

Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes

Andrea Carreño, Alejandro Chaparro-Giraldo 

Aluminum tolerance: mechanisms and genes

Abstract

Agricultural production in the Colombian Orinoco is affected by the high aluminum content found in 4.5 million hectares. Genotypes of different species have acquired different levels of tolerance and signaling pathways through various mechanisms, making a single model impossible. Some of the molecules commonly involved in the tolerance response have already been identified. To identify candidate genes to produce aluminum-tolerant cultivars, we consulted scientific articles published between 1987 and 2013. We obtained data of aluminum-tolerant materials and molecular mechanisms for tolerance through reports of techniques using hybridization, mutation, molecular marker-assisted selection and gene transfer. We found several reports on wholly or partially characterized genes with potential use in genetic engineering and in marker assisted selection to obtain aluminum tolerant genotypes.

Keywords: Transcription factor, gene, aluminum tolerance.

Edited by Alberto Acosta

1 Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Departamento de Biología & Instituto de Genética. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Received: 19-06-2013 Accepted: 22-10-2013

Published on line: 30-10-2013

Citation: Carreño A, Chaparro-Giraldo A (2013). Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes. *Universitas Scientiarum* 18(3): 283 - 310 doi: 10.11144/Javeriana.SC18-3.taev

Funding: N/A

Electronic supplementary material: N/A

SICI: 2027-1352(201309/12)18:3<283:TAAEEVMYG>2.0.TS;2-3

Introducción

La toxicidad por aluminio es el primer factor que limita la producción de cultivos en suelos ácidos, debido a que el 50% de la tierra potencialmente arable es ácida. Más del 60% de los suelos ácidos en el mundo, están en países subdesarrollados, donde la producción de alimentos es crítica (Von Uexküll & Mutert 1995). Cerca del 80% de los suelos en Colombia, en especial los suelos de la Orinoquia, son suelos ácidos (Camacho et al. 2008).

Además de diversas estrategias de manejo de suelos ácidos, otra táctica posible, es la generación de genotipos tolerantes a la toxicidad por aluminio. Estas aproximaciones son



tanto convencionales, mediante procesos de hibridación mendeliana o mutaciones, como moleculares, con el uso de selección asistida con marcadores, y biotecnológicas, con el uso de transferencia de genes mediada por ingeniería genética. Un elemento esencial en la aplicación de aproximaciones moleculares y biotecnológicas, es la identificación de genes que confieran tolerancia al aluminio. Para ello es necesario entender en el nivel molecular, tanto los efectos de la toxicidad, como los mecanismos de tolerancia.

Se identificaron genes con potencial uso en programas de fitomejoramiento por transferencia de genes, mediada por ingeniería genética. Estos genes corresponden a mecanismos de tolerancia, tales como la detoxificación interna y la exclusión del aluminio.

La estrategia de búsqueda de artículos científicos se basó en el uso de palabras claves, relacionadas con los temas de interés (“aluminum toxicity” y “aluminum tolerance”), mediante los cuales se identificaron documentos útiles para establecer límites temporales y temáticos de la revisión. La búsqueda se hizo en las bases de datos del Sistema Nacional de Bibliotecas de la Universidad Nacional de Colombia (SINAB) a partir de 1987. La lectura de documentos, dentro del contexto biológico del fenómeno revisado, orientó búsquedas específicas, combinando palabras claves generales con términos que permiten delimitar los temas. Así, por ejemplo, para buscar efectos de la toxicidad, se combinaban las palabras “aluminum toxicity” con “oxidative stress”, o con “DNA alteration”. La búsqueda de genes que confieran tolerancia, se realizó sobre literatura más reciente, después del año 2000, teniendo en cuenta reportes con bases empíricas. Se utilizaron diferentes combinaciones, como, por ejemplo, “aluminum tolerance”, “gen” y “transcription factors”. Las estrategias de fitomejoramiento, se buscaron combinando las palabras “aluminum tolerance” con “plant breeding”, entre otras combinaciones.

Los tópicos de esta revisión, incluyen: toxicidad por aluminio en plantas, captación y transducción de señales, mecanismos de tolerancia, genes que confieren tolerancia al aluminio, y

fitomejoramiento para la tolerancia al aluminio. Se presenta un modelo que permite razonar el escenario molecular de los mecanismos de tolerancia, a partir del cual se identifican genes con uso potencial en programas de fitomejoramiento, orientados a la producción de genotipos tolerantes. Estos genes fueron identificados en relación con proteínas transportadoras, factores de transcripción y, mitigación del estrés oxidativo.

Toxicidad por aluminio en plantas: El aluminio es el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre, es insoluble y generalmente no se encuentra disponible para participar en reacciones biogeoquímicas. Pero, especialmente bajo condiciones de suelos ácidos no solo puede ser movilizado hacia ambientes acuáticos (Driscoll & Schecher 1990), sino que también se favorece su entrada a las raíces de las plantas. Alrededor del 30% de los suelos de la superficie terrestre libre de hielo en el mundo son ácidos, presentándose principalmente en el cinturón del norte y el cinturón tropical del sur. El primero bajo clima frío y húmedo templado, está dominado por suelos Espodosoles, Alfisoles, Inceptisoles e Histosoles; mientras que el segundo, bajo condiciones cálidas y húmedas contiene predominantemente Ultisoles y Oxisoles. En los suelos ácidos la toxicidad por aluminio es una de las limitaciones para la producción de los cultivos (Von Uesxkull & Mutert 1995). El aluminio en el suelo puede estar unido por ligandos, o estar presente en otras formas no fitotóxicas como los aluminosilicatos y precipitados como silicatos de aluminio, que se encuentran mezclados con metales tales como sodio, potasio, hierro, calcio o magnesio (Von Uexküll & Mutert 1995, Baligar & Fageria 1997). No obstante, en condiciones de suelos ácidos (pH 5.5-4.5, o <4.5) los iones aluminio (Al^{3+}) se solubilizan y pueden penetrar células radiculares, lo cual inhibe el crecimiento de las raíces y dificulta la absorción de agua y nutrientes esenciales como fósforo y calcio (Kochian et al. 2005). Pese a que Al^{3+} es la forma más común relacionada con fitotoxicidad; mediante mediciones de raíz en plantas, se ha determinado que la especie de aluminio más fitotóxica es $AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)^{7+}_{12}$ (Kinraide 2003).

El grado de toxicidad varía ampliamente dependiendo de la especie de la planta, las condiciones de crecimiento, las concentraciones de aluminio y el tiempo de exposición (Delhaize & Ryan 1995, Kochian et al. 2004). La zona de transición de la raíz es la más sensible a aluminio, está localizada entre la zona de división celular activa y la zona de elongación celular rápida, y es importante en la percepción de señales ambientales y en el desarrollo, debido a que las células post-mitóticas que la conforman son competentes para una rápida elongación al sufrir vacuolización y reorganización del citoesqueleto gracias a las propiedades mecánicas de sus paredes celulares (Sivaguru & Horst 1998, Verbelen et al. 2006). La respuesta de mayor susceptibilidad por fitotoxicidad aluminio ocurre a los pocos minutos de exposición y trae como consecuencia retraso en el crecimiento de la raíz y abundancia de raíces laterales cortas que se tornan gruesas y frágiles, al parecer debido a la alta afinidad del aluminio con elementos como grupos fosfatos, sulfatos y carboxilos entre otros, que constituyen componentes celulares como pared celular, membranas y ácidos nucleicos (Matsumoto et al. 1976, Chang et al. 1999, MacKinnon et al. 2004).

La dinámica de las respuestas iniciales de crecimiento de las raíces frente a la exposición a aluminio varían de acuerdo a la susceptibilidad o la resistencia de la planta; al respecto, se han propuesto tres modelos principales denominados: umbral de toxicidad, hormesis, y umbral de tolerancia. El primero puede ser observado como una función del tiempo de exposición o la concentración a aluminio, la fase de retraso en la respuesta, es decir, cuando la curva del crecimiento de la raíz se mantiene estable o paralela al eje x, antes de que inicie la disminución en el crecimiento; puede ser interpretada como el tiempo o la concentración de aluminio requerida para que se interfiera con procesos claves en crecimiento y elongación de la raíz (Barceló et al. 2002). De otro lado, en la curva tipo hormesis, el crecimiento de la raíz es estimulado luego de una fase inicial de retraso, ya sea por exposición a bajas concentraciones que se encuentran por debajo del umbral de toxicidad de un elemento no esencial o debido a un efecto transitorio después de exposiciones

cortas a concentraciones potencialmente tóxicas (Barceló et al. 2002). El mecanismo que podría explicar la respuesta hormética frente al estrés por aluminio parece estar relacionado con estimulación de reacciones de defensa que llevan a la activación general del metabolismo, mejora de la deficiencia latente de un elemento esencial o conlleva a la mitigación de la toxicidad por protones. Finalmente, el modelo del umbral de tolerancia, aplica para algunas especies en las que bajas concentraciones de aluminio o tiempos cortos de exposición pueden causar inhibición significativa de la elongación de la raíz, mientras que concentraciones altas o tiempos de exposición prolongados tiene efectos tóxicos menores o ningún efecto (Barceló et al. 2002).

El apoplasto es el primer compartimento de la raíz que tiene contacto con especies de aluminio presentes en el suelo potencialmente tóxicas, y es la zona de mayor acumulación. Gran parte de los blancos del aluminio corresponden a componentes de la pared celular, lo cual altera sus propiedades mecánicas afectando la elongación de las células (Barceló et al. 1996, Poschenrieder et al. 2008). A pesar que la membrana plasmática parece ser altamente impermeable a cationes trivalentes, bajas tasas de aluminio tóxico para la célula pueden entrar hacia el citoplasma a través de mecanismos que aún no son claramente conocidos (Poschenrieder et al. 2008). Cuando una pequeña proporción de aluminio logra cruzar la pared celular y unirse a grupos carboxilo y fosfatos de la membrana plasmática puede alterar su fluidez (Barceló et al. 1996, Kochian et al. 2005), produciendo efectos característicos del síndrome de toxicidad por aluminio, como: cambios en el potencial de membrana, cambios en la actividad de los canales iónicos, alteración de la homeostasis de Ca^{2+} (Rengel & Zhang 2003), inhibición de la adenosín trifosfato (H^+ -ATPasa) (Ahn et al. 2001) y peroxidación de lípidos (Yamamoto et al. 2001).

En síntesis la inhibición del crecimiento de la raíz podría deberse a los siguientes eventos: 1. Alteración de la capacidad del intercambio de cationes de la pared celular, 2. Cambios en el potencial de membrana; afectando directamente la toma de cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Kuhn

et al. 1995), 3. Inducción de estrés oxidativo vía peroxidación lipídica, 4. Remplazo de Mg^{2+} o Fe^{3+} en reacciones celulares, 5. Interacción con el citoesqueleto (Blancaflor et al. 1998), 6. Interferencia con vías de señalización, y 7. Unión directa con el DNA o RNA (Kochian et al. 2005).

Captación y transducción de señales: Los procesos de captación del aluminio por parte de células de la zona de transición de la raíz no son totalmente claros, con todo, se cree que las interacciones con la pared celular, la membrana plasmática o sitios del simplasto pueden jugar un papel importante en este proceso. El aluminio posiblemente activa un canal de aniones en la membrana plasmática que es permeable a aniones de ácidos orgánicos, lo cual puede ocurrir a través de tres vías: 1. Interacción directa del aluminio con canales proteicos que causa su activación; 2. Interacción directa del aluminio con la membrana o a través de receptores específicos de membrana para iniciar una cascada de segundo mensajeros que activan los canales proteicos; o 3. Activación directa de canales proteicos por aluminio una vez este ha entrado al citoplasma o activación indirecta a través de segundos mensajeros (Ma et al. 2001). Posteriormente, la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en la producción de calosa, en el metabolismo de ácidos orgánicos o que codifiquen para proteínas transportadoras de ácidos orgánicos a través de la membrana plasmática, ocurre a través de la activación de cascadas de señales (Ma et al. 2001), que puede estar más relacionada con respuesta a exposición a aluminio prolongada, como ocurre en muchos otros estrés en plantas (Figura 1).

El aluminio interviene con la vía de transducción de señales de PLC; favoreciendo el incremento de segundos mensajeros como e IP y DAG a partir de PIP₂, los cuales estimula la liberación de Ca^{2+} de lugares de almacenamiento o activando proteínas quinasas, respectivamente; estas últimas están involucradas en regulación transcripcional. Adicionalmente PIP₂ participa en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, tráfico de vesículas y transporte iónico. A su vez la liberación de calcio

permite la activación de calmodulinas que regulan diferentes proteínas y factores de transcripción para la inducción de genes de respuesta a estrés como por ejemplo aquellos que codifican para proteínas transportadoras o enzimas biosintéticas de ácidos orgánicos (A.O) y de calosa entre muchos otros. Sin embargo, el aluminio también podría afectar esta ruta de transducción de señales al interactuar con calmodulinas. El aluminio causa peroxidación de lípidos y favorece el incremento de ROS; dicho incremento junto con el aumento en los niveles de calcio citoplasmático están relacionados con la activación de la biosíntesis de calosa, la cual se deposita en la pared celular contribuyendo a la disminución de la entrada de aluminio del apoplasto al simplasto. De otro lado, el NO regula los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés como enzimas detoxificadoras de ROS (SOD, CAT y APX entre otros), y también está involucrado en la modulación del equilibrio hormonal favoreciendo el incremento de giberelinas y zeatina ribosa; asociado con disminución en división y elongación celular, y resistencia a aluminio. Por otra parte el incremento de putrescina favorece el incremento de NO, lo cual podría jugar un papel clave en la estimulación de la excreción de ácidos orgánicos, específicamente de citrato.

Fosfolipasa C (PLC), fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG), especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), giberelinas (GA), zeatina ribosa (ZR), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) (Figura 1).

Diferentes mecanismos han sido propuestos en la transducción de señales, tales como: disminución de la elasticidad de la pared celular (Gunsé et al. 1997, Ma et al. 2004), alteración de la fluidez de la membrana y el potencial de membrana (Sivaguru et al. 2003) efectos en canales de iones y homeostasis iónica (Ahn et al. 2001), inhibición de la vía de la (PLC) (Ramos et al. 2007), tráfico por vesículas de membrana (Illés et al. 2006), alteración del citoesqueleto (Sivaguru et al. 1999), incremento en los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} (Rengel & Zhang 2003), inhibición del transporte de auxinas o ácido indolacético (IAA) (Kollmeier et al. 2000, Doncheva et al. 2005), cambios en las

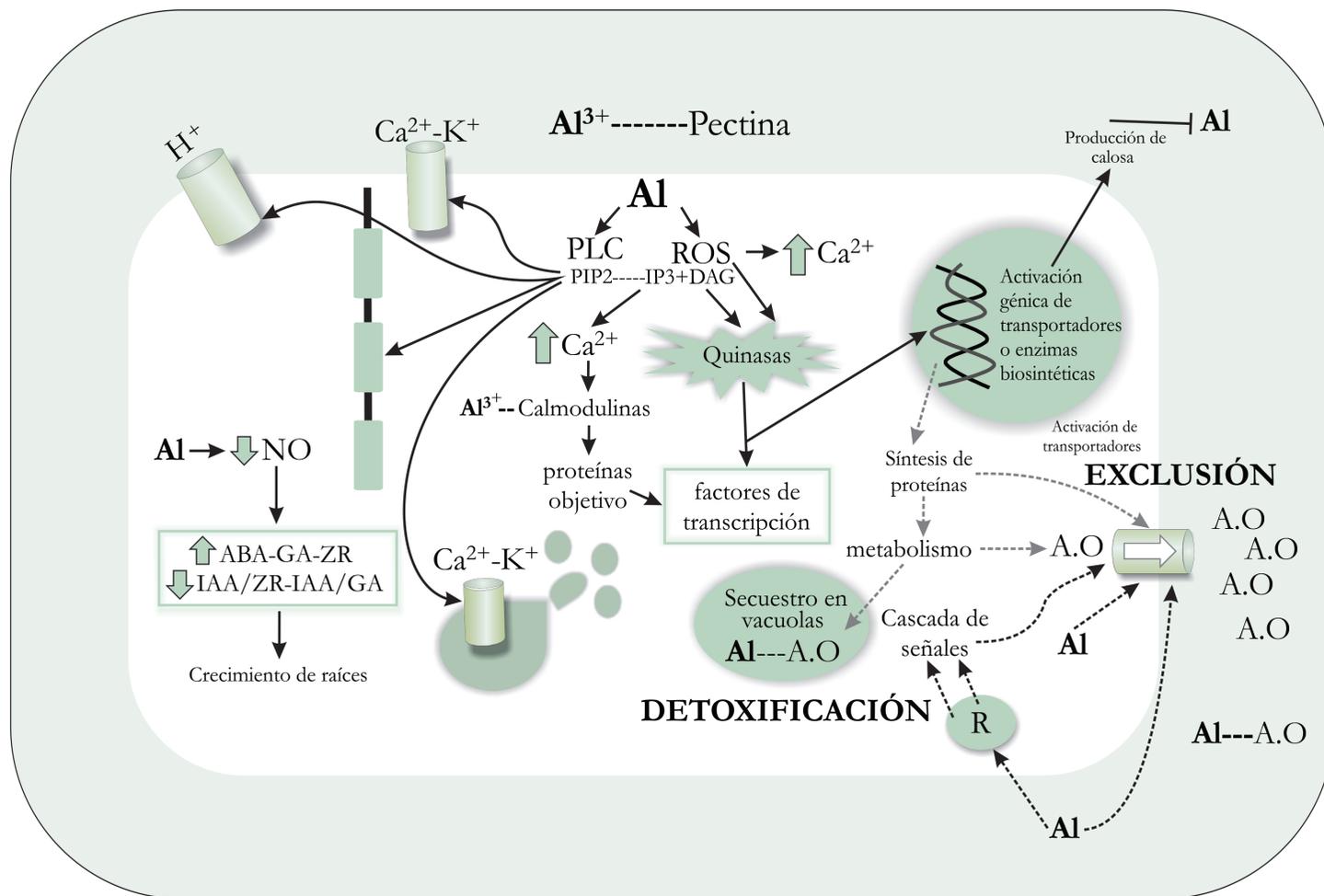


Fig. 1. Mecanismo propuesto de transducción de señal bajo estrés por aluminio y respuestas de tolerancia. La detoxificación del aluminio una vez ha entrado a la célula, involucra su unión con aniones de ácidos orgánicos y posteriormente el secuestro de estos complejos en vacuolas, mientras que la exclusión del aluminio consiste en el flujo de ácidos orgánicos desde la raíz hacia la rizósfera, los cuales quelan el aluminio e impiden su entrada a las células. **Flechas punteadas negras:** posibles vías que involucren activación de canales de aniones en la membrana plasmática permeables a aniones de ácidos orgánicos (A.O) sea por interacción del aluminio con receptores de membrana, interacción directa con canales proteicos sin entrar al citoplasma o al interior del mismo. **Flechas punteadas grises:** síntesis de proteínas involucradas en tolerancia aluminio. **Flechas sólidas:** rutas de transducción de señales que conllevan a respuestas de tolerancia a aluminio.

concentraciones de óxido nítrico (NO) endógeno (Illés et al. 2006, Tian et al. 2007), e interacción con otras fitohormonas (Gunsé et al. 2000, Massot et al. 2002) (Figura 1). A continuación se explica con mayor detalle algunos de los blancos celulares del aluminio y sus señalizadores más importantes. Sin embargo, aunque se traten

de manera independiente, en realidad son vías interconectadas.

Alteración del ADN y el ciclo celular: El órgano de la planta visiblemente afectado por aluminio es la raíz; pocos estudios han evaluado la relación entre dicho fenómeno y las interacciones que el

aluminio pueda tener con el ADN y el ciclo celular. Uno de estos estudios analizó el efecto del aluminio en la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas tipo A (CDKA) y en la síntesis de ADN; al comparar dos líneas celulares en suspensión de *Coffea arabica*, susceptible y tolerante; se encontró que esta última, mostró un incremento en la actividad de la CDKA y fue menos sensible a la inhibición de la síntesis de ADN, determinada a través de la incorporación de [³H]-timidina. Dicha tolerancia es atribuida a la producción de mayor cantidad de ácidos orgánicos que interactúan con el aluminio y con la capacidad de remover aluminio a través de la compartimentalización en vacuolas. La enzima CDKA, que catalizan la progresión del ciclo celular, parece tener un papel clave en la respuesta a aluminio. Esta respuesta es posiblemente regulada de manera post-transcripcional, puesto que no se observó un incremento o disminución significativa en los niveles de su mRNA en presencia del aluminio. Se plantean entonces, tres mecanismo que podrían regular a las CDKA: 1. Eventos de fosforilación/defosforilación involucrados en transducción de señales, 2. Incremento del pool de ciclinas y, 3. Disminución en los inhibidores de CDKA. (Valadez et al. 2007).

En contraste con el estudio anterior, Nezames et al. (2012) identificaron reguladores del ciclo celular que detienen el progreso de este en condiciones de exposición aluminio, resultando en inhibición del crecimiento de la raíz. A partir del mutante *als3-1* hiper-sensible al aluminio de *Arabidopsis thaliana* se aislaron supresores y se identificó un factor de punto de chequeo del ciclo celular denominado *ALUMINUM TOLERANT2* (*ALT2*), el cual monitorea y responde a daños en el ADN. Adicionalmente, en el mutante *alt2-1* carente de *ALT2* funcional, no se detiene el crecimiento de la raíz después de la exposición a aluminio, no acumula ciclina B1; en el ápice de la raíz, ni es capaz de lograr la diferenciación del centro quiescente, y presenta altos niveles de tolerancia al aluminio con respecto a la silvestre. Por otra parte el mutante *atr* también es más tolerante al aluminio, y en este se afecta el punto de chequeo del ciclo celular.

ATAXIA TELANGIECTASIA-MUTATED y *RAD3-RELATED* es una proteína serina/treonina quinasa, captada y activada por rupturas de ADN doble cadena; ésta fosforila varias proteínas clave que inician la activación del punto de control de daño de ADN, conduciendo a la detención del ciclo celular, la reparación del ADN o la muerte celular. Los autores plantean que *ALT2* es necesario para activar la detención del crecimiento de la raíz después de la exposición a aluminio ya que el alelo *alt2-1* es una mutación de pérdida de función en una proteína que contiene un motivo putativo WD40 *DDB1-binding*, previamente identificado como TANMEI, el cual se requiere para la valoración de la integridad del ADN, incluyendo la supervisión de enlaces cruzados de ADN. Adicionalmente proponen, que el aluminio actúa como agente dañino leve del ADN *in vivo* y que la inhibición en el crecimiento de la raíz ocurre por la detección y respuesta de TANMEI/*ALT2* y ATR frente a este daño, deteniendo el progreso del ciclo celular y llevando a la diferenciación del centro quiescente. Sin embargo, el daño del aluminio sobre el ADN no tiene consecuencias inmediatas en el crecimiento de las raíces, lo cual probablemente ocurre gracias a la naturaleza reversible de la unión del aluminio a ADN, debida a las interacciones electrostáticas. Por otra parte, en un entorno de suelo es posible que la exposición a aluminio sea crónica, y pese a que la unión es reversible, el suministro constante de aluminio podría activar permanente la vía mediada por *ALT2*-y ATR lo que finalmente llevaría a la inhibición del crecimiento de la raíz (Nezames et al. 2012).

Estrés oxidativo: Bajo condiciones de no estrés la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ocurre principalmente en los compartimientos celulares que contienen una cadena transportadora de electrones como mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas; siendo las primeras una de las principales fuentes, ya que la cadena de electrones mitocondrial alberga electrones con suficiente energía libre para reducir directamente el O₂; dicho fenómeno es inevitable en la respiración aeróbica. Sin embargo, la formación de ROS

puede incrementar como respuesta a estrés bióticos y abióticos, causando un desbalance de su producción en la célula y ocasionando estrés oxidativo, el cual afecta diferentes moléculas orgánicas y componentes celulares (Gill & Tuteja 2010).

El aluminio causa disfunción mitocondrial, inhibe la respiración celular, reduce el adenosín trifosfato (ATP) y favorece la producción de ROS. La acumulación de aluminio en la célula, afecta inicialmente la actividad de la membrana mitocondrial interna lo que impide el flujo de electrones y disipa el potencial de membrana, esto conlleva a la muerte celular después una exposición prolongada a aluminio. En células fotosintéticas, los cloroplastos son unos de los principales organelos celulares de formación de ROS a través de la fotosíntesis; mientras que en células de plantas no fotosintéticas como las células de la raíz y en cultivos celulares no clorofílicos, se ha evidenciado que la cadena transportadora de electrones de la mitocondria es el principal sitio de producción (Yamamoto et al. 2003). El incremento instantáneo y sostenido de ROS en la raíz, y no, la peroxidación de lípidos, parece ser un factor determinante en la rigidificación de la pared celular y la inhibición del crecimiento de la raíz por aluminio (Yamamoto et al. 2003). En raíces de arveja el contenido de ATP, la respiración y la elongación de la raíz decrecen similarmente de forma dependiente de la dosis de aluminio o del tiempo de duración del tratamiento (Yamamoto et al. 2002). De otro lado, Jones et al. (2006), encontraron que en plantas de maíz expuestas a aluminio, la rigidificación de las capas epidérmicas ocurre debido a que la calosa se deposita en la pared celular, y esto se correlaciona con el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático inducido por ROS. Por tanto, se cree que ROS actúa como segundo mensajeros en la cascada de transducción de señales relacionada con la formación de depósitos de calosa en la pared celular, previniendo la entrada del aluminio al simplasma de las células de la raíz.

Pese a la importancia de ROS como segundo mensajero en diferentes vías de señalización de respuesta a estreses se sabe también, que el desbalance entre la producción de este y los

mecanismos de detoxificación (estrés oxidativo), favorece la interacción de ROS con diferentes macromoléculas causando daños en componentes celulares, lesiones y mutaciones en el ADN, así como disfunciones metabólicas irreparables que llevan a la muerte celular. Gracias a la recopilación de diferentes trabajos relacionados con el efecto del aluminio en las células de la raíz durante y luego de la exposición, se plantea una asociación entre el estrés oxidativo con la inhibición del crecimiento y cambios estructurales de la raíz. Esto se observa cuando en la raíces tratadas con aluminio, se incrementa el anión radical de superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que es la mayor fuente de ROS, formada principalmente en la membrana plasmática por la acción de la NADPH oxidasa. Posteriormente ocurre un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de lignina, y se presenta un aumento de la rigidez en las paredes celulares, así como distorsiones y rupturas en la estructura de la célula (Matsumoto & Motoda 2011). En la recuperación de las raíces es evidente la disminución de radicales $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , y en el contenido de lignina; observándose finalmente la elongación del cilindro central en raíces recuperadas (Matsumoto & Motoda 2011).

Una de las respuesta de la célula frente fenómenos de estrés oxidativo mencionados anteriormente, es la activación de sistemas de detoxificación de radicales libres. En arveja (*Pisum sativum* L.) la inducción de estrés oxidativo a causa de la exposición a aluminio, está acompañada de cambios en el perfil de expresión de antioxidantes. En raíces se expresan principalmente las enzimas glutatión-s-transferasa (GST) y catalasa (CAT). En partes aéreas se incrementa la ascorbato peroxidasa citosólica (cAPX), la expresión génica (SOD) con cobre y zinc fue alta a las 24 horas y disminuyó a las 48. La expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y (SOD) con hierro fue elevada en concentraciones altas de aluminio después de 24 y 48 horas de exposición (Panda & Matsumoto 2010).

Por otra parte, en raíces de plántulas de trigo se observaron diferencias entre el genotipo susceptible y el tolerante respecto al incremento en la actividad de componentes enzimáticos y no

enzimáticos del sistema de defensa antioxidativo para la detoxificación de ROS; la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD), fue mayor en el genotipo susceptible, mientras que en el tolerante hubo más actividad de la catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), monodehydroascorbato reductasa (MDHAR), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GXP), monodehydroascorbato (AsA) y glutatión (GSH). A partir de esto los autores proponen que la capacidad de componentes enzimáticos y no enzimáticos puede ser un factor determinante en la tolerancia a aluminio en plantas (Xu et al. 2012).

Finalmente, de acuerdo con el estudio de Achary & Panda (2010) en *Allium cepa*, el aluminio tiene un modo de acción bifásico en el que altas dosis inducen daños en el ADN y bajas dosis (no tóxicas) confieren protección genómica; ambas fases parecen estar mediadas por ROS a través de diferentes vías, ya que se observa una relación dependiente de la dosis de aluminio en su generación. Al someter la raíz de la planta a un rango de concentración de 1-10 μ M de aluminio, se inducen respuestas adaptativas que confieren protección genómica a las células, frente a sustancias como el cloruro metil mercurio (MMCl genotóxico de tipo aneugénico), etilmetanesulfonato (EMS mutágeno estándar alquilante) o aluminio; bajo estas concentraciones de aluminio los niveles de ROS son también bajos, de esta manera posiblemente se activan cascadas de señalización de respuestas adaptativas frente a genotoxicidad. Sin embargo, las concentraciones de aluminio por debajo de 1 μ M muestran muy poco efecto al respecto; mientras que concentraciones mayores a 10 μ M incrementan los efectos perjudiciales de estas genotoxinas.

Alteración del metabolismo de fosfolípidos de membrana: Los fosfolípidos son importantes en la homeostasis celular, ya que no solo son los bloques estructurales de las membranas sino que también participan en procesos celulares indispensables como transducción de señales, dinámica del citoesqueleto, transporte o tráfico de vacuolas y cambios en la arquitectura celular (Pleskot et al. 2013). Debido a que los fosfolípidos son uno de los blancos celulares del aluminio; en la

membrana celular ocurren cambios en el potencial que inducen su despolarización y afectan la homeostasis del Ca²⁺, afectando a su vez muchos procesos del crecimiento y el metabolismo celular regulados por Ca²⁺. Adicionalmente también se presenta peroxidación lipídica al aumentar el contenido de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pleskot et al. 2013).

Huynh et al. (2012) evaluaron el efecto del aluminio en el contenido y composición de lípidos de membrana, y en la expresión de genes responsables de su biosíntesis en plantas de arroz, bajo condiciones de hidroponía. Encontraron que en los genotipos susceptibles se presentaba inhibición en el crecimiento de la raíz y la parte aérea. Además, hallaron una relación entre el tiempo de exposición al aluminio y la disminución en el contenido de ácidos grasos insaturados y de lípidos. Este efecto fue notorio en raíces y parte aérea con la fosfatidilcolina, y con los glicolípidos monogalactosildiacilglicerol y digalactosildiacilglicerol, en la parte aérea. Por otro lado, después de 12 horas de exposición a aluminio, observaron modificación en la expresión de los genes que codifican enzimas biosintéticas de fosfolípidos y desaturasas de ácidos grasos, que fue menor en los genotipos susceptibles. Por tanto, se plantea que el aluminio limita la capacidad de los tejidos para la síntesis *de novo* de lípidos de membrana a través la reducción de la expresión de genes clave en la biosíntesis de los mismos en los genotipos susceptibles. Sin embargo, pese a que se cree que los genotipos resistentes mantienen la estabilidad en la composición y contenido de lípidos a través de mecanismos que evitan el daño a membranas, como detoxificación de ROS o que eviten fenómenos lipolíticos; se requieren más estudios al respecto.

En general, se conoce que la activación de la cascada de señales de fosfolípidos es otro de los primeros fenómenos celulares desencadenados por el aluminio, aunque no exclusivo de este estrés, ya que también es activada por diferentes tipos de estreses bióticos y abióticos; dicha cascada de señalización a su vez activa mecanismos posteriores de respuesta, como la generación de segundos mensajeros que interactúan con varias proteínas.

La fosfolipasa C (PLC) cataliza la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol DAG a partir de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), que respectivamente actúan como segundos mensajeros estimulando la liberación de Ca²⁺ de lugares de almacenamiento y activando proteínas quinasas (Haug et al. 1994). Adicionalmente PIP₂ también participa en la regulación de la dinámica del citoesqueleto, tráfico de vesículas y transporte iónico; y sus niveles son regulados por diferentes quinasas y fosfatasa lipídicas (Stevenson et al. 2000).

El aluminio no solo activa sino que interviene en la vía de señalización de inositolfosfato y vías de fosforilación de proteínas, alterando el metabolismo de los fosfolípidos de membrana que son regulados por la enzima PLC otras enzimas clave en las vías de transducción de señales. Los efectos parecen variar dependiendo de la especie de planta, el tiempo de exposición y la concentración del aluminio; por ejemplo, en líneas celulares en suspensión de *Coffea arabica* en las que la actividad de la PLC e IP₃ se incrementa dos veces más al estar expuestas a aluminio en periodos de tiempo de un minuto, mientras que bajo exposición a largo término la actividad de PLC es inhibida en más del 50% (Martínez et al. 2003). Por otra parte, en células en suspensión de plantas de tomate expuestas a aluminio, se determinó que las concentraciones bajas estimulan las vías de señalización de la PLC y PLD, lo que conlleva a la producción de ROS y posteriormente a la muerte celular, que parece ser ejecutada por proteasas tipo-caspasas (Yakimova et al. 2007). Otros estudios han demostrado que el aluminio inhibe la actividad de PLC y a su vez inhibe la formación de segundos mensajeros como ácido fosfatídico (PA) (Ramos-Díaz et al. 2007) y de DAG (Pejchar et al. 2010) en células en suspensión de café y tabaco respectivamente.

De otro lado, se ha demostrado que las fosfolipasas *Dγs* son inducidas por aluminio y contribuyen a las alteraciones de la membrana a causa de este estrés. La supresión de *PLDγ* a través de RNAi disminuyó la expresión de *PLDγ* 1 y *PLDγ* 2, e incrementó la tolerancia a aluminio en *Arabidopsis thaliana*. Las plantas knockout y las

RNAi-suprimidas para *PLDγ* 1, mostraron mayor crecimiento radicular respecto a las silvestres. El daño a nivel de membranas fue más evidente en las silvestres en cuanto a alteración de fosfolípidos y glicolípidos con el tratamiento a aluminio, en comparación con las líneas mutantes; por lo que *PLDγs* podría modular los lípidos de la membrana bajo este estrés, pero niveles altos de dichas fosfolipasas modularían negativamente la tolerancia a aluminio (Zhao et al. 2011).

Como consecuencia de la fitotoxicidad por aluminio ocurren daños estructurales y funcionales a nivel de membrana, atribuidos a su unión directa con regiones de fosfolípidos o proteínas de la membrana plasmática, afectando la permeabilidad y los procesos de transporte de membrana. Sin embargo, la mayor consecuencia fisiológica a causa de la alteración del metabolismo de los fosfolípidos por aluminio es la inhibición del crecimiento y cambios morfológicos de la raíz. Estos cambios podrían estar relacionados con la alteración de la función de proteínas del citoesqueleto como *actin-capping* y *microtubule-bundling*, que son transductores clave en señalización lipídica (Huang et al. 2003, Huang et al. 2006, Staiger & Blanchoin 2006, Pleskot et al. 2013), puesto que el citoesqueleto es una de las estructuras celulares blanco de la acción del aluminio (Poschenrieder et al. 2009). La unión directa de isoformas de PLD al citoesqueleto podrían afectar la dinámica de esta estructura (Pleskot et al. 2010). Es posible, que los mecanismos moleculares coordinados entre PLD-PA y citoesqueleto en las células vegetales, intervengan en las respuestas frente a la toxicidad por aluminio especialmente en la elongación celular y por tanto en la morfología y crecimiento de la raíz.

El papel del calcio: El incremento en la actividad citosólica del Ca²⁺ causado por aluminio es uno de los mecanismos importantes en transducción de señales, ya que altera numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos involucrados en el crecimiento de la raíz. Uno de los efectos tóxicos del Al³⁺ en el crecimiento y desarrollo de la planta ha sido atribuido a la ruptura de la homeostasis del Ca²⁺; causando inhibición de la toma de este por la raíz, bloqueo de los canales de calcio

regulados por voltaje y por tanto disminución en la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma. Cuando el Al^{3+} permea la membrana plasmática al parecer a través de canales de cationes no selectivos, puede interactuar con canales de Ca^{2+} permitiendo que este sea liberado e incrementado en el citosol (Rincón-Zachary 2010).

A través de la técnica de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) fue posible captar la imagen de raíces de *Arabidopsis thaliana* expresando un sensor de Ca^{2+} denominado *yellow cameleon* 3.60; de esta manera se evidenció incremento en la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol a los pocos segundos de la exposición a Al^{3+} . Se observó que Al^{3+} induce diferentes firmas de Ca^{2+} en las células dependiendo de la región de la raíz; especialmente en la zona de transición (la más sensible al aluminio), el comportamiento de la concentración de Ca^{2+} fue bifásico (Rincón-Zachary et al. 2010). Recientemente fue propuesto un modelo sobre los posibles mecanismos y eventos secuenciales a causa de la exposición a aluminio que conllevan a la inducción transitoria de calcio en el citosol y a la inhibición en el crecimiento de la raíz. En primer lugar el Al^{3+} favorece la apertura de canales de Ca^{2+} en la zona de transición de la raíz lo que permite su flujo hacia el interior de las células; posteriormente el Ca^{2+} en el citoplasma alcanza su primer pico de la firma bifásica anteriormente mencionada; la cual activa canales de Ca^{2+} de estructuras de almacenamiento interno como vacuolas, retículo endoplasmático, mitocondria o plastidios; produciendo el segundo pico de la firma de Ca^{2+} (Rincón-Zachary 2010).

A través de ensayo cometa bajo condiciones alcalinas en raíces de *A. cepa*, se identificó que el aluminio induce daño en el ADN en concentraciones de 50, 100 y 200 μM . De acuerdo a la longitud de la cola se determinó que el daño fue significativo respecto al control, es dosis dependiente; y fue comparable con el daño inducido por etil metano sulfonato (EMS), un mutageno alcalino usado como control positivo (Achary et al. 2008). El daño fue atribuido al aumento de ROS inducido por el aluminio (Achary et al. 2008). Los mismos autores proponen que el Ca^{2+} juega

un papel fundamental en los mecanismos que inducen daño en el ADN por acción del aluminio. Mediante tratamientos independientes, previos a la exposición a aluminio en raíces de *A. cepa* con un quelante de calcio (EGTA), dos sustancias que bloquean canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática y, un antagonista de calmodulinas/quinasas (CaM/CDPK) dependientes de Ca^{2+} , se observó una disminución significativa en la inducción del daño al ADN y en la muerte de células de la raíz. De acuerdo con los resultados de este trabajo, la disrupción de la homeostasis de ROS/ Ca^{2+} y la señalización mediada por Ca^{2+} son eventos clave en la inducción de la toxicidad por aluminio, que produce daños en el ADN o muerte celular en plantas (Achary et al. 2013).

Por otro lado, el Ca^{2+} tiene un papel en la reticulación de materiales compuestos por pectina, en condiciones normales se une a la pectina de la pared celular. Pero, cuando la planta está expuesta a aluminio, se considera que el primer sitio de unión del Al^{3+} en el apoplasto es la matriz de pectina, debido a que puede unirse más fuertemente a ella, desplazando las uniones de pectina- Ca^{2+} . Este proceso, altera las propiedades físicas de la pared celular (extensibilidad, rigidez y permeabilidad), afectando negativamente la extensión y la división celular. Las cargas negativas de los grupos carboxilo de la matriz péptica también la hacen altamente afín al Al^{3+} (Chang et al. 1999).

Se ha encontrado una relación entre la acumulación de aluminio y el contenido de pectina entre diferentes especies de plantas a nivel del ápice de la raíz, así como una correlación positiva entre el contenido de aluminio y su unión con la pectina en la formación de calosa (Horst et al. 1999). Por otra parte, el grado de metilación de la pectina, controlado por la pectin metiltransferasa también determina las cargas negativas de la membrana y por tanto su afinidad por el aluminio (Eticha et al. 2005). Recientemente Yan et al. (2011) demostraron a partir del fraccionamiento de componentes de la pared celular de raíces de *Arabidopsis* previamente expuestas a aluminio, que el principal componente de la pared celular en relación a la acumulación de la mayor cantidad de aluminio (75%) es la hemicelulosa1. Sumado a

ello, la localización *in vivo* de la actividad de XET que se encarga de reordenamientos moleculares de polímeros de xiloglucanos y es la hemicelulosa más abundante en dicotiledóneas, mostró que el aluminio inhibe ampliamente su actividad a los 30 minutos de exposición a través de regulación transcripcional, tal inhibición esta acompañada por la inducción de la formación de depósitos de calosa en la raíz (Yan et al. 2011).

El aluminio afecta vías de señalización que involucran Ca^{2+} ya que puede interactuar con calmodulinas y otras proteínas dependientes de este (Siegel & Haug 1983). Pese a que las calmodulinas no parecen estar directamente involucradas con la resistencia, a través de la regulación de la homeóstasis del calcio y de los sistemas de antioxidantes en hojas se mejora el desempeño de la planta bajo condiciones de toxicidad por aluminio. Análisis de expresión de ARN mensajero del gen que codifica para la calmodulina 1 (VcCaM1) de *Vaccinium corymbosum*, mostraron patrones de expresión independientes entre raíces y hojas, posteriores a diferentes tiempos de exposición a aluminio. Si bien, los niveles de expresión en raíces no se correlacionan con la resistencia o susceptibilidad de los cultivares evaluados, dichos niveles en hojas parecen indicar que VcCaM1 es importante en diversos procesos fisiológicos y de respuesta al estrés. Esto podría determinar indirectamente la resistencia a aluminio en plantas de *Vaccinium corymbosum* (Inostroza-Blancheteau et al. 2013).

El papel del óxido nítrico (NO): El óxido nítrico (NO) es una molécula biológica y gaseosa, involucrada en el crecimiento y desarrollo de la planta, así como también en respuestas a varios estreses abióticos ya que tiene una fuerte interacción con otras moléculas señalizadoras como ABA, ROS y Ca^{2+} . La retroalimentación de Ca^{2+} en las actividades nitrato reductasa y óxido nítrico sintasa (NR/NOS), y las respuestas cooperativas con peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y peróxido de nitrito (OONO₂) cuya formación ocurre al reaccionar con el anión superóxido O_2^- , son procesos regulados por NO. Las señales de estrés causan un desequilibrio entre la producción y la eliminación de NO, lo cual altera

la vía de transducción de señales del NO. Esta vía regula los niveles de expresión de algunos genes involucrados en respuestas a estreses abióticos, como: transportador de malato activado por aluminio (*ALMT1*), bax inhibitor-1 (*BI-1*), proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK), glutatión (GSH) glutatión, *S*-nitrosoglutatión (*GSNO*), glutatión *S*-transferasa (*GST*), flavin hemoglobina (*HMP*), nitrito reductasa inducible (*NiR*), óxido nítrico-asociado 1 (*NOA1*), óxido nítrico sintasa (*NOS*), nitrato reductasa (*NR*), peroxidasa (*POD*), gen asociado a la senescencia (*SAG*), superóxido dismutasa (*SOD*), enzima de procesamiento vacuolar-1 (*VPE-1*) y xantina oxidasa (*XO*) (He et al. 2012a).

La importancia del NO en el estrés por aluminio como molécula señalizadora también se debe a su rol en la tolerancia a aluminio en plantas. Estudios al respecto proponen que el NO puede prevenir la toxicidad de ROS en la membrana plasmática y así reducir la entrada y acumulación de Al^{3+} en células de la raíz (Mittler 2002, Wang & Yang 2005, Tian et al. 2007). Adicionalmente NO puede estimular la capacidad de resistencia a estrés por la eliminación de ROS redundante en las células de tejidos fotosintéticos (Tian et al. 2007) a través de la inducción de enzimas detoxificadoras como SOD, CAT y APX y el incremento en el contenido de prolina (Zhang et al. 2008).

Estudios más recientes (He et al. 2012b) reafirman la capacidad del NO en la tolerancia a aluminio y proponen otros mecanismos de acción; como la relación entre el NO y cambios hormonales. En general se sabe que el crecimiento y desarrollo de las plantas es regulado por la interacción de hormonas endógenas y que la raíz es un órgano importante de síntesis, transformación y transporte de estas; por lo que su regulación podría influir en la tolerancia a aluminio. Por ejemplo el aumento diferencial de ácido abscísico (ABA) está relacionado con tolerancia a estreses, a través de la degradación de proteínas y ácidos nucleicos que favorece la inhibición del crecimiento de la planta, ayuda a mantener la estabilidad de las membranas, promueve absorción de K^+ y Ca^{2+} , e induce proteínas relacionadas con estrés. Por otra parte las giberelinas (GA) estimulan la liberación

de Ca^{2+} en la pared celular, y afectan la síntesis y el transporte de auxinas para promover división y elongación celular. A su vez el ácido indol acético (IAA) puede promover la elongación celular, ya sea por el incremento en la elasticidad y la capacidad infiltrativa de la pared celular; o a través de la síntesis de ARN y proteínas que constituyen el protoplasto y pared celular. Mientras que zeatina ribosa (ZR), un tipo de citoquinina, tiene funciones en la promoción de la división celular, la inhibición de la elongación celular y la promoción de la expansión celular. Adicionalmente, IAA junto con la GA promueven la elongación celular e incrementan los efectos de ZR. Por otra parte, GA y ABA se restringen entre sí (He et al. 2012b).

La interacción NO exógena y hormonas en la tolerancia a aluminio fueron evaluadas en los ápices de la raíz de centeno y trigo. En primer lugar encontraron que el centeno es más tolerante respecto al trigo, ya que presenta menor inhibición en el crecimiento de la raíz y menor acumulación de aluminio; posiblemente debido al incremento de IAA en la raíz, bajo este estrés. En contraste, la inhibición significativa de la elongación de la raíz evidenciada en trigo puede darse porque el aluminio interfiere con formación de la señal de unión de IAA a enzimas dependientes de ATP. Por otra parte, el contenido de GA disminuyó bajo estrés por aluminio pero incrementó cuando en condiciones de estrés se adicionó nitroprusiato de sodio un donador de NO (SNP), este tratamiento también redujo la inhibición en la elongación de la raíz debido a la disminución en los valores de IAA/GA y IAA/ZR, dicho efecto fue más significativo en trigo. Por tanto, se cree que el NO puede mitigar la toxicidad por aluminio a través del incremento en la secreción de GA, que conduce a la disminución en división y elongación celular. La aplicación de SNP también elevó significativamente el contenido ZR en ápices radiculares, evidenciándose una relación positiva entre la secreción de ZR y la resistencia a aluminio. Por otra parte, se encontraron diferencias entre centeno y trigo en relación a los patrones de los valores de ABA/GA, GA/ZR y ABA (IAA+GA+ZR) regulados por NO; que incrementaron en el primero y disminuyeron en el segundo. Mientras que los valores de GA/ZR

disminuyeron en centeno e incrementaron en trigo. En conclusión, los autores plantean que el NO puede reducir la acumulación de aluminio en ápices de la raíz a través de la regulación del equilibrio hormonal para incrementar la tolerancia a aluminio, en especial en las plantas de trigo susceptibles al aluminio (He et al. 2012b).

Otro de los mecanismos en los que el NO podría favorecer la tolerancia a aluminio involucra su asociación con las poliaminas en la respuesta a estreses abióticos en varias especies de plantas. Wang et al. (2013), encontraron que el estrés por aluminio incrementa la putrescina endógena libre, en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*); adicionalmente en plántulas tratadas con putrescina exógena se disminuyó la inhibición en el crecimiento de la raíz y la acumulación de aluminio. Ellos también evidenciaron que la putrescina induce la producción de NO bajo este estrés, al parecer a través de la modulación de la NR. Por otra parte, investigaron los efectos del NO en la excreción de citrato desde la raíz y la acumulación de aluminio en ápices de raíces, encontrando que la estimulación en la excreción de citrato por la raíz y la reducción de la acumulación de aluminio ocurre a través de donadores de NO; mientras que detoxificadores de NO inhiben dicha secreción e incrementan la acumulación de aluminio en la raíz. Debido a que la actividad de la H^+ -ATPasa de la membrana ha sido correlacionada con la exudación de citrato, es posible que el NO intervenga en su modulación bajo estrés por aluminio. Finalmente los autores aclaran que los mecanismos anteriormente señalados pueden estar determinados por la especie de planta ya que otros estudios similares con especies diferentes, varían en los resultados.

Mecanismos de tolerancia a aluminio: La tolerancia a metales en plantas se ha definido como la habilidad para sobrevivir en un suelo que es tóxico para otras plantas y es manifestado por la interacción entre un genotipo y su ambiente (Macnair et al. 2000). Dos mecanismos generales de tolerancia a aluminio han sido establecidos en plantas, el apoplástico y el simplástico. El primero consiste en la exclusión de aluminio para prevenir su penetración al interior de las células involucrando barreras físicas o exudación de compuestos a través

de la raíz; mientras que el segundo mecanismo involucra la detoxificación interna del aluminio.

Dentro de las barreras físicas que evitan la entrada a aluminio en plantas se destaca la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática frente al flujo de aluminio, la formación de barrera de pH en la rizósfera o en el apoplasto de la raíz e inmovilización del aluminio en la pared celular gracias a la producción de calosa (Jones et al. 2006). Recientemente, Arroyave et al. (2013), demostraron que las barreras apoplásticas podrían determinar la resistencia a aluminio entre especies de *Brachiaria*. La resistencia alta y moderada de *B. decumbens* y *B. brizantha* respectivamente, fue asociada con el mecanismo de exclusión determinado por la barrera apoplástica de exodermis multiseriada de la raíz y el desarrollo de la banda de Caspary, que controla el acceso apoplástico de iones, mientras que en genotipo susceptible a aluminio, *B. ruziziensis*, carece de exodermis constitutiva-suberizada.

Las principales sustancias exudadas por la raíz que evitan la entrada del aluminio fitotóxico a la misma son los compuestos fenólicos y ligandos quelatantes; siendo estos últimos los más conocidos (Kochian 1995); sin embargo, los compuestos fenólicos parecen favorecer la estabilidad de los complejos Al^{3+} -ácidos orgánicos evitando la entrada del aluminio fitotóxico a las células de la raíz, gracias a reacciones de desprotonación en presencia de grupos carboxílicos o a través de la inhibición de microorganismos que degradan ácidos orgánicos en la rizosfera (Barceló & Poschenrieder 2002).

Por otra parte, la detoxificación interna del aluminio sucede cuando éste ya ha penetrado al simplasma de las células, entonces es quelado por aniones de carboxilatos que son secuestrados en vacuolas. La capacidad de detoxificación difiere en relación al tipo de ácido orgánico de acuerdo a estabilidad del complejo que forma con aluminio; siendo los más comunes citrato, malato y oxalato (Kochian 1995, Kochian et al. 2005). En arroz, dicho mecanismo es controlado en gran parte por el transportador *half-size* ABC, OsALS1, miembro del subgrupo del transportador asociado con

procesamiento del antígeno (TAP) y codificado por el gen Os03g0755100 (*OsALS1*), que es regulado por el factor de transcripción de dedos de zinc tipo C2H2, ART1. La expresión de *OsALS1* además de ser rápida y exclusivamente inducida por aluminio en la raíz, presenta un patrón y una localización específica en el tonoplasto de todas las células de la raíz; lo cual difiere respecto al patrón de expresión del homólogo *AtALS1* de *Arabidopsis*, que se expresa en el tonoplasto de todas las células de la planta. Líneas knock-out para este gen fueron significativamente más sensibles específicamente a aluminio, al ser evaluadas con otros metales, y acumularon más aluminio a nivel de núcleo y citosol en comparación con las silvestres. Finalmente levaduras transformadas con *OsALS1* fueron sensibles al aluminio, posiblemente debido a la localización errónea de la expresión, por lo que los autores concluyen que la localización de OsALS1 en el tonoplasto es responsable del secuestro de aluminio dentro de vacuolas permitiendo la detoxificación interna en arroz (Huang et al 2012).

Por otra parte, el nivel de tolerancia a aluminio en plantas también está determinado por la especie. Pese a que *Arabidopsis thaliana* no presenta un alto nivel de tolerancia a aluminio respecto a otras plantas, ha sido un modelo biológico muy interesante para el estudio de este estrés debido a su fácil manipulación en el laboratorio y debido a la secuencia completa de su genoma, entre otros aspectos. De otro lado, la tolerancia a aluminio entre diferentes especies de cereales teniendo en cuenta varios genotipos de cada especie ha sido evaluada por Famoso et al. (2010), quienes desarrollaron un sistema de imágenes de alto rendimiento y un programa computacional para cuantificación del sistema radical completo, encontrando el siguiente orden en relación a la tolerancia: arroz > maíz > sorgo = trigo. A partir de estos resultados los autores proponen que el arroz podría ser un modelo muy útil para la caracterización de mecanismos que confieren altos niveles de tolerancia a aluminio en cereales (Tabla 1), teniendo en cuenta que adicionalmente se cuenta con abundancia de recursos genómicos y genéticos de esta especie.

Tabla 1. Mecanismos de tolerancia natural a aluminio entre algunas especies. Se incluyen principales mecanismos que involucran proteínas transportadoras. Los cultivares o líneas de cada especie varían en grado de tolerancia. El grado de tolerancia está representado en un rango entre muy alta tolerancia (++++) y baja tolerancia (+). Uridina difosfato glucosa (UDP-Glc).

Especie	Grado de tolerancia	Mecanismo de tolerancia	Genes	Función del proteína o dominio
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	Exclusión: liberación malato y citrato.	<i>AtMATE</i>	Transportador de citrato Al-activado (Liu et al. 2009)
			<i>ALS3</i>	Transportador ABC-like protein (redistribución del Al acumulado lejos de tejidos sensibles) (Larsen et al. 2005)
			<i>AtALMT1</i>	Transportador de malato Al-activado (Hoekenga et al. 2006)
<i>Oriza sativa</i> (cultivar)	++++	Exclusión: liberación de UPD-glc y contenido de polisacáridos en la pared celular.	<i>STAR1</i>	Dominio de unión a nucleótido.
			<i>STAR2</i>	Dominio transmembranal de un transportador tipo bacteriano <i>ATP binding cassette</i> (ABC) (Huang et al. 2009)
		Detoxificación interna: expresión rápida de <i>OsALS1</i> inducida por aluminio, en células en tonoplasto de células de raíz.	<i>OsALS1</i>	Transportador <i>half-size</i> ABC, OsALS1. (Huang et al. 2012)
			Detoxificación interna: transportador localizado en la membrana plasmática de células epidérmicas del ápice de la raíz específico para Al ³⁺ .	<i>Nrat1</i>
<i>Triticum aestivum L</i>	++	Exclusión: liberación malato		<i>TaALMT1</i>
<i>Sorghum bicolor</i>	++	Exclusión: liberación citrato	<i>SbMATE</i>	Transportador de citrato localizado en la membrana plasmática (Magalhaes et al. 2007)
<i>Zea mays</i>	+++	Exclusión: liberación de citrato	<i>ZmMATE1</i>	Transportadores que median el flujo de aniones, localizado en membrana (Maron et al. 2010).
			<i>ZmMATE2</i>	

Genes que confieren tolerancia a aluminio:

Entre los genes más importantes que confieren tolerancia a aluminio identificados hasta el momento se encuentran aquellos involucrados en codificar para proteínas transportadoras de aniones orgánicos u otros compuestos, así como factores de transcripción y enzimas detoxificadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Delhaize et al. 2012).

Proteínas transportadoras: La identificación y caracterización de genes que codifican para transportadores de aniones orgánicos ha sido un aspecto relevante en los estudios de tolerancia a aluminio en varias especies que utilizan este mecanismo para minimizar los efectos perjudiciales causados por este metal. El primer gen de tolerancia a aluminio en plantas fue aislado en

trigo, y se denominó *taALMT1*; dicho gen codifica para una proteína de membrana transportadora de malato activada por aluminio que se expresa constitutivamente en ápices radiculares, permitiendo flujo de malato a desde el ápice de la raíz hacia la rizósfera; aquellos genotipos con mayor expresión de *taALMT1*, mostraron ser más tolerantes a aluminio respecto a los de menor expresión (Sasaki et al. 2004). Estos resultados fueron también soportados por Raman et al. (2005); quienes determinaron que el gen *taALMT1* colocaliza con un QTL mayor para la tolerancia a aluminio (*Alt_{BH}*) en trigo. Posteriormente, homólogos de *taALMT1* fueron identificados en *Arabidopsis thaliana*, canola (*Brassica napus*; Hoekenga et al. 2006, Ligaba et al. 2006) y centeno (*Secale cereal*) (Collins et al. 2008).

Por otra parte, el principal gen responsable de la tolerancia a aluminio identificado en *Sorghum bicolor* (sorgo) es *sbMATE*, el cual colocaliza con un QTL mayor para la tolerancia a aluminio (*AltSB*) en esta especie. Este gen, codifica para un transportador de citrato en la membrana plasmática que se activa por aluminio y pertenece a la familia de transportadores denominada “de extrusión de múltiples drogas y compuestos tóxicos” (MATE) (Magalhaes et al. 2007). Homólogos funcionales de *sbMATE* han sido identificados en cebada (*Hordeum vulgare*) (Furukawa et al. 2007) y *Arabidopsis thaliana* (Liu et al. 2009). Pese a que en maíz la tolerancia a aluminio es considerada una característica multigénica, que a su vez involucra múltiples mecanismos, la liberación de citrato a través de la raíz parece jugar un papel muy importante en la tolerancia, ya que dos miembros de la familia MATE denominados *ZmMATE1* y *ZmMATE2*, que han sido clonados y caracterizados en esta especie, colocalizan con el QTL mayor de tolerancia a aluminio. Adicionalmente se sugiere que *ZmMATE1* es un homólogo funcional de genes que codifican para transportadores de citrato, involucrados en tolerancia a aluminio y caracterizados en sorgo, cebada y *Arabidopsis*. Mientras que *ZmMATE2* al parecer no codifica para un transportador de este tipo, pero podría estar involucrado en tolerancia a aluminio en maíz (Maron et al. 2010).

A partir de estos estudios es posible proponer una estrategia de fitomejoramiento para conferir

tolerancia a aluminio, consistente en identificar y usar alelos de alta expresión de los genes que codifican para transportadores de ácidos orgánicos quelantes (Takeda & Matsuoka 2008). A través de la transferencia de estos genes por ingeniería genética, se han logrado obtener plantas de arroz (*Oryza sativa*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papaya (*Carica papaya*), trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*) tolerantes a aluminio (Begum et al. 2009, De la Fuente et al. 1997, Trejo-Tellez et al. 2011, Delhaize et al. 2009).

Análisis genéticos han revelado que la toxicidad por aluminio en *Arabidopsis* es genéticamente compleja, con al menos ocho únicos loci, que al ser mutados confieren incremento en la sensibilidad a aluminio. La sensibilidad puede surgir ya sea por mutaciones que causan defectos en los mecanismos de resistencia a aluminio o por incremento en los mecanismos de toxicidad por aluminio. Larsen et al. (1997), aislaron y caracterizaron el mutante de *Arabidopsis* sensible a aluminio denominado *als3*, el cual presenta inhibición severa del desarrollo de la parte aérea y en el crecimiento de la raíz frente a la exposición a aluminio. Cuando los mutantes fueron transferidos a medios de cultivo con AlCl_3 las raíces primarias no recobraron su crecimiento a diferencia de las plántulas silvestres. El poco desarrollo de la parte aérea de dichos mutantes reflejado en hojas que no se expanden, parece ser independiente de los daños en la raíz, debido a que otros metales como LaCl_3 o CuSO_4 , los cuales inhiben drásticamente el crecimiento de la raíz no bloquearon el desarrollo de la parte aérea en las plántulas mutantes. Adicionalmente, teniendo en cuenta que la alta acumulación de calosa en las puntas de las raíces es un indicador de estrés inducido por aluminio; las plántulas mutantes no acumularon altas cantidades de esta en el ápice de la raíz, a diferencia de las silvestres. Por otra parte, en plántulas *als3* expuestas a aluminio se encontró acumulación de niveles significativos de calosa en los primordios foliares. Posiblemente el fenotipo de *als3* se debe a la reducción en la disponibilidad de nutrientes en la parte aérea debido a la toma reducida de los mismos por parte de la raíz, a causa de la toxicidad por aluminio (Larsen et al. 1997). Posteriormente con base en clonación posicional de

la mutación *als3-1* fue posible aislar el gen *ALS3* el cual es expresado principalmente en los hidátodos de las hojas y a través del floema de la planta y en el córtex de la raíz luego de la exposición a aluminio. Este gen codifica para un transportador ABC like-protein involucrado en la tolerancia a aluminio en *Arabidopsis*; cuya función es redistribuir el aluminio acumulado lejos de tejidos sensibles y así proteger la raíz en crecimiento de los efectos tóxicos del aluminio (Larsen et al. 2005).

Ma et al. (2005) indujeron mutaciones con rayos γ en arroz (*Oryza sativa* L.) en el cultivar Koshihikari, con el fin de comprender mejor el mecanismo de resistencia en esta especie ya que ha sido reportada como el cereal cultivado con mayor tolerancia a aluminio en condiciones de campo (Foy 1988). El mutante *als1* fue aislado a partir de 560 líneas; su fenotipo es similar al silvestre en ausencia de aluminio sin embargo bajo exposición a aluminio la elongación de la raíz es inhibida en un 70%, mientras que en el silvestre tan solo es inhibida en un 8%. A partir de cultivares resistentes que acumulan menos aluminio en la raíz respecto a cultivares sensibles se sugirió que la resistencia a aluminio en arroz es debido a mecanismos de exclusión que no parecen estar relacionados con la exudación de citrato; sino con la producción de sustancias específicas en la superficie de la pared celular que modifican su composición para prevenir la unión a aluminio o que permiten cambios de pH en la rizósfera (Ma et al. 2002). Posteriormente Yang et al. (2008), descartaron los cambios en el pH de la rizósfera como mecanismo de tolerancia a aluminio en arroz y lo atribuyeron al contenido de polisacáridos (pectina, hemicelulosa 1 y 2) en la pared celular ya que los genotipos tolerantes presentaban un mayor contenido frente a los susceptibles.

Algunos genes responsables para la tolerancia a aluminio han sido identificados en arroz. Los primeros en ser identificados se denominaron *STAR1* y *STAR2*, los cuales son expresados principalmente en raíz y su expresión responde específicamente al aluminio. Estos genes codifican para un dominio de unión a nucleótidos y un dominio transmembranal de un transportador tipo bacteriano, respectivamente. *STAR2* es un homólogo de *ALS3* (involucrado en la tolerancia

a aluminio en *Arabidopsis* (Larsen et al. 2005) pero difieren en los patrones de expresión y localización celular, el primero solo se expresa en raíz mientras que el segundo lo hace en todos los órganos. Los dominios proteicos *STAR1* y *STAR2* forman un complejo que funciona como un único transportador de membrana *ATP binding cassette* (ABC), que permite el flujo uridina difosfato glucosa (UDP-Glc), que es una forma activada de glucosa usada como sustrato por las glicosiltransferasas para sintetizar varios glucósidos. Al parecer el mecanismo de tolerancia a aluminio, radica en que UDP-Glc es transportado por *STAR1-STAR2* desde el citosol dentro de vesículas y posteriormente éste o glucósidos derivados, son liberados desde las vesículas hacia el apoplasto por exocitosis y usados para modificar las paredes celulares evitando la unión del aluminio (Huang et al. 2009).

Otro gen de tolerancia a aluminio identificado en arroz es *Nrat1*, que codifica un transportador 1 *Nramp* de aluminio localizado en la membrana plasmática de células epidérmicas del ápice de la raíz, específico para aluminio iónico trivalente. Pertenece a la familia *Nramp* (*natural resistance-associated macrophage protein*). Líneas de arroz knockout de *Nrat* presentan disminución en la toma de aluminio, incremento en la cantidad de aluminio unido a la pared celular y por tanto mayor sensibilidad a aluminio. Este transportador parece estar involucrado en mecanismo de detoxificación a través del secuestro del complejos de aniones orgánicos con aluminio dentro de vacuolas (Xia et al. 2010).

Factores de transcripción: Dentro de los genes involucrados en la tolerancia a aluminio se ha determinado el papel de algunos que codifican para factores de transcripción. En *Arabidopsis*, a partir de semillas mutadas con etil metanosulfonato se aisló un mutante hipersensible a rizotoxicidad por H^+ , que se presentaba con una única mutación en el cromosoma 1, de tipo recesivo. A través de clonación posicional seguida por análisis de secuencias del genoma se determinó que el gen mutado codifica para una proteína de dedos de zinc tipo-Cys₂His denominada “sensible a rizotoxicidad por protones” (*STOP1*), tratándose de una mutación sin sentido en el dominio de dedos de

zinc de dicha proteína. El mutante *stop1* no presenta sensibilidad a cadmio, cobre, lantano, manganeso, ni a cloruro de sodio, pero causa hipersensibilidad a rizotoxicidad por Al^{3+} . Este mutante carece de la inducción del gen *AtALMT1* y de *ALS3* (Sawaki et al. 2009).

Otra de las razones por las que se considera que *STOP1* juega un papel importante en la tolerancia a aluminio en suelos ácidos en *Arabidopsis*, es que el análisis de transcriptoma en esta especie demostró que varios genes son regulados negativamente en el mutante *stop1*, lo que indica que este factor de transcripción está involucrado en la vía de transducción de señales a través de la regulación de la expresión génica en la respuesta a H^+ y aluminio. Sin embargo *STOP1* no parece estar involucrado en el mecanismo de variación fenotípica de tolerancia a H^+ y aluminio en *Arabidopsis* según estudios de QTL (Hoekenga et al. 2006), además la expresión de *STOP1* es muy estable en accesiones tanto tolerantes como susceptibles (Luchi et al. 2007).

Recientemente se reportó en arroz, un factor de transcripción de dedos de zinc tipo-C2H2 denominado ART1, el cual se expresa constitutivamente en la raíz y regula específicamente la expresión de 31 genes que controlan la tolerancia a aluminio en arroz, incluyendo *STAR1* y 2, los cuales son homólogos de genes de tolerancia a aluminio en otras plantas. Algunos de los genes regulados por ART1 están implicados tanto en detoxificación interna como externa de aluminio (Yamaji et al. 2009). Pese a esto, ART1 no es el homólogo más cercano a STOP1 en el genoma de arroz ya que solo comparten entre sí un 41.2% de identidad y difieren en las respuestas a estreses y genes que regulan corriente abajo, a excepción de dos genes (*STAR2/ALS3* y *MATE*). Estos dos factores de transcripción también regulan dos genes *Nramp* independientes que pertenecen a ramas diferentes de la familia *Nramp* (Sawaki et al. 2009). Los mutantes de *stop1* son más sensibles tanto a aluminio (Luchi et al. 2007) como a pH ácido mientras que los mutantes *art1* solo muestra incremento en la sensibilidad a aluminio; adicionalmente *STAR1* y *STAR2* no responde a pH bajo (Yamaji et al. 2009) lo que posiblemente explica la amplia diferencia en el nivel de tolerancia

frente a la toxicidad por aluminio entre arroz y *Arabidopsis* que podría deberse a los mecanismos que utiliza cada especie (Yamaji et al. 2009).

Mitigación del estrés oxidativo: Una de las consecuencias del estrés por aluminio es el estrés oxidativo, lo que lleva al incremento en la actividad de las enzimas de detoxificación. Genes que codifican para Glutatión S-transferasa (GST), (*AtGST1* y *AtGST11*), han sido identificados en *Arabidopsis*, a través del *screening* de genes inducibles por aluminio. La expresión de los dos genes *AtGST* fue caracterizada bajo estrés por aluminio; logrando determinar que *AtGST1* se expresa constitutivamente principalmente en hojas en un nivel bajo; mientras que en estrés por calor, frío, y daño oxidativo es altamente expresado. Por otra parte la expresión de *AtGST11* fue insignificante en hojas bajo condiciones sin estrés y su expresión fue constante tanto en hojas como raíz después de ocho horas de exposición a aluminio (Ezaki et al. 2004).

Cultivares de arroz resistentes a aluminio presentan incremento en la expresión de enzimas detoxificadoras como superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasas (POD) respecto a los no tolerantes (Meriga et al. 2003). De igual forma, la diferencia en tolerancia entre líneas de maíz ha sido asociada significativamente con la producción las enzimas antioxidantes como SOD y POD (Giannakoula et al. 2010). Adicionalmente a través de la expresión de un gen de trigo denominado *WmSOD1*, el cual codifica para la enzima manganeso superóxido dismutasa (MnSOD, EC 1 15 1 1) bajo el control de un promotor constitutivo en canola, se obtuvo plantas transgénicas fenotípicamente normales y más resistentes a estrés oxidativo al estar expuestas a aluminio (Basu et al. 2001).

Las poliaminas también parecen estar involucradas en disminuir el daño oxidativo de componentes celulares y en la regulación de la concentración de minerales en la célula. Wen et al. (2009), transformaron pera europea (*Pyrus communis* L. Ballad) con el gen *MdSPDS1* de manzano (*Malus domestica*) que codifica para espermidina sintasa. Al comparar la línea transformante respecto a la silvestre luego de haberlas sometido a estrés por aluminio se encontró que el desempeño de la primera

fue mucho mejor, teniendo en cuenta características como el incremento neto en altura de la parte aérea, el peso fresco, y cambios morfológicos. Adicionalmente los parámetros de antioxidantes (SOD y glutatión reductasa; GR) se relacionaron cercanamente con la cantidad de espermidina, y fueron mayores en la transformantes. Por otra parte las concentraciones de calcio y algunos metales que actúan como cofactores de SOD incrementaron en dicha línea en comparación con la silvestre, después del estrés por aluminio. Los niveles de prolina se encontraron altos en ambas líneas bajo estrés por aluminio, pero fueron más pronunciados en la línea transformada. A partir de estos hallazgos se cree que la espermidina y el incremento en el contenido de prolina mejoran la tolerancia a aluminio en la línea transformante especialmente a través de la mitigación del estrés oxidativo y el balance de elementos minerales.

Recientemente fue descrito otro mecanismo que permite la reducción de ROS en la célula favoreciendo la tolerancia a aluminio (Panda et al. 2013). A través de la evaluación de los cambios respiratorios y las producción de ROS, en mitocondrias aisladas y en células de tabaco bajo estrés por aluminio de una línea susceptible y otra tolerante; se demostró alta capacidad en la ruta de la oxidasa alternativa mitocondrial (AOX) en comparación con las ruta del citocromo; así como mayor expresión del gen *AOX1* en la línea tolerante. Adicionalmente, gracias a la transformación constitutiva de líneas celulares de tabaco sensibles al aluminio con el gen *NtAOX*, se logró mayor expresión del gen y mayores niveles de la proteína, tanto bajo estrés por aluminio como sin el estrés en las líneas celulares transformadas en comparación con las líneas tolerantes y las susceptibles silvestres. Las líneas transformadas también mostraron mayor capacidad respiratoria, reducción en la producción de ROS y mayor capacidad para crecer. De esta manera los autores concluyen que AOX juega un papel crítico en tolerancia a estrés por aluminio, ya que desacopla la respiración de la producción mitocondrial de ATP y puede mejorar el desempeño bajo estrés por aluminio previniendo el exceso de la acumulación de ROS en líneas celulares de tabaco (Panda et al. 2013).

Fitomejoramiento para la tolerancia a aluminio:

Una aproximación efectiva frente a los problemas que causan los suelos ácidos y la toxicidad por aluminio en la producción de los cultivos es obtener cultivares tolerantes; lo cual podría lograrse a través de tres estrategias principales: 1. Mejoramiento convencional, que se basa en recombinación sexual, por lo que se realizan cruces dirigidos seleccionando los parentales y sus descendientes en dirección a una característica agronómica determinada; 2. Mejoramiento molecular, que involucra el desarrollo de poblaciones segregantes para la tolerancia al estrés y se identifican marcadores moleculares ligados a loci de características cuantitativas (QTL) que contribuyan a la tolerancia al estrés, para posteriormente realizar selección asistida por marcadores (MAS); 3. Ingeniería genética, en la que se conserva la integridad del genotipo parental, insertando solo una pequeña porción adicional de información que controla la característica deseada.

La selección de líneas superiores tolerantes a aluminio en condiciones de campo es una tarea compleja y costosa por la variación espacio temporal del aluminio tóxico en los suelos que dificulta medir con precisión la tolerancia. En contraste, el mejoramiento molecular permite evaluar rápidamente un amplio número de genotipos al mismo tiempo, empleando marcadores moleculares como: polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), secuencias simples repetidas (SSR) y polimorfismos de nucleótido simple (SNP), principalmente. Los marcadores moleculares también han facilitado el desarrollo de genotipos tolerantes a aluminio, el análisis de las relaciones entre marcadores-genotipo y variación entre el rasgo fenotípico lo que permite seleccionar rasgos cuantitativos dentro de QTL. Cuando estos marcadores se encuentran ligados a QTL que controlan la tolerancia a aluminio pueden ser usados en MAS para la incorporación de este rasgo. MAS busca hacer selección de uno o más rasgos sin requerir de selección basada en el fenotipo, es una estrategia que tiene ventajas para características con herencia compleja que son difíciles o costosas de fenotipificar (ST. Clair 2010).

La tolerancia a aluminio es una característica compleja que parece estar controlada por múltiples genes, sin embargo, ha sido posible mapear y clonar genes de efecto mayor en la tolerancia. Algunos de los trabajos más recientes que involucran el mapeo de QTLs que controlan tolerancia a aluminio se ha realizado en arroz (Famoso et al. 2011), trigo (Navakode et al. 2009), soya (Qi et al. 2008) y maíz (Maron et al. 2010, Mattiello et al. 2012, Maron et al. 2013) entre otros. Interesantemente, Mattiello et al. (2012), integraron datos de microarreglos de plantas de maíz cultivadas en suelos ácidos con datos de QTLs, lo que permitió la identificación de varios genes que codifican para ciclinas, una proteína de unión a RNA, un inhibidor de proteasas, factores de replicación y la proteína precursora 8 xiloglucano endotransglicosilasa; que pueden trabajar conjuntamente y contribuir al papel de los QTLs en mantener el crecimiento de la raíz de plantas de maíz en condiciones de suelos ácidos con aluminio fitotóxico. Adicionalmente, se ha propuesto la importancia en el número de copias del gen *MATE1* en la adaptación de maíz a suelos ácidos en el trópico, ya que la expansión en el número de copias de este, está asociada con una mayor expresión del mismo, lo que conlleva a su vez a una mayor tolerancia; adicionalmente sugieren que los cambios estructurales del genoma pueden ser un respuesta evolutiva rápida a nuevos ambientes (Maron et al 2013).

La obtención de plantas tolerantes a aluminio por medio de ingeniería genética es otra estrategia que ha resultado efectiva en algunas especies. Por ejemplo, Basu et al. (2001), transformaron canola (*Brassica napus*) sobre expresando la secuencia de cDNA (*WMn-SOD*) proveniente de trigo que codifica para una enzima antioxidante denominada manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). Las plantas transgénicas bajo estrés por aluminio, presentaron mayor retención de clorofila y menos fuga de electrolitos bajo estrés oxidativo, así como reducción en la inhibición de crecimiento de la raíz y en los niveles de malondialdehído, en comparación con la silvestres; lo que indica que la sobre expresión de *WMn-SOD* puede mejorar la tolerancia a la toxicidad por aluminio.

Por otra parte la enzima piruvato fosfato diquinasa (PPDK) que cataliza la formación de fosfoenolpiruvato (PEP), precursor de la síntesis de ácidos orgánicos protectantes en el citosol, fue sobreexpresada en raíz de tabaco. Las líneas transgénicas mostraron una mayor tolerancia a aluminio, reflejada en mayor crecimiento de la raíz y menor acumulación de aluminio en ápices radiculares respecto a las silvestres (Trejo et al. 2010). La tolerancia a aluminio también ha sido lograda en otras plantas a través de la expresión de genes que codifican para transportadores de ácidos orgánicos. Líneas transgénicas de cebada (*Hordeum vulgare L.*) transformadas con el gen *taALMT1* de trigo, mostraron incremento en la tolerancia a aluminio, mayor eficiencia en la toma de fósforo, y duplicaron la producción del grano respecto a las líneas no transformadas en suelos ácidos (Delhaize et al. 2009). Por tanto los autores consideran que el gen *taALMT1* es un buen candidato para ser usado en ingeniería genética de cultivos susceptibles a estrés por aluminio sin afectar el rendimiento.

Finalmente, vale la pena resaltar el contexto colombiano frente a la mejora genética de plantas en relación con la tolerancia a la toxicidad por aluminio, ya que cerca del 80% de los suelos del país son ácidos, en especial los suelos de la altillanura (Camacho et al. 2008), que son promisorios para la extensión de la frontera agrícola. Varios trabajos han sido desarrollados por el Centro Internacional de Agricultura tropical (CIAT) y sus socios, dentro de los que se resalta el desarrollo técnicas para evaluar tolerancia a la toxicidad por aluminio (Howeler 1987) y metodologías de selección de variedades cultivadas de diferentes especies tolerantes a aluminio con alto potencial de rendimiento (Nicholaides & Pika 1987); así como trabajos de mejoramiento en sorgo (Burgonovi et al. 1987) y gramíneas, especialmente de *Brachiaria* a través de técnicas de mejoramiento convencional para desarrollar nuevos híbridos que combinen resistencia a aluminio y tolerancia a sequía, y que sean capaces de desempeñarse bien en suelos ácidos de baja fertilidad (Grof 1981, Mejía 2011). Adicionalmente el CIAT y sus socios han desarrollado nuevas líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) que además de ser resistentes al aluminio y a la

sequía presentan buenos rendimientos (Thung et al. 1987, Eticha et al. 2010, Mejía 2011).

Por otra parte, la soya (*Glycine max*) es otra de las especies importantes en la cual se han desarrollado programas de fitomejoramiento para suelos ácidos en Colombia; a través del Instituto Colombiano de Agricultura (ICA), que dio inicio en 1984 al programa de mejoramiento a partir de accesiones de la colección mundial provenientes de Brasil y Taiwán entre otros países, y de poblaciones segregantes y líneas avanzadas del ICA; obteniendo líneas tolerantes al 70% de saturación de aluminio; dichas líneas fueron denominadas litas, y de estas, la primera en ser liberada fue la línea lita 09 con el nombre de Soyica Altillanura 2; que presentó un rendimiento promedio de 1,5 t ha⁻¹ (Valencia & Ligarreto 2010). Posteriormente, en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) en los años 90's se modificó el esquema para mejorar el rendimiento aumentando la saturación de las bases del suelo en un 50%, lográndose rendimientos de 1,8 a 4,0 t ha⁻¹. Las variedades liberadas consecutivamente con este esquema fueron Orinoquia 3, Corpoica Libertad 4, Corpoica Taluma 5 y Corpoica Superior; la cuales presentaron un alto potencial de rendimiento, tolerancia a enfermedades y buena calidad de grano. Sin embargo, en Colombia cerca del 80% de la soya cultivada pertenece a la variedad Soyica P-34 la cual presenta susceptibilidad aluminio (Valencia & Ligarreto 2010).

La integración de mejoramiento convencional con aproximaciones genómicas, fisiológicas y técnicas de ingeniería genética, permiten una mejor comprensión y aprovechamiento de los mecanismo inmersos en la genética de la adaptación a estreses abióticos. De acuerdo con Ishitani et al. (2004), lograr identificar genes que gobiernan rasgos agronómicos importantes, requiere no solo de la buena fenotipificación de los cultivos en diferentes ambientes sino también de herramientas genómicas integradas a herramientas bioinformáticas, con las cuales se facilita y optimiza la obtención de plantas de interés agronómico más tolerantes a estreses abióticos, como por ejemplo al estrés o toxicidad por aluminio.

Conclusión

El estrés por aluminio en plantas es un problema para la producción agrícola, debido a que cerca del 30% de los suelos de la superficie terrestre libre de hielo son ácidos (Von Uesxkull & Mutert 1995). En estos suelos el principal problema es la toxicidad por aluminio, ya que la acidez favorece la liberación de iones aluminio (Al³⁺), que son los principales causantes de fitotoxicidad.

A nivel celular el aluminio puede activar canales en la membrana plasmática permeables a aniones de ácidos orgánicos, ya sea por interacción con receptores de membrana o interacción directa con canales proteicos involucrando o no la entrada de este al citoplasma. Como consecuencia de lo anterior se generan cascadas de señales que activan la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en tolerancia a aluminio como son las enzimas biosintéticas de ácidos orgánicos y canales de transporte de los mismos; así como intermediarios en la ruta de transducción de señales como PLC, PIP2, IP3, DAG, ROS y NO.

El estrés por aluminio se caracteriza especialmente por causar inhibición en el crecimiento de la raíz como consecuencia de la alteración de diferentes mecanismos y estructuras celulares. El aluminio afecta la síntesis de ADN y la regulación de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, la toxicidad por aluminio causa disrupción en la homeostasis de ROS/Ca²⁺ y la señalización mediada por Ca²⁺, considerados eventos clave en la inducción de daños en el ADN o muerte celular en plantas (Achary et al. 2013). De otro lado la alta actividad de CDKA que catalizan la progresión del ciclo celular a través de los principales puntos de control (G1-S y G2-M), se ha asociado con tolerancia a aluminio, al parecer a través de regulación post-transcripcional que involucra eventos de fosforilación y desfosforilación, incremento en el *pool* de ciclinas o por disminución de inhibidores de CDKA (Valadez et al. 2007). En contraste, los reguladores del ciclo celular TANMEI/ALT2 y ATR participan en la detención de su progreso, lo cual está relacionado con la inhibición del crecimiento de la raíz y diferenciación del centro quiescente, bajo exposición a aluminio (Nezames et al. 2012).

La inhibición en el crecimiento de la raíz, también está relacionada con la reducción en la expresión de genes clave en la biosíntesis *de novo* de lípidos de membrana, daños estructurales y funcionales de la misma; por tanto los niveles de tolerancia a aluminio están en parte determinados por la capacidad de mantener la estabilidad en la composición lipídica y el contenido de lípidos a través de mecanismos que eviten fenómenos lipolíticos y que favorezcan la detoxificación de ROS (Huynh et al. 2012); ya que sumado a esto, el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático inducido por ROS es responsable de la formación de depósitos de calosa en la pared celular, lo cual causa rigidificación de las capas epidérmicas de la raíz para evitar la entrada de aluminio a la célula. Sin embargo, esto a su vez afecta negativamente el crecimiento de la raíz (Jones et al. 2006, Achary et al. 2013).

En condiciones sin exposición a aluminio, a nivel del apoplasto el Ca^{2+} se une a la matriz péptica, sin embargo en presencia de Al^{3+} , este puede unirse más fuertemente a la pectina respecto al Ca^{2+} desplazando las uniones pectina- Ca^{2+} y de esta forma alterando propiedades físicas de la pared celular, lo que afecta negativamente la extensión y la división celular (Chang et al. 1999). Por otra parte, al parecer las calmodulinas podrían estar indirectamente involucradas con la resistencia a aluminio, al mejorar el desempeño de la planta bajo condiciones de toxicidad, a través de la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} y sistemas de antioxidantes en hojas (Inostroza-Blancheteau et al. 2013).

Se han propuesto dos mecanismos principales de defensa de la planta al aluminio. El primero es el apoplástico y consiste en la exclusión de aluminio para prevenir su penetración al interior de las células. Esto se consigue a través de mecanismos tales como la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática frente al flujo de aluminio, la formación de barrera de pH en la rizósfera o en el apoplasto de la raíz, la inmovilización del aluminio en la pared celular (Jones et al. 2006), o la exudación de ligandos quelatantes provenientes del ápice de la raíz. Los dos últimos son los más conocidos (Kochian 1995). El segundo mecanismo es la detoxificación interna y sucede cuando el aluminio ya ha penetrado al simplasma de las células, entonces es quelado por

aniones de carboxilatos que son secuestrados en vacuolas (Kochian 1995, Kochian et al. 2005).

Una de las moléculas a la que se le ha atribuido un papel importante en señalización, respuesta y tolerancia a estrés por aluminio es NO. En general, el estrés causa un desequilibrio entre su producción y eliminación, alterando la vía de transducción de señales de NO, que regula los niveles de expresión de algunos genes involucrados en respuestas a estrés, como por ejemplo *ALMT1*, que codifican para el transportador de malato activado por aluminio. Adicionalmente el NO puede prevenir la toxicidad de ROS en la membrana plasmática y reducir la entrada y acumulación de Al^{3+} en células de la raíz, a expensas de la inhibición en la elongación de esta (Mittler 2002, Wang & Yang 2005, Tian et al. 2007). Por otra parte, a través de la inducción por NO de enzimas detoxificadoras como SOD, CAT y APX y el incremento en el contenido de prolina se estimula la eliminación de ROS redundante en las células de tejidos fotosintéticos (Tian et al. 2007, Zhang et al. 2008). Finalmente, estudios recientes proponen que el NO podría incrementar la tolerancia a aluminio a través de la regulación del equilibrio hormonal o a través su asociación con las poliaminas (He et al. 2012b, Wang et al. 2013).

De otro lado, la comprensión de la toxicidad por aluminio y los mecanismos de tolerancia en plantas así como la identificación de genes involucrados en estos, entre los que se destacan aquellos que codifican transportadores de membrana como (*ALMT1*, *MATE*, *ALS3*, *Nrat1*, *STAR1* y *STAR2*) (Larsen et al. 2005, Hoekenga et al. 2006, Ligaba et al. 2006, Magalhaes et al. 2007, Furukawa et al. 2007, Collins et al. 2008, Yang et al. 2008, Liu et al. 2009, Huang et al. 2009, Yamaji et al. 2009, Maron et al. 2010, Xia et al. 2010); factores de transcripción (*STOP1*, *ART1*); (Hoekenga et al. 2006, Luchi et al. 2007, Yamaji et al. 2009, Sawaki et al. 2009) y aquellos que participan en la mitigación del estrés oxidativo (*WMin-SOD*, *MdSPDS1*, *NtAOX*) (Basu et al. 2001, Wen et al. 2009, Panda et al. 2013); han permitido avances importantes en la obtención de plantas con mayor tolerancia a aluminio.

La identificación en la literatura, de genes involucrados en tolerancia a aluminio en plantas,

y los mecanismos de acción en los que participan, es una información valiosa que puede ser usada como punto de partida para la obtención de plantas tolerantes a este estrés, a través de ingeniería genética en Colombia. El análisis detallado y comparativo de estudios en los que se han introducido genes con el fin de incrementar la tolerancia a aluminio, en diferentes especies de plantas podría llevar a la selección de genes candidatos para tal propósito, teniendo en cuenta especialmente el nivel de tolerancia logrado, las pruebas con las que se evalúa la tolerancia, así como la libertad de operación que estas tecnologías puedan tener en relación con los derechos de propiedad intelectual para su uso en genotipos comerciales; ya que en muchos casos se podrían usar tecnologías que no están patentadas en el país o cuya patente haya caducado. A través de este ejercicio es posible lograr una conexión entre la academia y las necesidades agrícolas nacionales en las que el estrés por aluminio es poco conocido pero del alto impacto, debido a la abundancia de este elemento en gran parte de los suelos colombianos. Este es el principal producto del presente trabajo, el cual hace parte de un proyecto de investigación que tiene el propósito de desarrollar materiales tolerantes a aluminio, en especies cultivadas como soya y maíz, para la Orinoquía colombiana.

Finalmente, a través de estrategias como mejoramiento convencional, molecular e ingeniería genética es posible lograr plantas tolerantes a estrés por aluminio entre muchos otros estreses. Al respecto, el mejoramiento molecular permite evaluar rápidamente un amplio número de genotipos al mismo tiempo, empleando marcadores moleculares, lo cual puede facilitar la selección de líneas superiores tolerantes al aluminio, ya que en condiciones de campo, las formas y las concentraciones de aluminio varían en el espacio y el tiempo, haciendo costosa y compleja esta labor. Adicionalmente pese a que se cree que tolerancia a aluminio es una característica poligénica compleja, ha sido posible mapear y clonar algunos de los genes que tienen mayor efecto en la tolerancia con los cuales se han transformado plantas por ingeniería genética logrando mayor tolerancia a este estrés.

Por otra parte, pese a que cerca del 80% de los suelos colombianos son ácidos, en especial los suelos de la altillanura (Camacho et al. 2008); la mejora genética de plantas más tolerantes o resistentes a estrés por aluminio dentro del contexto colombiano, demuestra que las investigaciones más recientes se han enfocado principalmente en cultivos de frijol y *Brachiaria* por parte del CIAT y soya en Corpoica. No obstante, pese a estos esfuerzos y avances, el estudio sobre el estrés causado por aluminio, permanece relegado en las investigaciones de cultivos y la mejora genética en el país.

Agradecimientos

Nuestros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, en especial al grupo de Ingeniería Genética de Plantas del Departamento de Biología, quienes apoyaron el desarrollo de esta revisión como parte del proyecto de investigación para la obtención de plantas cultivadas tolerantes a aluminio.

Conflictos de interés

Los autores del presente artículo declaran que no tiene ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Achary V, Parinandi N, Panda B (2013) Calcium channel blockers protect against aluminium-induced DNA damage and block adaptive response to genotoxic stress in plant cells. *Mutation Research* 751: 130-138
- Achary V, Panda B (2010) Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis* 25 (2): 201-209
- Achary V, Jena S, Panda K, Panda B (2008) Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 300-310
- Ahn S, Sivaguru M, Osawa H, Chunng C, Matsumoto H (2001) Aluminum Inhibits the H⁺-ATPase Activity by Permanently Altering the Plasma Membrane Surface Potentials in Squash Roots. *Plant Physiology* 126: 1381-1390
- Arroyave C, Tolrà R, Thuy T, Barceló J, Poschenrieder C (2013) Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. *Environmental and Experimental Botany* 89: 11-18

- Baligar V, Fageria N (1997) Nutrient use efficiency in acid soils: Nutrient management and plant use efficiency. In: A. C. Moniz et al. (ed) *Plant-Soil Interactions at low pH stress*: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp75-93
- Barceló J, Poschenrieder C, Vázquez M, Gunsé B (1996) Aluminium phytotoxicity. A challenge for plant scientists. *Fertilizer Research* 43:217-23
- Barceló J, Poschenrieder C (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48: 75-92
- Basu U, Good G, Taylor J (2001) Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell and Environment* 24: 1269-1278
- Begum H, Osaki M, Watanabe T, Shinano T (2009) Mechanisms of aluminum tolerance in phosphoenolpyruvate carboxylase transgenic Rice. *Journal of Plant Nutrition* 32:84-96
- Blancaflor E, Jones D, Gilrpy S (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology* 118: 159-172
- Burgenovi R, Schaffert R, Gitta (1987) Breeding aluminium-tolerant sorghums. In Workshop on Evaluating Sorghum for Tolerance to Al-toxic Tropical Soils in Latin America, Cali (Colombia), 28 May-2 Jun 1984. CIAT
- Camacho J, Luengas C. & Leiva F (2008) Effect of agricultural intervention on the spatial variability of some soils chemical properties in the eastern plains of Colombia. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68 (1): 42-55
- Chang Y, Yamamoto Y, Matsumoto H (1999) Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in culture tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron. *Plant Cell Environment* 22: 1009-1017
- Collins N, Shirley N, Saeed M, Pallotta M, Gustafson J (2008) An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 79:669-682
- De La Fuente J, Ramírez-Rodríguez V (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Sciences* 276:1566-1568
- Delhaize E, Ryan P (1995) Aluminum Toxicity and Tolerance in Plants. *Plant Physiology* 107: 315-321
- Delhaize E, Taylosr P, Hocking P, Simpson R, Ryan P, Richardson A (2009) Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorous nutrition and grain production when grown on acid soil. *Plant Biotechnology Journal* 7:391-400
- Delhaize E, Feng Ma J, Ryan P (2012) Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends in Plant Sciences* 17 (6): 341-348
- Doncheva S, Amenós M, Poschenrieder C, Barcelo J (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* 56 (414):1213-1220
- Driscoll C, & Schecher W (1990) The chemistry of aluminum in the environment. *Environmental Geochemistry and Health* 12(1-2): 28-49.
- Eticha D, Staß A, Horst W (2005) Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell and Environment* 28: 1410–1420
- Eticha D, Zahn M, Bremer M, Yang Z, Rangel A, Rao I, et al (2010) Transcriptomic analysis reveals differential gene expression in response to aluminium in common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. *Annals of botany* 105(7): 1119-1128.
- Ezaki B, Suzuki M, Motoda H, Kawamura M, Nakashima S, Matsumoto H (2004) Mechanism of gene expression of Arabidopsis glutathione S-transferase, AtGST1, and AtGST11 in response to aluminum stress. *Plant physiology* 134(4): 1672-1682.
- Foy C (1988) Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 19: 959-987
- Famoso A, Clark R, Shaff J, Craft E, McCouch S, Kochian L (2010) Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice Aluminum Tolerance Mechanisms. *Plant Physiology* 153: 1678-1691
- Famoso A, Zhao K, Clark R, Tung C, Wright M, Bustamente C, et al (2011) Genetic Architecture of Aluminum Tolerance in Rice (*Oryza sativa*) Determined through Genome-Wide Association Analysis and QTL Mapping. *PLoS Genetics* 7(8): 1-16
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, et al (2007) An aluminum activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiology* 48: 1081-1091
- Giannakoula A, Mousakas M, Syros T, Yupsanis T (2010) Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the AL-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental of Experimental Botany* 67(3): 487-494

- Gill S, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (12): 909-930
- Grof B (1981) The performance of Andropogon gayanus-legume associations in Colombia. *Journal of Agricultural Science* 96: 233-237
- Gunsé B, Pschenrider C, Barceló J (1997) Water Transport Properties of Roots and Root Cortical Cells in Proton- and Al-Stressed Maize Varieties. *Plant Physiology* 113: 595-602
- Gunsé B, Poschenrieder C, Barceló J (2000) The role of ethylene metabolism in the short-term responses to aluminium by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. *Environmental and Experimental Botany* 43: 73-81
- Haug A, Shi B, Vitorello V (1994) Aluminum interaction with phosphoinositide associated signal transduction. *Archives of Toxicology* 68: 1-7
- He H, Zhan J, He L, Gu M (2012a) Nitric oxide signaling in aluminum stress in plants. *Protoplasma* 249:483-492
- He H, He L, Gu M, Li X (2012b) Nitric oxide improves aluminum tolerance by regulating hormonal equilibrium in the root apices of rye and wheat. *Plant Sciences* 183: 123-130
- Hoekenga O, Maron L, Piñeros M, Cançado G, Shaff J, Kobayashi Y, et al (2006) AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 9738-9743
- Horst W, Schmohl N, Kollmeier M, Baluska F, Sivaguru M (1999) Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane-cytoskeleton continuum? *Plant and Soil* 215: 163-174
- Howeler R (1987) Effective screening techniques for tolerance to aluminium toxicity. In Workshop on Evaluating Sorghum for Tolerance to Al-Toxic Tropical Soils in Latin America, Cali (Colombia), 28 May-2 Jun 1984. CIAT
- Huang S, Blanchoin L, Kovar D, Staiger C (2003) *Arabidopsis* capping-protein (AtCP) is a heterodimer that regulates assembly at the barbed ends of actin filaments. *Journal of Biological Chemistry* 278: 44832-44842
- Huang S, Gao L, Blanchoin L (2006) Heterodimeric Capping Protein from *Arabidopsis* Is Regulated by Phosphatidic Acid. *Molecular Biology of the Cell* 17:1946-1958
- Huang C, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma J (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell Online* 21(2): 655-667.
- Huang C, Yamaji N, Chen Z, Ma J (2012) Tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant Journal* 69: 857-867
- Huynh V, Repellin A, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A (2012). Aluminum stress response in rice: effects on membrane lipid composition and expression of lipid biosynthesis genes. *Physiologia Plantarum* 146(3): 272-284.
- Inostroza-Blancheteau C, Aquea F, Loyola R, Slovin J, Josway S, Rengel Z, et al (2013) Molecular characterisation of a calmodulin gene, *VcCaM1*, that is differentially expressed under aluminium stress in highbush blueberry. *Plant Biology* ISSN 1435-8603
- Illéš P, Schlicht M, Pavlovkin J, Lichtscheidl I, Baluška F, Ovecka M (2006) Aluminium toxicity in plants: internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *Journal of Experimental Botany* 57(15): 4201-4213
- Ishitani M, Rao I, Wenzl P, Beebe S, Tohme J (2004) Integration of genomics approach with traditional breeding towards improving abiotic stress adaptation: drought and aluminum toxicity as case studies. *Field Crop Research* 90: 35-45
- Jones D, Blancaflor E, Kochian L, Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and Wall rigidification in maize roots. *Plant Cell and Environment* 29: 1309-1318
- Kinraide T (2003) Toxicity factors in acidic forest soils: attempts to evaluate separately the toxic effects of excessive Al^{3+} and H^{+} and insufficient Ca^{2+} and Mg^{2+} upon root elongation. *European Journal of Soil Science* 54:323-333
- Kochian L (1995) Cellular mechanism of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 237-260
- Kochian L, Hoekenga O, Pineros M (2004) How do plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology* 55: 459-493
- Kochian L, Piñeros M, Hoekenga O (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant and Soil* 247: 175-195
- Kollmeier M, Felle H, Horst W (2000) Genotypical Differences in Aluminum Resistance of Maize Are Expressed in the Distal Part of the Transition Zone. Is Reduced Basipetal Auxin Flow Involved in Inhibition of Root Elongation by Aluminum? *Plant Physiology* 122: 945-956

- Kuhn A, Bauch J, Schroder W (1995) Monitoring uptake and contents of Mg, Ca and K in Norway spruce as influenced by pH and Al, using microprobe analysis and stable isotope labelling. *Plant and Soil* 168: 135-150
- Larsen P, Kochian L, Howell S (1997) Al inhibits both shoot development and root growth in *als3*, an Al-Sensitive *Arabidopsis* mutant. *Plant Physiology* 114: 1207-1214
- Larsen P, Geisler M, Jones C, Williams K, Cancel J (2005) ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 41: 353-363
- Ligaba A, Katsuhara M, Ryan P, Shibasaka M, Matsumoto H (2006) The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiology* 142: 1294-1303
- Liu J, Magalhaes J, Shaff J, Kochian L (2009) Aluminum activated citrate and Malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal* 57: 389-399
- Luchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, et al (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and co-regulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(23): 9900-9905
- Ma J, Ryan P, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *TRENDS of Plant Sciences* 6(6): 273-278
- Ma J, Shen R, Zhao Z, Wissuwa M, Takeuchi Y, Ebitani T, et al (2002) Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. *Plant and Cell Physiology* 43: 652-659
- Ma J, Shen R, Nagao S, Tanimoto E (2004) Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant and Cell Physiology* 45(5): 583-589.
- Ma J, Nagao S, Huang C, Nishimura M (2005) Isolation and characterization of a rice mutant hypersensitive to Al. *Plant and Cell Physiology* 46: 1054-1061
- Mackinnon N, Crowell K, Udit A, Macdonald P (2004) Aluminum binding to phosphatidylcholine lipid bilayer membranes: 27Al and 31P NMR spectroscopic studies. *Chemistry and Physics of Lipids* 132: 23-36
- Macnair M, Tilstone G, Smith S (2000) The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants. En: Terry N., Banuelos G (ed) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, pp 235-250
- Magalhaes J, Liu J, Guimarães C, Lana U, Alves V, Wang Y-H, et al (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics* 39: 1156-1161
- Martínez M, Racagni G, Muñoz A, Brito L, Loyola V, Hernández T (2003) Aluminium differentially modifies lipid metabolism from the phosphoinositide pathway in *Coffea arabica* cells. *Journal of Plant Physiology* 160: 1297-1303
- Maron L, Piñeros M, Guimarães C, Magalhaes J, Pleiman J, MAO C, et al (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *The Plant Journal* 61:728-740
- Maron L, Guimarães C, Kirst M, Albert P, Birchler J, Bradbury P, et al (2013) Aluminum tolerance in maize is associated with higher MATE1 gene copy number. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(13):5241-5246
- Massot N, Nicander B, Barcelo J, Poschenrieder C, Tillberg E (2002) A rapid increase in cytokinin levels and enhanced ethylene evolution precede Al³⁺-induced inhibition of root growth in bean seedlings (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Growth Regulation* 37: 105-112
- Matsumoto H, Hirasawa F, Torikai H, Takahashi E (1976) Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. *Plant and Cell Physiology* 17:127-37
- Matsumoto H, Motoda H (2011) Aluminum toxicity recovery processes in root apices. Possible association with oxidative stress. *Plant Science* 185-186:1-8
- Mattiello L, da Silva F, Menossi M (2012) Linking microarray data to QTLs highlights new genes related to Al tolerance in maize. *Plant Science* 191: 8-15
- Mejía M (2011) CIAT. www.ciatnews.cgiar.org/es/2011/01/20/nuevo-frijol-resistente-a-condiciones-climaticas-adversas/#sthash.kYOLyP3d.dpuf. Noticias Eco-eficiencia en acción. Nuevo frijol resistente a condiciones climáticas adversas. Consultado Agosto 11 2013
- Meriga B, Reddy K, Rao R, Reddy A, Kishor K (2003) Aluminum-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedling of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology* 161: 63-68
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Sciences* 7:405-410
- Navakode S, Weidner A, Lohasser U, Röder M, Börner A (2009) Molecular mapping of quantitative trait loci (QTLs) controlling aluminum tolerance in bread wheat. *Euphytica* 166 (2): 238-290

- Nezames C, Sjogren C, Barajas J, Larsen P. (2012). The *Arabidopsis* Cell Cycle Checkpoint Regulators TANMEI/ALT2 and ATR Mediate the Active Process of Aluminum-Dependent Root Growth Inhibition. *The Plant Cell* 24: 608-621
- Nicholaides III, Piha M (1987) A new methodology to select cultivars tolerant to aluminium and with high yield potential. In Workshop on Evaluating Sorghum for Tolerance to Al-Toxic Tropical Soils in Latin America, Cali (Colombia), 28 May-2 Jun 1984. CIAT.
- Howeler, R. H. (1987). Effective screening techniques for tolerance to aluminium toxicity. In Workshop on Evaluating Sorghum for Tolerance to Al-Toxic Tropical Soils in Latin America, Cali (Colombia), 28 May-2 Jun 1984. CIAT
- Panda S, Sahoo L, Katsuhara M, Matsumoto H (2013) Overexpression of Alternative Oxidase Gene Confers Aluminum Tolerance by Altering the Respiratory Capacity and the Response to Oxidative Stress in Tobacco Cells. *Molecular Biotechnology*. 54:551-563
- Panda A, Matsumoto H (2010) Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *Biometals* 23: 753-762
- Pejchar P, Potocký M, Novotná Z, Veselková S, Kocourková D, Valentová O, et al (2010) Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytologist* 188: 150-160
- Pleskot R, Potocký M, Pejchar P, Linek J, Bezvoda R, Martinec J, et al (2010) Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. *The Plant Journal* 62 (3): 494-507
- Pleskot R, Li J, Žárský V, Potocký M, Staiger C (2013) Regulation of cytoskeletal dynamics by phospholipase D and phosphatidic acid. *Trends in Plant Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.005>
- Poschenrieder C, Günsé B, Corrales I, Barceló J (2008) A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment* 400: 356-368
- Poschenrieder C, Amenós M, Corrales I, Doncheva S, Barceló J (2009) Root Behavior in Response to Aluminum Toxicity. *Plant-Environment Interactions Signaling and Communication in Plants*: 21-43
- Qi B, Korir P, Zhao T, Yu D, Chen S, Gai J (2008) Mapping Quantitative trait Loci Associated with Aluminum Toxin Tolerance in NJRIKY Recombinant Inbred Line Population of Soybean (*Glycine max*). *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (9): 1089-1095
- Raman H, Zhang K, Cakir M, Appels R, Garvin D, Maron L, et al (2005) Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 48: 781-791
- Ramos-Díaz A, Brito-Argáez L, Munnik T, Hernández-Sotomayor S (2007) Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 225(2): 393-401
- Rengel Z, Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome. *New Phytologist* 159:295-314
- Rincón-Zachary M, Teaster N, Sparks J, Valster A, Motes C, Blancaflor E (2010) Fluorescence resonance energy transfer sensitized emission of yellow cameleon 3.60 reveals root-zone-specific calcium signatures in *Arabidopsis* in response to aluminum and other trivalent cations. *Plant Physiology* 152:1442-58
- Rincón-Zachary M (2010) A possible mechanism and sequence of events that lead to the Al³⁺-induced [Ca²⁺]_{cyt} transients and inhibition of root growth. *Plant Signaling & Behavior* 5 (7): 881-884
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ju Ahn S, Ryan P, et al. (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 37: 645-653
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, et al (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiology* 150(1): 281-294.
- Siegel N, Haug A (1983) Aluminium interaction with calmodulin: evidence for altered structure and function from optical and enzymatic studies. *Biochemical Biophysics Acta* 744: 36-45
- Sivaguru M, Baluška F, Volkmann D, Felle H, Horst W (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology* 119: 1073-1082
- Sivaguru M, Horst W (1998) The distal part of the transition zone is the most aluminum sensitive apical root zone of maize. *Plant Physiology* 116:155-63
- Sivaguru M, Pike S, Gassmann W, Baskin T (2003) Aluminum Rapidly Depolymerizes Cortical Microtubules and Depolarizes the Plasma Membrane: Evidence that these Responses are Mediated by a Glutamate Receptor. *Plant and Cell Physiology* 44(7): 667-675
- Staiger C, Blanchoin L (2006) Actin dynamics: old friends with new stories. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 554-562
- ST.Clair D (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance Loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology* 48: 247-268
- Stevenson J, Perera I, Heilmann I, Persson S, Boss W (2000) Inositol signaling and plant growth. *TRENDS in Plant Science* 5: 252-258

- Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Reviews. Genetics* 9: 444-457
- Tian Q, Sun D, Zhao M, Zhang W (2007) Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist* 174: 322-331
- Trejo-Tellez L, Stenzel R, Gómez-Merino F, Schmitt (2010) Transgenic tobacco plants overexpressing pyruvate phosphate dikinase increase exudation of organic acids and decrease accumulation of aluminum in root. *Plant and Soil* 326: 187-198
- Thung M, Ortega J, Erazo O (1987) Breeding methodology for phosphorus efficiency and tolerance to aluminium and manganese toxicities for beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In Workshop on Evaluating Sorghum for Tolerance to Al-Toxic Tropical Soils in Latin America, Cali (Colombia), 28 May-2 Jun 1984. CIAT
- Valadez N, Colli J, Brito L, Muñoz J, Zuñiga J, Castaño E, Hernandez T (2007) Differential Effect of Aluminum on DNA Synthesis and CDKA Activity in Two *Coffea arabica* Cell Lines. *Journal of Plant Growth Regulation* 26:69-77
- Valencia R, y Ligarreto M (2010) Mejoramiento genético de la soya (*Glycine max* [L.] Merrill) para su cultivo en la altillanura colombiana: una visión conceptual prospectiva. *Agronomía Colombiana* 28 (2): 155-163
- Verbelen J, De Cnodder T, Vissenberg K, Baluška F (2006) The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signaling and Behavior* 1:296-304
- Von Uexküll H, Mutert E (1995) Global extend development and economic impacts of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1-15
- Wang Y, Yang Z (2005) Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiology* 46:1915-1923
- Wang H, Huang J, Liang W, Liang X, Bi Y (2013) Involvement of putrescine and nitric oxide in aluminum tolerance by modulating citrate secretion from roots of red kidney bean. *Plant Soil* 366:479-490
- Wen X, Banc Y, Inouea H, Matsudad N, Moriguchi T (2009) Aluminum tolerance in a spermidine synthase-overexpressing transgenic European pear is correlated with the enhanced level of spermidine via alleviating oxidative status. *Environmental and Experimental Botany* 66: 471-478
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma J (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(43): 18381-18385.
- Xu F, Li G, Jin C, Liu W, Zhang S, Zhang Y, et al (2012) Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. *Biologic plantarum* 56(1): 89-96
- Yakimova E, Kapchina-Toteva V, Woltering E (2007) Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology* 164: 702-708
- Yamaji N, Feng C, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y, et al (2009) A Zinc Finger Transcription Factor ART1 Regulates Multiple Genes Implicated in Aluminum Tolerance in Rice. *The Plant Cell* 21: 3339-3349
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H (2001) Lipid Peroxidation Is an Early Symptom Triggered by Aluminum, But Not the Primary Cause of Elongation Inhibition in Pea Roots. *The Plant Physiology* 125:199-208
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S, Rikiishi S, Matsumoto H (2002) Aluminum Toxicity Is Associated with Mitochondrial Dysfunction and the Production of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology* 128: 63-72
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S, Rikiishi S, Matsumoto H (2003) Oxidative stress triggered by aluminum in plant roots. *Plant and Soil* 255: 239-243
- Yang J, Li Y, Zhang Y, Zhang S, Wu Y, Wu P, et al (2008) Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology* 146: 602-611
- Yang J, Zhu X, Peng Y, Zheng C, Li G, Liu Y, Shi Y, Zheng S (2011) Cell Wall Hemicellulose Contributes Significantly to Aluminum Adsorption and Root Growth in *Arabidopsis*^{10A1}. *Plant Physiology* 155: 1885-892
- Zhang L, Mehta S, Liu Z, Yang Z (2008) Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiologist* 49:411-419
- Zhao J, Wang C, Bedair M, Welti R, Sumner L, Baxter I, Wang X (2011) Suppression of Phospholipase Dcs Confers Increased Aluminum Resistance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 6(12):1-11

Tolerancia al aluminio en especies vegetales: mecanismos y genes

Resumen. Un problema para la producción agrícola en la Orinoquia colombiana, son los 4,5 millones de hectáreas con altos contenidos de aluminio. Genotipos de diferentes especies presentan niveles de tolerancia a través de diversos mecanismos, las vías de señalización también pueden diferir, por lo que no se cuenta con un modelo único. Algunas de las moléculas comunes que participan en la respuesta de tolerancia se determinaron. Para identificar genes candidatos a utilizar en el desarrollo de cultivares tolerantes al aluminio, se consultó artículos científicos publicados entre 1987 y 2013. Mediante el reporte de uso de técnicas convencionales de hibridación, mutación, selección asistida por marcadores moleculares y transferencia de genes, se obtuvieron datos de materiales tolerantes evidenciándose mecanismos moleculares para tolerancia al aluminio. Se encontraron reportados genes total y parcialmente caracterizados, con uso potencial en ingeniería genética y en selección asistida por marcadores, para la obtención de genotipos tolerantes al aluminio.

Palabras clave: Factor de transcripción; gen; tolerancia al aluminio.

Tolerância ao alumínio em espécies vegetais: mecanismos e genes

Resumo. Um problema para a produção agrícola no Orinoco da Colômbia, são os 4,5 milhões de hectares com alto teor de alumínio. Genótipos de diferentes espécies apresentam tolerância através de diferentes mecanismos, as vias de sinalização também podem ser diferentes, de modo que não existe um modelo único. Algumas das moléculas comuns envolvidas na resposta da tolerância foram determinadas. A fim de identificar genes candidatos para uso no desenvolvimento de cultivos tolerantes ao alumínio foram consultados artigos científicos publicados entre 1987 e 2013. Por meio de técnicas convencionais que utilizam a hibridização, mutação, seleção assistida por marcadores moleculares e de transferência de genes, obtiveram-se dados de materiais tolerantes e se evidenciou mecanismos moleculares para tolerância ao alumínio. Encontraram-se reportados vários genes total e parcialmente caracterizados, com uso potencial na engenharia genética e na seleção assistida por marcadores, para a obtenção de genótipos tolerantes ao alumínio.

Palavras-chave: Fator de transcrição; gen; tolerância ao alumínio.