



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Animal, Bioloxía Vexetal e Ecoloxía

Área de Fisioloxía Vexetal

**Efecto de fitofortificantes comerciais sobre el crecimiento de cultivos  
hortícolas**

**Efecto de fitofortificantes comerciais sobre o crecemento de cultivos  
hortícolas**

**Effects of commercial phytostrengtheners on the growth of  
horticultural crops**

**Cristina Beceiro Durán**

**Traballo de fin de grao**

**Data de defensa: 29 de xullo de 2015**

**Dirixido por Federico Pomar Barbeito e Cristina Silvar Pereiro**



# ÍNDICE

1. Resumen/Resumo/Summary	
2. Introducción.....	1
I. El tomate .....	1
II. El aluminio .....	1
III. Medios de defensa fitosanitaria (MDF) o fitofortificantes .....	3
IV. Manvert-Silikon y el silicio .....	4
3. Objetivos.....	6
4. Material y métodos.....	7
I. Material vegetal, proceso de siembra y mantenimiento de las plántulas .....	7
II. Aplicación del tratamiento.....	7
III. Protocolo de pesado en fresco, pesado en seco y almacenamiento de las muestras ..	8
IV. Medida de la expresión génica por PCR en tiempo real .....	8
V. Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR) .....	9
5. Resultados y discusión .....	10
I. Estudio del efecto de diferentes condiciones sobre el crecimiento vegetativo.....	10
II. Medida de la expresión génica por PCR en tiempo real.....	11
III. Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos .....	13
6. Conclusiones/Conclusions.....	16
7. Bibliografía.....	17



## RESUMEN

El aluminio es un metal naturalmente frecuente en los suelos cultivables de todo el mundo, pero su efecto fitotóxico produce daños en las plantas y baja la calidad de las partes comestibles. Analizamos los efectos de un producto fitofortificante disponible comercialmente en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con la intención de estudiar su capacidad de minimizar los efectos nocivos del aluminio. Los estudios de biomasa y de expresión génica no demostraron efectividad, pero el análisis por espectroscopía de infrarrojos de las paredes celulares de la raíz apunta a un posible efecto protector del producto relacionado con cambios en la composición de la pared.

## RESUMO

O aluminio é un metal naturalmente frecuente nas terras aráveis de todo o mundo, pero o seu efecto fitotóxico produce danos nas plantas e baixa a calidade das partes comestíbeis. Analizamos os efectos dun produto fitofortificante disponible comercialmente en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), coa intención de estudar a súa capacidade de minimizar os efectos nocivos do aluminio. Os estudos de biomasa e de expresión xénica non demostraron efectividade, pero o análise por espectroscopía de infravermellos das paredes celulares da raíz apunta a un posíbel efecto protector do produto relacionado con cambios na composición da parede.

## SUMMARY

Aluminum is a naturally abundant metal in arable soils all across the world, but its phytotoxic effects cause damage to plants and lower the quality of the edible parts. We analyzed the effects of a commercially available phytostronghtener on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings, with the intention of studying its capacity to minimize damage by aluminum. Biomass and gene expression studies didn't prove its effectiveness, but the analysis of root cell walls via infrared spectroscopy points to the product having a protective effect regarding changes in the cell wall composition.



## 1. Introducción

### El tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia Solanaceae, una de las más grandes del reino vegetal. Las solanáceas son un grupo cosmopolita de más de 3000 especies, que sólo está ausente en condiciones desérticas extremas y en las áreas frías del hemisferio Norte. La familia se caracteriza por tener un porte herbáceo o arbustivo, con algunos casos de pequeño porte arbóreo. Las hojas son generalmente simples y alternas, y las flores son hermafroditas, bien solitarias o reunidas en inflorescencias cimosas (Díaz-González *et al.*, 2004). También se caracterizan por contar con numerosas especies que contienen diversos alcaloides (atropina en la belladona, nicotina en el tabaco, escopolamina en el beleño o la mandrágora...), más o menos activos y algunos venenosos.

El tomate se originó en la costa occidental de Sudamérica y comenzó a ser utilizado para el consumo por los mayas y otras civilizaciones de la región. Los españoles distribuyeron el tomate a lo largo de sus colonias, y su adaptabilidad a un amplio rango de condiciones climáticas ha permitido que en la actualidad su cultivo se extienda alrededor de todo el mundo, desde los trópicos a las regiones templadas. En España, el tomate es una de las especies hortícolas con mayor superficie de cultivo dedicada (48,6 miles de Ha en 2012), con una producción superior a los 4 millones de toneladas. En Galicia, la superficie dedicada al tomate supera las 1000 hectáreas y se producen más de 100.000 toneladas al año (MAGRAMA, 2013).

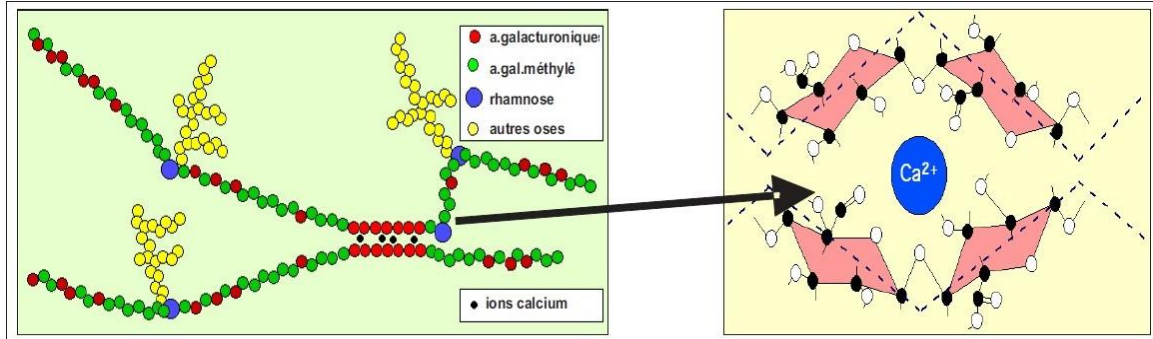
Además de su importancia en la horticultura, el tomate ha sido ampliamente utilizado por la comunidad científica como planta modelo para el estudio de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno, así como en estudios genéticos relacionados con la calidad del fruto y tolerancia al estrés (Panthee y Cheng, 2010). La enorme importancia de este cultivo hace aún más importante el estudiar y mejorar caracteres agronómicos clave para minimizar las pérdidas económicas.

### El aluminio

El aluminio es un elemento químico metálico no ferromagnético, de símbolo Al, que pertenece al grupo 13 (elementos térreos) del sistema periódico. Es el elemento metálico más abundante en la Tierra (representa el 8,1% del peso de la corteza terrestre) y se calcula que el 40% del total de tierras cultivables del planeta son suelos ácidos, en los que los niveles de aluminio soluble son elevados (Kopittke *et al.*, 2015). Cuando el pH alcanza valores inferiores a 5, el aluminio contenido en aluminosilicatos y otros productos precipitados se solubiliza en ión Aluminio  $Al^{3+}$ , que tiene un fuerte efecto fitotóxico y se considera el principal causante de la pérdida de rendimiento y bajada de calidad de las partes comestibles de los cultivos (Zheng *et al.*, 2014).

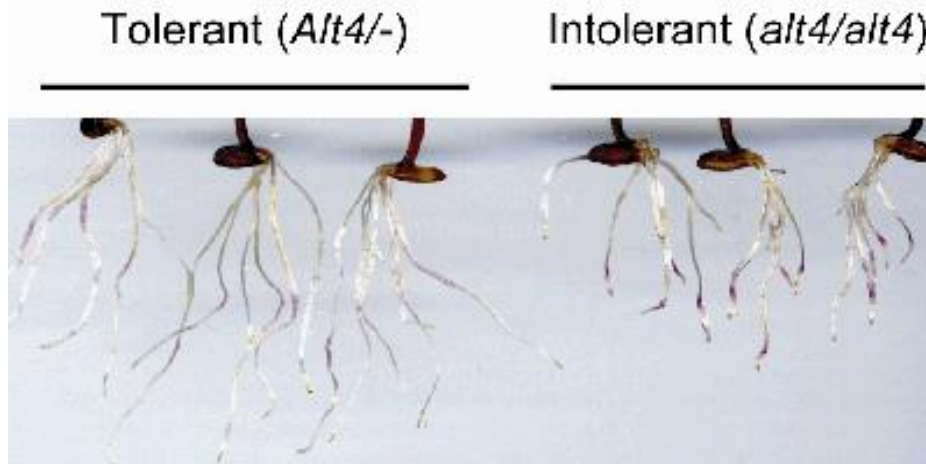
El aluminio produce efectos negativos tanto en el simplasto como en el apoplasto, En el simplasto se ha comprobado que interfiere con la síntesis de ADN y la mitosis, genera disrupciones en el funcionamiento normal del aparato de Golgi, inhibe las funciones mitocondriales y afecta a la integridad de la membrana (Kopittke *et al.*, 2015). A nivel del apoplasto, la presencia de aluminio induce la inhibición de enzimas de la pared celular (expansinas, XET...), el endurecimiento de la pared en sí e incluso puede provocar rotura celular (Kopittke *et al.*, 2015).

La principal diana del aluminio en la pared son las pectinas, las cuales son abundantes en paredes primarias y especialmente en células que se encuentran en fase de expansión, y son responsables de la plasticidad de la pared. El aluminio interfiere con los grupos éster y sustituye a los iones de calcio de la estructura original (Figura 1), reduciendo los contenidos de pectina y limitando la flexibilidad de la pared (Sujkowska *et al.*, 2015).



**Figura 1:** Representación de la estructura "eggbox" formada para ligar dos cadenas de pectina. Tomada de Ouldali *et al.* (2011)

El fenotipo general de una planta dañada por aluminio suele ser uno con raíces truncadas, con un desarrollo pobre de los pelos radicales y ápices radicales inflamados (Figura 2), con una capacidad escasa para captar agua y elementos nutritivos y una notable translocación de fósforo desde las raíces hacia los tallos (Luo *et al.*, 1999).



**Figura 2:** Raíces de centeno (*Secale cereale* L.) tratadas con una tinción para resaltar los daños producidos por exposición a aluminio en variedades tolerantes e intolerantes. Tomada de ACPFG.

Se han aislado más de 20 genes con expresión inducida por aluminio en diversas especies de plantas. La mayoría de dichos genes son genes de respuesta a estreses generales como bajada del nivel de fosfatos, heridas, estrés oxidativo o infección por patógenos; y algunos están bien caracterizados por su función antioxidante (glutatión S-transferasa, peroxidasa, superóxido dismutasa), pero por ahora no se ha probado la presencia de genes que respondan específicamente al aluminio (Sarwat, Ahmad y Abdin, 2013). Este tipo de respuesta inespecífica es habitual cuando se trata de estreses por metales: los estudios realizados en tomate por Chakraborty y colaboradores (2014) encontraron resultados parecidos al exponer las plantas a cobre; donde se producía un aumento significativo de enzimas relacionadas con las defensas de la planta (peroxidasa, fenilalanin amonio-liasa,  $\beta$ -1,3



glucanasa, polifenol oxidasa...) y de los niveles de fenoles, sustancias con un fuerte carácter antioxidante.

El tomate y otras dicotiledóneas (soja, *Arabidopsis*, etc) son más sensibles al aluminio que otras especies cultivadas como pueden ser las gramíneas (trigo, bambú...), por lo que han sido objeto de múltiples estudios en los últimos tiempos. El equipo de Zheng (2014) determinó que, tras una exposición a largo plazo, las raíces de tomate muestran una expresión diferencial de proteínas relacionadas con estrés oxidativo, detoxificación, metabolismo de ácidos orgánicos, metabolismo de la metionina (Met), proliferación y muerte celular. También observaron una fuerte regulación positiva de superóxido dismutasa, monodeshidroascorbato reductasa y otras enzimas del metabolismo antioxidativo, y niveles disminuidos de algunos de los componentes de la maquinaria fotosintética (como RUBISCO o precursores de componentes del PSII), que provocaban clorosis en los cotiledones y un retraso en la maduración de las plántulas. En cotiledones de tomate, los procesos más importantes inducidos por el aluminio son tres: Inducción del metabolismo antioxidativo y detoxificante, refuerzo de procesos glucolíticos y del ciclo del glioxilato, y supresión de la maquinaria de fijación de carbono (Zhou *et al.*, 2009).

La principal medida con la que combatir el estrés por aluminio es la secreción de ácidos orgánicos a la rizosfera. El aluminio estimula la secreción de ácidos de bajo peso molecular como el ácido cítrico y el ácido málico incluso a corto plazo, y se piensa que una síntesis constante de bajas dosis es suficiente para proteger las regiones sensibles de la raíz en las plantas tolerantes (Delhaize *et al.*, 1993). Los ácidos orgánicos no sólo tienen la capacidad de quelar el aluminio fuera de la planta, sino que también permiten la formación de complejos almacenables en la vacuola (Shen *et al.*, 2002). Ward (2011) comprobó que la deficiencia de fósforo que habían observado otros autores como Luo (1999) estaba relacionada con los ácidos orgánicos, puesto que en ausencia de P, el CO<sub>2</sub> de la rizosfera se incorpora más fácilmente a los ácidos orgánicos a través de la ruta de la PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa), lo que significa una detoxificación más efectiva del aluminio al haber más quelante disponible.

### Medios de defensa fitosanitaria (MDF) o fitofortificantes

Un producto fitofortificante (también llamado medio de defensa fitosanitaria o MDF) se define como un producto (sustancia o microorganismo) cuyo propósito es favorecer que los cultivos desarrollen vigor o tolerancia frente a organismos patógenos o a condiciones ambientales adversas mediante la activación de las defensas de la planta. Esto puede ocurrir a través de la estimulación de las resistencias o los mecanismos de defensa de la planta, o por competencia con los organismos nocivos por el espacio o las sustancias nutrientes en la parte aérea (filosfera) o el entorno de la raíz (rizosfera) de la planta. Una característica predominante de los productos fitofortificantes es que son efectivos si son aplicados como tratamientos preventivos, pero que son difíciles de usar como medio de control de una plaga o enfermedad cuando ésta ha alcanzado los límites del umbral económico (AEFISA).

El uso de MDF permite la optimización de las dosis de empleo de los productos fitosanitarios al dotar a la planta de un estado sanitario mejorado, pero no pueden ser productos fitosanitarios ni contener sustancias activas (Directiva 91/414/CEE y el Reglamento (CE) Nº 1107/2009), ser productos fertilizantes o abonos CE (Reglamento (CE) Nº 2003/2003 y Real Decreto 824/2005) ni ser un producto biocida (Directiva 1998/8/CE y Real Decreto 1054/2002). En resumen, ningún fitofortificante puede tener un efecto directo sobre un organismo patógeno de las plantas y, si así fuese, debe ser autorizado como un producto fitosanitario (AEFISA).

Con fecha de 16 de Diciembre de 2014 se ha publicado en el B.O.E. el R.D. 951/2014 del 14 de Noviembre, por el que se regula la comercialización de determinados medios de defensa fitosanitaria. Los Medios de Defensa Fitosanitaria que actualmente se están comercializando al amparo de la Orden APA 1470/2007 del 24 de Mayo (la cual queda derogada por este Real Decreto) deben ajustarse a los nuevos requisitos fijados en la Instrucción de fecha 17 de diciembre de 2014 de la Dirección General de la Sanidad de la Producción Agraria en un plazo de seis meses. También se ha habilitado un registro de Determinados Medios de Defensa Fitosanitarios que recoge la totalidad de productos denegados, así como los productos sujetos a la disposición transitoria del decreto.

### Manvert-Silikon y el Silicio

**RIQUEZAS GARANTIZADAS**

% p/p % p/v
Óxido de Silicio (SiO <sub>2</sub> )
30 36

**INDICACIONES**

**MANVERT SILIKON** protege a las plantas contra el ataque de microorganismos patógenos, ya que la acumulación de silicio en los tejidos de la epidemis en forma polimérica, orgánica y cristalina, permite proteger y fortalecer mecánica y bioquímicamente a los tejidos de la planta.

**MANVERT SILIKON** favorece la mejor absorción de Fósforo (P) y Hierro (Fe) presentes en el suelo, por parte de la planta, incrementando así la productividad y calidad de las cosechas agrícolas.

**MANVERTSILIKON** tiene acción sinérgica con el Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Zinc (Zn) y Molibdeno (Mo) optimizando el desarrollo del cultivo y producción de cosecha, también se mejora la vida media de las cosechas perecedoras.

**MANVERT SILIKON** favorece el desarrollo radicular de las plantas y con ello mejora la adaptabilidad de éstas al medio, les protege frente a periodos de estrés y potencia su desarrollo y crecimiento.

**CARACTERÍSTICAS**

**MANVERT SILIKON** promueve la colonización de las raíces por algas, líquenes, bacterias y micorrizas, mejorando la fijación y asimilación de nitrógeno y fósforo entre otros minerales.

**MANVERT SILIKON** incrementa la resistencia de la planta a la salinidad.

**MANVERT SILIKON** incrementa la resistencia a la sequía en las plantas. La fertilización con silicio puede optimizar el aprovechamiento del agua de riego en un 30 a 40% y ampliar los intervalos del riego sin efectos negativos sobre las plantas. Adicionalmente al sistema irrigación-drenaje, la fertilización con minerales de silicio activo, permiten completar la rehabilitación de suelos afectados por sales, compactación y bajos niveles de pH.

**DOSIS**

Aplicación foliar: debe aplicarse a la dosis 2-4 cc/l de caldo. Realizar de 2 a 4 aplicaciones por ciclo de cultivo, dependiendo de las exigencias del cultivo. Aplicado vía riego: 0,5-1 l/ha a una dosis máxima de 2 l/ha, indicado para las plantas a las cuales se les intenta alargar el ciclo productivo.

**MANVERT SILIKON** puede aplicarse en cualquier momento del ciclo de cultivo y muy especialmente en periodos de estrés y en aquellos en que la planta es más sensible al ataque de microorganismos patógenos.

**OBSERVACIONES**

**COMPATIBILIDAD**  
**MANVERT SILIKON** es compatible con la mayoría de productos fertilizantes.

**CONSERVACIÓN, ALMACENAJE Y TRANSPORTE**  
S2: Manténgase fuera del alcance de los niños.  
S13: Manténgase lejos de alimentos, bebidas y plantas.  
Lávase con agua y jabón tras su manipulación. No aplicar un pallet sobre otro.  
Mejor de temperatura recomendada para almacenamiento de producto: +5°C a +35°C. Este producto no está sujeto a ninguna norma toxicológica ni para su manejo ni para su aplicación.  
La Compañía garantiza la riqueza y composición del producto, y no se hace responsable de los daños causados por un uso inadecuado, por inobservancia total o parcial de las instrucciones de la etiqueta.  
Se recomienda su utilización bajo asesoramiento técnico agronómico.

Cumple con la orden APA 1470/2007

**FABRICANTE:**  
**BIOVERT, S.A.**  
Ctra. C-12, Km 150,5 - 25137 CORBINS (LLEIDA) ESPAÑA

**ETIQUETA SÓLO PARA USO INFORMATIVO  
NO ES PARA USO COMERCIAL**

Figura 3: Etiqueta comercial de Manvert-Silikon.

Manvert Silikon es un producto comercialmente disponible fabricado por la empresa española Biovert S.A. Se categoriza como un inductor de autodefensa y el fabricante recomienda su uso para diversos propósitos:

- Protección de las plantas contra el ataque de microorganismos patógenos, ya que fortalece mecánica y bioquímicamente los tejidos de la planta.
- Mejora de la absorción de fósforo (P) y de hierro (Fe) presentes en el suelo, para incrementar la productividad y calidad de las cosechas agrícolas.
- Optimización del desarrollo del cultivo y producción de la cosecha gracias a la sinergia con el Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Zinc (Zn) y Molibdeno (Mb). También se mejora la vida media de las cosechas perecedoras.
- Favorecimiento del desarrollo radicular de las plantas y mejora la adaptabilidad de éstas al medio. Protección frente a periodos de estrés y potenciamiento de su desarrollo y crecimiento.

El fabricante también promueve su aplicación en todo tipo de cultivos de modo preventivo para activar el sistema de autodefensa de la planta. Afirman que Manvert-Silikon provoca una respuesta inducida por la planta frente a ataques de microorganismos patógenos (hongos), insectos y estrés abiótico.

La composición del producto es dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ). El Silicio (símbolo Si) es un elemento químico metaloide, situado en el grupo 14 (Carbonoideos) de la tabla periódica. Después del oxígeno, el silicio es el segundo elemento más abundante en la corteza terrestre (representa el 27,7% del peso). El silicio es asimilado por las plantas en forma de ácido silícico (fórmula general  $[\text{SiO}_x(\text{OH})_{4-2x}]_n$ ), y pueden acumularlo en distinta magnitud (el tomate, por ejemplo, es un mal acumulador). El silicio tiene un efecto positivo en la lucha contra el estrés causado por metales pesados gracias a dos mecanismos diferenciados. El primero es la actuación de la sílice amorfa como una barrera física, y el segundo está relacionado con las funciones bioquímicas del ácido silícico en el metabolismo de la planta (Wu *et al.*, 2015).

Existen muchas menos evidencias de las funciones directas del silicio en las plantas que de su papel en forma inerte, pero sí se han documentado efectos como la protección del aparato fotosintético en condiciones de estrés por cobre en ejemplares de *S.densiflora* (Mateos-Naranjo *et al.*, 2015) y se sospecha que puede participar en el secuestro y acomplejamiento de metales pesados para limitar su asimilación y transporte por la planta.

## **2. Objetivos**

El presente trabajo ha perseguido los siguientes objetivos:

- 1) Estudio del crecimiento vegetativo de plantas tratadas con Manvert-Silikon en presencia y ausencia de aluminio en el medio.
- 2) Evaluación de la capacidad del Manvert-Silikon de inducir cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta al aluminio.
- 3) Estudio de los cambios en las paredes celulares de raíces, en presencia de aluminio y bajo el tratamiento con Manvert-Silikon, usando espectroscopía de infrarrojos.

### 3. Material y métodos

#### Material vegetal, proceso de siembra y mantenimiento de las plántulas

Todos los ensayos utilizaron una misma variedad de semilla de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) disponible comercialmente, concretamente la variedad San Pedro de la empresa Vilmorin. La siembra se realizó a mano en bandejas con semilleros desechables rellenos con vermiculita. Las plantas se regaron exclusivamente con agua destilada durante 16-18 días que permiten la germinación y el desarrollo de una plántula con aparición de las primeras hojas verdaderas, y se conservaron en una cámara climatizada con unas condiciones constantes de 16 horas de luz a 25°C de temperatura y 8 horas de oscuridad a 18°C. La posición de las bandejas –y, posteriormente, los tubos– en la cámara fue preferencialmente de luz indirecta, para prevenir la desecación excesiva de las plántulas.

#### Aplicación del tratamiento

Se prepararon tubos de ensayo de 12 mL de capacidad en gradillas para colocar una planta en cada uno. Se seleccionaron plantas que ya presentasen el primer par de hojas verdaderas y que fuesen homogéneas en tamaño para colocar una por cada tubo. El experimento cuenta con 15 réplicas (hechas en tres grupos de 5 plantas) de ocho condiciones distintas que se detallan a continuación:

**Tabla 1:** Descripción de la relación de tratamientos aplicados a las plantas para el experimento.

Número	Abreviatura	Tratamientos aplicados
1	H <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> O P	Tubo con agua Agua pulverizada sobre hojas
2	H <sub>2</sub> O+Al+H <sub>2</sub> O P	Tubo con AlCl <sub>3</sub> disuelto Agua pulverizada sobre hojas
3	H <sub>2</sub> O+Silikon P	Tubo con agua Manvert-Silikon pulverizado sobre las hojas
4	H <sub>2</sub> O+Al+Silikon P	Tubo con AlCl <sub>3</sub> disuelto Manvert-Silikon pulverizado sobre las hojas
5	H <sub>2</sub> O	Tubo con agua
6	H <sub>2</sub> O+Al	Tubo con AlCl <sub>3</sub> disuelto
7	H <sub>2</sub> O+Silikon D	Tubo con Manvert-Silikon disuelto en la solución
8	H <sub>2</sub> O+Al+Silikon D	Tubo con AlCl <sub>3</sub> y Manvert-Silikon disueltos en la solución

Los grupos 2 y 4 fueron rociados con una solución de Manvert Silikon 3 mL/L 24 horas antes del transplante de las series a los tubos donde se les aplicó el tratamiento. Los grupos 1 y 3 actúan como controles de los grupos 2 y 4, siendo rociados con agua destilada en lugar del Silikon. Los tubos en los grupos 1, 3 y 5 se llenaron de agua destilada, mientras que los grupos 2, 4, y 6 llevaban una solución de AlCl<sub>3</sub> 500µM en agua destilada. El grupo 7 contenía una solución de Manvert Silikon en agua destilada a 3 mL/L; y para el grupo 8 se añadió Silikon a la solución de AlCl<sub>3</sub> 500 µM para alcanzar la misma concentración final que en los otros grupos. Las soluciones se renovaron aproximadamente cada 3 días, con un tiempo total de exposición al aluminio de 9 días.

### Protocolo de pesado en fresco, pesado en seco y almacenamiento de las muestras

Se rotulan tres placas Petri por cada una de las condiciones del experimento para recoger separadamente las raíces, los tallos y las hojas (con peciolo) de las réplicas cultivadas. Pesamos las muestras (obtenidas de 5 plantas cada vez) en fresco con ayuda de una balanza de precisión, y posteriormente las colocamos en una estufa a 80°C durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, volvemos a tomar datos de los pesos del mismo conjunto de plantas, ahora completamente secas.

En algunos casos fue necesario el almacenamiento de las muestras para poder realizar distintos análisis en otro momento. Para ello, se empaquetó el material vegetal en papel de aluminio y se sumergió en nitrógeno líquido, para su posterior embolsamiento y conservación en un arcón a -80°C.

### Medida de la expresión génica por PCR en tiempo real

Realizamos un estudio de la expresión génica del gen LHA en los cuatro grupos no expuestos a Aluminio (1, 3, 5 y 7), con la intención de determinar si el Silikon tenía capacidad de modificar su expresión en ausencia de aluminio. LHA es una H<sup>+</sup>-ATPasa que se expresa en la membrana plasmática de raíces de tomate, y tiene un papel clave en proporcionar energía y regular una gran cantidad de transportadores secundarios. Algunos autores han encontrado correlación entre la actividad de esta enzima, que se activa como respuesta a la deficiencia de fósforo (Zhu *et al.*, 2005), y una mayor secreción de ácidos orgánicos (Ohno *et al.*, 2003). Estos resultados indican que LHA podría estar involucrada en el eflujo hacia la rizosfera de ácidos orgánicos al generar un gradiente de cargas a favor de dicho movimiento (Yang *et al.*, 2011).

Se recogieron las muestras de raíz de su almacenaje a -80°C para ser homogenizadas con nitrógeno líquido en sendos morteros estériles. El homogenizado fue nuestro material de partida para extraer el RNA de dichas raíces, utilizando el mini-kit BioRad Aurum<sup>TM</sup> Total RNA. Se determinó la cantidad total de RNA aislado por espectrofotometría, para poder medir 200ng que se pudieran utilizar como molde para una retrotranscripción a cDNA. Para este proceso se empleó el kit First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La expresión génica relativa se cuantificó con el sistema de PCR en tiempo real iCycler iQ (BioRad) en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI). Se enviaron dos réplicas de cada muestra de cDNA y oligos para un gen control (TUB-tubulina, un gen con expresión constitutiva) y nuestro gen de interés (LHA). La mezcla de reacción (50 µl) se preparó incluyendo 0,3 µl de cada cebador, 2,5 µl de cDNA y 1xIQ SYBR Green Supermix (BioRad). El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificación: 95 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos y 72 °C 50 segundos. Finalmente se añadió un paso de elongación a 72 °C durante 5 minutos.

Tras recibir los resultados, comprobamos mediante el software del fabricante (Optical System Software 3.0, BioRad) la existencia de un único pico en las curvas de "melting" (lo que demuestra que siempre se estaba amplificando una secuencia de características atribuibles al gen que esperamos amplificar) y que la eficiencia de amplificación fuese superior al 98% y equivalente para ambos genes.

### Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR)

Para este procedimiento trabajamos con dos réplicas de los tratamientos 5, 6, 7 y 8. Se realizó un aislamiento de paredes celulares de nuestras muestras de raíz siguiendo el procedimiento de Pomar *et al.* (2002). Nuestro material congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se homogenizó en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvillo fino, que se suspende en  $1250\mu\text{L}$  de agua destilada y se centrifuga a  $13000\text{rpm}$  durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se lavó y centrifugó dos veces con una solución de Tritón X-100 al 1%, en las mismas condiciones que la primera centrifugación. Seguidamente se lavó con agua para poder eliminar los restos de Tritón, y dos veces con alcohol de  $60^{\circ}$ , seguidos siempre de centrifugaciones en las mismas condiciones ( $13000\text{rpm}$ , 10 minutos, temperatura ambiente). El último de los lavados se realizó con alcohol de  $96^{\circ}$ , tras el mismo se centrifugó una vez más, se decantó el sobrenadante y se pasaron las muestras a una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  con el propósito de secarlas por completo.

Posteriormente, se trasladaron esas muestras al SAI para poder realizar los espectros en un espectrómetro Bruker Vector 22 FTIR (Fourier Transforme-Infra Red) (Bruker Optics, Madrid, España) equipado con un ATR de reflexión simple con prisma de diamante Golden Gate (Specac), cuyo brazo permitió aplicar una presión constante a la muestra sobre el cristal, para conseguir un contacto perfecto entre la muestra y el haz de infrarrojos incidente, evitando la pérdida de radiación incidente. Se obtuvieron 3 espectros de infrarrojo entre los  $4000$  y los  $400\text{cm}^{-1}$  para cada réplica, con una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ . Los datos obtenidos de los espectros de FTIR se analizaron con el programa Opus (Bruker) para su normalización y la corrección de línea base, y posteriormente con Microsoft Excel para el cálculo de promedios entre los datos de los 3 espectros conseguidos para cada réplica.

### Procesamiento estadístico de los datos

En lo que respecta al crecimiento vegetativo, se llevó a cabo un análisis estadístico en los datos de peso fresco y peso seco recogidos para determinar si existían diferencias significativas en la biomasa como consecuencia de la aplicación de los diferentes tratamientos. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23 para analizar un modelo lineal general univariante con el peso como variable dependiente y el tratamiento aplicado y el tejido medido como variables fijas (modelo factorial completo). Como se observó que el tratamiento actuaba de forma diferente en función del tejido, se realizaron pruebas ANOVA a los distintos grupos. El análisis de varianza o ANOVA/ANDEVA es un tipo de modelo estadístico que busca analizar los valores de la media de distintos grupos de variables y determinar la existencia de variación entre ellos. Es, por tanto, un test que se aplica para discernir si existe diferencia entre los valores de la media de varios grupos. Se complementó el ANOVA con un test de Duncan como prueba *post-hoc*. El test de Duncan agrupa los tratamientos en subconjuntos de medias estadísticamente similares cuando la ANOVA detecta diferencias significativas.

Los datos de las paredes celulares (FTIR) se promediaron en Microsoft Excel y se sometieron a un Análisis de Componentes Principales (PCA) en IBM SPSS 23. Este test estadístico analiza todas las variables (en nuestro caso, los números de onda) y genera nuevas variables, combinación de las anteriores, llamadas componentes, que explican la varianza de las muestras de forma mucho más reducida, y asigna los valores que tendrían nuestras muestras en esas nuevas variables. Este análisis también nos permite ver cuáles de nuestras variables de entrada tienen mayor relevancia a la hora de explicar la varianza total de nuestros datos. A continuación, se utilizó el software Sigmaplot 13.0 para representar gráficamente los resultados del PCA.

## 4. Resultados y discusión

### Estudio del efecto de diferentes condiciones sobre el crecimiento vegetativo

Los resultados de las pruebas estadísticas no muestran diferencias significativas entre los pesos medios de los grupos que se expusieron a los distintos tratamientos. Las únicas diferencias significativas que puede detectar el análisis ANOVA se dan en los tallos (Tabla 2), pero los test *post-hoc* tampoco son capaces de ofrecer una explicación concluyente a esa diferencia en la varianza.

**Tabla 2:** Resultados de las ANOVA realizadas a los datos de peso fresco y seco de las muestras.

#### Raíces, peso fresco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,0341	7	,005	1,369	,283
Dentro de grupos	,0569	16	,004		
Total	,0911	23			

#### Tallos, peso fresco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,1216	7	,017	2,716	,046
Dentro de grupos	,1023	16	,006		
Total	,2239	23			

#### Hojas, peso fresco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,0677	7	,010	,418	,877
Dentro de grupos	,3707	16	,023		
Total	,4384	23			

#### Raíces, peso seco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,0002	7	,000	1,859	,144
Dentro de grupos	,0003	16	,000		
Total	,0005	23			

#### Tallos, peso seco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,0017	7	,000	3,480	,018
Dentro de grupos	,0011	16	,000		
Total	,0027	23			

#### Hojas, peso seco

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,0025	7	,000	1,602	,205
Dentro de grupos	,0036	16	,000		
Total	,0061	23			



Tabla 4: Resultados del Test de Duncan para los datos de tallo.

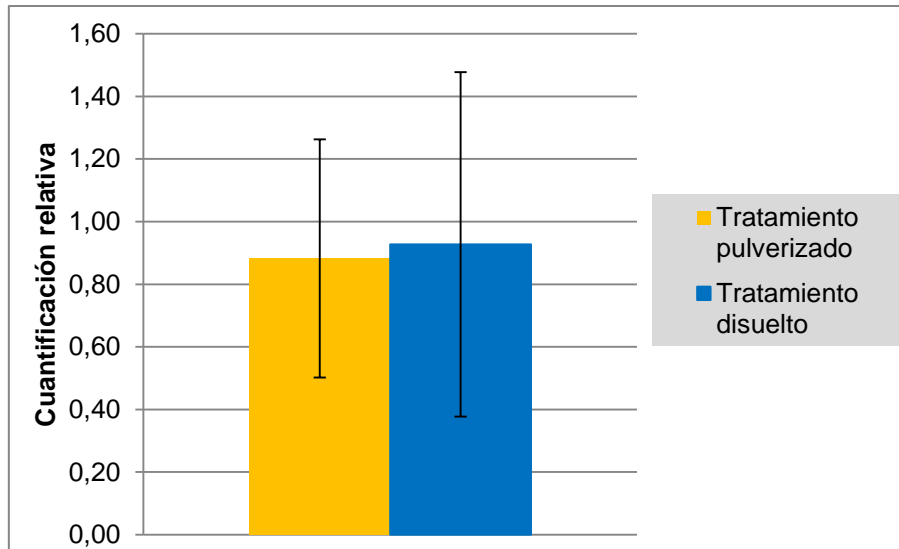
Tallos - Peso fresco				Tallos - Peso seco			
Tratamientos	N	Subconjunto $\alpha= 0.05$		Tratamientos	N	Subconjunto $\alpha= 0.05$	
		1	2			1	2
H <sub>2</sub> O	3	,3869		H <sub>2</sub> O	3	,0374	
H <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> OP	3	,4160		H <sub>2</sub> O+H <sub>2</sub> OP	3	,0419	
H <sub>2</sub> O+Al	3	,4435		H <sub>2</sub> O+Al	3	,0423	
H <sub>2</sub> O+SP	3	,4479		H <sub>2</sub> O+SP	3	,0493	
H <sub>2</sub> O+Al+H <sub>2</sub> OP	3	,5249	,5249	H <sub>2</sub> O+Al+H <sub>2</sub> OP	3	,0496	
H <sub>2</sub> O+Al+SD	3	,5256	,5256	H <sub>2</sub> O+Al+SD	3	,0527	,0527
H <sub>2</sub> O+SD	3	,5298	,5298	H <sub>2</sub> O+SD	3	,0532	,0532
H <sub>2</sub> O+Al+SP	3		,6185	H <sub>2</sub> O+Al+SP	3		,0660
Sig.		,070	,205	Sig.		,053	,077

Los subconjuntos representados en la tabla para cada conjunto de datos son similares estadísticamente. En ambos casos, podemos ver cómo los grupos 2, 4 y 8 se agrupan (junto al 7 en peso fresco) en el segundo subconjunto, mientras que el primero incluye siempre a todos los grupos menos al 4. En vista de los resultados, no podemos concluir que la exposición a aluminio, el tratamiento con Manvert-Silikon o sus efectos combinados tengan un efecto estadísticamente significativo sobre las medidas de biomasa. Cabe destacar que otros autores sí han encontrado cambios en la biomasa de raíz como respuesta a la exposición (Nogueirol *et al.*, 2015).

#### Medida de la expresión génica por PCR en tiempo real

Una vez seleccionado nuestro gen candidato, se procedió a determinar sus niveles de expresión en las plantas expuestas a nuestro tratamiento con el producto comercial. La RT-PCR nos permite conocer la expresión génica relativa de un gen candidato respecto a otro que nos sirva para normalizar la expresión del gen de estudio.

Para presentar los resultados se representó el incremento de Ct ( $\Delta$ Ct) de cada gen respecto al control (TUB). Definimos Ct como aquel ciclo en el que el producto de la PCR comienza a emitir una fluorescencia que se puede distinguir del fondo. Como la pendiente de la recta presentada fue inferior a 0,1 se aplicó el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001), y se representaron los resultados de dicha cuantificación relativa para cada tipo de aplicación del tratamiento (pulverización del Silikon sobre las hojas o aplicación disuelto en el agua de riego).



**Figura 4:** Expresión relativa del gen LHA (gen de interés) frente a TUB (gen de expresión constitutiva) en raíces de *Solanum lycopersicon* expuestas a Manvert Silikon en dos formatos de aplicación. Gráfica realizada con MS Excel.

En nuestro estudio de expresión génica buscamos comparar los niveles de expresión de una proteína que tiene aparición constitutiva (la tubulina) frente a una que suponemos que puede ver su expresión modulada por el aluminio, como es la LHA. Cuando observamos la figura 4, sin embargo, vemos que ni el lugar de aplicación del tratamiento (el pulverizado afectaba más directamente a las hojas, mientras que disolver el Silikon en la solución afectaba más directamente a las raíces) ni las diferencias de expresión para cada grupo de plantas son particularmente distintivas.

Los niveles de expresión de LHA son muy similares a los de la tubulina, muy cercanos entre los dos tratamientos y los datos del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  indican que el error es muy amplio, por lo que en un principio no podríamos afirmar que el Silikon modifica la expresión génica de LHA. Sin embargo, esto no supone una base para decir que la secreción de ácidos se vea reducida (son independientes) o que la ATPasa tenga menor actividad, puesto que la modulación de la actividad podría responder a modificaciones postranscripcionales de la misma manera que la induce el aluminio (Yang *et al.*, 2011), que no se verían reflejadas con esta prueba.

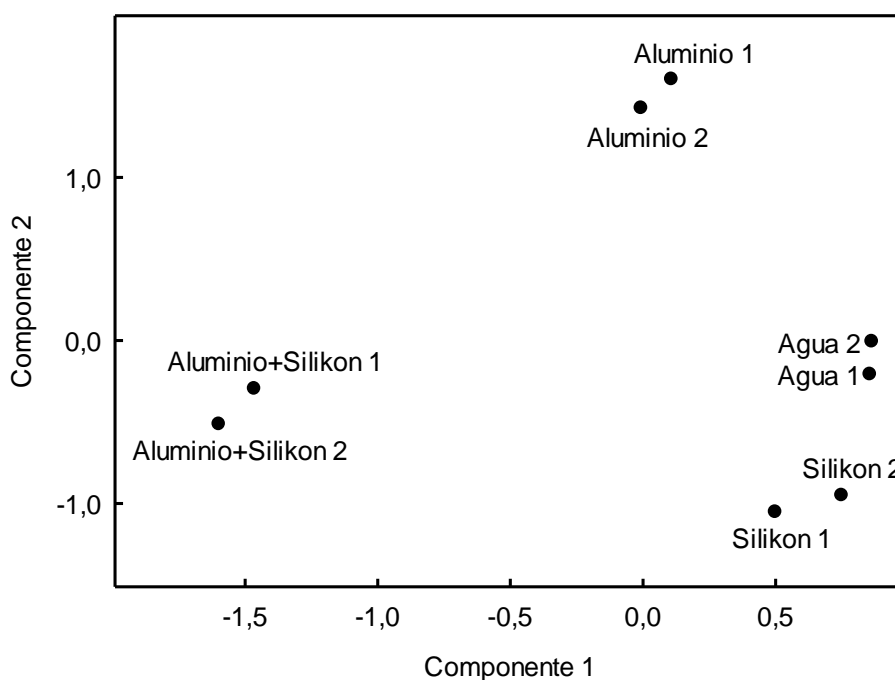
También podría argumentarse que si el dióxido de silicio del Silikon se transformase en ácido silícico, tendría efecto quelante (por el cual el aluminio volvería a su estado nativo no soluble) y minimizaría la necesidad de la planta de producir ácidos orgánicos. Esto se observó a nivel experimental en el laboratorio, en el que los tubos que tenían solución con aluminio y Silikon muchas veces presentaban un precipitado blanquecino; y las raíces no presentaban una sintomatología tan acusada como los grupos sin tratar con Silikon.

### Análisis de paredes celulares mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR)

En la tabla 3 se pueden observar los cinco primeros componentes obtenidos tras el ACP, así como el porcentaje de la varianza explicada por cada uno de ellos y la varianza total acumulada. Podemos observar que el primer componente explica la mayoría de la varianza con un 74%, alcanzándose más de un 90% con los dos primeros.

**Tabla 3:** Resultado del PCA para nuestras muestras en el rango del espectro (1800-800cm<sup>-1</sup>).

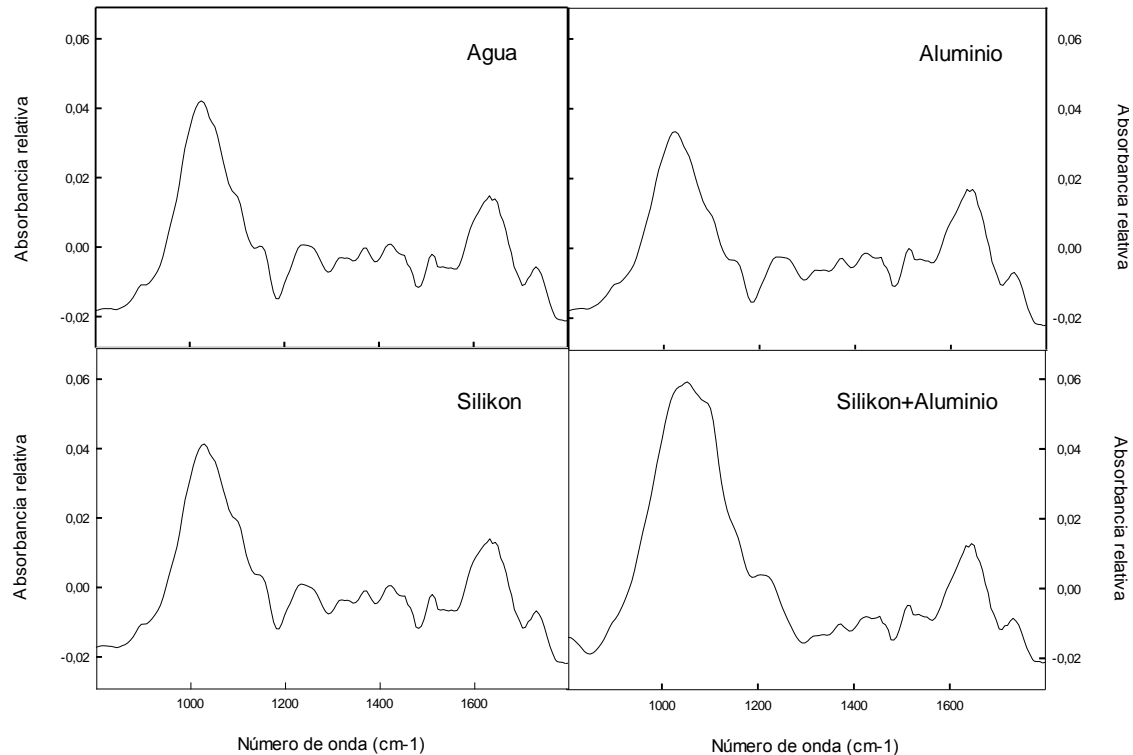
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	129,697	74,538	<b>74,538</b>
2	28,087	16,142	<b>90,681</b>
3	11,079	6,367	<b>97,048</b>
4	2,525	1,451	<b>98,499</b>
5	1,361	,782	<b>99,281</b>



**Figura 5:** Representación gráfica del Componente 1 frente al Componente 2 del APC.

La representación gráfica de los valores de los dos primeros componentes para las distintas muestras nos permiten comprobar cómo el análisis por FT-IR de las paredes celulares es capaz de discriminar los diferentes tratamientos (Figura 5). Este hecho nos indica de manera inequívoca que la presencia de aluminio provoca cambios drásticos en las paredes celulares.

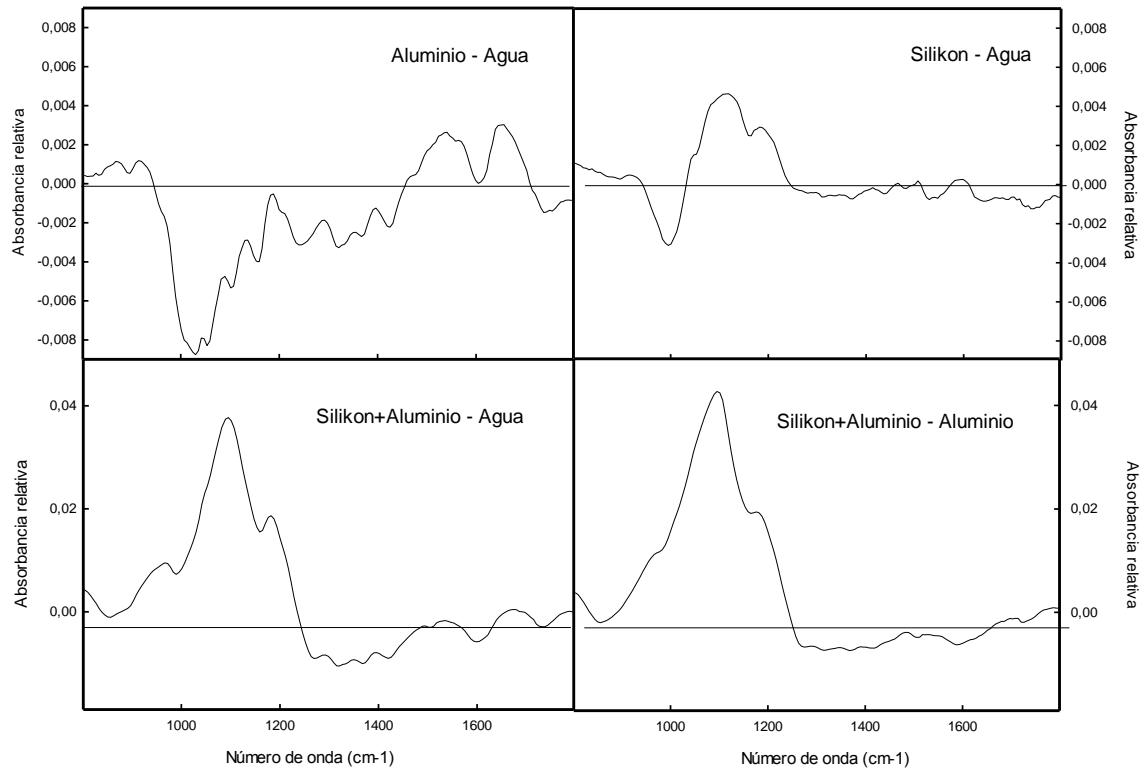
Los resultados del análisis de componentes principales indican que la mayor parte de la varianza de nuestros datos es fácilmente explicable con pocos factores, que además son fácilmente atribuibles a los tratamientos. Cuando representamos los dos primeros resultados de nuestro PCA (en la Figura 5) observamos cómo las dos réplicas para cada una de las condiciones están agrupadas pero separadas de las demás, lo que significa que tienen características similares entre ellas pero distintas de las plantas que crecieron en condiciones diferentes. Al observar las variables que más contribuyeron a los componentes resultado de un análisis del espectro completo (datos no presentados), se observó que el rango más decisivo se concentrada entre los  $1800-800\text{cm}^{-1}$ . No resulta llamativo que este rango sea el de mayor importancia en el espectro, dado que se encuentra asociado a múltiples componentes de la pared: La región entre  $1650-1500\text{cm}^{-1}$  se corresponde con anillos fenólicos y ácidos urónicos no esterificados, indicadores de la presencia de ligninas; mientras que la región  $1200-800\text{cm}^{-1}$  se compone de varios picos superpuestos de distintos carbohidratos (Fernández-Pérez *et al.*, 2014).



**Figura 6:** Espectros de absorbancia relativa para nuestras muestras en el rango de números de onda acotado a  $1800-800\text{cm}^{-1}$

Cuando observamos los espectros individuales de cada tipo de muestra podemos inferir la composición diferencial de la pared en base al tratamiento recibido. La figura de la esquina superior izquierda nos sirve de referencia al ser la del grupo control que no recibió tratamiento alguno. A través de ella, podemos observar que el aluminio tiene un pico más bajo en la parte correspondiente a carbohidratos, mientras que el más cercano a la zona relacionada con las ligninas es sensiblemente mayor. Por su parte, las raíces tratadas con Silikon (superior derecha) presentan un espectro muy similar al del grupo control. No es hasta que contamos con la presencia simultánea de Manvert-Silikon y aluminio que se produce un cambio sustancial en el

perfil del espectro. El contenido en polisacáridos se dispara respecto al resto de grupos, mientras que las ligninas permanecen relativamente inalteradas.



**Figura 7:** Espectros diferenciales de absorbancia relativa para los distintos tratamientos, acotado al rango de números de onda  $1800\text{-}800\text{cm}^{-1}$ . Nótese la diferencia de escala vertical entre ambas mitades.

La forma más clara de visualizar las diferencias entre los tratamientos nos las ofrecen la siguiente figura, en la cual se han restado los valores de unos espectros a otros para poder observar así qué números de onda presentan diferencias en la absorbancia relativa en ambos sentidos, lo que nos permite estimar mayores o menores cantidades de cada compuesto. Cuando establecemos un diferencial entre las plantas afectadas por aluminio y el grupo control (superior izquierda), vemos que se produce un descenso moderado en la zona asociada con carbohidratos de pared, mientras que la región relacionada con las ligninas tiene un balance total positivo, lo que apunta a una pared más rígida y con componentes más propios de una pared secundaria que de una zona en crecimiento. Esa idea es consistente con el fenotipo típico de raíz afectada por el aluminio que describía Luo (1999).

Cuando aplicamos Silikon de forma preventiva y observamos los efectos respecto al control (superior derecha), lo que observamos es que la zona relacionada con las ligninas permanece prácticamente inalterada, y que los cambios se concentran en torno a los polisacáridos. En el rango que les corresponde, vemos descensos mezclados con incrementos, lo que nos puede estar indicando un cambio en las proporciones de polisacáridos presentes, sin alterar en gran medida la cantidad global de estas moléculas. Existe la posibilidad de asociar estos cambios en la composición de la pared con el fortalecimiento mecánico atribuido al silicio, fortaleciendo la barrera física que supone la pared vegetal contra el aluminio.

Los espectros de la parte inferior de la figura, que comparan el efecto conjunto del Silikon y el aluminio en las paredes con el grupo control y el expuesto únicamente a aluminio, son las que muestran cambios a una escala mucho más acusada que las dos anteriores. A la izquierda podemos ver cómo el

contenido en carbohidratos se dispara (es un aumento cinco veces superior al que sucedía sólo con Silikon) mientras que, otra vez, la región de las ligninas no muestra grandes cambios. Lo mismo ocurre si contrastamos el tratamiento de Silikon en presencia de aluminio con los daños que produce el elemento por su cuenta: el incremento total de contenido en carbohidratos es incluso mayor debido a que se está sumando a la pérdida que producía el aluminio por su cuenta, mientras que la zona asociada con ligninas presenta unos valores globales de pérdida por el mismo motivo (las ligninas aumentaban en cantidad como respuesta al aluminio).

La observación de estas gráficas nos permite ver diferencias sustanciales en la composición de la pared como respuesta a la exposición al aluminio y al Manvert-Slikon. En este caso sí podemos observar la capacidad del Silikon de modificar la respuesta de la planta cuando se la somete a estrés, e incluso se vislumbra un posible cambio incluso con una aplicación preventiva.

## 5. a. Conclusiones (Castellano)

Los tratamientos aplicados a las muestras no producen cambios significativos en el peso de las muestras, según lo observado en pruebas estadísticas, a pesar de lo observado por otros autores.

Los datos obtenidos no nos permiten afirmar que Manvert-Silikon induzca cambios en la expresión génica de LHA respecto a un gen de expresión constitutiva, pero la actividad de la proteína podría responder a otro tipo de modificaciones.

Por otro lado, sí se observan cambios en la proporción de componentes de la pared celular como consecuencia de la aplicación del tratamiento con Manvert-Silikon, de la presencia de aluminio libre y de efectos combinados entre los dos. Es posible observar diferencias en los espectros incluso con una aplicación de tipo preventivo de Manvert-Silikon.

## 5.b. Conclusions (English)

The treatments applied to our samples do not result in significant changes to the weight of said samples, as observed through statistical testing despite the findings of other authors.

The data obtained does not give ground to affirm that Manvert-Silikon induces changes in LHA gene expression compared to a constitutive gene, however protein activity may respond to other types of modification.

On the other hand, changes in the composition of the cell wall can be observed as a consequence of treatment with Manvert-Silikon, presence of free aluminum and their combined effects. It is possible to note differences even with a preventive application of Manvert-Silikon.

## 6. Bibliografía

Asociación Española de Fitosanitarios y Sanidad Ambiental (2012) *Productos fitofortificantes*. <http://www.aefisa.es/productos/otros-medios-de-defensa-vegetal> (Última consulta 20/07/2015)

Australian Centre for Plant Functional Genomics (ACPFPG) *Aluminium tolerance* <http://www.acpfg.com.au/index.php?id=7> (Última consulta 21/07/2015).

Chakraborty N, Chandra S, Acharya N (2014) *Sublethal heavy metal stress stimulates innate immunity in tomato*. The Scientific World Journal Volume 2015, Article ID 208649.

Delhaize E, Ryan P.R, Randall P.J (1993) *Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices*. Plant Physiology 103, 695-702.

Díaz-González T.E, Fernández-Carvajal Álvarez M.C, Fernández Prieto J.A. (2004) *Curso de Botánica*. Ediciones Trea. Gijón, España

Fernández-Pérez F, Pomar F, Pedreño M.A, Novo-Uzal E (2014) *The suppression of AtPrx52 affects fibers but not xylem lignification in Arabidopsis by altering the proportion of syringyl units*. Physiologia Plantarum, doi:10.1111/ppl.12310.

Kopittke P.M, Moore K.L, Lombi E, Gianoncelli A, Ferguson B.J, Pax F, Blamey C, Menzies N.W, Nicholson T.M, McKenna B.A, Wang P, Gresshoff P.M, Kourousias G, Webb R.I, Green K, Tollenaere A (2015) *Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots*. Plant Physiology 167, 1402-1411.

Livak K.J, Schmittgen T.D (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$  method*. Methods 25, 402-408.

Luo H.M, Watanabe T, Shinano T, Tadano T (1999) *Comparison of aluminum tolerance and phosphate absorption between rape (*Brassica napus* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in relation to organic acid exudation*. Soil Sci. Plant Nutr. 45 (4), 897-907.

MAGRAMA (2013) *Anuario de Estadística: Estadísticas del medio rural*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/> (última consulta 18/07/2015).

MAGRAMA (2014) *Registro de determinados medios de defensa fitosanitaria*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Madrid. <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-determinados-medios-de-defensa-fitosanitaria/> (Última consulta 19/07/2015)

Mateos-Naranjo E, Gallé A, Flórez-Sarasa I, Perdomo J.A, Galmés J, Ribas-Carbó M, Flexas J (2015) *Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C<sub>4</sub> grass *Spartina densiflora**. Journal of Plant Physiology 178, 74-83.



Nogueirol R.C, Monteiro F.A, Gratão P.L, Borgo L, Azevedo R.A (2015) *Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes*. Environ Monit Asses 187:73.

Ohno T, Koyama H, Hara T (2003) *Characterization of citrate transport through the plasma membrane in a carrot mutant cell line with enhanced citrate excretion*. Plant Cell Physiol 44, 156–162

Ouldali O, Aoues A, Meedah B, Slimani M, Nicolas A, Kharoubi O (2011) *Beneficial effects of carrot pectin against lead intoxication in Wistar rats*. International Journal of Green Pharmacy 5 (2), 126-130.

Panthee D.R, Cheng F (2010) *Genomics of fungal disease resistance in tomato*. Current Genomics 11, 30-39.

Pomar F, Merino F, Ros Barceló A (2002) *O-4-Linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Wiesner (phloroglucinol-HCl) reaction*. Protoplasma 220: 17-28

Sarwat M, Ahmad A, Abdin MZ (Editors) (2013). *Stress signaling in plants: Genomics and Proteomics perspective, Volume 1*. Springer Science+Business Media New York.

Shen H, Ian X, Zhao M, Zheng S, Wang X (2002) *Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates*. Environ Exp Bot 48, 1–9.

Sujkowska-Rybkowska M, Borucki W (2015) *Pectins esterification in the apoplast of aluminum-treated pea root nodules*. Journal of Plant Physiology 184, 1-7.

Ward C.L, Kleinert A, Scortecci K.C, Benedito V.A, Valentine A.J (2011) *Phosphorus-deficiency reduces aluminium toxicity by altering uptake and metabolism of root zone carbon dioxide*. Journal of Plant Physiology 168, 459-465.

Wu J, Guo J, Hu Y, Gong H (2015) *Distinct physiological responses of tomato and cucumber plants in silicon-mediated alleviation of cadmium stress*. Frontiers in Plant Science 6, article 453.

Yang J.L, Zhu X.F, Peng Y.X, Zheng C, Ming F, Zheng S.J (2011) *Aluminum regulates oxalate secretion and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity independently in tomato roots*. Planta 234:281-291.

Zheng L, Lan P, Shen R.F, Li W.F (2014) *Proteomics of aluminum tolerance in plants*. Proteomics 14, 566-578.

Zhou S, Sauvé R, Thannhauser T.W (2009) *Aluminum induced proteome changes in tomato cotyledons*. Plant Signaling and Behavior 4:8, 769-772.

Zhu Y, Yan F, Zörb C, Schubert S (2005) *A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions?* Plant Cell Physiol 46, 892–901