremento de luminosidad de las diferentes variedades se observa un comportamiento marcadamente diferente entre éstas. Ambas variedades aumentan la luminosidad debida al calcio libre, cuando se someten a la exposición al aluminio, pero la pauta de comportamiento que muestran es bastante diferente.

Como puede observarse en el gráfico 13 el incremento de la luminosidad en Bakero fue muy bajo (menos del 40%), tanto en las plantas control como en las plantas sometidas a tratamiento con aluminio. Además, a pesar de que las plantas tratadas muestran un ligero aumento en el incremento de luminosidad, éste no es significativo. Por el contrario, Sikuaní presentó un mayor aumento en la luminosidad (como se puede observar en el gráfico 5) respecto a Bakero. En las plantas que no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento con aluminio se observa un incremento en la luminosidad de un 98%. El aumento que se produjo en las plantas sometidas a tratamientos con aluminio fue superior al incremento que se produjo en los dos tratamientos de Bakero pero significativamente inferior a su respectivo control.

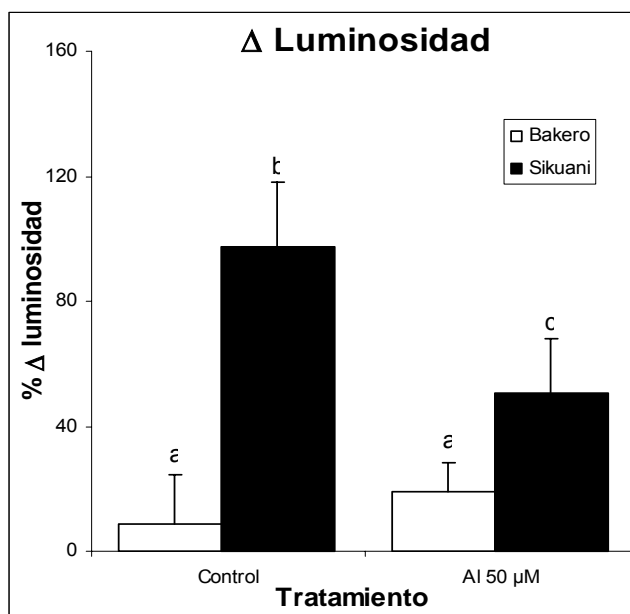


Gráfico 5.- Representación de la variación porcentual de la luminosidad debida al Ca^{2+} en células del primer nivel cortical en raíces de *Zea mays* L. Las barras representan medias \pm s.d. ($n = 20$). Las medias con distinta letra presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$)

Si observamos la evolución del incremento de luminosidad en las muestras (ordenadas), vemos también una diferencia en el comportamiento de ambas variedades. Como muestra el gráfico 5, las raíces de la variedad Sikuaní se muestran un mayor incremento de la luminosidad, tanto en los controles como en los tratamientos con aluminio y las diferencias observadas son significativas. No ocurre así en la variedad Bakero en la que se observa las diferencias observadas no son significativas.

4.4 Microanálisis del contenido vacuolar.

4.4.1 Microanálisis de K y P.

Las pautas de comportamiento de ambas variedades siguen un patrón muy parecido y en ambas el contenido de K y P es menor en las muestras de las raíces de las plantas tratadas con aluminio que en los tratamientos control. En todas ellas existe una tendencia a aumentar el contenido de ambos iones a las 4 horas de tratamiento control y parece que se mantiene este contenido tras 24 horas aunque no de una manera significativa. Sin embargo, no ocurre así en las plantas tratadas con aluminio donde el contenido tras 4 horas no parece aumentar respecto al inicial y además se mantiene al prolongar el tratamiento a 24 horas, incluso puede sufrir una disminución

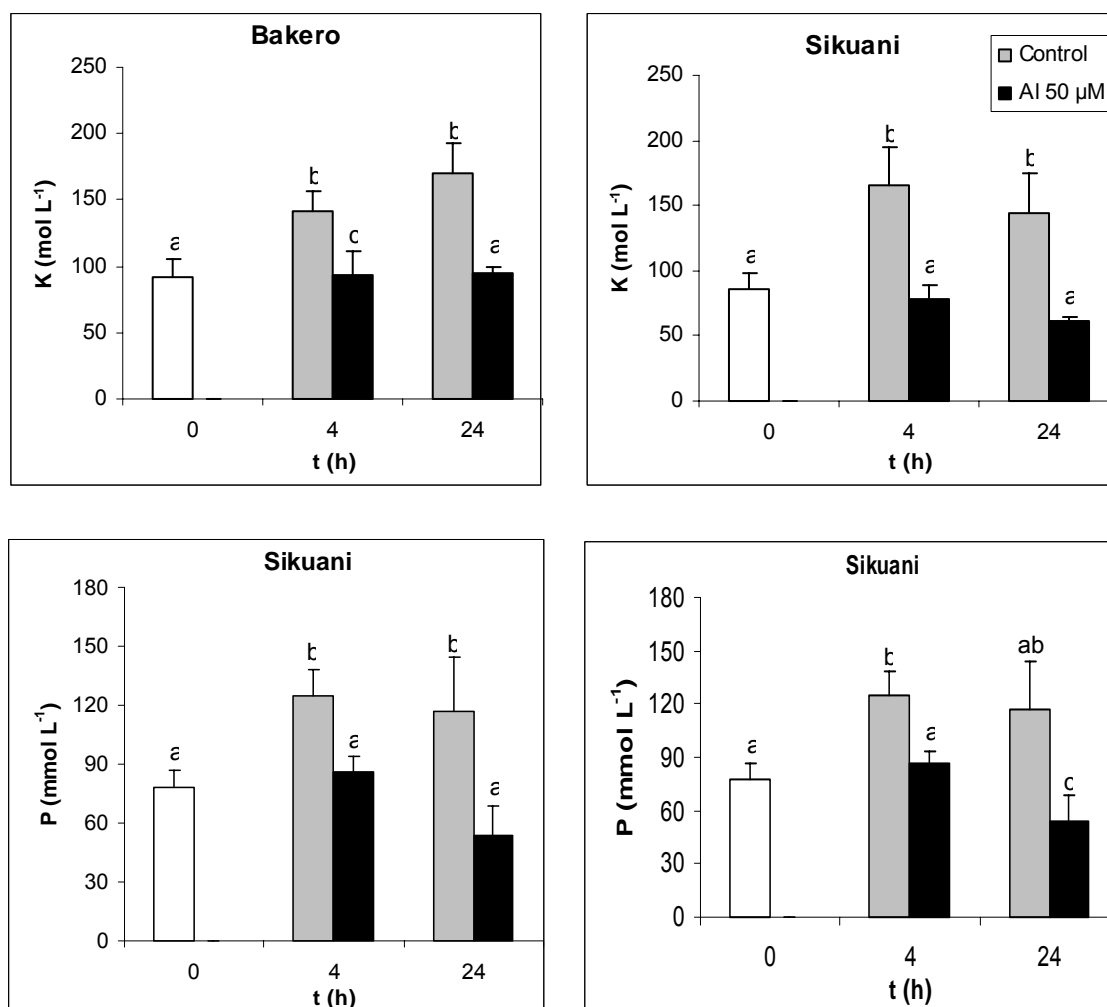


Gráfico 6.- Evolución del contenido en K y P en células del primer nivel cortical de raíces de las dos variedades de *Z. mays* L sometidas a distintos tratamientos con Al. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Las medias con distinta letra presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

como ocurre con el contenido de K en la variedad Sikvani a las 24 horas.

Como se puede observar en el gráfico 6, las variaciones de P no presentan grandes diferencias de comportamiento entre las dos variedades estudiadas. El contenido de P en ambas variedades presenta el mismo comportamiento y las disminuciones de este elemento en los tratamientos con aluminio son significativas para los tiempos 4 y 24 horas respecto a su control, mientras que, como hemos dicho anteriormente los controles tienen una tendencia a aumentar con el tiempo. En la variedad sensible Bakero, como puede verse en la gráfico 6, el contenido de fósforo es muy bajo en los tratamientos con aluminio respecto a los tratamientos control tanto a las 4 como a las 24 horas de aplicado el aluminio. Se observa una tendencia a mantenerse durante todo el tratamiento con aluminio a una concentración de 60 mM e incluso disminuye de una manera más acusada en la variedad más sensible Bakero tras 24 horas de aplicado el tratamiento con aluminio. Como hemos dicho, los tratamientos control parecen presentar una tendencia a aumentar el contenido de P con el tiempo y se estabilizan alrededor de 120 mM.

Sikvani (gráf. 6), presenta el mismo comportamiento que Bakero y mientras que los controles tienden a aumentar tras 4 horas ya estabilizarse tras 24 horas, los tratamientos con aluminio presentan concentraciones menos elevadas respecto a su control. A pesar de que ambas variedades presentan la misma tendencia, Sikvani, muestra una disminución más acusada respecto a su control tras 4 horas de tratamiento.

Lo mismo sucede en los controles de potasio, que tienden a aumentar su concentración de este ión con el tiempo y a estabilizarse a una concentración aproximada de 150 mM de K en ambas variedades. Si nos fijamos en la evolución del contenido de K en Sikvani tratamiento, como se ve en el gráfico 6, el comportamiento presentado sigue la misma tendencia que el comportamiento del potasio en la variedad Bakero (gráf. 6). Parece que en ambas variedades no aumenta la concentración del ión respecto a su control inicial, se mantiene durante todo el tratamiento con aluminio en una concentración de 90 mM aproximadamente, mientras que como hemos dicho el control tiende a estabilizarse a una concentración de 150 mM. Sin embargo, dentro de este comportamiento similar la concentración de Sikvani tras 4 horas de tratamiento con cloruro de aluminio es significativamente inferior respecto a su control que en la variedad Bakero, ya que representa la mitad de la concentración respecto a éste.

4.4.2 Microanálisis de ácidos orgánicos.

Al igual que sucede con los iones K y P, los análisis de nitrato llevados a cabo en el interior de la vacuola presentan un comportamiento muy parecido entre ambas variedades.

El contenido de nitrato en la vacuola en ambas variedades (gráfico 7) aumenta en gran medida cuando las plantas se someten a los tratamientos con aluminio y tras sólo 24 horas de tratamiento la concentración inicial de ambas variedades se dobla (pasa de 2 mM a 4 mM, aproximadamente) que se mantiene a las 24 horas.

Por el contrario, los controles presentan concentraciones muy bajas de nitrato y parece que se mantiene o no varía mucho respecto a su concentración inicial de 0.5

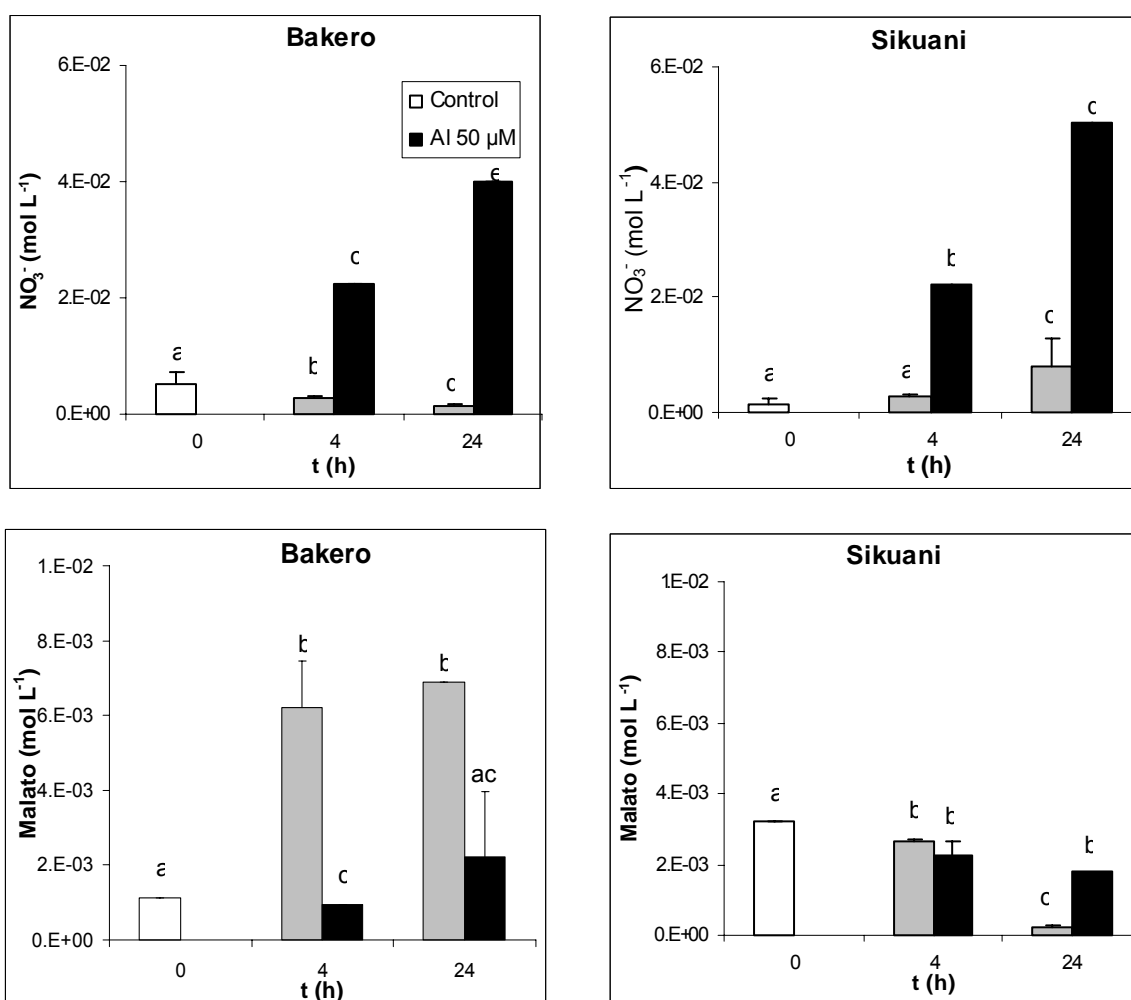


Gráfico 7.- Evolución del contenido en NO_3^- y malato en las células del primer nivel cortical de raíces de *Z. mays* L. sometidas a distintos tratamientos con Al. Las barras representan medias \pm s.d. (n=3). Las medias con distinta letra presentan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

mM en Bakero y 0.2 mM en Sikuni.

El contenido de malato estudiado, sin embargo, presenta un comportamiento muy diferente en las dos variedades en los tratamientos con aluminio, aunque sigue siendo muy parecido en los controles, presentando una tendencia a mantener la misma concentración durante todo el tratamiento (gráfico 7), aunque la concentración inicial de malato en Sikuni (3mM) ya es superior a la de Bakero (1mM).

En los tratamientos con aluminio, el contenido de malato en Bakero (gráfico 7) aumenta progresivamente a medida que se prolonga el tratamiento y es muy superior a los controles, mientras que en Sikuni (gráfico 7), el contenido de malato en la vacuola presenta un comportamiento totalmente contrario y va disminuyendo su concentración progresivamente e incluso a las 24 horas de tratamiento es inferior a la concentración a la misma hora en el control, cosa que no sucede nunca en Bakero donde las concentraciones controles no superan nunca a las concentraciones tratadas.

5 DISCUSIÓN

Tal como se expuso en el trabajo de primer año de investigación (Garzón, 1999) y como se comprueba ahora estudiando la tasa de crecimiento radicular, uno de los primeros síntomas visibles en cuanto a la toxicidad por aluminio es la disminución en la elongación de la raíz. Existe una gran relación entre este factor y la tolerancia al aluminio. La inhibición del crecimiento radicular producida por el aluminio puede manifestarse tras sólo 30 minutos de tratamiento, de manera que constituye un factor claro y rápido a la hora de definir el grado de tolerancia de la planta a los diferentes tratamientos con este metal. Debido a esta clara relación negativa existente expuesta por numerosos autores entre ellos Llugany *et al.* 1995, este factor es uno de los principalmente usados para definir y clasificar las especies estudiadas respecto a su tolerancia al aluminio. Teniendo en cuenta esto, y que todas las variedades estudiadas se vieron en mayor o menor grado afectadas, podemos establecer un orden de tolerancia, como a continuación se detalla.

Al ser expuestas al Al, las variedades de monocotiledóneas (gráfico 2) presentan una reducción menos marcada del crecimiento que las variedades de dicotiledóneas (gráfico 1). Por lo tanto, teniendo en cuenta únicamente este factor, podríamos hablar de una mayor tolerancia por parte de las variedades de *Zea mays* estudiadas. Ninguna de las variedades de maíz estudiadas presentó una disminución del crecimiento muy marcada, a pesar de que dentro de las variedades ensayadas, la variedad Bakero, de origen europeo, presenta un mayor grado de inhibición de la elongación radicular que Sikuaní, de origen tropical, ya que ésta mantiene su tasa sin cambios significativos a lo largo de todo el tratamiento. Así, se podría hablar de una relación origen-tolerancia dentro de las variedades de maíz, relación que no se presenta tan claramente en las variedades de dicotiledóneas, donde las variedades tropicales se vieron tanto o más afectadas que las variedades europeas. Sin embargo, teniendo en cuenta que tras 24 horas de tratamiento con aluminio la reducción del crecimiento es mucho más marcada en las variedades europeas que en las tropicales, se espera una mayor adaptación de estas últimas a condiciones de alta disponibilidad de aluminio. Dentro de las variedades tropicales de dicotiledóneas, Preto presenta una respuesta más positiva que Carioca (gráfico 1), ya que la disminución porcentual del crecimiento al prolongar el tratamiento con $50 \mu\text{M}$ de AlCl_3 es mucho menor que en Carioca y ni siquiera es significativa respecto a su control para el mismo tiempo de

exposición. Las variedades europeas de *Phaseolus vulgaris* presentan un comportamiento mucho más sensible al aluminio y la disminución del crecimiento es acusada en ambas variedades aunque parece que Contender presenta una mayor tolerancia a los efectos que Superba (gráfico 1).

A pesar de que está claro que la raíz es uno de los primeros órganos en ser afectado, las razones fisiológicas por las que el aluminio produce esta disminución del crecimiento no han sido todavía debidamente esclarecidas. Sin embargo, tampoco está claro si el aluminio produce esta inhibición desde el apoplasto o desde el simplasto (Horst, 1995). El aluminio, como catión trivalente bajo condiciones ácidas, tiene múltiples lugares de acción y se cree que el principal y primer lugar de acción es el apoplasto, donde se uniría a la pared celular y a la cara externa de la membrana plasmática, uniéndose principalmente a los grupos carboxilo y al material péctico (Blamey, 1993). Parece que la unión del aluminio a la matriz péctica tiene efectos substanciales en las propiedades físicas de la pared celular disminuyendo su extensibilidad, y en la membrana afectando su permeabilidad y, por lo tanto, pudiendo afectar al normal crecimiento de la planta.

A lo largo de las diferentes investigaciones llevadas a cabo en relación con la toxicidad por aluminio, otros factores menos específicos han sido utilizados también de manera complementaria a la inhibición del crecimiento radicular, como es la formación de callosa para determinar el grado de tolerancia al metal. A pesar de que la deposición de callosa es una respuesta de la planta a cualquier tipo de estrés, mecánico, biofísico, químico y biológico, ha sido relacionada en numerosos estudios con la resistencia a la toxicidad por aluminio (Llugany *et al.*, 1994; Massot *et al.* 1999). Sin embargo, esta formación de callosa se presenta como un factor menos específico y menos relacionado directamente con la toxicidad por aluminio. Es por ello que la disminución del crecimiento debida a la unión del aluminio a la membrana plasmática se ha propuesto como una de las principales razones de la reducción del crecimiento (Zhang *et al.* 1999).

Teniendo en cuenta este efecto producido por el aluminio y las numerosas hipótesis que señalan el daño en la membrana plasmática como uno de los principales y primeros efectos del aluminio en la planta, en nuestro estudio se propone una alternativa al examen del grado de tolerancia a los efectos del aluminio teniendo en cuenta este factor. La utilización de la tinción vital como mecanismo para determinar la sensibilidad de las plantas al aluminio respecto a los daños producidos en la

membrana plasmática podría utilizarse como método alternativo o complementario al estudio del crecimiento radicular, ya que la tinción señala y diferencia las células cuya permeabilidad ha sido alterada de las que no lo ha sido.

De acuerdo con estos resultados, al examinar las diferencias de comportamiento que ocurren en el estudio de los perfiles elaborados mediante los patrones de luminosidad proporcionados por la tinción vital, se observan diferencias en el comportamiento de las diferentes variedades estudiadas que muestran una concordancia con los estudios sobre inhibición radicular provocada por el aluminio. Así, se pueden clasificar los perfiles en dos grupos de comportamiento. En los gráficos 3 y 4, correspondientes a los perfiles de tinción vital, podemos observar que dichos perfiles varían de dos formas distintas, tanto en mono- como en dicotiledóneas. Por un lado, las variedades europeas Contender y Superba de *Phaseolus vulgaris*, presentan líneas paralelas entre las plantas control a las 4 y 24 horas, mientras que lo mismo ocurre con las plantas tratadas con aluminio. Así, se establece un grupo control y otro determinado por la exposición al aluminio. En el caso de las variedades tropicales, ocurre lo mismo en Carioca (gráfico 3). Por lo que respecta *Z. mays*, también pueden diferenciarse dos comportamientos, siendo el de la variedad Bakero similar al anterior.

Por lo que respecta a la variedad de *P. vulgaris* Preto y la de *Z. mays* Sikuani, las variaciones en las pendientes de las rectas de regresión se agrupan de forma temporal y no puede establecerse ninguna relación con la exposición al Al (gráficos 3 y 4), lo cual es concomitante con la tolerancia sugerida por los efectos sobre el crecimiento.

Diferentes hallazgos sugieren que los primeros 2-3 mm de la raíz, correspondientes a la zona de elongación y/o la parte distal de la zona de transición, son el blanco primario para la toxicidad por aluminio en maíz (Ryan *et al.* 1993, Sivaguru & Horst, 1998). Sasaki *et al.* (1997), trabajando con yoduro de propidio, han mostrado que el lugar más probable del efecto primario de la toxicidad por Al sobre el crecimiento de raíces de trigo corresponde a las células de la zona de elongación, manifestándose por una reducida viabilidad de las células de dicha zona de concomitante con alteraciones estructurales e incremento de la lignina tras 3 horas de tratamiento con aluminio. La unión del Al a componentes de la membrana celular provocando alteraciones en la permeabilidad parece ser uno de los factores primarios responsables de la reducción del crecimiento y la alteración de la integridad de la membrana plasmática, que pueden conducir a los efectos observados sobre los perfiles de tinción vital, tal y como es sugerido por diversos autores (Ryan *et al.* 1994,

Peixoto *et al.* 2001, Koyama *et al.* 1995, Oteiza, 1994).

Los resultados de este primer experimento indican claramente que las técnicas de tinción vital, junto con el análisis de imagen, pueden ser un método rápido y fiable para determinar la tolerancia al Al en diferentes plantas, aunque los mecanismos fisiológicos implicados merecen estudios posteriores, puesto que, por ahora, no podemos dar una respuesta clara sobre los primeros mecanismos o los mecanismos puntuales por los que el aluminio daña la membrana. Sin embargo, los datos discutidos a continuación muestran claramente que uno de los efectos atribuibles al aluminio está relacionado con la alteración de los niveles de calcio intracitoplasmático.

Uno de los daños descritos producidos por el aluminio y que podría causar la disminución en el crecimiento radicular es el desplazamiento del calcio apoplástico por el aluminio debido a una competencia por los diferentes ligandos. Es generalmente aceptado que los cambios fisiológicos producidos tanto en la membrana como en el citoplasma por el aluminio se producen como consecuencia de un bloqueo en la homeóstasis del calcio (Rengel, 1992, Rengel y Zhang, 2003). La disminución de la absorción de este elemento podría ser consecuencia directa de la interacción del aluminio con el apoplasto sin necesidad de que hubiera una penetración del mismo al interior celular y ésta podría considerarse una de las primeras consecuencias de la toxicidad producida por el metal. Ello nos llevaría a observar posteriormente una disminución en el crecimiento radicular y una serie de trastornos metabólicos posteriores relacionados, como efectos sobre proteínas que necesitan calcio, efectos sobre la calmodulina, la cual no puede actuar como cofactor de otras proteínas sin la presencia de calcio, efectos sobre la polimerización de los microtúbulos, etc. Numerosas investigaciones han señalado que el aluminio bloquea la absorción de calcio al interior celular en diferentes especies (Rengel y Elliot, 1992, Huang *et al.* 1992, Jones *et al.* 1998), e incluso parece que su translocación a la parte aérea de la planta es inhibida por los efectos tóxicos del aluminio (Huang *et al.* 1993). A pesar de estos numerosos estudios, están apareciendo cada vez más revisiones que indican que aunque el aluminio sea capaz de producir un desorden metabólico a través del calcio dicho desorden no necesariamente se produciría a través de un bloqueo en la absorción del mismo. Así, Kinraide (1994) mostró cómo tratamientos con aluminio en *Triticum aestivum* L. inhibían el crecimiento radicular pero no afectaban a la absorción de calcio.

Nuestras investigaciones relacionadas con el aluminio y sus interferencias con el

calcio indican una distorsión de los niveles de calcio en las dos variedades de *Z. mays* estudiadas (gráfico 5). Numerosos estudios indican que esta disminución o distorsión en los niveles de calcio intracelular puede ser debida a una inhibición en la translocación de calcio al interior celular. Así, Huang *et al.* (1993), en estudios con *Triticum aestivum* tratado con aluminio, encontraron una inhibición de la absorción de calcio. Sin embargo, nuestros estudios no esclarecen si existe una inhibición o no de la absorción de este ión ya que como muestra Sikvani, el incremento en la señal de calcio citoplasmático libre es menor en las células de las plantas expuestas al Al que en las control, mientras que en Bakero el incremento es mayor aunque no significativamente distinto en las plantas tratadas respecto a las plantas control.

Estos resultados coinciden parcialmente con los encontrados por Ma *et al.* (2002), los cuales también emplearon Fluo-3 para observar la evolución de calcio libre en células de raíz de *Secale cereale* resistentes al aluminio. En este experimento se observó un aumento del calcio libre citoplasmático en las plantas tratadas respecto a los controles e, incluso, comprobaron cómo este aumento disminuía al aplicar el aluminio conjuntamente con malato.

En nuestro caso, a pesar de que en la variedad resistente también se produce un incremento en el calcio libre citoplasmático, éste es menor en los tratamientos con Al que en los controles. Sin embargo, el incremento en ambos casos es significativamente diferente respecto a Bakero, por lo que también existe un comportamiento diferencial entre la variedad sensible y la tolerante.

Todos estos resultados demuestran que se produce una distorsión en los niveles citoplasmáticos de calcio cuando las raíces son expuestas al aluminio. Esta distorsión, independientemente de que se bloquee o no el transporte de calcio, puede ser responsable de numerosos trastornos metabólicos para la planta, dada la importancia metabólica del calcio. El calcio actúa como mensajero secundario en la transducción de diferentes señales desde el medio exterior que rodea a la planta hasta elementos del metabolismo celular. El transporte de calcio hacia el exterior del citoplasma a través de la membrana plasmática puede realizarse mediante una ATP-asa (Evans *et al.* 1990), aunque también se encuentran canales en la bicapa lipídica que dan lugar a un transporte pasivo hacia el interior de la misma. La distorsión de los niveles de calcio puede explicar muchos síntomas observados por toxicidad del aluminio, ya que el calcio está implicado en muchos procesos al actuar como mensajero secundario juntamente con la calmodulina activando y desactivando ciertas enzimas (Trewavas y

Gilroy, 1991). La actividad del calcio es muy elevada en el simplasma a pesar de su baja concentración. El calcio, además, aparentemente interactúa con factores que influyen en la formación y organización del citoesqueleto (Jones *et al.* 1998), en la división celular (en la formación de los microtúbulos del huso mitótico), y en la elongación (Rengel *et al.* 1992, Delhaize *et al.* 1995). En cuanto a la calmodulina, pueden producirse alteraciones importantes debido a la inhibición de la actividad de ésta, que necesita unirse al calcio para activar otras enzimas. La calmodulina, entre otros procesos, controla la despolimerización de los microtúbulos y la imposibilidad de muchas células afectadas de formar el huso profásico y metafásico puede deberse también al mal funcionamiento de la calmodulina (Fisher *et al.* 1993).

A pesar de que la mayoría de estudios han postulado una primera actuación externa (apoplástica) del aluminio, numerosos autores han propuesto que el aluminio es capaz de atravesar la membrana plasmática en un periodo muy corto de tiempo. Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio (Vázquez *et al.* 1999) confirman que el aluminio puede observarse ya en el interior de la célula tras sólo 4 horas después de haber iniciado el tratamiento, hecho, que ya había sido propuesto por otros autores como Lazof *et al.*, (1994, 1996b).

Así, a pesar de que a partir de nuestros datos no podemos indicar si hay un bloqueo o no de la absorción de calcio, sin embargo, teniendo en cuenta el comportamiento de ambas variedades a lo largo del estudio frente al aluminio, sería posible que las distorsiones producidas en los niveles de calcio no fueran debidas a una inhibición en la absorción del catión y sí a una mayor y/o más eficaz utilización del calcio por parte de la variedad Sikuaní o incluso a una ligera substitución del calcio (ya se explicó la elevada afinidad del aluminio por la calmodulina) por el aluminio en ciertos procesos metabólicos que impidan el correcto desarrollo de la variedad Bakero.

Conjuntamente con los efectos sobre el calcio, el aluminio puede producir efectos sobre otros nutrientes a nivel de la vacuola, tanto de una forma primaria como secundaria, lo cual se ha puesto de manifiesto en los análisis de K y P realizados en este trabajo.

El contenido de fósforo suele ser uno de los factores limitantes para el crecimiento de la planta e incluso las plantas pueden sufrir deficiencia de fósforo incluso cuando la concentración de éste en el suelo es adecuada. Algunas de las estrategias utilizadas por las plantas para aumentar la disponibilidad de fósforo son la acidificación de la rizosfera, la exudación de fosfatasas, la formación de raíces laterales y la exudación

de ácidos orgánicos (Marschner, 1995). El contenido de fósforo en el interior de la vacuola parece disminuir en los tratamientos con aluminio en ambas variedades respecto al control (gráfico 6). Sin embargo, el comportamiento es muy similar en ambas variedades, por lo que no parece que ésta sea una característica determinante en cuanto a una respuesta frente al aluminio, ya que tanto en la variedad más resistente –Sikuani-, como en la variedad más sensible –Bakero-, se produce una disminución significativa tanto a las 4 como a las 24 horas de exposición al metal. Si tenemos en cuenta los efectos más directos del aluminio, podemos observar la disminución producida ya a las 4 horas de tratamiento, la cual podría mostrar una respuesta más directa de las variaciones producidas por el metal, ya que la disminución que se observa en ambas variedades tras 24 horas de tratamiento podría no ser tan específica del aluminio. Así, vemos que también en Sikuani la disminución es más acusada tras 4 horas de tratamiento con aluminio que en Bakero.

Una deficiencia de P en la solución nutritiva podría estimular, entre otras cosas, la exudación de ácidos orgánicos al apoplasto, aunque esto sólo ocurre en casos en los que las reservas de fósforo se encuentran totalmente agotadas (Gaume *et al.*, 2001). Esta no parece ser nuestra situación, puesto que de antemano se tuvo en cuenta que los fosfatos presentan una gran tendencia a formar complejos con el aluminio a la hora de planificar las concentraciones en la solución nutritiva para evitar la aparición de deficiencias de fosfatos. En nuestro caso, y a partir de los cálculos realizados mediante el programa GEOCHEM (ver apéndice), es posible observar que en la solución suplementada con aluminio, hasta un 29.52 % de los fosfatos formaron complejos con el aluminio y, muy minoritariamente, con calcio (0.58%) y con Fe^{2+} (0.29%). A pesar de lo antedicho, los niveles de fosfatos en solución fueron suficientes para evitar una deficiencia de P, de forma que se evitó confundir los efectos producidos por la deficiencia de fósforo y la toxicidad por aluminio. A pesar de ello, se produce una disminución de las concentraciones de fósforo en el interior de la vacuola, lo cual probablemente puede atribuirse a los efectos del aluminio sobre el metabolismo o la estructura celular.

De la misma manera que el fósforo, el comportamiento observado en cuanto al potasio intracelular presenta una pauta considerablemente parecida y su contenido disminuye en los tratamientos con aluminio en ambas variedades. Esta disminución coincide con los resultados obtenidos por Lidon *et al.* (1999), quienes observaron una considerable disminución en la concentración de potasio en plantas de *Zea mays* sometidas a tratamientos con aluminio en concentraciones superiores a 0.33 mM.

Además, la acumulación en vacuola de este elemento se requiere tanto para estabilizar el pH citoplasmático como para disminuir el potencial osmótico en las vacuolas, necesario para que se produzca la extensión celular (Marschner, 1986), de manera que podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales el aluminio inhibe o disminuye el crecimiento radicular de las plantas.

Teniendo en cuenta la diferente sensibilidad de las distintas variedades y al hecho que en ambas variedades se observa un comportamiento similar en la evolución del contenido en K frente a la exposición al aluminio, esta disminución en la concentración del K vacuolar en plantas tratadas con el metal no parece implicar un mecanismo de respuesta frente a los efectos tóxicos del metal, sino más bien una de las interferencias que el metal podría causar en la homeóstasis celular. Sin embargo, la disminución producida en las concentraciones de potasio a las 4 horas de aplicado el tratamiento con aluminio en las plantas de Bakero es bastante más acusada respecto a su control que las producidas en Sikuni, tal como se observa en el gráfico 6. Además, teniendo en cuenta la estrecha relación que se indica en numerosos estudios entre la exudación de ácidos orgánicos, como método de tolerancia al aluminio y el eflujo de potasio como coentraión (Kollmeier *et al.* 2001) y la mayor tolerancia de Sikuni, basada en gran parte en esta exudación de ácidos orgánicos frente a los efectos del metal (Gaume *et al.* 2001), es muy probable que nos encontremos frente a un comportamiento del potasio determinado por este hecho.

Esta disminución de la concentración vacuolar de potasio tras 4 horas de tratamiento con cloruro de aluminio podría ser debida a un eflujo de potasio al exterior celular. La liberación de ácidos orgánicos hacia el exterior resultaría en una despolarización de la membrana plasmática, de manera que este equilibrio debería mantenerse mediante la exudación de aniones o la absorción de cationes (Jones, 1998). Estos resultados están de acuerdo con la insensibilidad a los cationes de aluminio mostrada por el canal de eflujo de potasio en la membrana plasmática de plantas de maíz en ciertos estudios (Kollmeier *et al.* 2001). Parece, entonces, que el canal de salida de potasio no es inhibido, permitiendo así la estabilización de la membrana plasmática. Sin embargo, diversos estudios muestran cómo la adición de aluminio a solución de cultivo produce, además de una estimulación de los canales de salida, una inhibición de los canales de entrada (Miyasaka *et al.*, 1989).

En estudios llevados a cabo por Kollmeier (2001) en relación a la exudación de ácidos orgánicos en plantas de maíz, se observó la inhibición producida por elevadas

concentraciones de aluminio en el canal de entrada de potasio en la membrana plasmática, inhibición que se producía en menor grado en medios ácidos pero sin tratamientos con el metal. Este bloqueo en la entrada de potasio ya había sido observado en otras investigaciones llevadas a cabo en plantas de *Triticum aestivum* por autores como Gassman *et al.* en 1994. Por lo tanto, también habría que tener en cuenta esta inhibición a la hora de valorar la menor concentración de potasio en las plantas tratadas.

Las interferencias relacionadas con este ión nos llevarían a variaciones importantes en las concentraciones vacuolares del mismo para, así, mantener constantes las concentraciones citoplasmáticas. Se han descrito dos mecanismos de transporte de potasio hacia el tonoplasto: uno vía PPasa y otro vía un sistema antiport $H^+:K^+$ (1:1) (Walker *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, si observamos los resultados obtenidos en el análisis de nitrato, (gráfico 7) vemos, en ambas variedades se produce un aumento progresivo de éste a lo largo del tiempo de exposición al aluminio respecto a sus controles. Este aumento en la concentración de nitrato podría estar ocasionado por un flujo de compensación, puesto que la acumulación de nitrato en la vacuola es de considerable importancia para mantener el equilibrio catión-anión (Marschner, 1995). Basándonos además en otros estudios, no parece que se produzca un aumento en la absorción de nitratos en la planta al ser tratadas con aluminio, sino más bien lo contrario. En estudios con *Glycine max*, Lazof y colaboradores (1994), demostraron que la absorción de nitratos en dichas plantas sometidas a tratamientos con aluminio era inhibida. Por lo tanto, no parecen existir indicaciones de que este aumento de la concentración de nitratos en vacuola se deba a un aumento en la absorción por parte de la planta y sí parece ser indicativo de un movimiento electrosmótico compensatorio.

Parece, pues, que este eflujo de potasio está relacionado con la exudación de ácidos orgánicos. Parece, además, que existen importantes evidencias de la correlación positiva entre la exudación de ácidos orgánicos inducida por el aluminio y la resistencia a éste y, dependiendo de la especie de la planta, se han de identificado distintos tipos de ácidos orgánicos inducidos por el aluminio en los exudados de las raíces (Delhaize *et al.*, 1993, Basu *et al.*, 1994, Jones *et al.*, 1998b).

Como se ha indicado anteriormente, la exudación de componentes orgánicos por parte de las raíces juega un papel importante en la detoxificación del aluminio de la célula, tanto vía exclusión como mediante la detoxificación de éste en el simplasma,

donde los ácidos orgánicos tales como el cítrico y el málico pueden quelar también al aluminio evitando los efectos tóxicos de éste (Sudayha *et al.* 1986), capacidad corroborada por el hecho de que al pH citoplasmático los ácidos se encuentran desprotonados.

Aunque existen muchos tipos de ácidos orgánicos en el interior de las células de la raíz, sólo uno o dos ácidos específicos son secretados en respuesta al aluminio (Kidd *et al.*, 2001). Para que se produzca esta quelación en la rizosfera, los ácidos orgánicos deben ser transportados al exterior de la célula a través de la membrana plasmática, lo cual sugiere un transporte especial en respuesta al aluminio. Para la exudación de estos ácidos orgánicos a la rizosfera se ha descrito la activación por parte del aluminio de un canal iónico (Piñeros *et al.*, 2001). Este canal, posee ciertas similitudes con el ya descrito por Ryan *et al.* en 1997 y, aunque mediante la técnica empleada se sugirió que este canal catalizaba el eflujo de iones Cl^- , no ha sido hasta la realización de otros estudios que han podido elucidarse los mecanismos del eflujo y la selectividad de los canales iónicos. Dichos canales son permeables a una gran variedad de aniones inorgánicos y orgánicos (Hedrich *et al.* 1990), de manera que se proponen como canales donde se produciría el eflujo de estos ácidos orgánicos.

Viendo el comportamiento de todos los iones estudiados, es posible observar que las variaciones no son muy marcadas entre las distintas variedades de maíz. Sin embargo, Sikuni presenta una mayor tolerancia a los efectos producidos por el aluminio, tolerancia que puede ser debida a una multiplicidad de factores, entre los que se puede encontrar, en comparación con la variedad Bakero, una mayor capacidad de exudación de ácidos orgánicos al apoplasto como medio de detoxificación externa del metal. En este sentido, Gaume *et al.* (2001) hallaron que tanto variedades de maíz sensibles (Corso) como tolerantes (Sikuni) al aluminio eran capaces de exudar ácido cítrico, málico, y succínico, aunque la variedad sensible produjo una exudación mucho menor que la tolerante. Estos resultados indican que la capacidad de detoxificación externa del aluminio no se ciñe solamente a variedades tolerantes.

En nuestro experimento observamos un comportamiento diferencial entre ambas variedades respecto al contenido vacuolar en malato: mientras que en Bakero se produjo una elevada disminución del mismo respecto a su control a lo largo del tratamiento con aluminio, no ocurre así en Sikuni (gráfico 7) donde, incluso tras 24 horas de haber sido tratada con aluminio, la concentración de malato es incluso

superior a su control. La concentración inicial de ambas variedades es superior en Sikuni que en Bakero, lo cual coincide con el trabajo de Gaume citado anteriormente. Siguiendo con las investigaciones de Gaume y colaboradores (2001) parece que en ambas variedades la actividad de la PEPC aumentaba a medida que prolongaban el tratamiento con aluminio, de forma que se podría sugerir una síntesis de ácidos orgánicos al someter las plantas al metal de una forma análoga al funcionamiento del sistema de "pH stat" (Marschner, 1995), lo cual estaría en concordancia con los datos obtenidos a partir de los análisis del contenido en nitratos de la vacuola (gráfico 7). En relación con ello, Lidon *et al.* (1997) han observado un aumento de la actividad sintética de las enzimas NADP-malico y Piruvato diquinasa en plantas de maíz sometidas a tratamientos con aluminio, lo que explicaría parcialmente la variación de las concentraciones de ácidos orgánicos en los tratamientos.

En Sikuni se observa una disminución constante en el contenido en malato de la vacuola ya en el tratamiento control. Este hecho podría indicar un mecanismo o un comportamiento innato que de antemano ayudaría a la planta a combatir los efectos del metal o de la acidez. Esto no ocurre así en el control de Bakero (gráfico 7), donde la concentración de malato aumenta a lo largo del tratamiento. Teniendo en cuenta los distintos comportamientos en este aspecto y el diferente grado de tolerancia de las variedades a los efectos del aluminio, se podría considerar el hecho de que a pesar del mayor eflujo de malato de la vacuola al citosol por parte de Bakero podría ser que la exudación se produjese para paliar los efectos de la entrada del metal al citosol, ya que como se muestra en numerosos estudios (Vázquez *et al.* 1999) se ha observado aluminio en el interior celular a tiempos muy cortos de tratamiento, de manera que podría ser que en Bakero, al no poseer de un mecanismo tan eficiente a la hora de detoxificar el metal en el exterior exudándolo a través de la membrana plasmática, lo detoxificara en el segundo paso (en el citoplasma) ya que como hemos dicho la unión del aluminio a ácidos orgánicos previene la formación de complejos con partes sensibles de la célula.

Si suponemos que en Sikuni se produce una formación más eficiente de ácidos orgánicos (ya que a pesar de que Sikuni exuda ácidos orgánicos a la rizosfera la concentración de éstos no disminuye como sucede en el control, sino que se mantiene a lo largo del tratamiento con el catión) podríamos explicar por qué Sikuni mantiene la concentración de malato e incluso supera la concentración control a las 24 horas.

Esta diferencia de comportamiento entre ambas variedades podría corresponderse

a distintos patrones de comportamiento, en relación a la exudación de ácidos orgánicos como método de tolerancia, previamente descritos por otros autores (Ma *et al.*, 2000, 2001). El Patrón I corresponde a plantas donde la capacidad de síntesis de ácidos orgánicos es relativamente poco afectada por los tratamientos con aluminio. Dentro de este patrón podríamos encasillar a la variedad Bakero, la cual presenta una gran producción de malato en los tratamientos control, pero su efectividad en síntesis no parece ser muy afectada, al menos eficientemente, a la hora de exponerse a tratamientos con el metal, ya que la concentración de malato disminuye fuertemente al ser tratada con el catión aluminio. El segundo patrón se corresponde con aquellos casos en los que se observa un incremento en la actividad enzimática (Patrón II) relacionado con la biosíntesis de ácidos orgánicos. Ma *et al.* (2001), describen cómo la actividad del enzima citrato sintasa aumenta un 30% en plantas de centeno expuestas a aluminio. Por anteriores estudios (Gaume, *et al.* 2001), también sabemos que ciertos enzimas relacionados con la biosíntesis de ácidos orgánicos aumentan su actividad en la variedad Sikuni sometida a tratamientos con aluminio, de manera que esta variedad, además de poseer un mecanismo de exudación constante en plantas bajo condiciones ácidas del control, poseería un mecanismo de síntesis y exudación al ser sometida a los efectos del aluminio, que si no marca la diferencia con Bakero en cuanto a su existencia probablemente lo haga en cuanto a su efectividad.

Observando los resultados obtenidos, podríamos afirmar que lo que sugieren los datos en este caso es que la diferencia en la tolerancia de ambas plantas en cuanto a la exudación de ácidos orgánicos, además de en la diferente respuesta de éstas en cuanto a la formación *de novo* de ácidos orgánicos, podría estar en la membrana plasmática, no en el tonoplasto, ya que, aunque en ambas variedades se produzca esta exudación de malato desde la vacuola, este hecho no parece que en Bakero suponga un método eficiente en cuanto a la exclusión apoplástica del metal y sin embargo, sí que parece que sea un método eficiente en Sikuni, la cual, además de exudar malato, parece que mantiene una síntesis en respuesta a los efectos del aluminio contrariamente a Bakero, que no parece responder frente a éstos.

Ma *et al.* (2001), identificaron un canal aniónico activado por el aluminio permeable a malato y citrato que se encontraba más frecuentemente en células de plantas de maíz tolerantes que en células de plantas sensibles., lo cual podría explicar esta diferencia en el comportamiento de Bakero y Sikuni. Además, la menor concentración de potasio en Sikuni a las 4 horas, podría explicarse como consecuencia de un transporte al apoplasto a través de una estabilización del potencial. Probablemente

Sikuani posea un mecanismo de activación y un número de canales aniónicos en la membrana plasmática muy superior a Bakero de manera que la exudación de malato sería mucho más efectiva en la primera variedad.

Integrando este hecho con los datos obtenidos respecto al calcio y los efectos observados sobre la permeabilidad de la membrana, abre la posibilidad de una explicación al comportamiento de la variedad Bakero. Esta variedad, al no presentar un método efectivo de exclusión externa, puede hallarse sometida a una penetración mayor del metal al citoplasma, lo cual explicaría, al menos en parte, la ligera mayor concentración de calcio libre en plantas de Bakero sometidas a tratamientos con aluminio, ya que el este metal podría estar substituyendo al calcio en el interior de la célula. Esto concordaría con la observación de que en la variedad Sikuani se observa un incremento de calcio libre significativamente inferior en plantas tratadas con el metal. Además, remitiéndonos a los datos obtenidos en el trabajo de primer año de investigación (Garzón, 1999), se observa en los datos de Tinción vital cómo la permeabilidad de la membrana plasmática en la variedad Bakero se encuentra mucho más afectada que la permeabilidad de la variedad Sikuani, lo cual también se corresponde con los perfiles de tinción vital, tanto en *Phaseolus vulgaris* (gráfico 3) como en *Zea mays* (gráfico 4).

Finalmente, los datos en este estudio nos ayudan a responder a ciertos temas relacionados con los efectos del metal sobre aspectos como la distorsión en las concentraciones de distintos elementos en los diferentes compartimentos celulares debidas a la toxicidad por aluminio, como son las alteraciones en el crecimiento, efectos sobre la permeabilidad de la membrana y homeostasis del calcio y alteraciones nutricionales y de contenido vacuolar. De esta forma, este estudio nos da una idea general de ciertas variaciones metabólicas y fisiológicas producidas en las células radiculares como sitio primario de la acción del metal, obteniendo así, una idea general y coherente de lo que se propone como funcionamientos de ciertos mecanismos de tolerancia en estas variedades y una explicación a algunos de los efectos producidos por el aluminio.

6 CONCLUSIONES

1. Los datos de elongación radicular establecen una definición clara en cuanto a la tolerancia de las diferentes variedades al metal. Siendo las diferencias más notables en dicotiledóneas que en monocotiledóneas.
2. El calculo de la inhibición de la tasa del crecimiento radicular, junto con el diferente comportamiento mostrado en las regresiones obtenidas a partir de la tinción vital, muestra una clara relación en cuanto a la tolerancia diferencial de las distintas variedades. Se puede, por tanto, definir esta nueva técnica de análisis de imagen como método útil para establecer los grados de tolerancia al metal en función a los daños producidos por el metal en la permeabilidad de la membrana.
3. El aluminio provoca distorsiones en los niveles de calcio intracitoplasmático de forma diferencial entre variedades sensibles y tolerantes, por lo que probablemente se vea afectada la transmisión de señales intracitoplasmáticas.
4. La variación en el contenido en fósforo y potasio en la vacuola sugiere un mecanismo diferencial de respuesta frente al aluminio que puede ser relacionado con las diferencias en la tolerancia frente a este metal.
5. La estrecha relación entre el contenido de potasio y la exudación de ácidos orgánicos sugiere una regulación de los mecanismos de detoxificación por parte de la planta.
6. Las variaciones en los niveles de nitratos sugieren que este ión actúa en los mecanismos de compensación del equilibrio del pH y cargas en el el citoplasma relacionado con los movimientos de cationes y aniones mencionados en el punto anterior.
7. Las variaciones en el contenido vacuolar en malato señalan este anión como ácido quelante del aluminio en estas variedades.
8. Se observan diferentes mecanismos en cuanto a la formación y exudación de ácidos orgánicos en función a la sensibilidad de la planta, existiendo por parte de la variedad más tolerante, una concentración inicial de malato mayor, una

exudación constante en los controles y una formación más eficiente al exponerse al aluminio, lo cual concuerda con la tolerancia mencionada.

9. El comportamiento estudiado de ácidos orgánicos sugiere que el punto diferencial en la exudación de malato entre ambas variedades, además, se encontraría en la membrana plasmática y no en el tonoplasto.

7 BIBLIOGRAFÍA.

- Aimi, R., Murakami, T. Cell- physiological studies on the growth of crop plants. Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. D. 11, 331-393 (1964).
- Aniol, A., Gustafson, J. P.. Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticale. Can. J. Genet. Cytol. 26, 701-705 (1984).
- Archambault, D. J., Zhang, G., Taylor, G. J. A comparison of the kinetics of aluminium uptake and distribution in roots of wheat (*Triticum aestivum*) using different aluminium sources: a revision of the operational definition of simplastical aluminium. Physiol. Plant, 98, 578-586 (1996).
- Baligar, V. C.; Wright, R. J.; Ritchey, K.D.; Fageria, N. K. Bioassay technique to assess acid soil contains for growth of wheat (*Triticum aestivum*) roots. Plant Nutrition Physiology and Applications M.C. Van Beusichen, ed.), pp419-424 Kluwer Academic Publishers. ISBN 0-7923-0740-2 (1990).
- Barceló, J., Poschenrieder, Ch. Fast root growth responses, root exudates and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. Environ. Exp. Bot. 48, 75-92 (2002).
- Barceló, J., Nicolas, G., Sabater, B., Sánchez, R. Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, S.A., Madrid. (2003).
- Basu U., Godbold, D., Taylor, G. J. Aluminium resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. J. Plant Physiol. 144, 747-753 (1994).
- Baudart, G. A.: Aluminium review 438:121-123.
- Bennet, R. J.; Breen, C. M; Fey, M. V. The primary site of Al injury of *Zea mays* L. Afric. J. Plant. Soil. 2(1): 8-17 (1985).
- Blamey, F. P.C., Edwards, D. G. Asher, C. J. Effects of aluminium, OH: AL and P: Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. Soil Sci. 136, 197-207 (1983).
- Blamey, F. P. C., Breem, M. Role of root cation exchange capacity in differential aluminium tolerance of Lotus species. J. Plant nutrition, 13, 729-744 (1990).
- Blamey, F. P., Asher, C. J., Kerven, J. L., Edwards, D. G., Factors affecting aluminium sorption by calcium pectate. Plant Soil 149:87-94 (1993).

- Broek, D.; Bastle, R.; Candford, K.; Narse, P. Involvement of p34cdc2 in stabilising the dependence of S phase on mitosis. *Nature* 349: 388-393 (1991).
- Carver, B. F., Ownby, J. B. Acid soil tolerance in wheat. *Adv. Agron.* 54, 117-173 (1995).
- Chang, Y-C, Ma, J. F., Matsumoto, H. Mechanism of Al induced iron chlorosis in wheat (*Triticum aestivum*). Al inhibited biosynthesis and secretion of phytosiderophore. *Physiol. Plant*, 102, 9-15 (1998).
- Clarkson, D. T. The effect of aluminium and some other trivalent metal cation on cell division in the roots apices of *Allium cepa*. *Ann. of Botan. N. S.* 29: 309-315 (1965).
- Crapper McLachlan, D. R. 1986. Aluminium in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 7: 525-532.
- Cuenca, G., Herrera, R., Merida, T. Distribution of aluminium in accumulator plants by X-ray microanalysis in *Richeria Grandis Vahl* leaves from cloud forest in Venezuela. *Plant Cell Environ.* 14, 437-441 (1991).
- Cumming, J. R.; Ecbert, R. T. Effect of Al on P uptake and translocation by red spruce seedling. *Can. J. Bot.* 16: 864-867 (1986).
- Darnowsky, D. W., Valenta, R., Parthasarathy, M. V. Identification and distribution of proflinilin in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *PLanta* 198, 158-161 (1996).
- Degenhardt, J., Larsen, P. B., Howell, S. H., Kochian, L. V. Aluminium resistance in the arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminium induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117, 19-27 (1998).
- Delhaize, E., Craig, S., Veaton, C. D., Bennet, R. J., Jagdish, V. C., Randall, P. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 103, 685-693 (1993).
- Delhaize, E., Ryan, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.* 107, 315-321 (1995).
- Driscoll, C. T.; Schecher, W. D. Aluminium in the environment. p59-122. In metal ions in biological systems. Vol 24. Aluminium and its role in biology. Siegel, H; Siegel, A. (eds). Marcel Dekker, New York (1988).
- Eklund, L., Eliasson, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. *J. Exp. Botany*, 41, 863- 867 (1990).

- Evans, D. E.; Briars, S. A.; and Willians, L. E. Active calcium transport by plant cell membrane. *Journal of Experimental Botany* 42: 285-303 (1991).
- Façanha, A. R., Okorokova- Façanha, A., L. Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminium-fluoride complexes. *Plant Physiol.* 129, 1763-1772 (2002).
- Frantzios, G., Galatis, B., Apostolakos, P. Aluminium effects on microtubule organization in dividing root tips cells of *Triticum turgidum* L. Mitotic cells. *New Phytol.* 145, 211-224 (2000).
- Fisher, D. D., Cyr, R. J. Calcium levels affects the ability to immunolocalize calmoduline to cortical microtubules. *Plant Physiol.* 103, 543-551 (1993).
- Foy, C. D.; Chaney, R. L.; White, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Rev. Plant Physiol.* 29: 511-566 (1978).
- Garzón, T. Importancia relativa de la compartimentación celular en el estudio de los mecanismos de resistencia al estrés iónico en plantas modelo. Trabajo de Investigación de tercer ciclo. Universidad Autónoma de Barcelona (2000).
- Gassman, W., Schoroeder, J. I. Inward rectifying K⁺ channels in root hairs of wheat. *Plant Physiol.* 105, 1399-1408 (1994).
- Gaume, A., Mächler, F., Frossard, E. Aluminium resistance in two cultivars of *Zea mays* L: Root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant and Soil*, 234: 73-81 (2001).
- Gepts, Genetics Resources of Phaseolus beans. Kluwer Academic Publishers. Paul Gepts (ed.). Department of Agronomy and Range Science, University of California, California, USA (1988).
- Grabsky, S., Schindler, M. Aluminium induces rigor within the actine network of soybeans cells. *Plant Physiol*, 108, 897-901 (1995).
- Gunsé, B., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. The role of ethylene metabolism in the short term responses to aluminium by root of two maize cultivars different in Al-resistance. *Environ. Exp. Bot* 43, 73-81 (2000).
- Hargrove, W. L. The solubility of Al-organic matter and its implication in plant uptake of Al. *Soil Sci.* 142(3): 179-181 (1986).
- Haug, A. Molecular aspects of aluminium toxicity in plants. *Rev. Plant Sci.* 1(4), 345-373 (1984).

- Henderson, M., Ownby, J. D. The role of root cap mucilage secretion in aluminium tolerance in wheat. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 10, 134-141 (1991).
- Hedrich, R., Bush, H., Raschke, K. Calcium and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* 9, 3889-3892 (1990).
- Horst, W. J.; Wagner, A.; Maschner, H. Mucilage protects root meristem from Aluminium injury. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 435-444 (1982).
- Horst, W. J. C. J., Asher, J. Cakmam, Suzulkiewicz, P., Wissemeier, A. H. Short-term responses of soybeans roots to aluminium. *J. of plant Physiol.* 140, 174-178 (1992).
- Horst, W. J. C. J., The role of apoplast on the aluminium toxicity and resistance of higher plants: A review. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 158, 419-428 (1995).
- Horst, W. J. C. J. Schoml, N., Kollmeier, M. Baluska, F., Sivaguru, M. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum?. *Plant Soil*, 215, 163-174 (1999).
- Howeler, R.H.; Cadavid, L.F. Screening of rice cultivars for tolerance of Al toxicity in nutrient solution as compared with a field screening method *Agron. J.* 68: 551-555 (1976).
- Huang, J. W., Shaff, J. E., Gruner, D. L., Kochian, L. V. Aluminium effects on calcium fluxes at the root apex of aluminium tolerant and aluminium sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.*, 98, 230-237 (1992).
- Huang, J. W., Grunes, D. L., Kochian, L. V. Aluminium effects on calcium translocation in aluminium-tolerance and aluminium sensitive wheat (*Triticum aestivum L*) cultivars. *Plant Physiol.* 102, 85-93 (1993).
- Jacob, S. R., Nothcote, D. H. In vivo glucan synthesis by membranes of celery petioles: The role of the membrane in determining the type of linkage formed. *J. Cell Sci. Suppl.* 2, 1-11 (1985).
- Jones, D. L., Kochian, L. V. Aluminium inhibition of the inositol 1, 4, 5 triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminium toxicity?. *Plant Cell*, 7, 1913- 1922. (1995).
- Jones, D. L., Kochian, L. V. Aluminium interaction with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in aluminium toxicity. *FEBS Lett.* 400, 51-57 (1997).

- Jones, D. L., Kochian, R. V., Gilroy, L. S. Aluminium induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cells culture. *Plant Physiol.* 116, 81-89 (1998).
- Jones, D., L. Organics acids in the rizhosphere: a critical review. *Plant Soil*, 205, 25-44 (1998b).
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. Trace elements in soil and plants . C.R.C. press, Inc. Boca Raton. Florida (1984).
- Kauss, H. Callose biosinthesys as calcium regulated process and possible relation to the induction of other metabolics changes. *Journal of Cell Sciences. Supplement 2*, 89- 103 (1985).
- Kennedy, C. W., Smith, W. C., Ba, M. T. Root cation exchange capacity of cotton cultivars in relation to aluminium toxicity. *J. Plant Nutrition*, 9(8), 1123-1133 (1986).
- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, Ch., Gunsé, B., Barceló, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced of amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L). *J. Exp. Bot.*, 52, 1339-1352 (2001).
- Kochian, L. V. Mechanism of micronutrient uptake and translocation in plants. *Micronutrients in agriculture*, ed. J., J. Mordtvert, 229-296. Soil Science Society of America. (1991a).
- Kochian, L. V, Shaff, J. E., Ryan, P., R. Microelectrode-based investigations into the relationship between Al toxicity and root cell membrane transport processes. *Curr Topics Plant Biochem. Physiol.* 10, 117-133 (1991b).
- Kochian. L. V. Cellular mechanism of aluminium toxicity and resistance in plants. *Ann. Rev. Plant Phisiol. Plant Mol. Biol.* 46, 237-260 (1995).
- Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C. S., Horst, W., Hedrich, R. Aluminium activates a citrate-permeable anion channel in the aluminium-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminium sensitive and an aluminium resistant cultivar. *Plant Physiol.*, 126, 397-410 (2001).
- Koyama, H., Toda, T., Yokota, S., Dawair, Z., Hara, T. Effects of Aluminum and pH on root Growth and Cell Viability in *Arabidopsis thaliana* Strain Landsberg in Hydroponic Culture. *Plant Cell Physiology* 36(1): 201-205 (1995).
- Küpper, H., Zhao, F. J., Mac Grath, S. P. Cellular compartmentation of Zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlapsy caerulescens* . *Plant Physiol.* 119 (1), 305-311 (1999).

- Lance, R.; Pearson, J. C. Effects of low concentration of Al on growth and water and mineral uptake by cottons roots. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 33: 95-98 (1969).
- Larkin, P. J. Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 14(4): 377-385 (1987).
- Lazoff, D. B., Goldsmith, J. G., Rufty, T. W., Linton, R. W. Rapid uptake of aluminium into cells of soybean root tips. *Plant Physiol.* 106,1107-1114 (1994).
- Lazoff, D. B., Goldsmith, J. G., Linton, R. W. The in situ analysis of intracellular aluminium in plants. *Prog. Botany* 58, 112-149 (1996).
- Lazof, D. B.; Goldsmith, J. G.; Rufty, T. W. Linton, R.W. The early entry of Al into cell of intact soybean roots. A comparison of three developmental roots regions using secondary ion mass spectrometry imaging. *Plant Physiol.* 112: 1289-1300 (1996b).
- Lee, J; Pritchard, M. V. Aluminium toxicity expression on nutrient uptake, growth and root morphology of *Trifolium repens* L. *Plant Soil* 82(1): 101-116 (1984).
- Lee, E., Yuspa, S. H. Aluminium fluoride stimulates inositol phosphate metabolism and inhibits expression of differentiated markers in mouse keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* 148, 106-115 (1991).
- Lidon, F, Ramalho, J. C., Barreiro, M., G. Aluminium modulation of the photosynthetic carbon reduction cycle in *Zea mays*. *Photosynthetica* 34 (3): 393-400 (1997).
- Lidon, F., Barreiro, M., Ramalho, J., Laureano, J. Effects of aluminium toxicity on nutrient accumulation in maize shoots: Implications on photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 22(2), 397-416 (1999).
- Liu, K., Luan, S. Internal aluminium block of plant inward potassium channels. *Plant Cell* 13, 1453-1466 (2001).
- Llugany, M., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. Monitoring of aluminium induced inhibition in root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. *Plant Physiol.* 93, 265-271 (1995).
- Llugany, M., Massot, N., Wissemeier, A. H., Poschenrieder, Ch., Horst, W., J., Barceló, J. Aluminium tolerance of maize cultivars as assessed by callose production and root elongation. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 157, 447-451 (1994).
- Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H., Hiradate, S. Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature*, 390, 596-570 (1997a).

-
- Ma, J. F., Zheng, S. J., Matsumoto, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.* 38, 1019-1025 (1997b).
- Ma, J. F.; Aluminium binding in the epidermal cell wall inhibits cell elongation of Okra hypocotyl. *Plant Cell Physiol.* 40(5): 549-556 (1999).
- Ma, J. F.; Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41 (4): 383-390 (2000).
- Ma, J. F. Aluminium tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol.* 122, 687-694 (2001).
- Ma, J. F., Ryan, P., R., Delhaize, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, Vol. 6, N°. 6 (2001).
- Ma, Q, Rengel, Z, Kuo, J. Aluminum toxicity in Rye (*Secale cereale*): Root growth and dynamics of cytoplasmic calcium in intact root tips. *Annals of Botany Company*, (October, 2002).
- MacDiarmid, C. W., Gardner, R. C. Al toxicity in yeast. A role for magnesium?. *Plant Physiol.* 112, 1101-1109 (1996).
- Mac Donalds-Stephens, J.L., Taylor, G.J. Kinetics of aluminium uptake by cell suspensions of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Plant Physiol.* 145, 327-334 (1995).
- Malkanathi, D. R. R., Moritsugu, M., Yokoyama, K. Effects of low pH and Al on absorption and translocation of some essential nutrients in excised barley roots. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41(2), 253-262 (1995).
- Marmé, D. The role of calcium and calmodulin in signal transduction . In second messengers in plant growth and development. Boss, W.G, Morré, D.J. (eds), pp: 57-80. Allan R. Liss, New York, NY (1989).
- Martin, R. B. Bioinorganic chemistry of Al. p.p. 1-57. In: Metal ions in biological systems. Vol. 24. Aluminium and its role in biology. H. Siegel y Siegel eds. Marcel Dekker Inc. New York. (1988).
- Martin, R. B., Aluminium speciation in biology. In Aluminium in biology an medicine. Cyba Foundation Symposia 169, eds. D. J. Chadwick and J. Whelan, pp: 5-25. Chichester, UK: John Wiley and Sons (1992).
- Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Inc. London. (1995).

- Massot, N., Poscherieder, Ch., Guevara, P., Barceló, J. Aluminio: I. Presencia y dinámica en el medio ambiente. *Cir. Far.* 309, 49-64 (1991).
- Massot, N., Llugany, M., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. Callosa production as indicator of aluminium toxicity in bean cultivars. *J. Plant Nutr.* 22(1): 1,10 (1999).
- Matsumoto, Hirasawa, E. Localization of absorbed Al. in pea root and its binding to nuclei acids. *Plant and Cell Physiol.* 17: 117-137 (1976).
- Matsumoto, H; Morimura, A; Takahashi, T. Binding of Al to DNA of DNP in pea root nuclei. *Plant Cell Physiol.* 18, 987-993. (1977).
- Matsumoto, H., Senoo, Y., Kasai, M., Maeshima, M. Response of the plant root to aluminium stress: Analisis of the inhibition of the root elongation and changes in membrane function. *J. Plant Res.* 109, 99-105 (1999).
- Mistrík, I, Tamás, L., Huttová, J. Quantitative changes in maize membrane proteins induced by aluminium. *Biol. Plantar.* 43 (1), 85-91, (2000).
- Myasaka, S. C.; Kochian, L. V.; Shaff, J. E.; Foy, Ch. D. Mechanism of aluminium tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 91: 1188-1196 (1986).
- Miyasaka, S. C., Buta, J., C., Howel, R., K., Foy, C. D. Mechanism of aluminium tolerance in snapbean. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96, 737-743 (1991).
- Mohen, A. V. El desafío de la lluvia ácida. *Investigación y Ciencia.* Octubre, 1988.
- Morimura, S., Matsumoto, H. Effect on aluminium on some properties and template activity of purified pea DNA. *Plant Cell Physiol.* 19, 429-436 (1978).
- Múltiples autores , C. E. Informe final. Proyecto: T53-CT92-0071. Adaptation of maize to acid soils of the tropics (1996).
- Naora, H., Mirsky, A. E., Allfrey, V. G. Magnesium and calcium in isolated cell nuclei. *J. Gen. Physiol.* 44, 713-741 (1961).
- Nichols B., E. and L. A. Oliveira. Effects of aluminium on the growth and distribution of calcium in roots of an aluminium sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare*). *Can. J. Bot.* 73: 1849-1858 (1995).

- Nichol, B. E., Oliveira, A. D. M., Glass, M. Y. Siddiqi. The effects of aluminium on the influx of calcium, potassium, ammonium nitrate and phosphate in an aluminium sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 101, 1262-1266 (1993).
- Ohman, L. O, Martin, R. B. Citrate is the main small molecule binding Al^{3+} in serum. *Clin. Chem.* 40, 598-601 (1994).
- Osaki, M., Watabane, T., Tadano, T. Beneficial effect of aluminium on growth of plants adapted to low pH Soils Sci. Plant nutr. 43 (3), 551-563 (1997).
- Osaki, M., Watabane, T., Ishizawa, T., Nilmond, C., Nuyim, T., Sittibush, C., Tadano, T. Nutritional characteristics in leaves of native plants grown in acid sulphate, Peat, Sundry Podzolic and saline soils distributed in Peninsular Thailand. *Plant Soil*, 201 (2), 175-182 (1998).
- Oteiza, P. I. A mechanism for the stimulatory effect of aluminium on iron-induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 374-379 (1994).
- Otsuka, K. Studies on aluminium-induced iron chlorosis. *Jnp. J. Soil Sci. Plant Nutri.* 40, 205-212 (1969).
- Papernik, L. A., Kochian, L. V. Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiol.*, 115, 657-666 (1997).
- Parker, D. R.; Zelazny, L. W.; Kinraide, T. B. Improvement to the program *Geochem. Soil Sci. Am. J.* 51:448-491 (1987).
- Peixoto, P.H., Cambraia, J., Sant' Anna, R., Mosquim, P.R., Moreira MA Aluminum effects of fatty acid composition and lipid peroxidation of purified plasma membrane fractions of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 24(7), 1061-1070 (2001).
- Piñeros, M., Testeer, M. Characterization of a voltage dependent calcium selective channel from wheat roots. *Planta*, 195, 478-488 (1995).
- Piñeros, M., Kochian, L. V, A patch clamp study on the physiology of aluminium toxicity and aluminium tolerance in *Zea mays*: identification and characterization of Al^{3+} - induced anion channels. *Plant Physiol.* 125, 292-305 (2001).
- Poschenrieder, Ch.; Barceló, J. 1985. La muerte de los bosques. *Cir. Far.* 286: 71-80.

- Poschenrieder, Ch., Massot, N., Guevara, P., Barceló, J. Aluminio: II. Mecanismos de toxicidad en hombre, animales y plantas. *Cir Far.* 313, 27-42 (1992).
- Rengel, Z. Competitive aluminium inhibition of net magnesium uptake by intact *Lolium multiflorum* roots. II. Plant age effects. *Plant Physiol.* 93, 1261-1267 (1990).
- Rengel, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121, 491-513 (1992).
- Rengel, Z., Elliott, D. C. Mechanism of aluminium inhibition of net $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by *Amaranthus* protoplasts. *Plant Physiol.* 98, 632- 638 (1992).
- Rengel, Z. Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytol.* 134, 389-406 (1996).
- Rengel, Z., Zhang, W. H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytol.* 159, 295-314 (2003).
- Rincon, M., Gonzales, R., A. Aluminium partitioning in intact roots of aluminium-tolerance and aluminium-sensitive wheat (*Triticum aestivum*, L.) cultivars. *Plant Physiol.* 99, 1021-1028 (1992).
- Ryan, R., R., DiTomaso, J., M., Kochian, L.V. Aluminium toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J. Exp. Bot.* 44, 437-446 (1993).
- Ryan, P.R., Kinraide, T.B., Kochian, L.V. Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminium rhizotoxicity. 1: Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. *Planta* 192, 98-103 (1994).
- Ryan, R., R., Delhaize, E., Randall, P. J. Malate efflux from root apices and tolerance of aluminium are highly correlated in wheat. *Aus. J. Plant Physiol.* 22, 531-536 (1995).
- Ryan, R., R., Skerrett M., Findlay, G.P., Delhaize, E., Tyerman, S. D. Aluminium activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 6547-6552 (1997).
- Sasaki, M., Yamamoto, Y., Ma, J. F., Matsumoto, H. Early events induced by aluminium stress in elongation cells of wheat root. *Soil sci. Plant Nutr.* 43, 1009-1014 (1997).
- Stachtaman, D.P., Reid, R. J., Ayling, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiol.* 116, 447-453 (1998).

- Scheiner, K. A. Callosa deposition and aluminium resistance in wheat. M. Cs. Thesis, University of Alberta, Canada, Canada (1992).
- Schofield, R. S., Pallon, J., Fiskesjö, G., Karlson, G., Malmqvist, K. G. Aluminium and calcium distribution patterns in aluminium-intoxicated roots of *Allium cepa* do not support the calcium displacement hypothesis and indicate signal mediated inhibition of root growth. *Planta*, 205, 175-180 (1998).
- Schoroeder, J. I., Ward, J. M., Gassman, W. Perspectives on the physiology and structure of inward-rectifying K⁺ channels in higher plants: Biophysical implications for K⁺ uptake. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 441-471 (1994).
- Siegel, N.; Haug, A. Aluminium interaction with calmodulin: Evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 744: 35-45 (1983).
- Sivaguru, M., Horst, W.J. The Distal Part of the Transition Zone Is the Most Aluminum-Sensitive Apical Root Zone of Maize. *Plant Physiol.* 116: 155-163 (1998).
- Smochhls, N., Horst, W. J. Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant Cell Environ.*, 23, 735-742 (2000).
- Stone, B. A. Non cellulosic β -glucans (callose) in cell walls. Pp. 52-74. IN: W.M. Dugger and S, Bartnicki- Garcia (eds.). *Structure, Function and biosynthesis of plant cell walls. Proceeding of the Seventh Annual Syposiuym in Botany*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (1984).
- Sudayha, C., G., Haugh, A. Organic acids reduce aluminium toxicity in maizde roots membrane. *Physiol. Plant*, 68, 189-195. SYSTAT 1994 SPSS Inc. Chicago (1986).
- Taylor, J., Mc Donalds-Stephens, J., Hunter, D., Rengel, Z., Reid, R. Direct measurement of aluminium uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*. *Plant Physiol.* 123, 987-996 (2000).
- Tepper, H. B., Yang, C. S., and Schadle, M. Effect of aluminium on growth of root tips of honeylocust and loblolly pine. *Enviromental and Experimental Botany* 29: 165-173 (1989).
- Triwavas, A., Gilroy, S. Signal transduction in plant cells. *Trends in genetics* 7, 356-361 (1991).

- Van Hees, P. A. W., Lundström, U. S. Equilibrium models of aluminium and iron complexation with different organics acids in soil solution. *Geoderma*, 94, 201-221 (2000).
- Vázquez, M. D.; Poschenrieder, Ch.; Corrales, I.; Barceló, J. Chage in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.* 119, 435-444 (1999).
- Watanabe, T., Osaki, M. Influence of aluminium and phosphorous on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, 237(1), 63-70 (1997).
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshisara, T., Tadano, T. Distribution and chemical speciation of aluminium in the Al acumulador plant *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, 201 (2), 165-173 (1998).
- Wagatsuma, T. Characteristics of upward translocation of Al. in plants. *Soil Sci. of plant Nutrition* 30 (3), 345-358. (1983).
- Wagatsuma, T., Minoru, K., Hayasaka, Y. Destrucción process of plant root cells by aluminium. *Soil. Sci. Plant Nutr.* 33, 161-175 (1987).
- Wagatsuma, T., Jugo, K., Ishikawa, F., Nakashima, T. Aluminium-tolerant protoplast from roots can be collected with positively charged silica microbeads: A method bases on differences in surface negativity. *Plant Cell physiol.* 36, 1493-1502 (1995).
- Walker, D.J., Leigh, R.A., Miller, A. J. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10510-10514 (1996).
- Wolniak, S. M. The regulation of mitotic spindle function. *Biochem. and Cell Biol.* 66, 490-514 (1988).
- Yamamoto, Y., Rikiishi, S., Chang, Y. C., Ono, K., Kasai, M., Matsumoto, H. Quatitative stimulation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: Correlation between aluminium uptake and growht inhibition. *Plant Cell Physiol.* 35, 575-583 (1994).
- Yang Y-Y, Jung J-Y, Song W-Y, Shuh H-S, Lee Y. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiol.* 1214:1019-26 (2000).
- Yim, K-O, Bradford, K. J. Callose deposition is responsable for apoplastic semipermeability of the endosperm envelop of muskmelon seeds. *Plant Physiol.* 118, 83-90 (1998).

-
- Zhang, G.; Hoddinott, J.; Taylor, G. J. Characterization of 1-3- glucano (callosa) synthesis in roots of *Triticum aestivum* in response to aluminium toxicity. *J. Plant Physiol.* 144, 229-234 (1994).
- Zhang, G, Rengel, Z. Aluminium induces an increase in cytoplasmic calcium in intact wheat root apical cells. *Australian Journal of Plant Physiol.* 26, 401-409 (1999).
- Zhang, G.; Taylor, G. J. Kinetics of aluminium uptake by excised root of Al tolerant and Al sensitive cultivars of *Triticum aestivum*. *Plant. Physiol.* 91(3): 1094-1099 (1989).
- Zhao, G., Succoff, E., Stadelman, E. J. Aluminium and calcium alteration of membrane permeability of *Quercus rubra* roots cortex cells. *Plant Physiol.* 83(1), 159-162 (1987).
- Zheng, S. J., Ma, J. F., Matsumoto, H. High aluminium resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117, 747-751 (1998).