



# MÁSTERES de la UAM

Facultad de Ciencias /11-12

Máster en Química  
Agrícola y Nuevos  
Alimentos



**Efectos de la  
aplicación del ácido  
naftalenacético al  
cultivo de altramuz  
blanco, sobre sus ca-  
pacidades adapta-  
tivas a condiciones  
desfavorables para  
su crecimiento.**

*Diego Alonso Gómez  
Salazar*

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Culminado este proyecto de investigación, quiero dar mis agradecimientos al Dr. Ramón Carpena Ruiz por la confianza dada durante el fuerte trabajo que se realizó a lo largo de estos meses. Esto representó un incentivo para poner el máximo empeño en la realización de los experimentos y de este informe, y espero haberme puesto a la altura del compromiso asumido. También externo mi agradecimiento a la doctoranda Teresa Fresno García, por su disposición amable para colaborar con las incidencias que se iban presentando, siempre de manera atenta y en el momento, y espero que le vaya muy bien en todo el trabajo que tiene por delante para conseguir su doctorado.

A modo personal, este trabajo representa la finalización de un proyecto que en cuestión de tiempo representa la duración de los estudios, más un año de preparación para emprender esta aventura. En este sentido quiero empezar por dedicar este proyecto a mis padres, no tengo como agradecerles el apoyo tan incondicional que siempre me dieron respecto a venirme a estudiar a España, y porque sé que no ha habido un día en que dejen de estar pendiente de si estoy bien. Muchas gracias, y esto es para ustedes. Son lo más grande que tengo y los quiero mucho.

Agradezco también a mi amigo Julio Bastos, quien se encuentra realizando su doctorado en Barcelona, por la gran ayuda durante los meses previos a emprender el viaje. Siempre lo tendré muy presente, sos un gran amigo. Y muy importante, quiero externar un agradecimiento muy grande a mi familia en Madrid (Leo, Zulay, Nicky y Debby), por haberme abierto las puertas de su casa. De verdad siento que es poco decir nada más GRACIAS, pero se los digo de todo corazón. Lo que han hecho por mí es algo muy grande, el permitirme vivir con ustedes y con la calidez de una familia increíble como la que hacen para mí significa mucho. Que Dios los bendiga y que me les vaya muy bien en todo.

Por último y no siendo menos importante, quiero dar las gracias a Dios y a la Virgencita de los Ángeles por todas las bendiciones recibidas en este tiempo.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Exudación de ácidos orgánicos como respuesta de las plantas a condiciones de cultivo deficientes de fósforo.....	1
1.1.1 Generalidades de la exudación de ácidos orgánicos.....	1
1.1.2 Raíces proteoides y exudación en el altramuz blanco.....	2
1.1.3 Experimentos previos con aplicación de auxinas en el cultivo de altramuz blanco.....	3
1.1.4 La bioquímica involucrada en la exudación de ácidos orgánicos.....	4
1.1.4.1 Alteración metabólica: el incremento en los niveles de ácidos orgánicos en las raíces....	4
1.1.4.2 Incremento en el transporte del anión citrato por la membrana plasmática.....	5
1.1.5 Otros hallazgos relacionados con la aplicación de auxinas, la formación de estructuras radiculares y la exudación de ácidos orgánicos en otros tejidos.....	6
1.1.6 Resumen de antecedentes.....	7
1.1.6.1 En altramuz blanco.....	7
1.1.6.2 En otros cultivos.....	8
1.2 Fitoinmovilización del arsénico por las raíces del altramuz blanco.....	8
1.2.1 Dinámica del arsénico.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
3.1 Cultivo seleccionado.....	11
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Tratamientos realizados.....	12
3.2.1.1 Sobre la elección de las dosis de fósforo, arsénico y ácido naftalenacético.....	13
3.2.2 Detalle experimental de las condiciones de cultivo.....	14
3.2.2.1 Germinación de las semillas.....	14
3.2.2.2 Desarrollo de las plantas.....	14
3.2.2.3 Aplicaciones de la auxina a las plantas en desarrollo.....	15
3.2.2.4 Ensayos preliminares para determinar el momento de toma de exudados luego de la aplicación de la auxina.....	16
3.2.3 Método para la recolección de exudados.....	17
3.2.4 Procesado de los tejidos.....	17
3.2.4.1 Procesado para la medición de arsénico.....	18
3.2.4.2 Procesado para la determinación de ácidos orgánicos.....	18
3.2.5 Determinaciones analíticas.....	18
3.2.5.1 Análisis de ácidos orgánicos en tejidos y exudados.....	18
3.2.5.2 Análisis de arsénico.....	19

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>20</b>
4.1 Efecto de la adición de diferentes dosis de NAA sobre la exudación de ácidos orgánicos, por las raíces de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo.....	20
4.1.1 Exudados de ácidos orgánicos y mediciones físicas de las plantas.....	20
4.1.2 Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.....	25
4.1.3 pH en los tiestos de cultivo de las plantas.....	28
4.2 Efecto de la adición del NAA sobre la absorción de arsénico por plantas de altramuz blanco cultivado con suministro de fósforo.....	29
4.2.1 Exudados de ácidos orgánicos.....	29
4.2.2 Efecto de las dosis de fósforo y arsénico seleccionadas sobre el peso total de las plantas	29
4.2.3 Efecto de los tratamientos con NAA sobre las medidas físicas de las plantas cultivadas con suministro de fósforo y en presencia de arsénico.....	30
4.2.4 Efecto de los tratamientos con NAA en la absorción de arsénico en plantas de altramuz blanco cultivadas con suministro de fósforo.....	33
4.2.4.1 ¿El tratamiento con NAA podría tener también un efecto en la capacidad fitoextractora del altramuz blanco?.....	35
4.2.5 Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.....	35
4.3 Efecto de la adición del NAA sobre la absorción de arsénico por plantas de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo.....	37
4.3.1 Exudados de ácidos orgánicos y mediciones físicas de las plantas.....	37
4.3.2 Efecto de los tratamientos con NAA en la absorción de arsénico en plantas de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo.....	38
4.3.3 Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.....	39
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Exudación de ácidos orgánicos como respuesta de las plantas a condiciones de cultivo deficientes de fósforo.

### 1.1.1. Generalidades de la exudación de ácidos orgánicos.

La exudación de ácidos orgánicos como el citrato, malato, oxalato, succinato y fumarato por las raíces de las plantas constituye un mecanismo de respuesta ante diferentes situaciones de estrés, que pueden ser de tres tipos (Delhaize y Jones, 2001):

- Estrés nutricional debido a la deficiencia de algún elemento.
- Estrés por la presencia de algún elemento tóxico.
- Estrés por un suministro bajo de oxígeno (condiciones de anoxia).

Ante estos estímulos las raíces pueden excretar varias sustancias, que van desde moléculas pequeñas como los ácidos orgánicos y fenoles, hasta macromoléculas como las enzimas. Estos exudados van a cumplir una función dependiendo del tipo de estrés: en el caso de una situación nutricional van a lograr que la planta tenga la posibilidad de disponer de más nutriente limitante; y ante un elemento tóxico, el exudado puede interactuar con éste para que ya no sea absorbido, o que pueda absorberlo pero de una forma en la que se acumule sin perjuicio para la planta. En el caso de una situación de anoxia, la planta realiza respiración anaeróbica en la cual se produce etanol o ácido láctico como productos, los cuales de ser acumulados en exceso en la planta pueden ocasionar un daño y por tanto son exudados (Delhaize y Jones, 2001).

La exudación de ácidos orgánicos generalmente se va a encontrar limitada a zonas específicas de las raíces, por ejemplo a los ápices de las raíces en el caso de la colza (*Brassica Napus*), y a los clusters de raicillas que se generan en las raíces proteoides del altramuz blanco (*Lupinus Albus*) (Delhaize y Jones, 2001). Esta última fue la planta seleccionada en este proyecto.

### 1.1.2. Raíces proteoides y exudación en el altramuz blanco.

El término “raíz proteoide” se debe a que las primeras plantas que se reportaron con esta morfología de raíces pertenecían a la familia de las proteáceas. Se entiende por **raíz proteoide** a aquella que posee uno o más clusters de raicillas (figura 1.1). Por su parte un **clúster** se define como una aglomeración de raíces cortas (de alrededor de 0,5 cm de longitud) que puede aparecer a lo largo de una raíz lateral (Watt y Evans, 1999). Estas estructuras van a acumular una mayor concentración de ácidos orgánicos alrededor de su superficie, y como consecuencia van a solubilizar más fósforo que aquellas raíces que no poseen clusters (Kihara *et al.*, 2003).



**Figura 1.1.** Sistema radicular de una planta de altramuz blanco con 21 días de desarrollo, cultivada bajo deficiencia de fósforo. Las raíces laterales que se han formado a este momento pueden considerarse como proteoides, ya que han desarrollado por completo el primer clúster de raicillas.

Las raíces proteoides son características del altramuz blanco, una leguminosa perteneciente al género *Lupinus* que tiene importancia a nivel comercial como forraje (Ballester *et al.*, 1980). A diferencia de las proteáceas, en las que toda la familia genera este tipo de raíces, estas raíces van a encontrarse solo en algunas leguminosas. Incluso dentro del género *Lupinus*, solo algunas especies forman raíces proteoides (Skene y James, 2000). El estímulo más estudiado para los exudados de este cultivo ha sido la deficiencia de fósforo, aunque la cuantificación de exudados ante elementos como el cobre y el aluminio también se ha reportado (Jung *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). La planta sí se ha estudiado respecto al consumo y movilidad de diferentes metales pesados, y se ha observado que la planta es capaz de transportar a las partes superiores el Mn, Ni y Zn, así como producir también una fuerte acumulación de Co y Cd en raíces (Page *et al.*, 2006, Vázquez *et al.*, 2006, Zornoza *et al.*, 2002).

Es conocido el papel que tienen los diferentes tipos de fitohormonas en el desarrollo de las raíces; sería de esperar que la formación de estructuras radiculares especiales como lo son clusters, también se encuentre regulada por estos compuestos. Su papel incluso podría ir más allá del crecimiento de estas estructuras, viéndose además involucradas en la función exudatoria. En este trabajo se ha seleccionado una auxina sintética, el ácido naftalenacético (NAA por sus siglas en inglés), como fitohormona a adicionar en los diferentes tratamientos para observar su respuesta en el desarrollo de las raíces y en la exudación de de ácidos orgánicos.

### 1.1.3. Experimentos previos con aplicación de auxinas en el cultivo de altramuz blanco.

El estudio del efecto de las auxinas en las raíces del altramuz blanco se originó en la observación de que las plantas desarrolladas con un suministro suficiente de fósforo no desarrollan raíces proteoides, y la exudación de ácidos orgánicos es muy baja. Con la aplicación de auxinas naturales y sintéticas como el ácido indolacético, ácido indolbutírico y ácido naftalenacético se ha logrado simular la formación de raíces proteoides en plantas cultivadas con un suministro alto de fósforo, con morfologías iguales a las que se generan naturalmente bajo la deficiencia de fósforo, pero tales raíces no exudan ácidos orgánicos (Gilbert *et al*, 2000; Hocking y Jeffery, 2004; Neumann *et al*, 2000; Skene y James, 2000).

Tal observación no resulta extraña dado que el desarrollo de los clusters y la posterior exudación de ácidos orgánicos se originan en el estrés ocasionado por la deficiencia de fósforo. Al respecto debe diferenciarse dos partes íntimamente ligadas sobre la generación de tal deficiencia en el cultivo. Si las plantas son cultivadas en hidroponía en ausencia de fósforo las raíces proteoides se desarrollan, sin embargo se ha reportado que si se omite el fósforo en la disolución nutritiva, pero se hacen aplicaciones foliares del elemento es posible suprimir la formación de los clusters (Marschner *et al*, 1987). Este comportamiento refleja que la planta responde a los niveles internos de fósforo más que a la composición del ambiente que rodea a las raíces, aunque la realidad en los suelos es que al haber un contenido de fosforo disponible bajo (situación de la mayoría de los suelos), se van a producir raíces proteoides dado que estos niveles bajos generarán la deficiencia en el interior de la planta.

El efecto de la aplicación de auxinas sobre la exudación de ácidos orgánicos en altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo no se ha reportado, la investigación publicada

hasta el momento se refiere únicamente a la no exudación observada en las plantas cultivadas con suministro adecuado de fósforo y con adición de auxina.

#### 1.1.4. La bioquímica involucrada en la exudación de ácidos orgánicos:

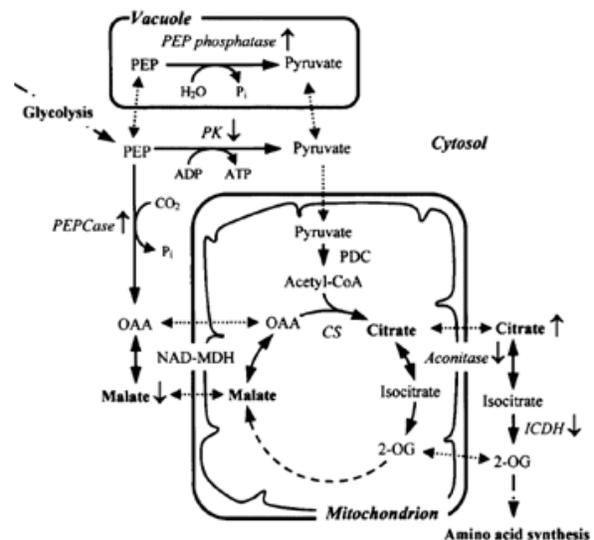
El fenómeno global de la exudación de ácidos orgánicos tiene dos componentes (Kihara *et al.*, 2003):

- Uno relacionado con los mecanismos que incrementan los niveles internos de los ácidos orgánicos en las raíces. La deficiencia de fósforo debe ocasionar por tanto una *alteración a nivel metabólico*.
- Otro relacionado con que exista un mecanismo en la membrana que permita la salida de los compuestos hacia la rizosfera, entendiéndose por este un canal aniónico (al pH cercano a 7 del citosol los ácidos orgánicos van a encontrarse como aniones).

##### 1.1.4.1 Alteración metabólica: el incremento en los niveles de ácidos orgánicos en las raíces.

Los exudados más relevantes en el caso del altramuz blanco son el citrato y el malato, y en términos de cantidad exudada por mucho el más importante es el citrato (Dessureault-Rompré *et al.*, 2006), de manera que se hará énfasis en la biosíntesis de este ácido orgánico.

El citrato se produce por la unión del oxaloacetato (OAA) con la acetil coenzima A (acetil-CoA) mediante la acción de la enzima citrato sintasa (CS) en la mitocondria (figura 1.2). Para que esta enzima pueda actuar se requiere un suministro adecuado de los



**Figura 1.2.** Representación de la alteración en el metabolismo del citrato en los clusters maduros del *Lupinus Albus* bajo condiciones de deficiencia de fósforo (Kihara *et al.*, 2003).

materiales de partida, de manera que también va a ser relevante la actividad de las enzimas que los producen. Pero por otro lado el catabolismo del citrato puede disminuir los niveles del compuesto que se encuentren en las raíces, específicamente por la conversión del citrato al 2-oxoglutarato (2-OG). Entonces mediante el bloqueo de esta vía podría aumentarse los contenidos del compuesto en estas partes (Kihara *et al.*, 2003). Una mayor actividad de la CS, así como de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCase) y la malato deshidrogenasa (MDH), y una menor actividad de la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) respaldan esta teoría. La expresión de estas enzimas está controlada por el ambiente (luz, contenido de sales), y por estímulos internos (hormonales, de desarrollo) (Uhde-Stone *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.2. Incremento en el transporte del anión citrato por la membrana plasmática

Se ha encontrado que la correlación entre la concentración interna de citrato y la exudación de citrato es débil. Por ejemplo, tanto los clusters maduros como los que están en senescencia contienen concentraciones similares de citrato, pero únicamente los maduros liberan citrato (Zhang *et al.*, 2004). La exudación de aniones orgánicos por el altramuz blanco sigue un patrón espacial (únicamente en los clusters) y temporal (varía según la etapa de desarrollo) (Tomasi *et al.*, 2009). Tales hallazgos sugieren que la exudación de ácidos orgánicos de este tipo de raíces no está controlada únicamente por la síntesis de los compuestos, y que más bien existe un mecanismo coordinado que involucra varios factores. Los transportadores que facilitan el movimiento de los aniones orgánicos a través de la membrana plasmática probablemente juegan un papel importante en la regulación de la exudación de estos aniones orgánicos (Zhang *et al.*, 2004). Además al no haber exudación en los clusters senescentes, que tienen una concentración de citrato en tejido muy similar a los clusters maduros (que sí exudan), se descarta la idea de que liberación tan alta se deba simplemente a una fuga como resultado de una pérdida de la integridad de la membrana ocasionada por la deficiencia de fósforo (Neumann *et al.*, 2000).

Sobre la existencia de canales permeables al citrato presentes en la membrana plasmática, una observación consistente con esta hipótesis es que el flujo de citrato en los clusters del altramuz blanco es sensible a bloqueadores de canales aniónicos tales como el ácido antraceno-9-carboxílico y el ácido etacrínico. Mediante la experimentación con protoplastos de las raíces se ha realizado una descripción de lo que podrían ser estos canales. Al

respecto se indicó que el mismo canal es permeable para el citrato y para el malato, por lo que un mismo transportador puede ser el responsable para la excreción de ambos aniones (Zhang *et al.*, 2004).

Se ha sugerido una correlación entre la liberación del citrato y protones, mediante una H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática que libera protones en el momento de la exudación de aniones orgánicos. Los resultados obtenidos indican que las raíces proteoides presentan un incremento en la actividad de la H<sup>+</sup>-ATPasa. La acidificación de la rizosfera, simultáneamente con la liberación de los aniones orgánicos es algo que se ha reportado. Dado que a los valores de pH del citosol los ácidos orgánicos se encuentran como aniones, y por la presencia de sistemas de transporte de citrato en la membrana plasmática de las células de las raíces del altramuz blanco, es probable que se requieran protones como fuente de energía y para la compensación de cargas durante la exudación de los aniones orgánicos (Tomasi *et al.*, 2009). Como resultado la rizosfera se acidifica (Neumann *et al.*, 2000)

#### **1.1.5. Otros hallazgos relacionados con la aplicación de auxinas, la formación de estructuras radiculares y la exudación de ácidos orgánicos en otros cultivos.**

Aparte de la aplicación exógena de auxinas para producir clusters en plantas cultivadas con suministro suficiente de fósforo, se ha estudiado el efecto de sustancias inhibitoras del transporte de auxinas desde las partes superiores a las raíces. Dos de estas sustancias son el TIBA (ácido-2,3,5-triyodobenzoico) y el NPA (ácido-N-(1-naftil) ftalámico, conocido como Naptalam), y se encontró que con ambas sustancias se suprime la formación de los clusters (Neumann *et al.*, 2000).

El ácido indolacético (IAA) tiene un papel importante en la generación de resistencia a diferentes tipos de estrés. Se ha visto que puede reducir el efecto tóxico del Cu<sup>+2</sup> en las raíces del girasol, lográndose producir raíces más largas y con pelos radiculares (Ouzounidou e Ilias, 2005). Se ha reportado además que esta auxina puede regular la actividad de los canales aniónicos en células vegetales. Por ejemplo se ha demostrado que puede interactuar directamente con la parte extracelular de los canales aniónicos de las células oclusivas para provocar la apertura de los estomas (Marten *et al.*, 1991). También puede ocasionar un desplazamiento del potencial de activación de la corriente aniónica en protoplastos de tabaco en cultivos de células en suspensión (Sabine *et al.*, 1994). *Y muy*

*recientemente se ha reportado que el IAA produce un incremento significativo en la exudación de malato de las raíces de trigo expuestas a Al.* En el caso del trigo existe la particularidad de que se tienen caracterizados los genes que codifican el canal aniónico que exuda malato por exposición al aluminio (Yang *et al.*, 2011). Tal información aun no se conoce para el altramuz blanco.

Aparte de la aplicación de auxinas, se ha probado el uso de otras fitohormonas como parte de la resistencia de las plantas a situaciones de estrés (Yang, 2011). La aplicación exógena de ácido abscísico puede incrementar la excreción de citrato inducida por el aluminio en soja (Shen, 2004), la exudación de oxalato en trigo sarraceno (“buckwheat”) en condiciones libres de aluminio (Ma *et al.*, 2001), y aminorar la inhibición en la elongación de raíces en la soja expuesta a aluminio (Shen *et al.*, 2004).

#### **1.1.6. Resumen de antecedentes**

El posible efecto de la adición de una auxina sobre la exudación de ácidos orgánicos, en altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo no se ha reportado. Los principales antecedentes que justifican los experimentos realizados, tanto en altramuz blanco como en otros cultivos se detallan a continuación.

##### **1.1.6.1. En altramuz blanco.**

- El altramuz blanco desarrolla clusters de raicillas en sus raíces principales bajo la deficiencia de fósforo. Estos clusters son capaces de liberar ácidos orgánicos, en especial citrato y en menor grado malato.
- La exudación es una respuesta hacia el estrés ocasionado por una deficiencia a nivel interno de fósforo. Con un suministro suficiente de fósforo no se generan los clusters, ni hay exudación significativa de ácidos orgánicos.
- Mediante la aplicación de auxinas naturales y sintéticas se ha notado que es posible que las raíces de esta planta produzcan clusters bajo un suministro adecuado de fósforo. Sin embargo tales clusters exudan muy pocos ácidos orgánicos.
- La aplicación de inhibidores del transporte de auxinas desde las partes superiores a las raíces también pueden inhibidor el desarrollo de raíces proteoides.

- La acumulación de ácidos orgánicos en las raíces y el fenómeno de exudación es el resultado de la acción de diferentes enzimas, dentro de las cuales se puede mencionar la fosfoenolpiruvato carboxilasa, de la que se ha reportado que su expresión está controlada entre otras cosas por efectos hormonales.

-

#### **1.1.6.2. En otros cultivos.**

- Se ha visto que las auxinas tiene un papel importante en la generación de resistencia a situaciones de estrés como la presencia de metales pesados.
- El papel de las auxinas en procesos que involucran canales aniónicos también se ha demostrado.
- A nivel de exudados, recientemente se reportó el incremento en la exudación de malato en las raíces de trigo expuestas a aluminio debido a la adición de ácido indolacético.
- La aplicación de otras fitohormonas como el ácido abscísico también puede alterar la exudación de ácidos orgánicos ante la presencia de metales pesados, e inclusive sólo con la aplicación de la fitohormona sin otro estímulo, como en el caso del trigo sarraceno.

### **1.2. Fitoinmovilización del arsénico por las raíces del altramuz blanco.**

La fitoinmovilización puede contribuir significativamente a la disminución de la solubilidad de metales y la revegetación de lugares contaminados. Este proceso se basa en la habilidad de las raíces y/o los microorganismos asociados para impedir el movimiento de los contaminantes en el suelo y su transferencia a la parte aérea de la planta. Algunos de los mecanismos involucrados incluyen la precipitación de los contaminantes en formas insolubles en el suelo y su acumulación en las vacuolas de las raíces (Bernal, M. et al, 2007).

El altramuz es una especie resistente a niveles elevados de elementos tóxicos en el suelo, con fuerte carácter exclusor, y gran capacidad para retenerlos en las raíces, evitando su transporte a la parte aérea donde se encuentran los tejidos fotosintéticos indispensables para la vida de la planta (Bernal, M. et al, 2007).

### 1.2.1. Dinámica del arsénico en planta.

Las plantas toman el arsénico principalmente en forma de arseniato, especie que predomina en suelos con niveles normales de oxígeno. Varios estudios han demostrado que el arseniato y el fosfato comparten el mismo sistema de transporte en plantas superiores, aunque los transportadores implicados tienen mayor afinidad por el fosfato que por el arseniato. El mecanismo de absorción implica el cotransporte de fosfato o arseniato y protones, con una estequiometría de 2 H<sup>+</sup> por cada ion H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> o H<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub><sup>-</sup> (Fresno, T., 2010).

Una vez en el interior de la célula, el arseniato es reducido a arsenito mediante consumo de glutatión en su forma reducida. Esta reacción se encuentra catalizada por una enzima que se ha denominado arseniato reductasa. A raíz de lo anterior, se ha comprobado que la mayoría del arsénico en tejidos vegetales está presente en la forma de arsenito. Esta forma tiene gran afinidad por los grupos tiol, y puede quedar almacenada en la vacuola, aunque también es posible su transporte por el xilema hacia otros tejidos (Moreno, E., 2010).

A diferencia del fósforo, el arsénico es un elemento poco móvil con respecto a la translocación de la raíz a las partes superiores en la gran mayoría de los cultivos, excepto en las plantas que se consideran como hiperacumuladoras, donde sí ocurre acumulación en las partes aéreas. Esto podría deberse a la acumulación en vacuola mencionada anteriormente (Fresno, T. 2010).

El efecto de la adición de una auxina sobre la capacidad de exclusión de arsénico por parte de las raíces de altramuz blanco se desconoce, por lo que se realizaron los experimentos correspondientes tanto en presencia como en ausencia de fósforo.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar los efectos de la aplicación de una auxina sintética -el ácido naftalenacético-, sobre dos adaptaciones que las plantas de altramuz blanco son capaces de realizar ante la deficiencia de un nutriente (fósforo), y la presencia un elemento tóxico (el arsénico); que son respectivamente, la exudación de ácidos orgánicos y la exclusión de arsénico por las raíces de la planta.

Para ello se propuso:

- Estudiar las variaciones en la exudación de ácidos orgánicos, que se producen en las plantas de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo, luego de varias aplicaciones de NAA a diferentes concentraciones.
- Cuantificar los efectos en el crecimiento de las diferentes secciones de la planta debido a los tratamientos hormonales.
- Determinar si la adición de la auxina en cada caso produce una variación en el grado en que se acidifica la rizosfera debido a la exudación de ácidos orgánicos, lo cual también tiene un efecto positivo para la adquisición de otros nutrientes.
- Estudiar las variaciones en las concentraciones de arsénico que resultan en partes superiores y aéreas, debido a los tratamientos con la auxina seleccionada.
- Estimar las variaciones en los contenidos de los ácidos orgánicos presentes en los tejidos, que puedan deberse tanto a la adición de la auxina, como a la presencia de arsénico, para tener una idea de las alteraciones a nivel metabólico que se producen en cada caso.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Cultivo seleccionado.

El altramuz blanco es una planta anual de germinación epigea y de sistema radicular desarrollado, con gran cantidad de raíces secundarias y raicillas a lo largo de estas. Las hojas son medianas, palmeadas y compuestas, sin zarcillos, presentando entre 5 y 11 folíolos de forma oblonga. Es crecimiento erecto y puede llegar hasta más de 75 cm (Maroto, 2004).

Se trata de una especie cultivada en el área mediterránea desde hace más

de 3000 años, siendo España uno de los países más ricos en flora autóctona del altramuz. Esta especie en específico (*Lupinus Albus*) es cultivada en la zona sur y oeste del país. Las zonas de cultivo están limitadas por el suelo, considerándose un cultivo de los suelos ácidos españoles, ya que no es posible cultivarlo en suelos con un pH superior a 6,8 o en los que contienen calcio activo. El interés del cultivo del altramuz se debe a su poder de enriquecimiento del suelo y al ser su semilla una fuente importante de proteínas (Paramio y Martínez, 1985). Aparte de su capacidad de movilizar las reservas de nutrientes del suelo, por tratarse de una leguminosa también realiza la fijación de nitrógeno atmosférico. Todo esto se traduce en que el altramuz blanco es capaz de crecer en suelos degradados y pobres en nutrientes, típicos de zonas contaminadas (Bernal *et al.*, 2007).



**Figura 3.1.** Campo de cultivo de altramuz blanco en Reino Unido, para la producción de semillas a utilizarse como aporte de proteína para la alimentación de ganado. Fuente: Rothamsted Research Institute ([http://www.rothamsted.ac.uk/aen/nut\\_dyn/nutdyn.htm](http://www.rothamsted.ac.uk/aen/nut_dyn/nutdyn.htm))

## 3.2. Métodos.

### 3.2.1 Tratamientos realizados.

Se cultivaron plantas de altramuz blanco tanto en presencia como en ausencia de un macronutriente (el fósforo), y lo mismo respecto a un elemento tóxico para la planta (el arsénico). De las cuatro combinaciones posibles entre nutriente y elemento tóxico, se hicieron tratamientos con auxinas en todos los casos menos en el medio nutricional con fósforo y sin arsénico (tratamiento "+P"), dado que los resultados de la aplicación de NAA con suministro de fósforo se ha reseñado previamente en otras publicaciones, con el resultado de que se forman clusters de raicillas pero que no exudan ácidos orgánicos (Hocking y Jeffery, 2004). La figura 3.2 muestra en detalle los tratamientos realizados, que se desarrollaron en once tiestos de cultivos, cada uno con capacidad para 10 L de disolución nutritiva y en los que se colocaron 30 plantas.



**Tratamientos deficientes de fósforo**

	Sin As			Con As	
	10 <sup>-7</sup> M NAA	10 <sup>-8</sup> M NAA	10 <sup>-9</sup> M NAA	No auxina	10 <sup>-8</sup> M NAA
No auxina					

**Tratamientos con suministro de fósforo**

	Con As				
	No auxina	No auxina	10 <sup>-7</sup> M NAA	10 <sup>-8</sup> M NAA	10 <sup>-9</sup> M NAA
No auxina					

### SIMBOLOGÍA USADA EN EL DOCUMENTO

"-P"	"-P + NAA 10 <sup>-7</sup> M"	"-P + NAA 10 <sup>-8</sup> M"	"-P + NAA 10 <sup>-9</sup> M"	"-P + +As"	"-P +As +NAA 10 <sup>-8</sup> M"	" +P"	" +P +As"	" +P +As +NAA 10 <sup>-7</sup> M"	" +P +As +NAA 10 <sup>-8</sup> M"	" +P +As +NAA 10 <sup>-9</sup> M"
------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	------------	----------------------------------	-------	-----------	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Figura 3.2. Tratamientos aplicados en los experimentos.

### 3.2.1.1. Sobre la elección de las dosis de fósforo, arsénico y el ácido naftalenacético.

**Tabla 3.1.** Dosis de fósforo y arsénico adicionada en cada tratamiento.

Tratamiento	Dosis de fosfato adicionada (mM)	Dosis de arseniato adicionada (mM)
"-P"	0	0
"+P"	0,250	0
"+P +As"	0,250	0,025
"-P + As"	0	0,025

Las dosis seleccionadas de fósforo y arsénico se muestran en la Tabla 3.1. La primera dosis que se estableció fue la de fosfato. En los trabajos realizados por Skene y James (2000), y Neumann *et al.* (1999), se indicaba que una dosis de 0,25 mM es suficiente para inhibir la formación de clusters en un tratamiento "+P"; esto justifica la utilización de esta cantidad.

Para la selección de la dosis de arsénico se utilizó como base el trabajo de Esteban *et al.* (2003), en el cual se realizaron experimentos hidropónicos en ausencia y presencia tanto de fósforo como de arsénico. La dosis de fosfato y arseniato adicionada fue de 1,5 mM y 0,1 mM respectivamente, por lo que se guardó una relación As/P de aproximadamente 1/10, que al aplicarse en este ensayo resulta en una concentración de arseniato de 0,025 mM. No obstante esta dosis fue verificada con el trabajo realizado por Moreno-Jiménez *et al.* (2010), en el cual se trató el problema de la selección de la dosis de As para un ensayo en hidroponía. En esta publicación los autores mencionan que la dosis adicionada en muchos ensayos hidropónicos realizados con anterioridad era muy elevada, y no guardaba relación con los niveles encontrados en suelos contaminados con arsénico, por lo que se realizó un ensayo con altramuz blanco para estimar un rango de dosis para un experimento hidropónico, que permitiese extrapolar los resultados a condiciones reales de un suelo contaminado. El valor máximo que debería usarse es de 10  $\mu$ M, sin embargo para guardar la relación del trabajo de Esteban *et al.* (2003) se mantuvo finalmente una dosis de 25  $\mu$ M, que representa un escenario peor, pero que tampoco es desproporcionado respecto al trabajo de Moreno-Jiménez *et al.* (2010).

Finalmente la dosis de auxina se seleccionó utilizando el trabajo de Skene y James (2000). En este se hizo un barrido desde  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-12}$  M de NAA para encontrar la dosis que produjera las raíces en condiciones "+P", que fuesen más similares a las que se producen en los tratamientos "-P". Las dosis que resultaron mejores para este fin corresponden a las del rango  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-9}$  M, que fueron los tres niveles de concentración usados en este ensayo.

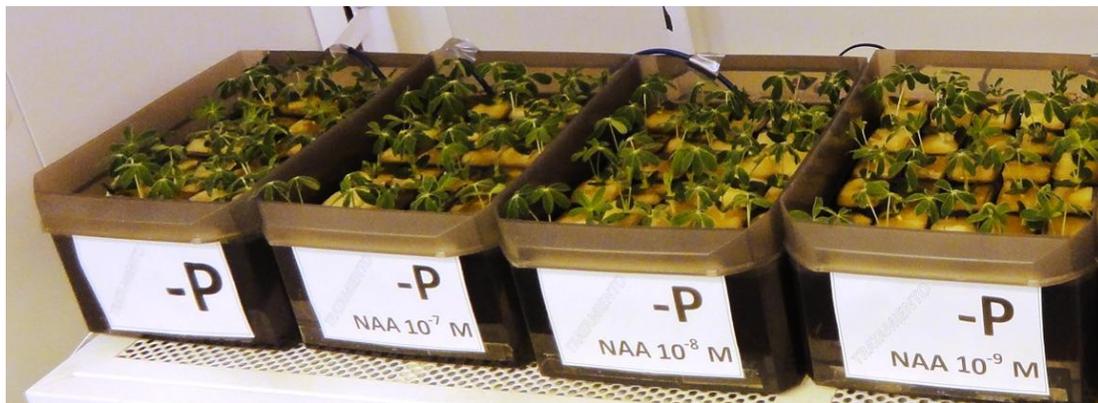
### 3.2.2. Detalle experimental de las condiciones de cultivo.

#### 3.2.2.1. Germinación de las semillas

Las semillas previamente esterilizadas en su superficie fueron germinadas en medio de papel toalla humedecido con agua destilada y  $\text{CaSO}_4$  0,25 mM, las cuales se colocaron en una estufa a 28 °C y se dejaron allí durante 72 horas. Las semillas que germinaron se trasladaron a tiestos de 3,5 L en los que se colocaron 24 semillas germinadas por tiesto. Estos fueron llevados a la cámara de cultivo (Dycometal) del Departamento de Química Agrícola de la Universidad Autónoma de Madrid. Las lámparas disponibles proporcionaban una intensidad de luz de aproximadamente  $520 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , y la cámara se programó con un ciclo de día/noche de 13 h/11 h con temperaturas de 25 °C/ 20 °C y humedad relativa de 40 %/ 60 %.

Los tiestos se llenaron de disolución nutritiva de fuerza 0,25 respecto a la nominal, la cual se mantuvo con aireación constante y se dejaron en desarrollo durante 8 días más (hasta el día 11 desde la germinación). La composición de la disolución nutritiva fue la siguiente:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mM,  $\text{KNO}_3$  4mM,  $\text{MgSO}_4$  1 mM, 36  $\mu\text{M}$  Fe-EDDHA; 33  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1,6  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,6  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 46  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 0,1  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Los tratamientos con fósforo contenían  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 mM, y a los deficientes para mantener la fuerza iónica se les adicionó KCl 0,25 mM. Las disoluciones de fuerza 0,25 no contenían arsénico.

#### 3.2.2.2. Desarrollo de las plantas.



**Figura 3.3.** Tiestos utilizados para el desarrollo de las plantas desde el día 11 hasta el día 37 desde la germinación. La imagen corresponde al día del traslado desde los tiestos de 3,5 L.

El día 11 se hizo una selección de las plantas según su homogeneidad visual en parte aérea y raíces (para este momento se habían desarrollado dos hojas completas en cada planta), y se procedió al traslado a los tiestos de 10 L que se muestran en la figura 3.3. El sistema utilizado para sujetar las plantas consistió de bandejas de alveolos que se recortaron para hacer agujeros más grandes (2,5 cm x 2,5 cm), en los cuales se introdujo trozos de goma espuma que tenían una hendidura en la cual se introducían las plantas. Las bandejas con goma espuma flotan por cuenta propia, por lo que no fue necesario sujetarlas al recipiente plástico por otros medios. Los recipientes se llenaron con disolución nutritiva de fuerza 1, y a ésta sí se adicionó el arsénico en concentración 25  $\mu\text{M}$  (sustituido por KCl 25  $\mu\text{M}$  en los tratamientos sin arsénico). Cada bandeja se llenó con 30 plantas, distribuidas en 5 filas de 6 plantas cada una, y se dejaron en contacto con la misma disolución nutritiva durante una semana completa (hasta el día 18 desde la germinación).

### 3.2.2.3. Aplicaciones de la auxina a las plantas en desarrollo.

El día 18 se hizo cambio de la disolución nutritiva y posteriormente se procedió a la primera aplicación de auxina en los tiestos correspondientes. Para esto a cada tiesto con disolución nutritiva recién sustituida, se le adicionó una alícuota de 50 mL de cada disolución de NAA, cuya concentración estaba calculada de forma que luego de la adición se encontrase las hormonas a los niveles correspondientes (de  $10^{-7}$  M a  $10^{-9}$  M). Se eligió este volumen para que fuese posible asegurar que mediante la agitación posterior, la auxina se encontrase distribuida en todo el volumen de disolución nutritiva, que era bastante grande (10 L). El NAA disponible se encontraba en estado sólido (Fluka, calidad estándar analítico), y la preparación de la disolución madre se realizó por disolución en 10 mL de KOH 0,1 M. Esta disolución tiene un pH muy elevado, sin embargo con las diluciones posteriores (incluyendo la última en la disolución nutritiva), no se provoca alteración en el pH del medio de cultivo. A los tratamientos sin auxina se les adicionó 50 mL de agua destilada. El cambio de disolución nutritiva y la posterior adición de auxina se realizaron siempre a primera hora de luz.

#### 3.2.2.4. Ensayos preliminares para determinar el momento de toma de exudados luego de la aplicación de la auxina.

La aplicación de las auxinas a la disolución nutritiva, y la recolección de exudados posterior llevó a plantear tres interrogantes:

- 1) ¿Con qué frecuencia debe realizarse la aplicación de auxinas, y en qué momento del desarrollo debe procederse a la primera aplicación?.
- 2) ¿Cuánto tiempo después de la adición de la auxina debe procederse a la recolección de ácidos orgánicos?.
- 3) ¿Transcurrido cuanto periodo desde el inicio del fotoperiodo, es que debe realizarse el muestreo de exudados?.

La pregunta 1 se resolvió con la información brindada en el experimento de Gilbert *et al.* (2000). En este se aplicó el NAA vía foliar para la formación de clusters en condiciones "+P", y la primera adición se realizó el día 16 desde la germinación. Se hicieron aplicaciones posteriores cada 4 días, de manera que se siguió este patrón pero con la diferencia de que en los experimentos realizados, la aplicación se realizó por adición a la disolución nutritiva.

Por otro lado las preguntas 2 y 3 se resolvieron mediante pruebas preliminares al ensayo final. Para la pregunta 2 se procedió a hacer una adición de NAA  $10^{-8}$  M a plantas con 33 días de desarrollo desde la germinación, y se hicieron muestreos de exudados 8 horas después, y a partir de este momento cada 24 horas (por tanto los muestreos se hacían siempre a la misma hora) hasta el día 37, cuando se hizo otra aplicación de auxina y se recolectaron exudados 8 horas después. En total fueron 5 muestreos. Utilizando como referencia el citrato se determinó que la recolección se haría transcurridos 3 días desde la aplicación de la auxina, y a partir de este momento cada 4 días hasta el final del experimento. Por tanto el primer muestreo de exudados se realizó al día 21 (auxina aplicada el día 18 como se dijo anteriormente). Respecto a la estabilidad del NAA en la disolución nutritiva, en el trabajo de Dunlap y Robacker (1988) se indica que este compuesto es bastante más estable que el ácido indolacético, que puede sufrir una degradación en cuestión de días debida al hierro de la disolución nutritiva. Para la pregunta 3 se hizo un ensayo pequeño durante un día, en el que se recolectaron exudados transcurridas 2 h, 5 h, 8 h y 11 h desde el inicio del fotoperiodo, con plantas de 37 días cultivadas bajo deficiencia de fósforo. En este caso se notó que la exudación de malato y succinato aumenta ligeramente a lo largo del día, mientras que la del citrato se mantiene constante. En la práctica los exudados se recolectaron luego de 8 h de luz.

### 3.2.3. Método para la recolección de exudados.



**Figura 3.4.** Sistema de incubación de raíces para la recolección de exudados de ácidos orgánicos.

A partir del día 21, y luego cada 4 días se procedió a la recolección de los exudados correspondientes a la raíz completa. La figura 3.4 muestra el sistema utilizado para este fin, el cual fue tomado de Peñaloza *et al.*, 2002. Las raíces fueron retiradas del tiesto de disolución nutritiva y se enjuagaron dos veces en disolución de  $\text{CaSO}_4$  0,25 mM.

Posteriormente se trasladaron a recipientes plásticos de 100 mL que contenían 40 mL de agua milli-Q previamente oxigenada y se dejaron allí durante 2 horas. Durante el periodo de recolección se procuró hacer agitaciones de los recipientes manualmente cada cierto tiempo. Transcurrido este tiempo las plantas se retiraron de los recipientes y se pusieron de nuevo en la disolución de  $\text{CaSO}_4$ . El medio de incubación de las plantas se agitó y se tomó una muestra de 10 mL para su inyección por cromatografía de exclusión de iones, lo restante se congeló a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Las plantas utilizadas fueron pesadas tanto en forma entera como por partes, y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el análisis posterior de ácidos orgánicos en los tejidos. Se trata por tanto de muestreos destructivos, realizándose por triplicado en cada fecha de muestreo, y cada replicado estaba constituido por dos plantas, de manera que se realizaron en total 5 muestreos.

### 3.2.4. Procesado de los tejidos.

Los tejidos congelados en nitrógeno líquido posteriormente fueron recortados en trozos con tijera, que luego se mezclaron para tener una muestra homogénea. La mitad se volvió a guardar en la nevera hasta el momento de determinación de ácidos orgánicos, y la otra parte se introdujo en sobres para su secado a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  durante 72 horas.

#### 3.2.4.1. Procesado para la determinación de arsénico.

Se pesó 0,25 g de material vegetal seco y molido en frascos de autoclave, al cual se le adicionó 1,5 mL de HNO<sub>3</sub> (65 %), 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) y 4 mL de agua milli-Q. Se agitó y se procedió a la digestión en autoclave a 125 °C y 1,5 kg/cm<sup>2</sup> durante 30 min (Lozano-Rodríguez et al., 1995). Terminado el ciclo se dejaron los recipientes en reposo durante 12 horas antes de la apertura del autoclave, y luego se procedió al filtrado y enrase a 15 mL con agua milli-Q. En el filtrado se realizó la medición de arsénico.

#### 3.2.4.2. Procesado para la determinación de ácidos orgánicos.

Se pesó 1 g del tejido fresco previamente macerado en un tubo falcon de 15 mL, al que luego se adicionaron 10 mL de ácido acético al 2 %. Los tubos se agitaron manualmente y posteriormente se colocaron en un agitador de volteo durante 1 hora. Se centrifugó y se tomó una alícuota de 4 mL, la cual se extrajo con 2 mL de cloroformo durante 20 min, esto con el fin de eliminar fenoles y alcaloides (Peñaloza *et al*, 2002). Por último se tomó una alícuota de 3 mL de la fase acuosa y se le adicionó 4 mL de agua milli-Q (volumen final 7 mL), se agitó en vortex y se procedió al análisis por cromatografía de exclusión de iones.

#### 3.2.5. Determinaciones analíticas.

##### 3.2.5.1. Análisis de ácidos orgánicos en tejidos y en exudados.

La determinación se realizó con un equipo Compact IC Plus 882 (Metrohm), utilizando una columna para cromatografía de exclusión de iones cuya fase estacionaria es un copolímero de poliestireno/divinilbenceno. La fase móvil consistió de una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 mM con 5 % de acetona. El flujo fue de 0,6 mL/min, y la detección de los analitos se realizó por conductimetría. La carrera cromatográfica tiene una duración de 16 min, periodo en el cual se resuelven adecuadamente los picos cromatográficos de los aniones oxalato, citrato, malato, succinato y acetato, sin embargo se reportan únicamente el citrato, malato y succinato. El acetato no se determinó por no disponerse del estándar analítico de este anión, y en el caso del oxalato se debe a que por su tamaño tan pequeño, sale al inicio de la carrera cromatográfica con el mismo tiempo de retención que iones inorgánicos como el sulfato, nitrato, fosfato y cloruro, que pueden encontrarse tanto en exudados como en tejidos.

### 3.2.5.2. Análisis de arsénico.

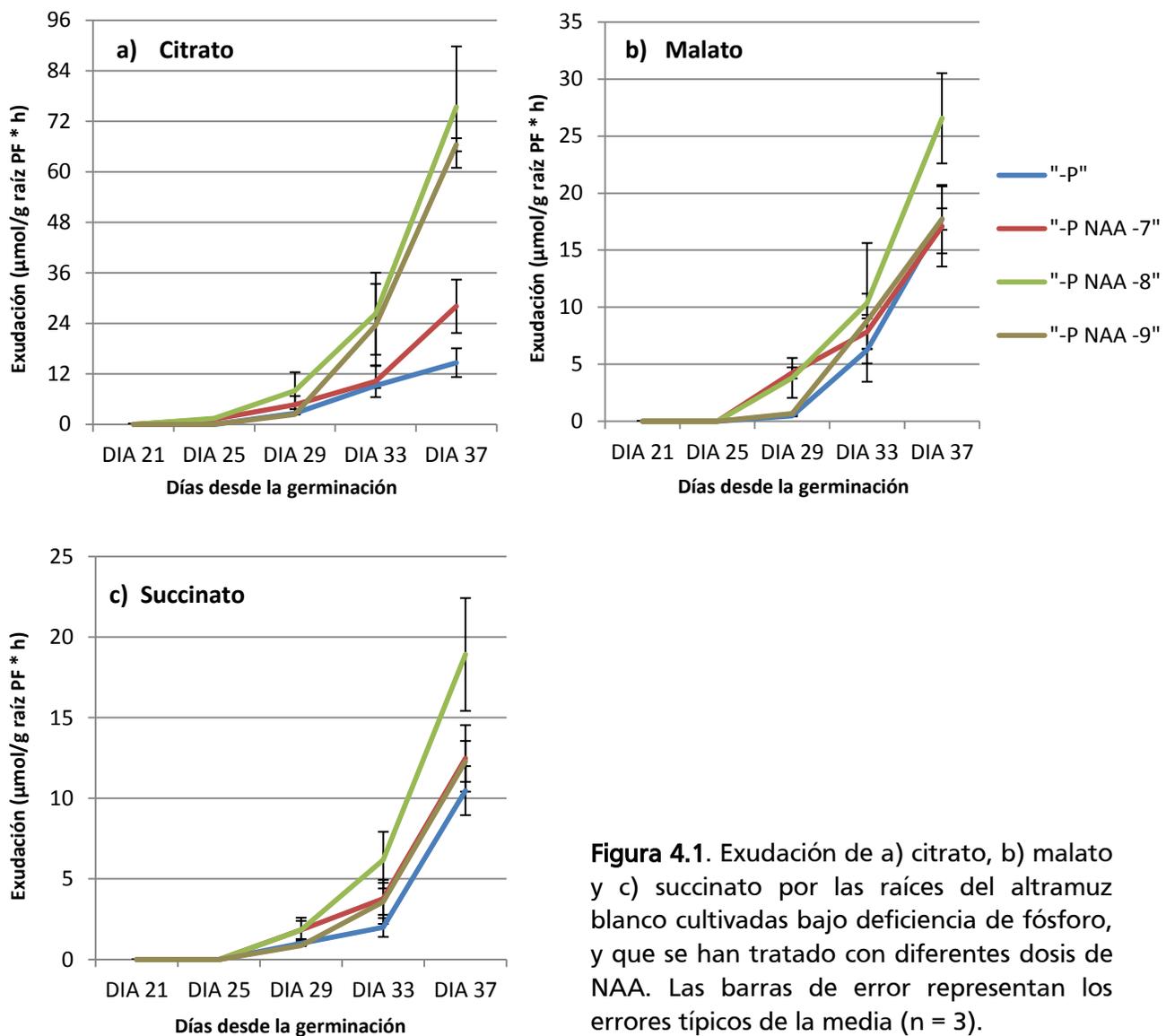
Se utilizó un instrumento de espectroscopia de fluorescencia atómica (Millenium Excalibur System, PS Analytical). El método reduce el arsénico a arsina, que se atomiza y se cuantifica por fluorescencia atómica. Para ello se utiliza como agente reductor una mezcla de  $\text{NaBH}_4$  al 0,8 % m/v y NaOH al 0,4 % m/v, como matriz una disolución de HCl al 25 % v/v, ácido ascórbico al 0,2 % m/v y KI al 1 % m/v.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto de la adición de diferentes dosis de NAA sobre la exudación de ácidos orgánicos, por las raíces de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo.

#### 4.1.1. Exudados de ácidos orgánicos y mediciones físicas de las plantas.

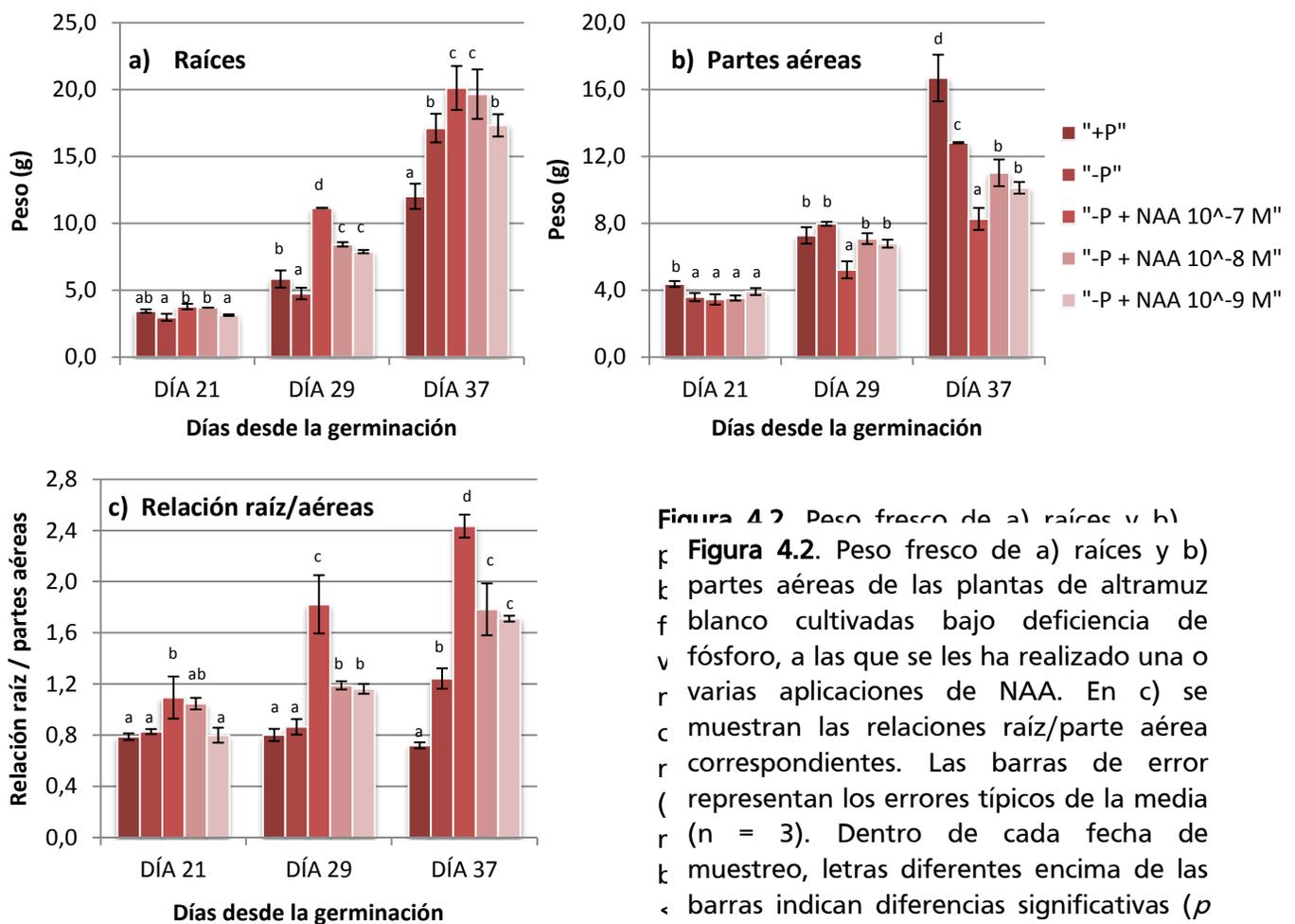
La figura 4.1 presenta la evolución en los niveles de exudación de citrato, malato y succinato que resultaron de los tratamientos con diferentes dosis de NAA, sobre plantas de altramuz blanco a las que no se suministró fósforo en la disolución nutritiva.



**Figura 4.1.** Exudación de a) citrato, b) malato y c) succinato por las raíces del altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo, y que se han tratado con diferentes dosis de NAA. Las barras de error representan los errores típicos de la media (n = 3).

Como se puede apreciar en la figura 4.1, el tratamiento con NAA  $10^{-8}$  M fue el que produjo los mayores incrementos en la exudación de los tres ácidos orgánicos que se analizaron. Al comparar las magnitudes de los valores que se presentan en cada uno de los gráficos, se nota que las plantas exudaron en mayor cantidad el citrato y en segundo lugar el anión malato, esto independientemente de la dosis de auxina aplicada, y coincide con lo que ha sido reportado previamente para las plantas de altramuz cultivadas bajo deficiencia de fósforo, tanto en experimentos realizados en hidroponía como en suelo (Peñalosa *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2005; Dessureault-Rompré *et al.*, 2007).

Son conocidos los diferentes roles que las auxinas cumplen en el desarrollo de las plantas; específicamente en la parte radicular es muy conocida su función como inductores de la formación de raíces laterales. En la figura 4.2 se muestran las mediciones de peso fresco de raíces, partes aéreas y las relaciones raíz/parte aérea correspondientes a los tratamientos realizados en deficiencia de fósforo, y a modo de comparación se presentan los resultados del tratamiento +P.



**Figura 4.2.** Peso fresco de a) raíces y b) partes aéreas de las plantas de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo, a las que se les ha realizado una o varias aplicaciones de NAA. En c) se muestran las relaciones raíz/parte aérea correspondientes. Las barras de error representan los errores típicos de la media ( $n = 3$ ). Dentro de cada fecha de muestreo, letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos.

La adición de las auxinas produjo un incremento en el peso fresco de las raíces de cultivadas bajo deficiencia de fósforo, el cual es directamente proporcional a la dosis de auxina adicionada (figura 4.2a); sin embargo en las partes aéreas la hormona tuvo el efecto contrario: con la dosis más alta hay una disminución bastante significativa en el peso de estas partes, que también es significativa con las otras dosis pero en menor grado (figura 4.2b). Al representar estas observaciones mediante un gráfico de relaciones peso raíz/peso partes aéreas, lo anteriormente dicho queda representado de forma más evidente (figura 4.3c). Por otro lado las raíces del tratamiento con suministro de fósforo, al no desarrollar clusters de raicillas corresponden a los pesos menores, pero en parte aérea son las que tienen mayor desarrollo. Al final del experimento se hizo un conteo del número de hojas que habían desarrollado las partes superiores, que en el tratamiento "+P" poseían en promedio 11 hojas/planta, lo cual difiere significativamente de las 8,5 hojas/planta que se habían desarrollado completamente bajo la deficiencia de fósforo (el número de hojas en todos los tratamientos con deficiencia de fósforo y adición de auxina no difirieron significativamente respecto al tratamiento "-P").

El tratamiento hormonal realizado sobre estas plantas efectivamente incrementó los niveles de citrato, malato y succinato que son exudados por las raíces proteoides, sin embargo la potenciación no guarda relación con el incremento en el desarrollo radicular que provoca la hormona, dado que la dosis más alta no provocó un incremento en la exudación respecto a las raíces no tratadas con auxina. Lo anterior podría deberse a que el efecto de las hormonas varía según la concentración en que fueron adicionadas. Para entender esto, debe considerarse primero únicamente lo que ocurre bajo condiciones de deficiencia y con suministro de fósforo (sin adición exógena de auxinas), y aparte de estas fitohormonas deben considerarse otras: las citoquininas. En un trabajo realizado por Neumann *et al.* (2000), se encontró que existe una **relación antagónica** entre ambas hormonas durante el proceso de formación de clusters:

- en experimentos con suministro de fósforo y con adición de **auxinas** se produce la formación de clusters (en ausencia de ellas y con suministro de fósforo normalmente no se producirían);
- pero bajo deficiencia de fósforo y con la adición de **citoquininas** la formación de estas estructuras es inhibida.



**Figura 4.3.** Sistema radicular de una planta de altramuz blanco de 37 días desde la germinación cultivada a) bajo deficiencia de fósforo y b) con suministro del nutriente.

Una deficiencia de fósforo o nitrógeno se asocia a niveles bajos de auxinas (favorecedoras del desarrollo de raíces laterales) y también de citoquininas (que inhiben la elongación sucesiva que podrían tener las anteriores, Kuiper *et al.*, 1989). Esta situación favorece el desarrollo radicular sobre el de las partes superiores (van der Werf y Nagel, 1996), con raíces que van a ser sobretodo del tipo proteoide. La formación del primer cluster ocurre alrededor del día 15 desde la germinación (Watt y Evans, 1999), y durante su desarrollo inicial están llegando auxinas desde las partes superiores, que van a promover la elongación de las raicillas que formarán el cluster; sin embargo en los ápices de éstas también ocurre un incremento en la producción de citoquininas, que finalmente

inhibe que aquellas se sigan elongando, y posiblemente además supriman la formación de otro cluster en la proximidad inmediata del primero (Lamont, B. 2003). Los clusters que se van formando posteriormente están bastante separados uno del otro.

Por otro lado, con un suministro adecuado de fósforo y nitrógeno se incrementa la síntesis de auxinas, a niveles que son inhibitorios para que se inicie la formación de clusters de raicillas, pero que resultan promotores para el desarrollo de otros tipos de raíces (Lamont, B., 2003). La formación de clusters en plantas con suministro de fósforo mediada por la

adición de auxinas en principio resultaría algo extraña, por tratarse de algo que incrementa aún más la concentración de auxinas, sin embargo el autor previamente citado indica que esto podría deberse a que la proporción de las auxinas respecto a otras hormonas (por ejemplo, citoquininas), es el factor relevante que justifica esta observación.



**Figura 4.4.** Sistema radicular de una planta de altramuz blanco de 37 días desde la germinación cultivada bajo deficiencia de fósforo, a la que se ha realizado cinco aplicaciones de a) NAA  $10^{-7}$  M b) NAA  $10^{-8}$  M y c) NAA  $10^{-9}$  M por adición a la disolución nutritiva.

Dicho lo anterior, podría concluirse que los experimentos realizados con la dosis mayor ( $10^{-7}$  M) produjeron plantas con raíces más desarrolladas, pero estas no fueron predominantemente del tipo proteoide como sí ocurrió con la dosis intermedia.

En las figuras 4.3 y 4.4 se muestran los sistemas radiculares que se produjeron al final de cada uno de los tratamientos. La dosis empleada para el tratamiento "+P" (0,25 mM) fue adecuada para inhibir la formación de clusters en las raíces (figura 4.3a), mientras que en el tratamiento "-P" la deficiencia del elemento provocó la formación de varios clusters en las raíces laterales (figura 4.3b). En los tratamientos con auxinas la dosis más alta produjo unas raíces bastante densas (figura 4.4a), en las que se aprecian clusters pero que no están presentes en la mayoría de raíces como sí ocurrió en el caso de la dosis  $10^{-8}$  M (figura 4.4b), donde se notan gran cantidad de clusters a lo largo de toda la estructura radicular (al observar nuevamente la figura 4.3b puede apreciarse que en la raíz de este tratamiento los clusters están concentrados en la mitad superior de las raíces). Por último la dosis más baja ( $10^{-9}$  M, figura 4.4c), produjo unas raíces que se parecen bastante a las producidas en el tratamiento "-P". De acuerdo a los resultados obtenidos por Lamont, B. (2003) en su estudio con *Hakea laurina* cultivada en perlita y regada únicamente con agua de grifo, en el que se hicieron aplicaciones de la auxina sintética 2,4,5-T, se puede decir que la dosis intermedia de NAA sirvió para potenciar lo que ocurre normalmente con la auxina endógena de las plantas (el ácido indolacético), mientras que la dosis alta sustituyó la respuesta que produce esta auxina en la planta por otra que es inhibitoria de la formación de clusters.

#### 4.1.2. Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.

Posterior a la toma de exudados se procedió al análisis de ácidos orgánicos en los tejidos de partes superiores y raíces. Los valores cuantificados en los tejidos muestreados al final del experimento se muestran en la Tabla 4.1. Al comparar los resultados obtenidos de los tratamientos en deficiencia de fósforo, con los correspondientes al experimento con suministro del elemento, se nota que los niveles para el tratamiento "+P" son los menores en todos los casos, siendo significativa la diferencia significativa en la mayoría de los casos.

Considerando los resultados de los tratamientos bajo deficiencia de fósforo y con adición de NAA aparecen otras situaciones, las cuales se comentan a continuación:

**Tabla 4.1.** Concentración de ácidos orgánicos en las partes superiores y raíces de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo al día 37 desde la germinación, y que se ha tratado con diferentes dosis de NAA. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico ( $n=3$ ). Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento		<i>Partes superiores</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)			<i>Raíces</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)		
	[AUX]	<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>	<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>
-P	N.A.	7,58 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	64,40 $\pm$ 6,03 <sup>b</sup>	0,71 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>	7,51 $\pm$ 2,46 <sup>b</sup>	8,43 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	3,66 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
-P	10 <sup>-7</sup> M	6,99 $\pm$ 1,54 <sup>ab</sup>	77,69 $\pm$ 4,95 <sup>c</sup>	0,96 $\pm$ 0,56 <sup>bc</sup>	5,39 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	6,40 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup>
-P	10 <sup>-8</sup> M	19,59 $\pm$ 3,20 <sup>c</sup>	52,15 $\pm$ 3,28 <sup>ab</sup>	1,25 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	8,08 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	10,22 $\pm$ 1,78 <sup>c</sup>	2,22 $\pm$ 0,86 <sup>b</sup>
-P	10 <sup>-9</sup> M	7,85 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	62,11 $\pm$ 2,73 <sup>b</sup>	1,15 $\pm$ 0,04 <sup>bc</sup>	6,11 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	7,30 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup>	1,18 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
+P	N.A.	2,44 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	45,69 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	1,82 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	7,51 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup>	1,66 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>

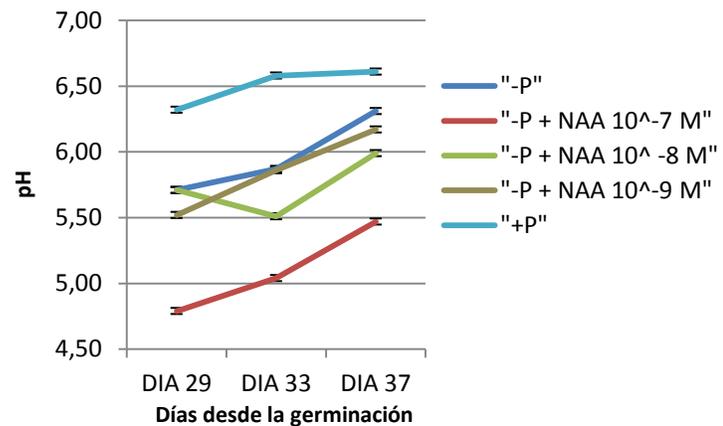
N.A.: no adicionada.

- **Niveles de citrato en raíces:** en ninguno de los tratamientos con NAA se produjo una diferencia significativa de la concentración en raíz de este anión respecto al tratamiento sin auxina. Este resultado concuerda con lo reportado previamente por Gilbert *et al.* (2000), que realizó aplicaciones foliares de NAA 10<sup>-8</sup> M en plantas cultivadas con y sin suministro de fósforo, y determinó la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa y malato deshidrogenasa en raíz. Las raíces bajo deficiencia de fósforo sí presentaron una actividad mayor de ambas enzimas respecto al tratamiento "+P", pero luego en presencia de auxina no se ve modificada la actividad de las enzimas en ninguno de los casos (deficiencia o suministro de fósforo). De los aniones exudados el citrato es el que más se ha estudiado respecto a su metabolismo, dado que se trata del anión con mayor tasa de exudación en este cultivo. Las enzimas recién mencionadas tienen un papel muy importante en la biosíntesis de citrato que ocurre en el interior de las plantas, no obstante en el experimento realizado los niveles de este anión no se incrementaron, lo cual puede justificarse en parte por lo observado con estas enzimas. Debe reiterarse que lo anterior sólo justifica en parte lo observado, debido que en realidad en este proceso participa un gran número de enzimas, unas relacionadas con la biosíntesis del citrato (además de las enzimas mencionadas, la citrato sintasa), pero también están involucradas otras que deben disminuir su actividad por formar parte del catabolismo del citrato (aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa).

- **Niveles de citrato en partes superiores** en estas partes la dosis que produjo la mayor exudación también provocó una mayor concentración de citrato en las partes superiores, resultado que coincide con lo reportado anteriormente por Peñaloza *et al.*, (2002), que sugiere que una porción significativa de ese citrato exudado puede haber sido transportado desde las partes superiores hasta las raíces durante las últimas etapas del estrés que genera la deficiencia de fósforo.
- **Niveles de malato en raíces:** en este anión sí se encontraron diferencias significativas respecto al control, siendo significativamente mayor el contenido de malato con la dosis intermedia, y significativamente menor con la dosis más alta. El que la respuesta haya sido diferente y en sentido contrario dependiendo de la dosis, puede justificarse en que ambas dosis provocaron alteraciones metabólicas distintas en el interior de la planta, dado que la auxina cumplió un rol particular en cada caso. Aparte de esto, debe mencionarse una consideración importante respecto a los datos de ácidos orgánicos obtenidos en raíces: los valores que se reportan corresponden al procesamiento completo de la raíz, sin considerar las diferentes secciones que aparecen en las raíces formadas (secciones con y sin clusters, ápices). Anteriormente en trabajos como el de Kihara *et al.* (2003) se ha demostrado que la composición de los ápices es un 50 % mayor en malato que en citrato (en  $\mu\text{mol}$  del ácido/gramo peso fresco de tejido), mientras que los clusters tienen una concentración de citrato que es más del triple de lo cuantificado de malato. Esto no se toma en cuenta en los valores que se reportan en raíz en este trabajo, por lo que los resultados deben interpretarse como un indicador de la reserva que poseen las raíces de las plantas de ese anión orgánico en cada tratamiento. Los datos en partes superiores no están sujetos a esta consideración, al no haber ninguna alteración física en las hojas o tallos debido al tratamiento con auxinas.
- **Niveles de malato en partes superiores:** Únicamente la dosis mayor produjo un valor significativamente mayor en partes aéreas respecto al tratamiento control.
- **Niveles de succinato en raíces y partes superiores:** La dosis intermedia de auxina (la mejor para la exudación) produjo un incremento significativo en la concentración de este anión en las partes superiores. En raíces ocurrió algo particular: independientemente de la dosis aplicada, la concentración de succinato en raíces fue significativamente menor respecto al tratamiento control. El descenso llega a niveles de un tratamiento con suministro de fósforo, con el que no hay diferencias significativas.

#### 4.1.3. pH en los tiestos de cultivo de las plantas.

Al finalizar cada periodo de recolección de exudados se procedió a tomar una muestra de la disolución nutritiva en que se desarrollaron las plantas, con el fin de notar la acidificación que produce todo el proceso de exudación en el medio de cultivo. La figura 4.5 muestra los resultados correspondientes a las fechas 3, 4 y 5 (días 29, 33 y 37 desde la germinación, respectivamente).



**Figura 4.5.** Variación del pH en los tiestos de cultivo que contienen la disolución nutritiva, resultado de las raíces de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo, y que se han tratado con diferentes dosis de NAA. Las barras de error representan los errores típicos de la media (n = 3).

La exudación de ácidos orgánicos produce simultáneamente una acidificación de la rizosfera (Neumann *et al.*, 2000), de forma que el tratamiento "+P", en el cual no se llegó a cuantificar ácidos orgánicos en ninguna de las etapas de desarrollo del cultivo, corresponde a los valores de pH más altos de todos los tratamientos. Considerando los diferentes tratamientos con auxina en bajo deficiencia de fósforo, se nota que la acidificación fue directamente proporcional a la concentración de NAA añadida a la disolución nutritiva. Esta relación también se cumple con la dosis más alta de la auxina de forma que, si bien una dosis tan alta inhibe la formación de clusters (el punto donde ocurre de forma más intensa la exudación de ácidos orgánicos), la elevada cantidad de otro tipo de raíces que se forman (reflejadas en el mayor peso del sistema radicular) tiene un efecto positivo en la acidificación de la rizosfera. Con la dosis intermedia y la inferior sí se guarda una relación proporcional a la tasa de exudación de ácidos orgánicos.

El papel de las auxinas en la acidificación de la rizosfera se ha demostrado bajo condiciones de deficiencia de hierro, ya que esta es una de las respuestas que se producen como consecuencia del estrés ocasionado. Se ha visto que la inducción de esta respuesta fisiológica, y otras morfológicas como la formación de pelos radiculares está mediada por auxinas (Bacaicoa *et al.*, 2011). Muy recientemente Takahashi, K *et al.* (2012) demostraron

que las auxinas activan la  $H^+$  ATPasa (responsable de la liberación de protones al medio extracelular) en hipocótilos etiolados de *Arabidopsis thaliana* mediante la fosforilación del penúltimo residuo de treonina de la  $H^+$  ATPasa durante las primeras etapas de la elongación del hipocótilo. Esto produce un incremento en la actividad de la enzima sin alteración de la cantidad en que ésta se encuentra.

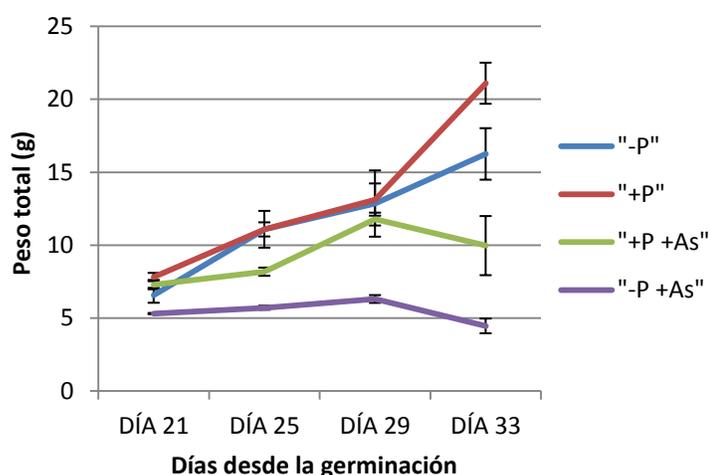
## 4.2. Efecto de la adición del NAA sobre la absorción de arsénico por plantas de altramuz blanco cultivado con suministro de fósforo.

### 4.2.1. Exudados de ácidos orgánicos.

El análisis de los exudados de las plantas cultivadas con suministro de fósforo, tanto en presencia como en ausencia de arsénico, no presentaron ninguna señal correspondiente a los ácidos orgánicos en ninguno de los muestreos realizados. Los tratamientos deficientes en fósforo sí produjeron ácidos orgánicos en los exudados, los valores obtenidos son los que se muestran en la figura 4.1.

### 4.2.2. Efecto de las dosis de fósforo y arsénico seleccionadas sobre el peso total de las plantas

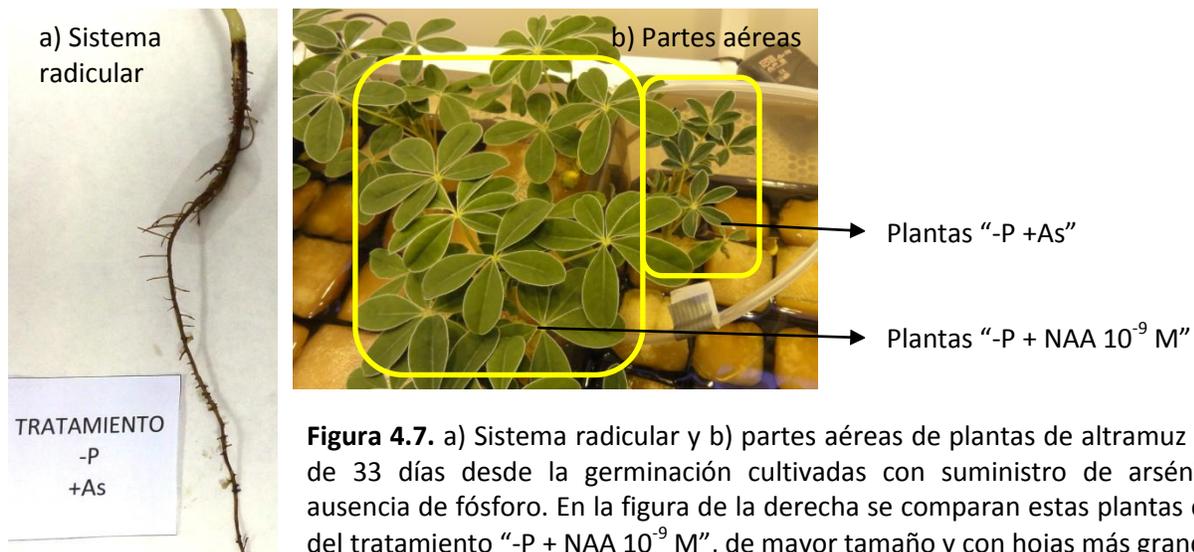
Los resultados de las mediciones que se reportan en la sección 4.2 incluyen las determinaciones hasta el día 33 desde la germinación por lo siguiente: con el sistema de cultivo utilizado para el desarrollo de las plantas (bandejas de alveolos con agujeros grandes y trozos de goma espuma para el soporte de las plantas), para el momento del cuarto muestreo (día 33 desde la germinación), se empezaron a notar



**Figura 4.6.** Efecto de los diferentes tratamientos de fósforo y arsénico sobre el peso total de las plantas de altramuz blanco. Las barras de error representan los errores típicos de la media ( $n = 3$ ).

coloraciones verdes en algunas secciones de las raíces debido a la formación de algas en los tiestos de cultivo. Para el último muestreo (día 37 desde la germinación) la afectación era total en todos los tratamientos, por lo que no se incluyeron los datos generados en este muestreo para el reporte de resultados.

La figura 4.6 presenta el efecto de las dosis de arsénico y fósforo utilizadas para la diferenciación de los tratamientos con suministro y en ausencia de los elementos mencionados, sobre el peso total de las plantas cultivadas. Como es de esperarse existe una tendencia según se desfavorecen las condiciones de desarrollo de las plantas: el peso mayor corresponde a la disolución nutritiva completa, seguidamente el tratamiento en ausencia de fósforo y por último los tratamientos con arsénico. En el tratamiento bajo deficiencia de fósforo y con suministro de arsénico los pesos totales se mantuvieron prácticamente invariables a lo largo del experimento. Se trata de plantas con un desarrollo radicular muy reducido (figura 4.7a) y en parte aérea son más bajas y poseen hojas más pequeñas (figura 4.7b).

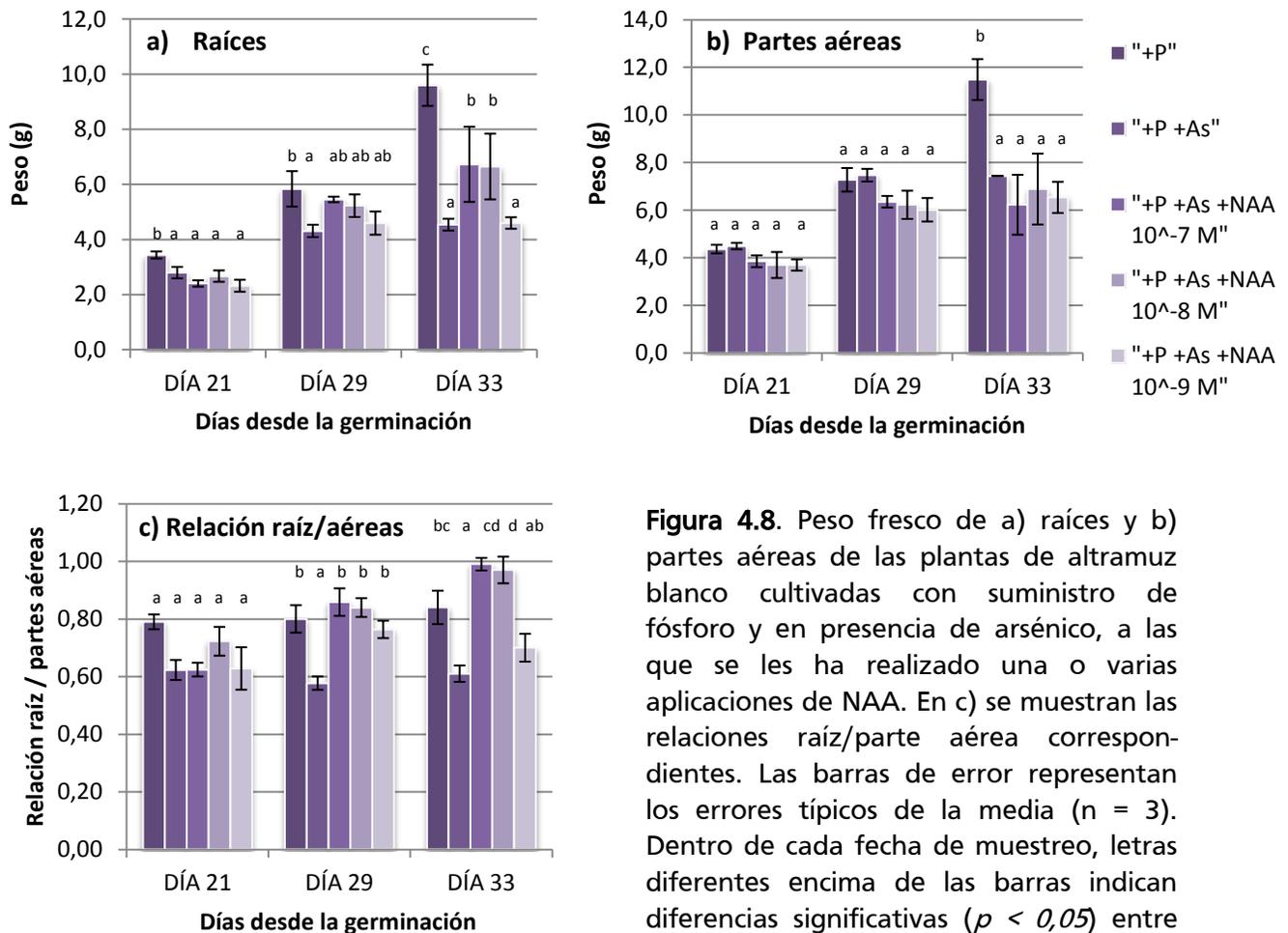


**Figura 4.7.** a) Sistema radicular y b) partes aéreas de plantas de altramu blanco de 33 días desde la germinación cultivadas con suministro de arsénico en ausencia de fósforo. En la figura de la derecha se comparan estas plantas con las del tratamiento “-P + NAA 10<sup>-9</sup> M”, de mayor tamaño y con hojas más grandes.

#### 4.2.3. Efecto de los tratamientos con NAA sobre las medidas físicas de las plantas cultivadas con suministro de fósforo y en presencia de arsénico.

Al igual que en los tratamientos con deficiencia de fósforo, se procedió a realizar las mediciones de peso fresco de raíces, partes aéreas y las relaciones raíz/parte aérea que

resultan del tratamiento con las auxinas. Los resultados se muestran en la figura 4.8, y a modo de comparación se incluyeron además los resultados del tratamiento "+P".



**Figura 4.8.** Peso fresco de a) raíces y b) partes aéreas de las plantas de altramuz blanco cultivadas con suministro de fósforo y en presencia de arsénico, a las que se les ha realizado una o varias aplicaciones de NAA. En c) se muestran las relaciones raíz/parte aérea correspondientes. Las barras de error representan los errores típicos de la media ( $n = 3$ ). Dentro de cada fecha de muestreo, letras diferentes encima de las barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos.

El tratamiento "+P +As" produjo una disminución significativa tanto de partes superiores (figura 4.8a) como de raíces (figura 4.8b) respecto al tratamiento "+P". La relación raíz/partes aéreas también termina siendo significativa dado que la disminución es mayor en raíces que en partes superiores (figura 4.8c). Por otro lado la adición del NAA a la disolución nutritiva también tuvo un efecto sobre el peso de las raíces que se producen, el cual es directamente proporcional a la concentración de la dosis empleada. La respuesta de las plantas a las diferentes concentraciones de las dosis utilizadas fue la misma que en condiciones de deficiencia de fósforo.



**Figura 4.9.** Sistemas radiculares de las plantas de altramus blanco con 29 días de desarrollo desde la germinación, cultivadas con suministro de fósforo y en presencia de arsénico, que se han tratado con diferentes dosis de NAA por adición a la disolución nutritiva. a) tratamiento "+P +As" (control), b) dosis NAA  $10^{-7}$  M, c) dosis NAA  $10^{-8}$  M y d) dosis NAA  $10^{-9}$  M

En la figura 4.9 se muestran las morfologías de las raíces que se produjeron en cada tratamiento. Como se puede apreciar las raíces del experimento sin auxina (figura 4.9a) son bastante sencillas, al igual que las de los tratamientos  $10^{-8}$  M y  $10^{-9}$  M. Las diferencias más importantes corresponden a la dosis más alta de auxina. En el primer caso las raíces desarrollaron clusters a lo largo de las raíces secundarias, y con la otra se produjeron raíces bastante tupidas, pero que no poseían estas aglomeraciones de raicillas. Es posible clasificar las estructuras formadas con la dosis más alta como clúster dado que poseen más de 10 raicillas por centímetro de raíz lateral, que es el criterio utilizado para definir estas estructuras. Se observaron indicios de formación de estos clusters desde el primer muestreo, y ya para el segundo era posible distinguirlos en las raíces laterales.

#### 4.2.4. Efecto de los tratamientos con NAA en la absorción de arsénico en plantas de altramuz blanco cultivadas con suministro de fósforo.

De los cinco muestreos en que se dividió el experimento, las determinaciones de arsénico se realizaron sobre los tejidos correspondientes a la primera, tercera y quinta fecha. Dado que para la última fecha se presentó el problema con las algas, se muestran a continuación los resultados del primer y tercer muestreo, momentos en los que las plantas habían recibido una y tres aplicaciones de las diferentes dosis de auxina; y habiendo transcurrido 10 y 18 días desde la primera exposición al arsénico, respectivamente. Los resultados se presentan en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Concentración de arsénico en raíces y hojas de altramuz blanco transcurridos 21 y 29 días desde la germinación, momentos a los que se habían realizado 1 y 3 aplicaciones de diferentes dosis de NAA a la disolución nutritiva. Cultivo con suministro de fósforo. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico ( $n=3$ ). Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento	Raíz ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)		Partes superiores ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	
	Día 21	Día 29	Día 21	Día 29
+P +As <sup>II</sup>	353 $\pm$ 109 <sup>a</sup>	804 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	24,8 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	22,0 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
+P +As + NAA $10^{-7}$ M	195 $\pm$ 109 <sup>a</sup>	1047 $\pm$ 29 <sup>c</sup>	19,8 $\pm$ 8,6 <sup>a</sup>	22,3 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>
+P +As +NAA $10^{-8}$ M	182 $\pm$ 65 <sup>a</sup>	591 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	14,5 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>
+P +As +NAA $10^{-9}$ M	364 $\pm$ 54 <sup>a</sup>	806 $\pm$ 57 <sup>b</sup>	14,0 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	19,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>

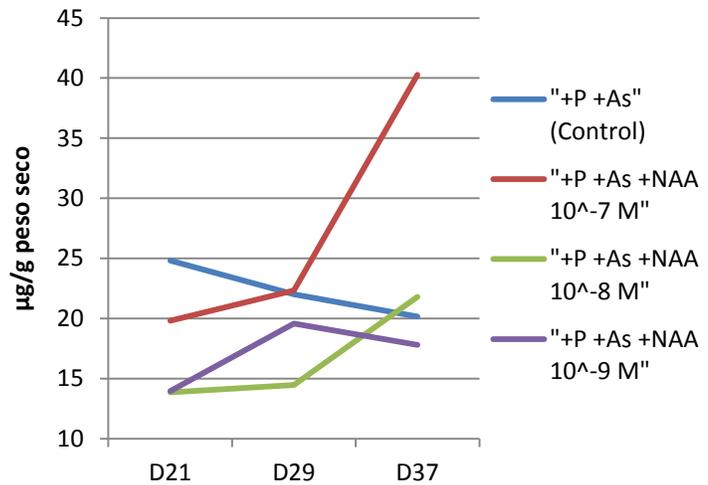
Los resultados muestran una mayor acumulación de As en las raíces, como ha sido reportado en otros estudios para este cultivo; y al tomar en cuenta las dosis de NAA únicamente con la dosis mayor es que la concentración de arsénico difiere significativamente del tratamiento control. Los valores del peso de raíces al día 29 (figura 4.8a) no difirieron significativamente del tratamiento control "+P +As", por lo que la mayor absorción de arsénico podría deberse a los clusters que se desarrollaron con la dosis mayor de NAA (figura 4.9b). Tales estructuras incrementan el área superficial de las raíces, con lo que pueden tener un mayor contacto con todo el medio de desarrollo. Los clusters producidos no exudan ácidos orgánicos al no existir una deficiencia de fósforo en la planta, pero sí que podrían ser los responsables del incremento en su capacidad de excluir arsénico en las raíces. El incremento respecto al tratamiento control es cercano al 30 %.

La aplicación de auxinas con fines de fitoremediación de suelos contaminados con arsénico fue reportada recientemente por Lyubum, Y (2009). En el estudio se utilizaron tres cultivos de relevancia en la agricultura (trigo, sorgo dulce y pasto sudán), y se suministró ácido indolacético a los cultivos por dos medios: mediante inoculación de semillas germinadas con *Azospirillum brasilense* Sp245, una rizobacteria capaz de liberar esta hormona al medio extracelular en cantidades significativas para la planta y tolerante al arsénico; y mediante el tratamiento de las plántulas de 3 días de desarrollo con una disolución de IAA  $10^{-5}$  g/L de NAA durante 24 horas, periodo luego del cual las plántulas fueron sembradas en un suelo contaminado con arsénico. El tratamiento con la bacteria produjo un incremento en la biomasa de las plantas, pero no un efecto significativo en la translocación de arsénico por estas, como sí ocurrió con el tratamiento hormonal mediante incubación de las plántulas en una disolución de IAA previa a la siembra. En este trabajo, al igual que en otro previo en el que también se hicieron pruebas con 2,4-D (Lyubum, *et al.*, 2002) no se hacen referencia a variaciones en la apariencia física o los pesos de las plantas, sin embargo sí se reporta un incremento en la capacidad fitoextractora.

Aparte de las mediciones realizadas, la determinación de fósforo en los tejidos de partes superiores y raíces permitiría obtener información muy valiosa respecto a estas diferencias en la absorción de arsénico. Esto tendría por objetivo determinar si las diferentes dosis de NAA tienen un efecto sobre los niveles de fosfato de los tejidos. Una concentración mayor de arsénico en tejido podría justificarse en niveles internos de fosfato menores que se deban a algún tipo de alteración que haya ocasionado la auxina. Al haber una menor concentración de fósforo, se podría favorecer la absorción del anión arseniato.

#### 4.2.4.1 ¿El tratamiento con NAA podría tener también un efecto en la capacidad fitoextractora del altramuz blanco?

Como se indicó anteriormente, los tratamientos con suministro de fósforo se vieron afectados al final del experimento por la formación de algas en los tiestos de cultivo. Sin embargo en el muestreo de las partes superiores correspondiente al día 37 desde la germinación, se encontró una situación bastante particular en los niveles de arsénico de estas partes. En la figura 4.10 se muestra que al día 37 desde la germinación, en el tratamiento con la dosis de auxina más alta



**Figura 4.10.** Concentración de arsénico en hojas de altramuz blanco transcurridos 20, 29 y 37 días desde la germinación. Cultivo con suministro de fósforo. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico (n= 3).

se encontraron niveles de arsénico en partes superiores que doblan el valor del tratamiento control, siendo esta dosis la única en que la diferencia es significativa respecto a las plantas que no se trataron con auxina. Es incierto el grado en que la presencia de las algas en los tiestos de cultivo puede afectar lo que ocurre en las partes superiores, sin embargo se trata de un incremento en la concentración de arsénico que ronda el 50 %.

#### 4.2.5. Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.

Los resultados del procesamiento de los tejidos para el análisis de ácidos orgánicos se muestra en la tabla 4.3. Las principales observaciones de cada uno de los aniones se resumen a continuación:

- **Citrato:** Los niveles de citrato en partes superiores no se vieron afectados por el arsénico, y la adición de la auxina tampoco varió la concentración del anión respecto al tratamiento sin hormona (comparación de las plantas "+P +As" con las plantas "+P +As +auxina"). Estos resultados guardan mucha relación con lo visto en

**Tabla 4.3.** Concentración de ácidos orgánicos en las partes superiores y raíces de altramuz blanco cultivado con suministro de fósforo y en presencia de arsénico al día 29 desde la germinación, y que se ha tratado con diferentes dosis de NAA. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico ( $n= 3$ ). Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento		<i>Partes superiores</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)			<i>Raíces</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)		
	[AUX]	<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>	<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>
+P	N.A.	1,54 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	43,48 $\pm$ 6,11 <sup>b</sup>	0,33 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,42 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	4,27 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	1,67 $\pm$ 0,16 <sup>ab</sup>
+P+As	N.A.	1,80 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	19,76 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	2,51 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	4,64 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	2,37 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>
+P+As	10 <sup>-7</sup> M	2,56 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	46,65 $\pm$ 0,97 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>	1,77 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	5,79 $\pm$ 1,75 <sup>ab</sup>	2,23 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
+P+As	10 <sup>-8</sup> M	2,28 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	48,50 $\pm$ 5,45 <sup>b</sup>	0,57 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	4,14 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>	8,78 $\pm$ 2,12 <sup>ab</sup>	1,27 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
+P+As	10 <sup>-9</sup> M	2,25 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	44,96 $\pm$ 1,60 <sup>ab</sup>	0,95 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	3,02 $\pm$ 0,18 <sup>c</sup>	8,76 $\pm$ 1,71 <sup>ab</sup>	1,49 $\pm$ 0,50 <sup>ab</sup>
-P	N.A.	2,68 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	54,09 $\pm$ 2,20 <sup>b</sup>	0,35 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	9,25 $\pm$ 0,04 <sup>e</sup>	10,19 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>	2,33 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>

N.A.: no adicionada.

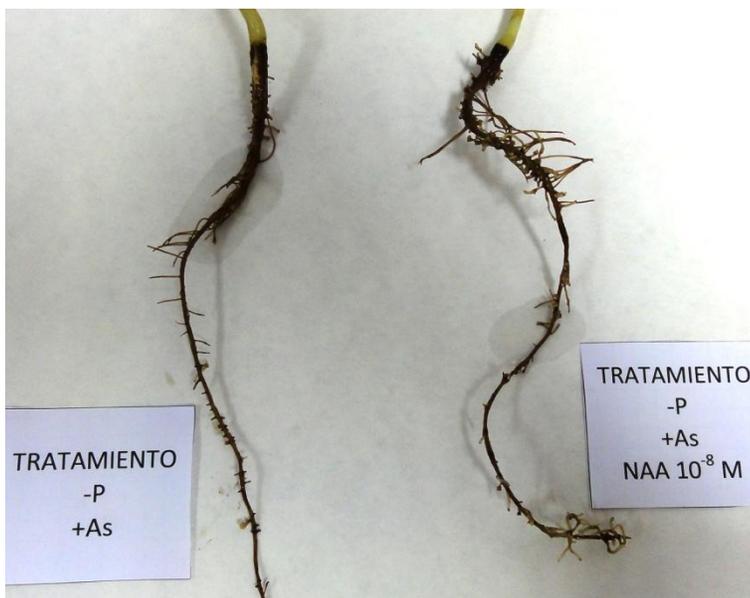
los tratamientos bajo deficiencia de fósforo y con aplicación de auxinas; en este caso se había notado un incremento en la concentración de citrato de las partes superiores exclusivamente con la dosis que produjo el incremento más significativo en la tasa de exudación, la cual era provocada por la deficiencia de fósforo. Ahora con las plantas cultivadas con suministro de fósforo no existe una deficiencia de este nutriente, por lo que no hay exudación ni hay alteración en los niveles del anión en partes superiores. En raíces el arsénico no modificó la concentración de citrato, pero los tratamientos con hormona sí produjeron alteraciones, notándose una disminución con la dosis más alta de auxina (que había provocado la mayor acumulación de arsénico en raíz), y un incremento con las otras dosis.

- **Malato:** El tratamiento con arsénico redujo en más de un 50 % los niveles de malato en parte superior (respecto al tratamiento "+P"), pero la adición del NAA restableció los niveles de este anión hasta los valores del tratamiento con suministro de fósforo (el valor del malato en partes superiores en los tratamientos "+P" y "-P" a los 29 días de desarrollo aún no difiere significativamente, como sí se notó para el muestreo del día 37, ver Tabla 4.1). En raíces la adición del arsénico tampoco modificó la concentración de malato, y los tratamientos con auxina incrementaron los niveles del anión pero estos resultaron no ser significativos (mayor incremento con la menor concentración de auxina).

- **Succinato:** En partes superiores no se notó una alteración de los niveles del anión debido a la presencia del arsénico (respecto al tratamiento "+P"), pero la adición de la auxina produjo incrementos en los niveles de succinato, el cual fue mayor con la dosis más baja de NAA. En este caso el incremento supera significativamente el valor del tratamiento "+P", que al igual que en el caso del malato a los 29 días de desarrollo aún no difiere significativamente del tratamiento "-P". En raíz tampoco hubo alteración en los niveles de succinato por la presencia del arsénico, ni hubo modificaciones en la concentración del anión en los tratamientos con auxina.

### 4.3. Efecto de la adición del NAA sobre la absorción de arsénico por plantas de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo.

#### 4.3.1. Exudados de ácidos orgánicos y mediciones físicas de las plantas.



**Figura 4.11.** Raíces de las plantas de altramuz blanco con 37 días de desarrollo desde la germinación, cultivadas con deficiencia de fósforo y en presencia de arsénico, y el efecto de la adición de NAA  $10^{-8}$  M

La figura 4.11 muestra la morfología de las plantas desarrolladas con deficiencia de fósforo y en presencia de arsénico, y el efecto de la adición de NAA a una concentración  $10^{-8}$  M (este ensayo se realizó únicamente con esta dosis de auxina). Como se puede apreciar se trata de raíces poco desarrolladas, que muestran una coloración muy oscura debida a la toxicidad del arsénico. El tratamiento con NAA no provoca ninguna

diferencia en la apariencia de las raíces respecto al control ("-P +As"), tampoco hay modificaciones en los pesos de raíces, partes aéreas ni relaciones raíz/parte aérea

(en la tabla 4.4, se presentan los datos hasta el día 37 de desarrollo dado que en los tratamientos bajo deficiencia de fósforo no se presentaron los problemas de formación de algas en los tiestos de cultivo).

**Tabla 4.4.** Efecto de la adición de NAA  $10^{-8}$  M a la disolución nutritiva, en el peso de las plantas de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo y en presencia de arsénico. Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento	Peso total (g)		Peso parte superior (g)		Peso raíces (g)		Relación raíces/aéreas	
	Día 33	Día 37	Día 33	Día 37	Día 33	Día 37	Día 33	Día 37
-P + As	4,47 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>	3,15 <sup>a</sup>	2,20 <sup>a</sup>	2,30 <sup>a</sup>	0,97 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>
-P + As +NAA $10^{-8}$ M	5,41 <sup>a</sup>	5,11 <sup>a</sup>	2,83 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	2,58 <sup>a</sup>	2,14 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>

#### 4.3.2. Efecto de los tratamientos con NAA en la absorción de arsénico en plantas de altramuz blanco cultivadas bajo deficiencia de fósforo.

La tabla 4.5 presenta los resultados del análisis de arsénico en las plantas cultivadas bajo deficiencia de fósforo. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos con y sin auxina en ninguno de los muestreos, por lo que se puede afirmar que la toxicidad del arsénico fue el factor determinante de la respuesta de las plantas.

**Tabla 4.5.** Concentración de arsénico en raíces y hojas de altramuz blanco transcurridos 21 y 29 días desde la germinación, momentos a los que se habían realizado 1 y 3 aplicaciones de diferentes dosis de NAA a la disolución nutritiva. Cultivo bajo deficiencia de fósforo. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico ( $n=3$ ). Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento	Raíz ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)		Partes superiores ( $\mu\text{g/g}$ peso seco)	
	Día 21	Día 29	Día 21	Día 29
-P +As"	673 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	811 $\pm$ 34 <sup>a</sup>	14,3 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	39,9 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>
-P +As + NAA $10^{-8}$ M	696 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	827 $\pm$ 35 <sup>a</sup>	16,6 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	36,9 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>

Al comparar los contenidos de arsénico entre los tratamientos "-P + As" y "+P +As" (tablas 4.2 y 4.5), se observa que al día 29 no hubo diferencia en los niveles de arsénico de los

tejidos de las raíces, pero sí que hubo un incremento en la concentración del elemento en partes aéreas. Este incremento es del doble respecto al tratamiento "+P +As". Por tanto mediante la aplicación de la dosis más alta de auxina, es posible obtener una concentración en el tejido de raíz de alrededor del 30 % superior a lo que absorbe la raíz en presencia o en ausencia de fósforo; y de comprobarse lo mostrado en la figura 4.10 respecto a la absorción de arsénico al día 37 (por ejemplo, mediante el procesamiento de los tejidos del día 33), con el uso de la auxina a esta concentración se lograría que la planta absorba aproximadamente la misma cantidad arsénico en sus partes superiores, que lo que absorbe la planta bajo deficiencia de arsénico. Esto último además en una planta de mucho mejor aspecto que las que resultan de un tratamiento "-P +As", por lo que en etapas posteriores el incremento aún podría ser mayor.

#### 4.3.3. Determinación de ácidos orgánicos en tejidos.

Los resultados de las determinaciones de ácidos orgánicos en los tejidos de las plantas desarrolladas bajo deficiencia de fósforo y con suministro de arsénico se muestran en la tabla 4.6 (valores al día 29 desde la germinación). Las principales diferencias respecto a los datos de los tratamientos en presencia de arsénico y fósforo (tabla 4.3), se da en los niveles de malato de las partes superiores y raíces. El arsénico produjo una disminución en el contenido de las partes superiores muy similar a la observada en el tratamiento "+P +As", pero en raíces no se vio la disminución en el contenido de este anión que sí se había notado en el tratamiento "+P +As".

**Tabla 4.6.** Concentración de ácidos orgánicos en las partes superiores y raíces de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo y en presencia de arsénico al día 29 desde la germinación, y que se ha tratado con diferentes dosis de NAA. Los valores representan el promedio  $\pm$  error típico ( $n= 3$ ). Las mismas letras en cada columna indican que no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ).

Tratamiento		<i>Partes superiores</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)			<i>Raíces</i> ( $\mu\text{mol/g}$ peso fresco)		
		<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>	<i>Citrato</i>	<i>Malato</i>	<i>Succinato</i>
	[AUX]						
-P+As	N.A.	3,04 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	17,62 $\pm$ 6,11 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	2,40 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	9,79 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	1,64 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
-P+As	10 <sup>-8</sup> M	2,95 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	19,76 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	2,54 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	8,66 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>	1,81 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>

N.A.: no adicionada.

## 5. CONCLUSIONES

- El ácido naftalenacético cumple un papel como potenciador de la exudación de ácidos orgánicos en plantas de altramuz blanco cultivado bajo deficiencia de fósforo. La respuesta es dependiente de la concentración, y no se trata sólo de una variación en la magnitud de la respuesta, sino además en el mecanismo mediante el cual actúa la hormona; lo anterior porque un mayor desarrollo radicular no implicó una mayor exudación, y por eso la dosis intermedia fue la mejor para incrementar los exudados de citrato, malato y succinato. El material orgánico que se exuda es probable que se origine desde las partes superiores, esto se notó en el caso del citrato, que es el principal componente de los exudados de este cultivo.
- Plantas cultivadas con suministro de fósforo, o bajo deficiencia de este nutriente pero en presencia de arsénico no exudan ácidos orgánicos; en el primer caso por no existir una deficiencia de fósforo, y en el segundo porque el arsénico provoca que las raíces de la planta se desarrollen muy poco. La no exudación en los tratamientos con fósforo es independiente de si existe o no arsénico en el medio de cultivo.
- El ácido naftalenacético también provoca un incremento en la capacidad exclusora de las raíces de altramuz blanco cultivado en presencia de fósforo y con arsénico. El incremento es superior con la dosis más alta, que ronda el 30 % respecto al tratamiento sin auxina. En partes superiores se deja la puerta abierta a investigar lo que puede ocurrir en etapas posteriores del cultivo. Con la dosis más elevada se encontró un incremento en alrededor del 50 % de la cantidad de arsénico sin tratar con auxina. Incluso podría ser útil realizar ensayos con una dosis aún más concentrada (NAA  $10^{-6}$  M). En partes superiores se llegaría a los niveles en tejido de un tratamiento deficiente de fósforo, pero al no ser deficiente la planta se ve mucho mejor que una planta cultivada con deficiencia de este nutriente.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Ballester, D. et al. *Chemical composition, nutritive value, and toxicological evaluation of two species of sweet lupine (Lupinus Albus and Lupinus Luteus)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 28: 402-405 (1980).

Delhaize, P., Jones, D. *Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 527-560 (2001).

Dessureault-Rompré, J. et al. *Modified micro suction cup/rhizobox approach for the in-situ detection of organic acids in rhizosphere soil solution*. Plant and Soil 286: 99-107 (2006)

Esteban, E. et al. *High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (Lupinus albus) is relatively insensitive to phosphate status*. New Phytologist 158: 165-173 (2003).

Fresno, T. *Modificación de la disponibilidad de arsénico en un suelo contaminado con escombros mineros por adición de fertilizantes fosfatados. Aplicaciones en tecnologías de fitoremediación*. Tesis de Máster. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid (2010).

Gilbert, G. et al. *Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate*. Annals of Botany 85: 921-928 (2000).

Hocking, P. y Jeffery, S. *Cluster-root production and organic anion exudation in a group of old-world lupins and a new-world lupin*. Plant and Soil 258: 135-150 (2004).

Jung, C. et al. *Release of phenols from Lupinus Albus L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification*. Plant and Soil 252: 301-312 (2003).

Kihara, T. et al. *Alteration of citrate metabolism in cluster roots of white lupin*. Plant and Cell Physiology 44 (9): 901-908 (2003).

Ma, Z. et al. *Regulatory mechanisms of Al induced secretion of organic acids anions – involvement of ABA in the Al-induced secretion of oxalate in buckwheat*. En: Horst, W. et al: Plant nutrition-food security and sustainability of agro-ecosystems. Kluwer, Holanda. 481-486.

Marschner, H. et al. *Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere*. Journal of Plant Nutrition 10: 1175-1184 (1987).

Marten, I et al. *Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells*. Nature 353: 758-762.

Massoneau, A. et al *Metabolic changes associated with cluster root development in white lupin (Lupinus Albus L.): relationship between organic acid excretion, sucrose metabolism and energy status*. Planta 213: 534-542 (2001).

Moreno-Jiménez, E. *Recuperación de suelos mineros contaminados con arsénico mediante fitotecnologías*. Tesis Doctoral. Departamento de Química Agrícola, Universidad Autónoma de Madrid (2010).

Moreno-Jiménez, E. et al. *Hydroponics as a valid tool to assess arsenic availability in mine soils*. Chemosphere 79: 513-517 (2010).

Neumann, G. et al. *Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (Lupinus albus L.)*. Annals of Botany 85: 909-919 (2000).

Skene, K., James, W. *A comparison of the effects of auxin on cluster root initiation and development in Grevillea robusta Cunn. ex R. Br. (Proteaceae) and in the genus Lupinus (Leguminosae)*. Plant and Soil 219: 221-229 (2000).

Ouzounidou, G., Ilias, I. *Hormone-induction protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity*. Biologia Plantarum 49: 223-228 (2005).

Page, V. et al. *Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant*. New Phytologist 171: 329-341 (2006).

Peñaloza, E. et al. *Spatial and temporal variation in citrate and malate exudation and tissue concentration as affected by P stress in roots of white lupin*. Plant and Soil 241: 209-221 (2002).

Sabine, Z. et al. *An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin*. Plant Journal 6(5): 707-716.

Shen, H et al. *Effecto fo K-252a and abscisic acid on the efflux of citrate from soybean roots*. Journal of Experimental Botany 55 (397): 663-667.

Tomasi, N. et al. *Plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase-dependent citrate exudation from cluster roots of phosphate*

- Uhde-Stone, C. et al. *Acclimation of white lupin to phosphorus deficiency involves enhanced expression of genes related to organic acid metabolism*. Plant and Soil 248: 99-116 (2003).
- Vázquez, S. et al. *Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil*. Water, Air, and Soil Pollution 177: 349-365 (2006).
- Wang, B. et al. *Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminum*. New Phytologist 176: 581-589 (2007).
- Watt, M., Evans, J. *Proteoid roots. Physiology and development*. Plant Physiology 121: 317-323 (1999).
- Yang, Y. et al. *Effect of indole-3-acetic acid on aluminum-induced efflux of malic acid from wheat (*Triticum aestivum* L.)* Plant and Soil 346: 215-230 (2011).
- Zhang, W. et al. *Citrate-permeable channels in the plasma membrane of clusters roots from white lupin*. Plant Physiology 136: 3771-3783 (2004).
- Zhu, Y. et al. *A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus Albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions?* Plant and Cell Physiology 46 (6): 892-901 (2005).
- Zornoza, P. et al. *Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity*. Plant Physiology and Biochemistry 40: 1003-1009 (2002).