



Terra Latinoamericana

ISSN: 2395-8030

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C.

Rodríguez-Sánchez, Verónica Monserrat; Morales-Moreno,
Joselin Damaris; Cram-Heydrich, Silke; Cruz-Ortega, Rocío
Localización y cuantificación de aluminio en tejidos vegetales: herramientas histoquímicas y analíticas
Terra Latinoamericana, vol. 40, e999, 2022
Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.999>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57371833038>

- ▶ [Cómo citar el artículo](#)
- ▶ [Número completo](#)
- ▶ [Más información del artículo](#)
- ▶ [Página de la revista en redalyc.org](#)



Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Localización y cuantificación de aluminio en tejidos vegetales: herramientas histoquímicas y analíticas

Aluminium localization and quantification in plant tissues: analytical and histochemical tools

Verónica Monserrat Rodríguez-Sánchez¹ , Joselin Damaris Morales-Moreno¹ ,
Silke Cram-Heydrich²  y Rocío Cruz-Ortega^{1,‡} 

¹ Laboratorio de Alelopatía, Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Circuito Exterior s/n, anexo al jardín botánico exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán. 04510 Ciudad de México, México.

[‡] Autora para correspondencia (rcruz@ecologia.unam.mx)

² Departamento de Geografía Física, Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad 3000, Copilco Universidad. 04510 Coyoacán, Ciudad de México, México.

Editor de Sección: Dr. Juan Carlos Noa Carrazana

RESUMEN

El aluminio (Al) es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre. Su forma química depende de los valores de pH del suelo. En suelos ácidos el Al se libera y solubiliza principalmente en la forma iónica de Al³⁺, la cual es tóxica para la mayoría de las plantas. Los principales efectos tóxicos del Al se observan en el ápice de la raíz, inhibiendo la división y elongación celular, lo que origina una raíz deficiente en la absorción de agua y nutrientes, dando como resultado la inhibición del crecimiento, y, por lo tanto, una disminución en la productividad de las plantas. Actualmente, el Al se encuentra disponible en suelos que no son naturalmente ácidos y se utilizan como tierras de cultivo. Esto ha generado una línea de investigación en relación con el efecto del Al en diferentes especies de plantas, por ejemplo, los sitios de acumulación y concentración en los diferentes órganos vegetales. En este contexto, el objetivo de la presente revisión es proporcionar una guía para seleccionar la técnica más adecuada que permita la localización y cuantificación del Al en los diferentes órganos de las plantas que crecen en suelos ácidos. Para ello, primero se describen los fundamentos de las distintas técnicas para localizar y cuantificar el Al en los órganos o tejidos vegetales y, con la finalidad de integrar la información se proporciona una guía para recomendar la técnica

más apropiada con base en algunas características de la(s) especie(s) a analizar. Profundizar en el estudio de los sitios de acumulación y las concentraciones de Al que las plantas pueden absorber, permitirá seleccionar cultivos tolerantes que pueden ser aprovechados para la producción agrícola o estudios de fitorremediación.

Palabras clave: hiperacumulación, histoquímica, suelos ácidos, toxicidad por aluminio.

SUMMARY

Aluminum (Al) is the third most abundant element in the Earth's crust. Its chemical form depends on the soil pH values. In acidic soils, Al is released and solubilized mainly in the ionic form of Al³⁺, which is toxic to most plants. The main toxic effects of Al are observed at the root apex, inhibiting cell division and elongation, which causes a deficient root to uptake water and nutrients, resulting in growth inhibition, thus, a decrease in plant productivity. At present, Al is available in soils that are not naturally acidic and used as farmland, which has generated a research line in relation with the effect of Al in different plant species, for example, accumulation and concentration sites in the different plant organs. In this context, the objective of this review article is to provide a guide to select the most appropriate technique that allows

Cita recomendada:

Rodríguez-Sánchez, V. M., Morales-Moreno, J. D., Cram-Heydrich, S. y Cruz-Ortega, R. (2022). Localización y cuantificación de aluminio en tejidos vegetales: herramientas histoquímicas y analíticas. *Terra Latinoamericana*, 40, 1-18. e999. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.999>

Recibido: 15 de julio de 2021. Aceptado: 8 de mayo de 2022.
Revisión. Volumen 40, septiembre de 2022.

localizing and quantifying Al in the different organs of plants growing in acidic soils. For this purpose, the fundamentals of the different techniques to locate and quantify Al in plant organs and/or tissues are first described, and this information is integrated by providing a guide recommending the most appropriate technique based on some characteristics of the species to be analyzed. Furthermore, going deeper into the study of Al accumulation sites and concentrations that the plants can absorb should allow selecting tolerant crops that can be used for agricultural production or phytoremediation studies.

Index words: *hyperaccumulation, histochemistry, acid soils, aluminum toxicity.*

INTRODUCCIÓN

Las características de los suelos son variables debido a sus interacciones con el medio físico, biótico y con las actividades humanas, que pueden alterar su composición. Esto ocurre con los suelos ácidos, que han aumentado su cobertura en los últimos 100 años, debido a la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, el exceso de materia orgánica añadida al suelo y los episodios de lluvia ácida (Weil y Brady, 2017). Los suelos ácidos poseen valores de $\text{pH} < 5.5$ durante la mayor parte del año (FAO, 2021). El valor de pH del suelo esta ligado con el poder amortiguador, que es una de las características del suelo más importantes para el desarrollo óptimo de las plantas, debido a que permite tolerar o generar cambios en el pH a causa de los iones disueltos, los minerales y los espacios llenos de agua o aire (Weil y Brady, 2017). Cuando ocurren procesos de acidificación del suelo, se debe a que existe una gran cantidad de iones hidrógeno (H^+) en solución que superan a otros iones disueltos, disminuyendo así el pH del suelo.

De manera natural los suelos ácidos se distribuyen en zonas templadas y tropicales. En las zonas templadas, los suelos ácidos son predominantemente orgánicos (esodosoles, alfisoles, inceptisoles e histosoles). Mientras que, en las zonas tropicales, los suelos son ácido-minerales entre los que predominan los ultisoles y los oxisoles (Von Uexküll y Mutert, 1995). En cambio, los suelos ácidos originados por las actividades humanas están en función de la demanda de producción agrícola. Generalmente se explotan intensamente suelos con poca capacidad amortiguadora para resistir los efectos

de una acidez inducida, liberando algunos elementos a la solución del suelo, como el aluminio (Al). Puesto que el Al es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre, es común encontrarlo en los minerales del suelo en formas cristalinas o amorfas, como los aluminosilicatos, oxihidróxidos y complejos orgánicos, que no están disponibles para reacciones químicas o biológicas (Kisnieriené y Lapeikaité, 2015; Weil y Brady, 2017).

Sin embargo, si el suelo se encuentra bajo condiciones ácidas el Al se vuelve soluble. Esto se origina por el exceso de H^+ que son adsorbidos en la superficie de los minerales, lo que causa un colapso en su red cristalina que libera el Al en forma de catión (Al^{3+}) a la solución del suelo. Otra parte del Al es adsorbido en los sitios de intercambio de los minerales y desplaza cationes esenciales para las plantas como son Ca, K, N, Mg, P, S, Mo. De esta forma el Al puede ser absorbido por las plantas y cuando las concentraciones en el suelo son de $10 \mu\text{M}$ o mayores, las plantas presentan condiciones muy desfavorables para su desarrollo. Inclusive, si la acidez llega a alcanzar valores de $\text{pH} < 3$ en el suelo comienza la solubilización del óxido de hierro cristalino (ferrihidrita), lo que lleva a la liberación de iones Fe^{3+} . Además, bajo estas condiciones casi el 100% de los cationes disponibles están conformados por Al^{3+} y, sólo una porción menor al 1% por H^+ , Fe^{3+} y Mn^{2+} (Kisnieriené y Lapeikaité, 2015; Weil y Brady, 2017). La principal característica fitotóxica del Al es el daño en el ápice de la raíz, originado por su deformación y una rápida inhibición de su elongación, como consecuencia se afecta la absorción de agua y, al no existir elementos esenciales disponibles se originan deficiencias nutritivas severas que pueden generar una disminución de la biomasa e inclusive la muerte de la planta (Ma, Ryan y Delhaize, 2001; Casierra-Posada y Aguilar-Avenidaño, 2007).

No obstante, existen plantas nativas de suelos ácidos como *Camellia sinensis* o *Melastoma malabathricum* y, otras especies cultivables como *Oryza sativa* y *Zea mays*, que han generado mecanismos ante la presencia de Al disponible en el suelo, permitiendo su crecimiento y desarrollo (Ma *et al.*, 2001; Pilon-Smits, Quinn, Tapken, Malagoli y Schiavon, 2009). En general, se pueden distinguir dos vías para evitar la toxicidad del Al. El primer mecanismo es la exclusión, donde las células de la raíz producen exudados que son liberados en la rizosfera para hacer menos soluble el Al y reducir su movilidad; las sustancias liberadas pueden ser

ácidos orgánicos como el ac. oxálico, ac. málico o ac. cítrico, compuestos fenólicos o polisacáridos en forma de mucílago (Panda y Baluška, 2015). El segundo mecanismo es la acumulación, que puede darse en las paredes celulares cuando el Al desplaza a los iones de calcio de las pectinas, también implica la entrada del Al a las células y su secuestro en las vacuolas de la raíz o de las hojas en formas no tóxicas, es decir, que el Al se une con aniones de ácidos orgánicos, como Al:Oxalato, Al:Citrato o Al:Malato (Ma *et al.*, 2001; Watanabe y Osaki, 2001).

Por lo anterior, se considera que las plantas tolerantes a Al son capaces de generar exudados para evitar su ingreso a los tejidos y su translocación es mínima o nula, mientras que, las plantas acumuladoras poseen mecanismos internos que permiten ingresar, transportar y secuestrar el Al en la parte aérea de las plantas. Cuando el Al ingresa a las células de la raíz es capaz de almacenarse en todos sus tejidos, desde la rizodermis hasta los vasos del xilema; luego es transportado por el sistema vascular del tallo hasta las hojas. Los sitios de almacén en las hojas de especies acumuladoras varían entre cada especie, en algunas el Al se distribuye en todos los tejidos, en otras solo en la epidermis, el mesófilo o los haces vasculares (Haridasan, Paviani y Schiavini, 1986; Bressan, Coan y Habermann, 2016).

El estudio de las respuestas que el Al genera en las plantas es muy diverso, pero una parte fundamental es determinar en qué órganos, tejidos o células se almacena el Al. Para lograrlo se requiere hacer visible su presencia, por ello, deben utilizarse colorantes que en su estructura química posean afinidad hacia el Al. Otra variable esencial es la cuantificación de las concentraciones del Al acumulado en los órganos o tejidos. Generalmente las investigaciones se basan en las cantidades de Al presentes en las hojas, se ha establecido que las plantas con menos de 1000 mg kg⁻¹ representan especies no acumuladoras, por otro lado, se consideran especies acumuladoras cuando son capaces de secuestrar más de 1000 mg kg⁻¹ de Al en sus hojas (Jansen, Broadley, Robbrecht y Smets, 2002). Para medir estas concentraciones existen dos grupos de técnicas, las de cuantificación elemental donde sólo se cuantifica la concentración del Al, en contraste, las técnicas de cuantificación multielemental son capaces de calcular las concentraciones del Al y de los aniones orgánicos con los que se une; finalmente existen técnicas que permiten realizar una cuantificación elemental

in situ, o sea, que se miden las concentraciones de Al y al mismo tiempo se determina el tejido o células donde se acumula.

Debido a que no todas las plantas responden de igual forma ante la presencia del Al, que los suelos ácidos siguen incrementado día a día por la explotación agrícola o forestal, es de vital importancia revisar cuáles son las técnicas que existen actualmente para localizar y cuantificar el Al en los tejidos vegetales. Si bien se conocen las respuestas tóxicas que genera este elemento en algunas especies, o los mecanismos de respuesta, aún existen especies vegetales en las que se desconoce cuál es el efecto que tiene. Por ello, en la presente revisión se realizó una compilación de las técnicas utilizadas en la localización y cuantificación del Al en las plantas. Además, se presenta un diagrama de flujo al lector para seleccionar la técnica más adecuada a sus intereses de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para identificar las publicaciones sobre las técnicas utilizadas en la localización y cuantificación del Al en tejidos vegetales, se realizó una búsqueda utilizando los portales web de Science Direct® 2020 Elsevier y Scientific Electronic Library Online (SciELO). En cada portal se escribieron las palabras clave: “aluminum in plants”, “aluminium in tissues plants”, “aluminum toxicity”. Después de revisar las técnicas encontradas en las publicaciones, se realizó una división en dos categorías: (i) las técnicas de localización o distribución *in situ* de aluminio, (ii) las técnicas de cuantificación que se subdividen en tres: a) técnicas de cuantificación total de aluminio, b) técnicas de cuantificación multielemental y c) las técnicas de cuantificación *in situ*. Únicamente se tomaron en cuenta las referencias más significativas a partir de 1986, de ellas se efectuó una compilación de las familias y especies vegetales (Cuadro 1).

Las Pruebas Histoquímicas como Técnicas de Localización *in situ* del Aluminio

Las plantas poseen una estrecha relación entre su ambiente y la organización de sus tejidos, el resultado de esta interacción puede generar la acumulación de diversas sustancias como almidón, compuestos fenólicos, calosa, elementos metálicos, etc. (Sandoval, 2005). Una manera de identificar estas

Cuadro 1. Familias y especies de plantas cuyos tejidos fueron analizados para encontrar aluminio.
Table 1. Plant families and species whose tissues were analyzed to find aluminum.

Familia	Especies
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. <i>Lupinus albus</i> L.
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Cupressaceae	<i>Cryptomeria japonica</i> (Thunb. Ex Lf) D.Don <i>Cicer arietinum</i> L.
Fabaceae	<i>Glycyne max</i> (L.) Merr. <i>Medicago sativa</i> L. <i>Pisum sativum</i> L.
Hydrangeaceae	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser. <i>Conostegia xalapensis</i> (Bonpl.) D. Don ex DC.
Melastomataceae	<i>Melastoma malabathricum</i> L. <i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud, <i>M. ferruginata</i> DC., <i>M. pohliana</i> Cogn., <i>M. rubiginosa</i> (Bonpl.) DC. <i>Microlicia fasciculata</i> Mart. ex Naud.
Musaceae	<i>Mussa spp.</i>
Myrtaceae	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.
Pinaceae	<i>Pinus taeda</i> L., <i>P. thunbergii</i> Parl. <i>Andropogon virginicus</i> L. <i>Brachiaria sp</i> <i>Eremochloa ophiuroides</i> (Munro) Hack. <i>Hordeum vulgare</i> L.
Poaceae	<i>Miscanthus sinensis</i> Andersson <i>Oryza sativa</i> L. <i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud. <i>Triticum aestivum</i> L. <i>Zea mays</i> L. <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench cv. Lifago y cv. Jianxi, <i>F. tataricum</i> cv. Rotundatum, <i>F. homotropicum</i> cv. Mianshawan, <i>Rumex acetosa</i> L. <i>Alberta minor</i> Baillon <i>Canthium confertum</i> Korth <i>Coccocypselum canescens</i> Willd. ex Roem. & Schult.
Polygonaceae	<i>Coptosapelta olaciformis</i> Elm <i>Faramea marginata</i> Cham. <i>Gouldia terminalis</i> (Hook. & Arn.) <i>Palicourea rigida</i> Kunth <i>Saprosma arboreum</i> Blume
Rubiaceae	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.
Rutaceae	<i>Solanum paniculatum</i> L.
Solanaceae	<i>Symplocos paniculate</i> (Thunb.) Miq.
Symplocaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze <i>Callisthene major</i> Mart.
Theaceae	<i>Qualea grandiflora</i> Mart., <i>Q. multiflora</i> Mart., <i>Q. parviflora</i> Mart. <i>Vochysia elliptica</i> Mart., <i>V. pyramidalis</i> Mart., <i>V. rufa</i> Mart., <i>V. thyrsoides</i> Pohl
Vochysiaceae	

sustancias es mediante pruebas histoquímicas, que se basan en la unión del tejido con algún colorante que posee estructuras químicas llamadas cromóforos o fluoróforos. Dichas estructuras reaccionan con los componentes celulares específicos y producen pigmentaciones o precipitados en los tejidos, que revelan la presencia del elemento o compuesto de interés. En el Cuadro 2 se enlistan los colorantes utilizados para la detección de Al en diversas familias vegetales.

Los cromóforos son moléculas orgánicas que poseen un radical benceno o unión triple de N en su estructura química, que revelan un color luego de unirse a los grupos hidroxilo, carboxilo, amino u otros iones en las células. Para facilitar la reacción debe utilizarse un mordiente entre la estructura celular y el colorante, los mordientes pueden ser sales de metales divalentes o trivalentes (Sandoval, 2005). Después de

la tinción, la muestra se coloca bajo la iluminación de campo claro de un microscopio fotónico para observar una coloración específica. Por otro lado, los fluoróforos son grupos funcionales de una molécula orgánica, que pueden unirse con otra molécula o ion blanco. Luego de la tinción, la muestra se excita a una longitud de onda específica para que el fluoróforo absorba energía y la emita en otra longitud de onda dentro del espectro visible, esta señal es detectada bajo microscopía confocal o de fluorescencia. La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen del propio fluoróforo y el medio en el que este disuelto (Tice, Parker y De Mason, 1992).

Hematoxilina (C₁₆H₁₄O₆). Este es el colorante más común y utilizado en los estudios reportados en la mayoría de las publicaciones, por lo general, este colorante es empleado para determinar la absorción de Al en raíces completas de plántulas, y hasta el 2011, De

Cuadro 2. Familias vegetales y técnicas histoquímicas aplicadas a la determinación de aluminio.
Table 2. Plant families and histochemical techniques applied to the determination of aluminum.

Familia	Técnica	Autor(es)
Brassicaceae	Morin	Ezaki, Nagao, Yamamoto, Nakashima y Enomoto (2008)
	Hematoxilina	Arroyave, Tolrà, Thuy, Barceló y Poschenrieder (2013)
Cucurbitaceae	Morin	Pereira <i>et al.</i> (2006)
Fabaceae	Lumogallion	Silva <i>et al.</i> (2000); Kataoka y Nakanishi (2001) y Zhou, Yang, Ren, Huang y An (2014)
	Aluminon	Haridasan, Paviani y Schiavini (1986) y Bressan, Coan y Haberman (2016)
	Hematoxilina	Bressan <i>et al.</i> (2016)
Melastomataceae	Cromo-azurol S	
	Violeta de Pirocatecol	Watanabe, Osaki, Yoshihara y Tadano (1998) y González-Santana, Márquez, Cram y Cruz-Ortega (2012)
Pinaceae	Lumogallion	Moyer-Henry <i>et al.</i> (2005)
Poaceae	Morin	Eticha, Staß y Horst (2005); Ezaki <i>et al.</i> (2008) y Ezaki, Jayaram, Higashi y Takahashi (2013)
	Hematoxilina	Vázquez, Poschenrieder, Corrales y Barceló (1999) y Awasthi <i>et al.</i> (2017)
Polygonaceae	Lumogallion	Zheng <i>et al.</i> (2005), Klug, Specht y Horst (2011) y Reyna-Llorens, Corrales, Poschenrieder, Barceló y Cruz-Ortega (2015)
	Morin	
Rubiaceae	Violeta de Pirocatecol	Britez, Watanabe, Jansen, Reissmann y Osaki (2002) y Nogueira, Bressan, Pinheiro y Habermann (2019)
	Cromo-azurol S	
Rutaceae	Morin	Riaz <i>et al.</i> (2018)
Symplocaceae	Violeta de Pirocatecol	Schmitt, Watanabe y Jansen (2016)
Theaceae	Morin	Hajiboland y Poschenrieder (2015)
	Hematoxilina	Li <i>et al.</i> (2017)
	Aluminon	Haridasan <i>et al.</i> (1986) y Bressan <i>et al.</i> (2016)
Vochysiaceae	Cromo-azurol S	Bressan <i>et al.</i> (2016)
	Hematoxilina	De Andrade <i>et al.</i> (2011) y Bressan <i>et al.</i> (2016)

Andrade y colaboradores probaron este colorante sobre secciones histológicas de hojas. La interacción de este colorante con el Al muestra una coloración violeta intenso (Bressan *et al.*, 2016). Durante su preparación, la hematoxilina debe oxidarse a hemateína, por lo general, se utiliza yodato de sodio como agente oxidante y el Al en el organismo actúa como mordiente (Kiernan, 2015). La solución recién preparada tiene un color ámbar intenso, debido a su exposición al O₂ atmosférico continúa oxidándose y cambiando de color. Una vez que la solución obtiene un color marrón opaco, carece de eficacia como colorante. Si esto ocurre, se debe preparar una solución nueva, según sea necesario. La tasa de oxidación se puede reducir manteniendo la solución de tinción bien tapada a 4 °C. Las soluciones deben ser neutras o ligeramente ácidas, ya que la alcalinidad favorece la rápida oxidación y reduce su vida útil. La tasa de oxidación se puede reducir añadiendo glicerol o alcohol a la solución (Kiernan, 2015). Una de las ventajas de aplicar esta prueba es que se realiza en un corto tiempo y puede aplicarse en cualquier tejido u órgano de la planta. La desventaja de esta tinción utilizada en raíces completas o cortes frescos es que las observaciones deben realizarse de manera inmediata, pues los tejidos deben mantenerse hidratados. Por otro lado, este colorante puede revelar la presencia de otros metales como el Fe (coloración negra) y Sn (coloración roja) (Kiernan, 2015; Bressan *et al.*, 2016).

Violeta de pirocatecol (C₁₉H₁₄O₇S). Este colorante se ha utilizado en la detección espectrofotométrica y electroquímica de adsorción del Al en agua (Wang, Stass y Horst, 2004). Hasta que Watanabe, Osaki, Yoshihara y Tadano (1998), lo emplearon como colorante sobre secciones histológicas de hoja y raíz en la especie acumuladora de Al, *Melastoma malabathricum*. Esta prueba histoquímica revela un color azul ante la presencia de Al. El colorante debe estar disuelto en una solución amortiguadora de hexamina-hidróxido de amonio, pH 6.2. La hexamina actúa como mordiente, para disminuir su oxidación el pH del amortiguador debe ser neutro, la estabilidad del pH está dado por la presencia de amoníaco o formaldehído. La solución debe mantenerse bien cerrada a 4 °C y, se recomienda prepararla 24 h antes de utilizarse para estabilizar el pH de la misma. Una desventaja es que el violeta de pirocatecol no sólo reacciona con el Al, sino también con otros iones metálicos como el Fe³⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ (Wang *et al.*, 2004). En el caso del Fe, para evitar

su interferencia se sugiere realizar una reacción de reducción, para mayor detalle del protocolo se recomienda consultar a Dougal y Wilson (1974).

Aluminon o Sal de triamonio del ácido aurin tricarboxílico (C₂₂H₂₃N₃O₉). Este colorante se usa para detectar Al en un medio ácido (pH 4), la coloración que se obtiene es roja y también tiñe de azul los núcleos celulares (Kiernan, 2015). A pH > 6 disminuye su sensibilidad para detectar Al. También la temperatura es un factor importante y, para obtener una coloración más intensa el colorante se deja reposar sobre los tejidos una hora. Sin embargo, el aluminon no es un reactivo específico del Al, esto se debe a que también se produce coloración en presencia de Fe³⁺ o Be²⁺, e incluso afecta la intensidad de la coloración formada. Otros factores que intervienen en la detección del Al con aluminon es la composición celular y el pH intercelular. Asimismo, se han encontrado resultados falsos negativos al aplicar este colorante y se han obtenido resultados variables en muestras histológicas incluidas en resinas tipo epoxi (Bressan *et al.*, 2016). Por lo tanto, el uso de este colorante no es muy recomendable para la localización del Al en los tejidos vegetales.

Cromo azulol S (C₂₃H₁₃Cl₂Na₃O₉S). Este es un colorante utilizado desde hace más de 40 años para identificar Al en los tejidos vegetales. La coloración azul indica la presencia de Al, la solución del colorante debe estar disuelta en un amortiguador de acetato de sodio a pH 4.82 (Bressan *et al.*, 2016). La aplicación del cromo azulol S comparado con la hematoxilina sobre especies acumuladoras de Al probó ser más sensible (Bressan *et al.*, 2016). Por otra parte, Wehr *et al.* (2010), realizaron una comparación entre distintos colorantes y determinaron que sólo el cromo azulol S mostró una sensibilidad mayor para detectar Al. Lo anterior, lo comprobaron al realizar pruebas con geles de pectinas y tejidos de raíz, en las que la coloración permaneció estable durante varias semanas al conservar las muestras a 4 °C. Esto sugiere que el cromo azulol S forma una unión estrecha con los iones de Al, incluso por su estructura química puede formar largas cadenas con el Al, si este se encuentra en solución (Wehr *et al.*, 2010).

Morin (2',3,4',5,7-Pentahidroxi flavona). Este es uno de los colorantes más usados en el análisis del Al en tejidos vegetales, debido a que posee una alta especificidad y por su estructura química posee cinco grupos funcionales para formar enlaces con el Al. Este colorante debe estar disuelto en una solución

amortiguadora de acetato de amonio, pH 5 (Browne, McColl y Driscoll, 1990). El morin se aplica sobre secciones histológicas frescas o fijadas que se observan bajo microscopía confocal. Para que pueda observarse la unión con el Al es necesario emitir una longitud de onda de excitación a 420 nm y la longitud de onda de emisión debe ser 510 nm, esto permite observar una señal de color verde en el microscopio confocal (Tice *et al.*, 1992). El límite de detección de esta técnica es de 2 nm (Lian *et al.*, 2003). Por otro lado, el morin es capaz de localizar el Al que se encuentra asociados a los grupos fosfatos en el núcleo (Crawford, Marshall y Wilkens, 1998; Zhang, Liu, Pang, Cai y Qi, 2002). Sin embargo, no puede detectar el Al estrechamente unido a las pectinas de la pared celular (Eticha, Staß y Horst, 2005). También se demostró que este colorante no puede unirse con el Al que está ligado a aniones de ácidos orgánicos (Klug, Specht y Horst, 2011). Con base en lo anterior, se debe tomar en cuenta que, a mayor estabilidad de unión entre el Al y los aniones de ácidos orgánicos (Al:malato (1:1) > Al:oxalato (1:3) > Al:citrato (1:1)) se revela una menor intensidad de señal de la unión entre el morin y el Al (Klug *et al.*, 2011).

Lumogallion (Ácido 5-cloro-3 -[(2,4-dihidroxifenil) diazenil] -2-hidroxibencenosulfónico). Es otro colorante fluorescente para localizar Al en tejidos vegetales. El Al se une en el centro de la molécula del lumogallion, para que se realice la unión con este metal, el colorante debe estar disuelto en amortiguador de acetos, pH 5.2. Luego de teñir las secciones histológicas, se observan bajo microscopía confocal. Su longitud de onda de excitación es de 488 nm y su longitud de emisión es de 520 nm, que muestra una señal verde en el campo de observación. El lumogallion posee una sensibilidad a Al mucho mayor que cualquier otro reactivo de tinción bajo un microscopio láser confocal (Kataoka, Iikura y Nakanishi, 1997). Otra ventaja de este fluorocromo es que puede unirse al Al extracelular o intracelular (Reyna-Llorens, Corrales, Poschenrieder, Barceló y Cruz-Ortega, 2015; Riaz *et al.*, 2018), e incluso es capaz de detectar el Al unido a aniones de ácidos orgánicos y, únicamente se reportan cambios en la intensidad de la fluorescencia debido al proceso de fijación (Silva *et al.*, 2000); se sugiere omitir estos pasos y realizar la tinción en secciones histológicas frescas o congeladas, sobretodo si se trata de especies no acumuladoras, pues el Al puede perderse.

Técnicas de Cuantificación

Las técnicas de cuantificación elemental o multielemental por lo general requieren la destrucción total y solubilización de la muestra. Esta destrucción puede realizarse por combustión o digestión de la muestra con ácidos fuertes (Tezotto *et al.*, 2013). En contraste, existen técnicas que no requieren la destrucción de la muestra, el análisis se realiza sobre su superficie, e incluso se pueden generar imágenes de los tejidos y obtener la distribución elemental si los analizadores están acoplados a microscopios electrónicos (Lombi, Scheckelc y Kempson, 2011; van der Ent *et al.*, 2019; Padilla-Cuevas, Yee, Merino, Hidalgo y Etchevers, 2020). Las técnicas de cuantificación útiles para la determinación de Al en los tejidos vegetales aparecen en el Cuadro 3, mientras que, en el Cuadro 4 se presentan algunas características de cada técnica y, en el Cuadro 5 se mencionan las familias vegetales a las que se han aplicado estas técnicas para cuantificar Al.

Técnicas de Cuantificación Elemental

Espectrofotometría. La espectrofotometría se ocupa de medir la cantidad de luz que puede absorber una sustancia química al determinar la intensidad de la luz cuando un haz se hace pasar a través de la solución que contiene a la muestra. El principio básico consiste en que cada elemento o sustancia absorbe o transmite luz en un cierto rango de longitud de onda de la radiación ultravioleta (185 - 400 nm), visible (400 - 700 nm) o infrarroja (700 - 15000 nm, Germer, Zwinkels y Tsai, 2014). La determinación espectrofotométrica de los elementos suele ir precedida por la separación de los componentes principales de la muestra, adicionalmente puede realizarse alguna prueba colorimétrica. En estas pruebas debe tenerse precaución con cambios de pH de la muestra o la intervención de otro elemento, si estos factores varían durante las mediciones se pueden generar sobreestimaciones o subestimaciones en la concentración.

La cuantificación del Al por espectrofotometría utiliza los mismos cromóforos descritos en el apartado anterior p. ej.: (Salazar-Chavarria, Sánchez-Nieto y Cruz-Ortega, 2020; Sun *et al.*, 2020). También existen métodos enzimáticos-colorimétricos para determinar la concentración de los ácidos orgánicos asociados al aluminio p. ej.: (Reyna-Llorens *et al.*, 2015).

Cuadro 3. Técnicas utilizadas para la cuantificación de aluminio en tejidos vegetales.
Table 3. Techniques used to quantify aluminum in plant tissues.

Cuantificación elemental	Cuantificación multielemental	Cuantificación elemental <i>in situ</i>
Espectrofotometría (Spectrophotometry)	Espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-AES, Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)	Microscopia electrónica con rayos X de energía dispersiva (EM-EDS, Electron microscopy with energy dispersive X ray)
Espectrometría de absorción atómica (AAS, Atomic absorption spectrometry)	Espectrometría de masas por atomización con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS, Inductive coupling plasma mass spectrometry)	Ablación láser con espectrometría de masas por atomización con plasma inductivamente acoplado (LA-ICP-MS, Laser ablation inductive coupling plasma mass spectrometry).
Espectrometría de rayos X (X ray spectrometry)	Espectrometría de resonancia magnética nuclear (Nuclear magnetic resonance spectrometry)	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High performance liquid chromatography)

Espectrometría de absorción atómica. Esta técnica mide la concentración del elemento de interés (Al) pasando luz a una longitud de onda específica, a través de la matriz que se encuentra en forma de una nube de átomos. La luz es emitida a la matriz por una fuente de radiación de un elemento en particular, también es conocida como lámpara de cátodo hueco o una lámpara de descarga sin electrodos (Helaluddin, Khalid, Alaama y Abbas, 2016; Skoog, Holler y Crouch, 2018). La absorción de la radiación de la matriz se hace pasar por un monocromador (serie de lentes y espejos) que elimina la luz dispersa de otras longitudes de onda, para dirigir la radiación hacia un detector, que convierte la señal de luz en una señal eléctrica proporcional. Posteriormente, un procesador de señales genera un gráfico donde aparecen las lecturas de los datos (Beaty y Kerber, 1993; Skoog *et al.*, 2018). Cabe señalar que la concentración generalmente se determina a partir de una curva de calibración, que se obtiene utilizando estándares de concentración conocida (González-Santana *et al.*, 2012). La cantidad de muestra requerida es de al menos 1 g, el límite de detección es de mg kg^{-1} (Helaluddin *et al.*, 2016). Durante el procesamiento de la muestra y su análisis deben controlarse muy bien las condiciones de humedad, para evitar interferencias durante la medición (Skoog *et al.*, 2018).

Espectrometría de absorción atómica de flama. La espectrometría de absorción atómica de flama es una técnica de análisis rápida y precisa. Esta técnica posee un

atomizador de flama de acetileno u óxido nitroso, entre otros tipos (Beaty y Kerber, 1993; Helaluddin *et al.*, 2016). La función de la flama es suministrar a la matriz una cantidad de energía suficiente ($\approx 2000\text{-}2500\text{ }^\circ\text{C}$) para disociar sus moléculas, enlaces y llevar al estado fundamental a sus átomos; para luego dirigir la muestra (Lajunen y Perämäki, 2004). El tiempo de análisis por elemento es de 10 a 15 s, con muy buena precisión. El límite de detección para la mayoría de los elementos es de mg kg^{-1} (Lajunen y Perämäki, 2004). Sin embargo, Skoog *et al.* (2018) mencionan que el límite de detección para el aluminio es de 30 partes por billon.

Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito. En ocasiones, las concentraciones elementales que deseamos detectar son demasiado bajas (trazas, $\mu\text{g kg}^{-1}$). Por lo que, debemos recurrir a técnicas que poseen complementos en los equipos de espectrometría de absorción, que mejoran notablemente su sensibilidad. Un ejemplo es el horno de grafito, que está programado para calentarse por etapas, que incluyen el secado para eliminar el disolvente, la incineración y atomización de los componentes de la matriz (Beaty y Kerber, 1993). La muestra atomizada y la trayectoria de la luz se retienen durante un período de tiempo prolongado, que mejora la sensibilidad de cuantificación. A diferencia de la flama, el tiempo de análisis por elemento es de 5 a 6 min, pero el horno de grafito analiza soluciones, lodos, o muestras sólidas. Una ventaja es que requiere cantidades muy pequeñas de muestra (5-20 μL) y el

Cuadro 4. Resumen de las técnicas para la cuantificación de aluminio.
Table 4. Summary of techniques to quantify aluminum.

Técnica	Límite de detección	Fuente de excitación	Fuente de detección
Spec	≈ 2 nm	Lámpara	Fotones
ASS	FAAS-mg kg ⁻¹ GFAAS-μg kg ⁻¹	Llama/Horno 1700 a 3200°C	Señal óptica / electrónica
X ray S	< 1 mg kg ⁻¹	Rayos X	Rayos X
NMR	200 MHz	Campo Magnético	Ondas radio
IPC-MS	μg kg ⁻¹	Plasma de 6000 - 8500°C	Iones
IPC-AES	μg kg ⁻¹	Plasma de ≈ 9700°C	Iones
HLPC	< 1 μg	No aplica	Iones
SEM-EDS	>100 mg kg ⁻¹	Electrones	Rayos X
LA-ICP-MS	< 1 mg kg ⁻¹	Láser	Iones

Técnicas modificadas de Helaluddin, Khalid, Alaama y Abbas (2016), Skoog, Holler y Crouch (2018), van der Ent *et al.* (2019) y Padilla-Cuevas, Yee, Merino, Hidalgo y Etchevers (2020). Modified techniques from Helaluddin, Khalid, Alaama and Abbas (2016), Skoog, Holler and Crouch (2018), van der Ent *et al.* (2019) and Padilla-Cuevas, Yee, Merino, Hidalgo and Etchevers (2020).

límite de detección para el aluminio es 0.03-0.1 μg kg⁻¹ (Brown y Milton, 2005; Helaluddin *et al.*, 2016).

Espectroscopia de rayos X. Se basa en la medida de la emisión, absorción, dispersión, fluorescencia y difracción de la radiación electromagnética. Los rayos X son radiación electromagnética de longitud de onda corta, que se producen por la desaceleración de fotones, electrones o protones de alta energía al incidir en un blanco metálico. Esto produce transiciones electrónicas de excitación y expulsión de electrones en los orbitales internos, que generan un vacío en este orbital. Luego, otros electrones con niveles energéticos mayores y más externos, llenan estos espacios vacíos y se generan los rayos X. El intervalo de longitud de onda de los rayos X es entre 0.01-10 nm (van der Ent *et al.*, 2019; Padilla-Cuevas *et al.*, 2020). Dada la extensión de esta técnica y los alcances de esta revisión, únicamente se hace mención que los rayos X se pueden generar de varias formas según Skoog *et al.* (2018): (i) por bombardeo con un haz de electrones de alta energía a un objetivo metálico, (ii) por el uso de un haz primario de rayos X sobre una muestra que luego genera una haz secundario de fluorescencia de rayos X (XRF), (iii) a través de una fuente radiactiva que desintegra la muestra y origina la emisión de rayos X y, (iv) por medio de una fuente de radiación de sincrotrón. Una ventaja de estas técnicas que utilizan rayos X es que pueden determinar cualquier

elemento con número atómico mayor al sodio (Skoog *et al.*, 2018). Sin embargo, una desventaja es que la espectrometría de rayos X no puede distinguir los complejos de un estado de oxidación, así como algunos complejos que contienen ligandos con funcionalidades de coordinación muy similares (van der Ent *et al.*, 2019).

Espectrometría de resonancia magnética nuclear. Esta técnica mide la absorción de la radiación electromagnética en la región de radiofrecuencia entre 4-900 MHz. A diferencia de la absorción ultravioleta, visible e infrarroja, en este proceso de absorción participan núcleos de átomos en lugar de electrones externos (Skoog *et al.*, 2018). Esta técnica espectroscópica se basa en las propiedades magnéticas de muestras sólidas, líquidas y gaseosas, de las que se identifican las estructuras de los compuestos orgánicos, especialmente después de la síntesis o el aislamiento de productos (Gauglitz y Moore, 2014). Su principio se basa en el hecho de que algunos núcleos atómicos tienen un momento angular y un momento magnético, o la propiedad especial llamada espín nuclear. En el núcleo atómico los espines nucleares se encuentran distribuidos al azar, pero al exponerlos a un campo magnético se genera un desdoblamiento de sus niveles de energía, pues los espines se orientan en dirección y en contra del campo magnético generado (McMahon, 2007; Günther, 2013), Figura 1.

Cuadro 5. Familias y técnicas de cuantificación utilizadas para medir aluminio.
Table 5. Plant families and techniques used to quantify aluminum.

Familia	Técnica	Autor(es)
Brassicaceae	SEM-EDS, HPLC	Pearse, Veneklaas, Cawthray, Bolland y Lambers (2006) y Wang, Shen, Zhang, Zhang y Neumann (2007)
Hydrangeaceae	ASS, ICP-AES	Toyama-Kato <i>et al.</i> (2003) y Schreiber, Jones, Lariviere, Mayhew y Cain (2011).
Melastomataceae	ICP-AES, HPLC, SEM-EDS	Ma, Hiradate, Nomoto, Iwashita y Matsumoto (1997); Watanabe y Osaki, (2001), González-Santana <i>et al.</i> (2012) y Ranal, Mendes, Teixeira, de Oliveira y Romero (2016)
Myrtaceae	AAS, NMR SPECTROSCOPY	Ikka, Ogawa, Li, Hiradate y Morita (2013)
Pinaceae	ICP-MS	Moyer-Henry <i>et al.</i> (2005)
Poaceae	AAS, HPLC, ICP-MS, X RAY SPECTROMETRY, SEM-EDS	Silva <i>et al.</i> (2000); Darkó <i>et al.</i> (2004); Meriga, Reddy, Rao, Reddy y Kishor (2004); Pearse <i>et al.</i> (2006); Ezaki <i>et al.</i> (2013); Ramos <i>et al.</i> (2016); Awasthi <i>et al.</i> (2017) y Wang <i>et al.</i> (2017)
Polygonaceae	FAAS, GFAAS, NMR SPECTROSCOPY, HPLC, ICP-AES, ICP-MS	Ma, Hiradate y Matsumoto (1998); Wang, Stass y Horst (2004); Zheng <i>et al.</i> (2005), Klug <i>et al.</i> (2011) y Wang, Chen, Iwashita, Shen y Ma (2015)
Rubiaceae	ASS, ICP-AES, SEM-EDS	Jansen, Watanabe, Dessein, Smets y Robbrecht (2003) y Malta, Arcanjo, Ribeiro, Campos y Azevedo (2016)
Theaceae	ICP-MS, X-RAY SPECTROMETRY, SEM-EDS, HPLC	Morita <i>et al.</i> (2004); Morita, Yanagisawa, Takatsu, Maeda y Hiradate (2008); Desideri, Meli, Roselli y Feduzi (2011); Hajiboland y Poschenrieder (2015) y Schulzki, Nüßlein y Sievers (2017).
Vochysiaceae	ICP-AES, SEM-EDS, HPLC, NMR SPECTROSCOPY	De Andrade <i>et al.</i> (2011); Bressan <i>et al.</i> (2016) y Nogueira <i>et al.</i> (2019)

La exposición a un campo magnético genera que la transferencia de energía en los núcleos paralelos de menor energía se mueva al estado de espín de mayor energía, donde ahora están “en resonancia”. Lo anterior, origina una longitud de onda correspondiente a las frecuencias de radio aplicadas a la muestra, cuando el giro vuelve a su nivel basal la energía se emite a la misma frecuencia. Entonces, la señal que coincide con esta transferencia se mide y procesa para producir un espectro de resonancia magnética nuclear para el núcleo analizado (Rubinson y Rubinson, 2001; McMahon, 2007; Universidad Hebrea de Jerusalén, 2020).

En el caso del aluminio se busca al ^{27}Al , que posee un núcleo cuadrupolar (spin 5/2) de alta sensibilidad que produce líneas amplias y evidentes en un intervalo de desplazamiento químico de 200 Hz, con una relación de frecuencia del 26.1%. La amplitud de línea de referencia es 11 Hz (a temperatura ambiente en un espectrómetro de 400 MHz) del compuesto $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ en D_2O (agua pesada, óxido de deuterio) a una concentración 1.1 M y con un tiempo de relajación longitudinal de 0.03 s.

El uso principal de la RMN de aluminio es detectar su presencia y medir su tasa de relajación. Siempre hay una señal amplia que surge de la sonda en el espectro de ^{27}Al , pero hay poca información disponible sobre los cambios químicos del Al (Universidad Hebrea de Jerusalén, 2020).

Técnicas de Cuantificación Multielemental

Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente. La espectrometría de emisión posee una menor susceptibilidad a las interferencias químicas que la espectrometría de absorción, debido a que la temperatura de atomización es mayor ($\approx 9700\text{ }^\circ\text{C}$). Además, en esta técnica cada elemento tiene un espectro característico de longitud de onda en función de su estructura electrónica. Por lo tanto, se pueden determinar simultáneamente los espectros de muchos elementos (Skoog *et al.*, 2018). Al unir este tipo de espectrometría con una fuente de plasma, que es una mezcla gaseosa conductora de electricidad, generalmente de argón, se logra la determinación de

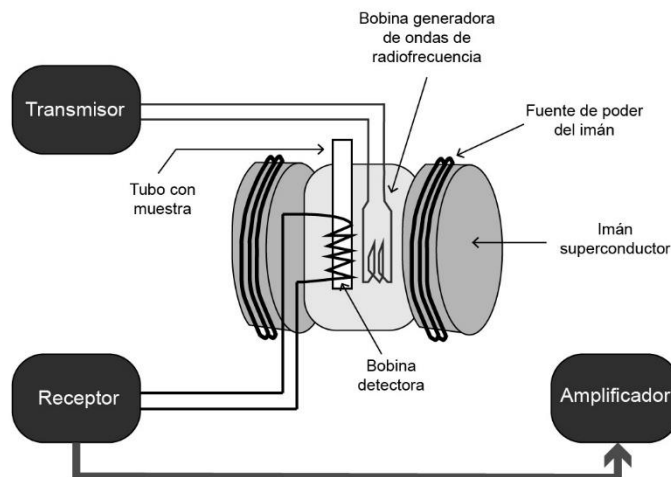


Figura 1. Diagrama de un espectrómetro de resonancia magnética nuclear. (Tomado y modificado de Günther, 2013).

Figure 1. Scheme of a nuclear magnetic resonance spectrometer. (Taken and modified from Günther, 2013).

bajas concentraciones de elementos de compuestos altamente resistentes a la descomposición térmica, (p. ej.: óxido de boro, fósforo, tungsteno, uranio, circonio y niobio) y la determinación de no metales como el cloro, bromo, yodo y azufre (Skoog *et al.*, 2018). Las muestras pueden ser líquidas o sólidas; para determinar la concentración de los elementos se deben realizar curvas de calibración para cada uno, en un intervalo de concentración comprendido entre 0 y 10 mg L⁻¹. Las disoluciones se preparan a partir de soluciones patrón certificadas para el análisis de emisión atómica de 1000 mg L⁻¹ en un medio de ácido nítrico (Skoog *et al.*, 2018). El límite de detección para el aluminio es 0.1-1 µg kg⁻¹ (Brown y Milton, 2005).

Espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente. Es una técnica utilizada para el análisis de contenidos totales simultáneos de elementos metálicos y no metálicos. Esta técnica es altamente sensible, puede cuantificar casi todos los elementos presentes en la tabla periódica con potencial de ionización menor al del argón en concentraciones traza (McMahon, 2007; Padilla-Cuevas *et al.*, 2020). El argón es utilizado para atomizar la muestra, debido a la alta temperatura del plasma los compuestos de la muestra son disociados eficientemente (> 90%) y pueden atomizarse más de 50 elementos a la vez. La adición de la espectrometría de masas permite determinar el peso molecular de cada elemento de la muestra, sin generarse interferencias isobáricas (Skoog

et al., 2018). El tiempo de medición es de 10 s por elemento. El límite de detección para la mayoría de los elementos es de 0.1 a 10 µg kg⁻¹; en el caso del aluminio es entre 0.001-0.1 µg kg⁻¹. Se ha informado que existen desviaciones estándar relativas del 2-4% en las regiones medias de las curvas de calibración (Brown y Milton, 2005). A pesar de que esta técnica tiene varios años de desarrollo, su costo es elevado, pero ofrece las mejores características de todas las espectrometrías atómicas en términos de sensibilidad, límites de detección, rendimiento y medición de elementos múltiples (Brown y Milton, 2005).

Cromatografía líquida de alta eficacia. En términos generales la cromatografía se refiere a la separación de los componentes de una mezcla, basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias a analizar. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza en una fase móvil, que se hace pasar por una fase estacionaria con la que es inmisible. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como una mezcla de solutos. La HPLC es el tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizada para separar y determinar especies en materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Skoog *et al.*, 2018). La muestra es transportada a través de una fase estacionaria en una columna empaquetada por una fase móvil líquida a alta presión, luego, los componentes se separan entre sí en una columna

y son cuantificados (McMahon, 2007; Lundanes, Reubsaet y Greibrokk, 2014). Las concentraciones trazas de materiales orgánicos e inorgánicos se pueden determinar entre 6-12 g, según el detector elegido. Al final, si es de interés para la investigación se puede recuperar cada fracción de la muestra al final de la columna (McMahon, 2007; Skoog *et al.*, 2018).

Esta técnica generalmente se ha utilizado en estudios cuyo interés fue determinar la forma en que el Al se encuentra ligado dentro de las células vegetales. Es decir, las uniones del aluminio con aniones de ácidos orgánicos como el oxálico, cítrico o málico (Ma *et al.*, 2001). Estas muestras se pueden obtener del medio de crecimiento (cultivos hidropónicos), la savia (generalmente recolectada con micropipeta los primeros 30 min después del corte en el tallo), exudados de raíz (Yang, Zhu, Zheng, Zhang y Zheng, 2011), e incluso del suelo.

Técnicas de Cuantificación Elemental *in situ*

Microscopía electrónica de barrido con un sistema de microanálisis de espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS o EDX). Esta es una técnica de obtención de imágenes que utiliza un haz de electrones para explorar una muestra. Dado que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la longitud de onda de la luz visible, los efectos de difracción ocurren en dimensiones físicas mucho más pequeñas. Por lo tanto, la resolución de la imagen en microscopía electrónica es mucho mejor que en microscopía óptica; obteniendo imágenes de hasta 1 000 000 de aumentos y una resolución de hasta 3 nm en presión variable (McMahon, 2007). Su funcionamiento se basa en la incidencia de un haz de electrones sobre una muestra conductora, este haz se enfoca en un punto en el que se lleva a cabo un barrido de la superficie microestructural. Después se obtienen las imágenes por la detección de electrones secundarios que se emiten desde la superficie de la muestra, debido a la excitación por el haz de electrones primario (Skoog *et al.*, 2018; Ul-Hamid, 2018).

La principal desventaja de la técnica es que las muestras deben verse en una cámara de aire para mantener las condiciones de vacío interno. En el caso de muestras biológicas deben tener un tratamiento previo (p. ej.: congelación, fijación o deshidratación), lo que puede provocar la producción de artefactos (McMahon, 2007; Lombi *et al.*, 2011). Por ello, se recomienda consultar

obras especializadas en el procesamiento de muestras biológicas p. ej.: (Goldstein *et al.*, 2018; Fleck y Humbel, 2019).

Los microscopios electrónicos de barrido pueden tener incorporado un detector de espectrómetro de rayos X de energía dispersiva (EDS, por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-Ray Spectrometer) para proporcionar información elemental basada en la emisión de rayos X fluorescentes después de la excitación con un haz de electrones incidente, que puede detectar fotones entre los 10 a 30 KeV. Debido al entorno de vacío, es posible analizar elementos de composición ligeros, así como metales y metaloides más pesados (Lombi *et al.*, 2011; Goldstein *et al.*, 2018). La funcionalidad de este detector se integra perfectamente con la operación del microscopio. La alta eficiencia del detector combinada con el gran ángulo sólido de recolección hace posible un tiempo de análisis de menos de 1 min, detectando concentraciones de $\mu\text{g kg}^{-1}$ en un área de análisis de 7x7mm (Ul-Hamid, 2018; van der Ent *et al.*, 2019). Otra ventaja es que este tipo de análisis permite conservar la integridad y distribución de los tejidos. Por lo que, esta técnica puede ser complementaria a los análisis netamente cuantitativos (Ipohorski y Bozzano, 2013). Entre las desventajas, se incluye una resolución de baja energía (122 eV) debido a que los picos de rayos X poco espaciados no pueden ser distinguibles (p. ej.: Ti y Ba; S, Mo y Pb), especialmente cuando los picos de los principales elementos interfieren con los picos de los elementos traza con baja detectabilidad (0.1-0.2% en peso). Por ello, se recomienda profundizar en las reglas físicas que rigen la generación y detección de rayos X, para realizar una exploración cuidadosa en la identificación de los picos generados por el software y obtener un resultado preciso (Goldstein *et al.*, 2018; Ul-Hamid, 2018).

Ablación láser con espectrometría de masas por atomización con plasma inductivamente. Como se mencionó anteriormente, la espectrometría de masas por atomización con plasma inductivamente acoplado realiza análisis multielemental a concentraciones traza, por medio de la detección de iones en muestras líquidas o gaseosas. A esta técnica se le puede añadir la ablación láser, que permite introducir muestras sólidas inorgánicas y orgánicas, polvo o materiales metálicos dentro del atomizador. La ablación utiliza un rayo láser de pulso intenso (Nd-YAG), y se hace incidir sobre la superficie de la muestra, para convertirla en vapor y partículas, que luego son dirigidas al atomizador del espectrómetro (Gauglitz y Moore, 2014; Hanč,

Piechalak, Tomaszewska y Barańkiewicz, 2014; Skoog *et al.*, 2018). Se puede realizar un análisis masivo con una resolución espacial de 100-1000 μm o un microanálisis local con una resolución espacial de 5-50 μm . Al enfocar el láser en un mismo punto es posible obtener perfiles elementales de profundidad (μm). Sin embargo, para tener una buena precisión se debe tener la certeza que el material vaporizado sea una muestra representativa con un fraccionamiento elemental insignificante durante el proceso de ablación. Lo anterior, puede minimizarse mediante el

uso de una matriz estándar, que haga referencia a una concentración conocida en una muestra estándar p. ej.: ^{13}C ; (Klug *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2011).

Elección del Uso de Técnicas para Localizar y Cuantificar Aluminio en Tejidos Vegetales

A continuación, se presenta una pequeña guía en forma de diagrama de flujo que apoya la elección de la técnica más adecuada para localizar o cuantificar aluminio en la(s) especie(s) en estudio (Figura 2).

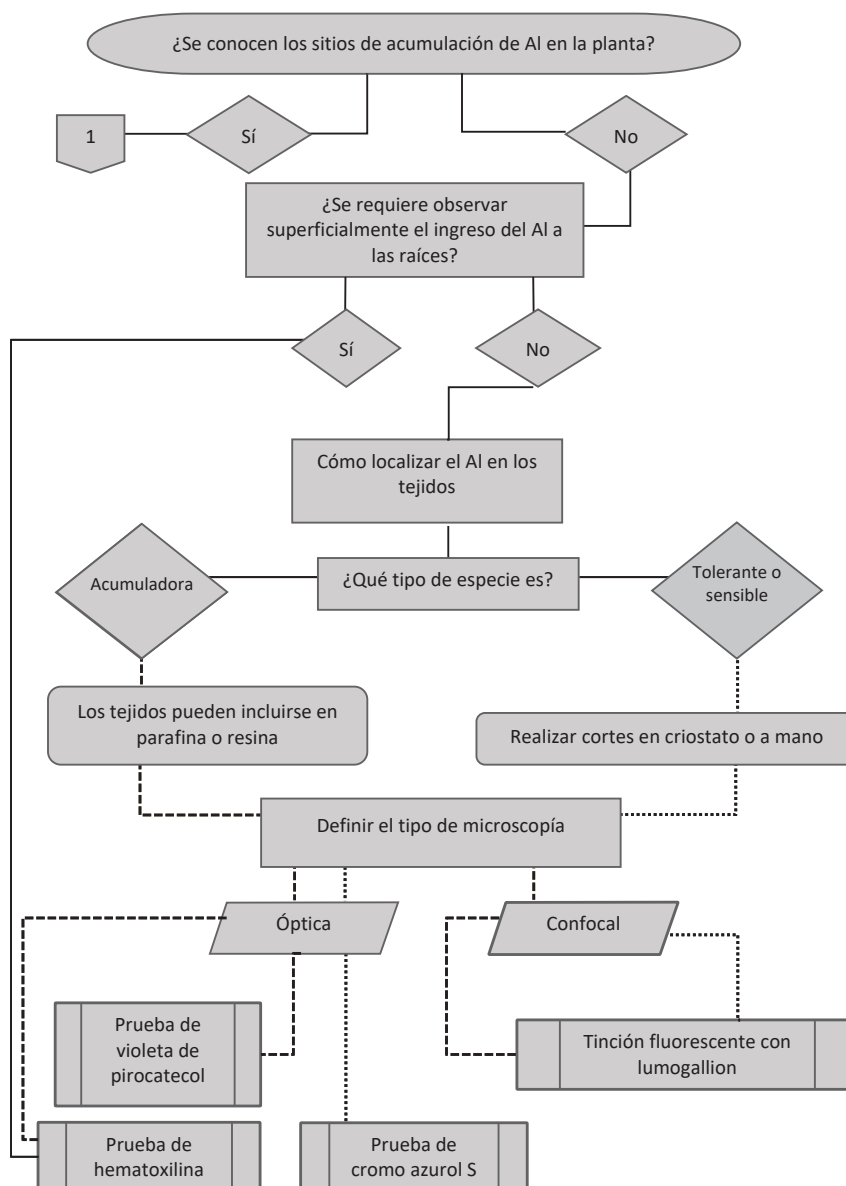


Figura 2. Guía que apoya la elección de la técnica más adecuada para localizar o cuantificar aluminio en las especies en estudio.

Figure 2. Guide that supports the choice of the most appropriate technique to locate or quantify aluminum in the species under study.

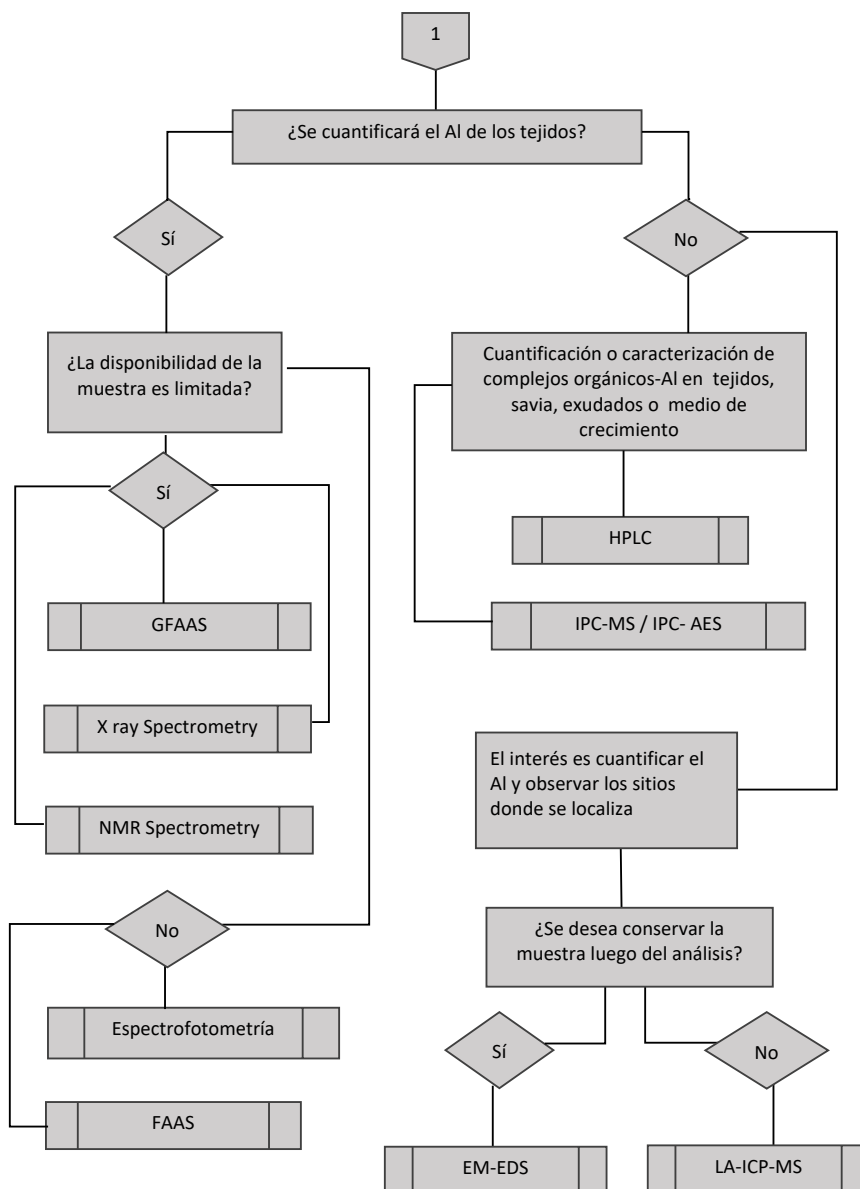


Figura 2 (continuación). Guía que apoya la elección de la técnica más adecuada para localizar o cuantificar aluminio en las especies en estudio.

Figure 2 (continuation). Guide that supports the choice of the most appropriate technique to locate or quantify aluminum in the species under study.

CONCLUSIONES

En la actualidad, la acidificación de los suelos está en aumento y el Al es un elemento disponible en ellos, lo que subraya la importancia de realizar investigaciones que evidencien los impactos que tiene este metal en las plantas. Hasta ahora se sabe que el Al es tóxico para la mayoría de las especies. Sin embargo, las especies tolerantes o acumuladoras pueden ser

clave para entender los mecanismos de adaptación ante este escenario, por ello se hace necesario incrementar las investigaciones sobre los efectos del aluminio en las plantas.

Estos estudios deben enfocarse en la localización y la cuantificación del Al en los tejidos, para posteriormente, poder establecer las posibles vías y mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares implicados, con el fin de comprender mejor los

procesos de adaptación, y por lo tanto, contribuir en el mejoramiento de cultivos más tolerantes al aluminio, y sentar las bases para las estrategias de fitoremediación.

Esta revisión se enfoca en la descripción técnica de las diferentes herramientas empleadas en la localización y cuantificación del Al de manera clara y puntual. Esta información integrada ayudará en los estudios de la interacción del Al y las plantas, reduciendo el tiempo para la elección de las técnicas, así como para esclarecer cuál técnica es más conveniente aplicar a los intereses de la investigación, y así poder dilucidar la naturaleza de la sensibilidad, tolerancia o acumulación del Al en las plantas.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

No aplicable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización, análisis formal, escritura, revisión y edición: V.M.R.S. Validación, administración del proyecto, adquisición de fondo: R.C.O. Investigación, metodología: V.M.R.S. Escritura: revisión y edición: V.M.R.S., R.C.O., S.K.H. y J.D.M.M. Investigación, escritura: preparación del borrador original, escritura: revisión y edición: V.M.R.S., S.K.H., R.C.O. y J.D.M.M.

AGRADECIMIENTOS

Verónica Monserrat Rodríguez Sánchez al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca número 717849. Al Dr. Gastón Contreras Jiménez, por su apoyo en la discusión de algunas técnicas mencionadas en la presente revisión.

LITERATURA CITADA

- Arroyave, C., Tolrà, R., Thuy, T., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2013). Differential aluminum resistance in *Brachiaria* species. *Environmental and Experimental Botany*, *89*, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.01.001>
- Awasthi, J. P., Saha, B., Regon, P., Sahoo, S., Chowra, U., Pradhan, A., ... Panda, S. K. (2017). Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. *PLOS ONE*, *12*(4), e0176357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176357>
- Beatty, R. D., & Kerber, J. D. (1993). *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry*. (2nd ed.). Norwalk, CT, USA: The Perkin-Elmer Corporation.
- Bressan, A. C. G., Coan, A. I., & Habermann, G. (2016). X-ray spectra in SEM and staining with chrome azurol S show Al deposits in leaf tissues of Al-accumulating and non-accumulating plants from the cerrado. *Plant and Soil*, *404*(1), 293-306. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2841-1>
- Britez, R. M., Watanabe, T., Jansen, S., Reissmann, C. B., & Osaki, M. (2002). The relationship between aluminium and silicon accumulation in leaves of *Faramea marginata* (Rubiaceae). *New Phytologist*, *156*(3), 437–444.
- Brown, R. J. C., & Milton, M. J. T. (2005). Analytical techniques for trace element analysis: an overview. *Trends in Analytical Chemistry*, *24*(3), 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.010>
- Browne, B. A., McColl, J. G., & Driscoll, C. T. (1990). Aluminum Speciation Using Morin: I. Morin and Its Complexes with Aluminum. *Journal of Environmental Quality*, *19*, 65-72. <https://doi.org/10.2134/jeq1990.00472425001900010008x>
- Casierra-Posada, F., & Aguilar-Avenidaño, O. E. (2007). Estrés por aluminio en plantas: reacciones en el suelo, síntomas en vegetales y posibilidades de corrección. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *1*(2), 246–257. <https://doi.org/10.17584/rech.2007v1i2.8701>
- Crawford, S. A., Marshall, A. T., & Wilkens, S. (1998). Localisation of aluminum in root apex cells of two Australian perennial grasses by X-ray microanalysis. *Australian Journal of Plant Physiology*, *25*, 427-435. <https://doi.org/10.1071/PP97163>
- Darkó, E., Ambrus, H., Stefanovits-Bányai, E., Fodor, J., Bakos, F., & Barnabás, B. (2004). Aluminium toxicity, Al tolerance and oxidative stress in an Al-sensitive wheat genotype and in Al-tolerant lines developed by in vitro microspore selection. *Plant Science*, *166*(3), 583-591. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.023>
- De Andrade, L. R. M., Gomes-Barros, L. M., Fernandes-Echevarria, G., Velho do Amaral, L., Cotta, M. G., Rossatto, D. R., ... Franco, A. C. (2011). Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. *Environmental and Experimental Botany*, *70*(1), 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.013>
- Desideri, D., Meli, M. A., Roselli, C., & Feduzi, L. (2011). Polarized X ray fluorescence spectrometer (EDPXRF) for the determination of essential and non essential elements in tea. *Microchemical Journal*, *98*(2), 186-189. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.01.008>

- Dougal, W. K., & Wilson, A. L. (1974). The absorptiometric determination of aluminium in water. A comparison of some chromogenic reagents and the development of an improved method. *Analyst*, 99(1180), 413-30 <https://doi.org/10.1039/AN9749900413>
- Eticha, D., Staß, A., & Horst, W. J. (2005). Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? *Journal of Experimental Botany*, 56(415), 1351-1357. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri136>
- Ezaki, B., Nagao, E., Yamamoto, Y., Nakashima, S., & Enomoto, T. (2008). Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Anders, are tolerant to multiple stresses including aluminum, heavy metals and oxidative stresses. *Plant Cell Reports*, 27(5), 951-961. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0503-8>
- Ezaki, B., Jayaram, K., Higashi, A., & Takahashi, K. (2013). A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. *Environmental and Experimental Botany*, 93, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.05.002>
- FAO (Food and Agriculture Organization of The United Nations). (2021). *Portal de suelos de la FAO*. Consultado el 17 enero, 2021, desde <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/manejo-de-suelos-problematicos/suelos-acidos/es/>
- Fleck, R. A., & Humbel, B. M. (2019). *Biological field emission scanning electron microscopy*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons.
- Gauglitz G., & Moore D. S. (2014). *Handbook of spectroscopy*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Germer, T. A., Zwinkels, J. C., & Tsai, B. K. (2014). *Spectrophotometry accurate measurement of optical properties of materials*. Elsevier Science. <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123860224>
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H., & Joy, D. C. (2018). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York, NY, USA: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6676-9>
- González-Santana, I. H., Márquez-Guzmán, J., Cram-Heydrich, S., & Cruz-Ortega, R. (2012). *Conostegia xalapensis* (Melastomataceae): an aluminum accumulator plant. *Physiologia Plantarum*, 144(2), 134-145. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01527.x>
- Günther, H. (2013). *NMR Spectroscopy basic principles, concepts, and applications in chemistry* (3rd ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH. ISBN: 978-3-527-33004-1
- Hajiboland, R., & Poschenrieder, C. (2015). Localization and compartmentation of Al in the leaves and roots of tea plants. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 84(1), 86-100. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.086>
- Hanć, A., Piechalak, A., Tomaszewska, B., & Baralkiewicz, D. (2014). Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in quantitative analysis and imaging of plant's thin sections. *International Journal of Mass Spectrometry*, 363, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2014.01.020>
- Haridasan, M., Paviani, T.I., & Schiavini, I. (1986). Localization of aluminium in the leaves of some aluminium-accumulating species. *Plant and Soil*, 94, 435-437. <https://doi.org/10.1007/BF02374336>
- Helaluddin, A. B. M., Khalid, R. S., Alaama, M., & Abbas, S. A. (2016). Main analytical techniques used for elemental analysis in various matrices. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(2), 427-434. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i2.29>
- Ikka, T., Ogawa, T., Li, D., Hiradate, S., & Morita, A. (2013). Effect of aluminum on metabolism of organic acids and chemical forms of aluminum in root tips of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. *Phytochemistry*, 94, 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.06.016>
- Iphorski, M., & Bozzano, P. B. (2013). Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. *Ciencia e Investigación*, 63(3), 43-53.
- Jansen, S., Broadley, M. R., Robbrecht, E., & Smets, E. (2002). Aluminum Hyperaccumulation in Angiosperms: A Review of Its Phylogenetic Significance. *The Botanical Review*, 68(2), 235-269.
- Jansen, S., Watanabe, T., Dessein, S., Smets, E., & Robbrecht, E. (2003). A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae. *Annals of Botany*, 91(6), 657-663. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg071>
- Kataoka, T., Iikura, H., & Nakanishi, T. M. (1997). Aluminum distribution and viability of plant root and cultured cells. *Soil Science and Plant Nutrition*, 43(1), 1003-1007. <https://doi.org/10.1080/00380768.1997.11863707>
- Kataoka, T., & Nakanishi, T. M. (2001). Aluminium distribution in soybean root tip for a short time Al treatment. *Journal of Plant Physiology*, 158(6), 731-736. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00163>
- Kiernan, J. A. (2015). *Histological and histochemical methods, theory and practice* (5th ed.). Banbury, United Kingdom: Scion Publishing Ltd.
- Kisnierienė, V., & Lapekaitė, I. (2015). When chemistry meets biology: The case of aluminium, A review. *Chemija*, 26(3), 148-158.
- Klug, B., Specht, A., & Horst, W. J. (2011). Aluminium localization in root tips of the aluminium-accumulating plant species buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5453-5462. <https://doi.org/10.1093/jxb/err222>
- Lajunen, L. H. J., & Perämäki, P. (2004). *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*. (2nd ed.). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847551900>
- Li, D., Shu, Z., Ye, X., Zhu, J., Pan, J., Wang, W., ... Wang, Y. (2017). Cell wall pectin methyl-esterification and organic acids of root tips involve in aluminum tolerance in *Camellia sinensis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.09.002>
- Lian, H., Kang, Y., Bi, S., Yasin, A., Shao, D., Chen, Y., ... Tian, L. (2003). Morin applied in speciation of aluminum in natural waters and biological samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376, 542-548. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-1936-8>
- Lombi, E., Scheckel, K.G., & Kempson, I. M. (2011). In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environmental and Experimental Botany*, 72(1), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.005>
- Lundanes, E., Reubsæet, L., & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

- Ma, J. F., Hiradate, S., Nomoto, K., Iwashita, T., & Matsumoto, H. (1997). Internal detoxification mechanism of Al in *Hydrangea* (Identification of Al Form in the Leaves). *Plant Physiology*, 113(4), 1033-1039. <https://doi.org/10.1104/pp.113.4.1033>
- Ma, J. F., Hiradate, S., & Matsumoto, H. (1998). High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. *Plant Physiology*, 117(3), 753-759. <https://doi.org/10.1104/pp.117.3.753>
- Ma, J. F., Ryan, P. R., & Delhaize, E. (2001). Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273-278. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01961-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01961-6)
- Malta, P. G., Arcanjo-Silva, S., Ribeiro, C., Campos, N. V., & Azevedo, A. A. (2016). *Rudgea viburnoides* (Rubiaceae) overcomes the low soil fertility of the Brazilian Cerrado and hyperaccumulates aluminum in cell walls and chloroplasts. *Plant and Soil*, 408(1/2), 369-384. <http://doi.org/10.1007/s11104-016-2926-x>
- McMahon, G. (2007). *Analytical instrumentation a guide to laboratory, portable and miniaturized instruments*. Southern Gate, Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao K. R., Reddy, L. A., & Kishor, P. B. K. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology*, 161(1), 63-68. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01156>
- Morita, A., Horie, H., Fujii, Y., Takatsu, S., Watanabe, N., Yagi, A., & Yokota, H. (2004). Chemical forms of aluminum in xylem sap of tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Phytochemistry*, 65(20), 2775-2780. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.043>
- Morita, A., Yanagisawa, O., Takatsu, S., Maeda, S., & Hiradate, S. (2008). Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). *Phytochemistry*, 69(1), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.06.007>
- Moyer-Henry, K., Silva, I., Macfall, J., Johannes, E., Allen, N., Goldfarb, B., & Rufty, T. (2005). Accumulation and localization of aluminium in root tips of loblolly pine seedlings and the associated ectomycorrhiza *Pisolithus tinctorius*. *Plant, Cell & Environment*, 28(2), 111-120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01240.x>
- Nogueira, M. A., Bressan, A. C. G., Pinheiro, M. H. O., & Habermann, G. (2019). Aluminum-accumulating Vochysiaceae species growing on a calcareous soil in Brazil. *Plant Soil*, 437, 313-326. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03978-2>
- Padilla-Cuevas, J., Yee-Madeira, H. T., Merino-García, A., Hidalgo, C., & Etchevers, J. D. (2020). Análisis de los elementos minerales esenciales y tóxicos en tejidos vegetales. *Agrociencia*, 54(3), 413-434. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v54i3.1916>
- Panda, S. K., & Baluška, F. (2015). *Aluminum stress adaptation in plants*. Switzerland: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19968-9>
- Pearse, S. J., Veneklaas, E. J., Cawthray, G., Bolland, M. D. A., & Lambers, H. (2006). *Triticum aestivum* shows a greater biomass response to a supply of aluminium phosphate than *Lupinus albus*, despite releasing fewer carboxylates into the rhizosphere. *New Phytologist*, 169(3), 515-524. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01614.x>
- Pereira, L.B., Tabaldi, L. A., Gonçalves, J.F., Jucoski, G.O., Pauletto, M.M., Weis, S.N., ... Schetinger, M. R. C. (2006). Effect of aluminum on δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). *Environmental and Experimental Botany*, 57(1), 106-115. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.004>
- Pilon-Smits, E. A., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 267-274. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>
- Ramos, I., Pataco, I. M., Mourinho, M. P., Lidon, F., Reboredo, F., Pessoa, M. F., ... Guerra, M. (2016). Elemental mapping of biofortified wheat grains using micro X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 120, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2016.03.014>
- Ranal, M. A., Mendes-Rodrigues, C., Teixeira, W. F., de Oliveira, A. P., & Romero, R. (2016). Seed germination of *Microlicia fasciculata*, an apomictic and aluminium accumulator species: Unexpected intraspecific variability in a restricted Neotropical savanna area. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 220, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.02.001>
- Reyna-Llorens, I., Corrales, I., Poschenrieder, C., Barceló, J., & Cruz-Ortega, R. (2015). Both aluminum and ABA induce the expression of an ABC-like transporter gene (FeALS3) in the Al-tolerant species *Fagopyrum esculentum*. *Environmental and Experimental Botany*, 111, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.11.005>
- Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., Imran, M., ... Jiang, C. (2018). Boron reduces aluminum-induced growth inhibition, oxidative damage and alterations in the cell wall components in the roots of trifoliolate orange. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.002>
- Rubinson, K. A., & Rubinson, J. F. (2001). *Análisis instrumental*. Madrid, España: Prentice Hall. ISBN: 84-205-2988-5
- Salazar-Chavarría, V., Sánchez-Nieto, S., & Cruz-Ortega, R. (2020). *Fagopyrum esculentum* at early stages copes with aluminum toxicity by increasing ABA levels and antioxidant system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 152, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.024>
- Sandoval, E. (2005). *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Cuadernos del Instituto de Biología núm. 38. Distrito Federal, México: UNAM ISBN: 970-32-3131-4
- Schmitt, M., Watanabe, T., & Jansen, S. (2016). The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AOB PLANTS*, 8, plw065. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw065>
- Schreiber, H. D., Jones, A. H., Lariviere, C. M., Mayhew, K. M., & Cain, J.B. (2011). Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals. *Biometals*, 24(6), 1005-1015. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9458-x>
- Schulzki, G., Nüßlein, B., & Sievers, H. (2017). Transition rates of selected metals determined in various types of teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and herbal/fruit infusions. *Food Chemistry*, 215, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.093>
- Skoog, D. A., Holler, J., & Crouch S. R. (2018). *Principles of instrumental analysis*. Boston, MA, USA: Cengage Learning Asia Pte Ltd
- Silva, I. R., Smyth, T. J., Moxley, D. F., Carter, T. E., Allen, N. S., & Rufty, T. W. (2000). Aluminum accumulation at nuclei of cells

- in the root Tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. *Plant Physiology*, 123(2), 543-552. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.543>
- Sun, L., Zhang, M., Liu, X., Mao, Q., Shi, C., Kochian, L. V., & Liao, H. (2020). Aluminium is essential for root growth and development of tea plants (*Camellia sinensis*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 984-997. <https://doi.org/10.1111/jipb.12942>
- Tezotto, T., Favarin, J. L., Neto, A. P., Gratão, P. L., Azevedo, R. A., & Mazzafera, P. (2013). Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). *Scientia Agricola*, 70(4), 263-267. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000400007>
- Tice, K. R., Parker, D. R., & De Mason, D. A. (1992). Operationally Defined Apoplastic and Symplastic Aluminum Fractions in Root Tips of Aluminum-intoxicated Wheat. *Plant Physiology*, 100(1), 309-318. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.309>
- Toyama-Kato, Y., Yoshida, K., Fujimori, E., Haraguchi, H., Shimizu, Y., & Kondo, T. (2003). Analysis of metal elements of hydrangea sepals at various growing stages by ICP-AES. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 237-241. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00220-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00220-6)
- Ul-Hamid, A. (2018). *A beginners' guide to scanning electron microscopy*. Dhahran, Saudi Arabia: Springer.
- Universidad Hebrea de Jerusalén. (2020). *NMR Lab. Jerusalén, Israel*. Consultado el 17 enero, 2021, desde <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/>
- van der Ent, A., Ocenar, A., Tisserand, R., Sugau, J. B., Echevarria, G., & Erskine, P. D. (2019). Herbarium X-ray fluorescence screening for nickel, cobalt and manganese hyperaccumulator plants in the flora of Sabah (Malaysia, Borneo Island). *Journal of Geochemical Exploration*, 202, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2019.03.013>
- Vázquez, M. D., Poschenrieder, C., Corrales, I., & Barceló, J. (1999). Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology*, 119(2), 435-444. <https://doi.org/10.1104/pp.119.2.435>
- Von Uexküll, H.R., & Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171, 1-15. <https://doi.org/10.1007/BF00009558>
- Wang, B. L., Shen, J. B., Zhang, W. H., Zhang, F. S., & Neumann, G. (2007). Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminum. *New Phytologist*, 176(3), 581-589. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02206.x>
- Wang, H., Chen, R. F., Iwashita, T., Shen, R. F., & Ma, J. F. (2015). Physiological characterization of aluminum tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytologist*, 205, 273-279. <https://doi.org/10.1111/nph.13011>
- Wang, S., Yuan, S., Su, L., Lv, A., Zhou, P., & An, Y. (2017). Aluminum toxicity in alfalfa (*Medicago sativa*) is alleviated by exogenous foliar IAA inducing reduction of Al accumulation in cell wall. *Environmental and Experimental Botany*, 139, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.03.018>
- Wang, Y., Stass, A., & Horst, W. J. (2004). Apoplastic Binding of Aluminum Is Involved in Silicon-Induced Amelioration of Aluminum Toxicity in Maize. *Plant Physiology*, 136(3), 3762-3770. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045005>
- Watanabe, T., Osaki, M., Yoshihara, T., & Tadano, T. (1998). Distribution and chemical speciation of aluminum in the Al accumulator plant, *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, 201, 165-173. <https://doi.org/10.1023/A:1004341415878>
- Watanabe, T., & Osaki, M. (2001). Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant and Soil*, 237(1), 63-70. <https://doi.org/10.1023/A:1013395814958>
- Wehr, J. B., Blamey, F. P. C., Hanna, J. V., Kopittke, P. M., Kerven, G. L., & Menzies, N. W. (2010). Hydrolysis and speciation of Al bound to pectin and plant cell wall material and its reaction with the dye chrome azurol S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5553-5560. <https://doi.org/10.1021/jf100201x>
- Weil, R. R., & Brady, N. C. (2017). *The nature and properties of soils* (15th ed.). Columbus, USA: Pearson Prentice Hall. ISBN 9780133254488
- Yang, J. L., Zhu, X. F., Zheng, C., Zhang, Y. J., & Zheng, S. J. (2011). Genotypic differences in Al resistance and the role of cell-wall pectin in Al exclusion from the root apex in *Fagopyrum tataricum*. *Annals of Botany*, 107(3), 371-378. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq254>
- Zhang, R. Y., Liu, Y., Pang, D. W., Cai, R. X., & Qi, Y. P. (2002). Spectroscopic and voltametric study on the binding of aluminum (III) to DNA. *Analytical Sciences*, 18(7), 761-766. <https://doi.org/10.2116/analsci.18.761>
- Zheng, S. J., Yang, J. L., He, Y. F., Yu, X. H., Zhang, L., You, J. F., ... Matsumoto, H. (2005). Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, 138(1), 297-303. <https://doi.org/10.1104/pp.105.059667>
- Zhou, P., Yang, F., Ren, X., Huang, B., & An, Y. (2014). Phytotoxicity of aluminum on root growth and indole-3-acetic acid accumulation and transport in alfalfa roots. *Environmental and Experimental Botany*, 104, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.02.018>