

RESPUESTA DE DOS ESPECIES DE LUPINO A ALUMINIO FITOTÓXICO¹

Response of two lupin species to phytotoxic aluminium

Enrique Peñaloza^{2*}, José Martínez³, Adolfo Montenegro² y Luis J. Corcuera⁴

ABSTRACT

The response of lupin species to phytotoxic aluminium (Al) was studied in *Lupinus albus* cv. Victoria and *L. angustifolius* cv. Gungurru, using *L. luteus* and *Hordeum vulgare* as tolerant and susceptible controls, respectively. Studies were done in nutrient solution and in soils with high Al content. In nutrient solution, nominal Al concentrations from 0 to 20 μ M allowed discrimination of the response to Al among species. At 10 μ M Al, root growth rates increased 90, 40 and 10% in *L. luteus*, *L. albus* and *L. angustifolius*, and reduced 75% in *H. vulgare*. Aluminium concentrations up to 80 μ M stimulated citrate efflux from lupin species, but not from *H. vulgare*. In soils with 27% Al saturation and adequate phosphorus (P), the aerial biomass of lupins was not affected and was reduced 90% in *H. vulgare*. In this soil, addition of P did not affect shoot biomass in *L. albus*, and increased it 18% in *L. angustifolius*. When both species were grown in soils with Al saturation ranging from 0.1 to 42% and low P, addition of P increased shoot biomass by 22% in *L. albus* and by 131% in *L. angustifolius*, independent of Al treatments. According to these results, *L. albus* and *L. angustifolius* can withstand phytotoxic Al saturation of at least 42% in soils with adequate P supply. The response to this stress would depend on the ability of the species to acquire P from P-deficient soil. Citrate efflux by the roots would be at least one of the mechanisms used by both lupin species to tolerate phytotoxic Al in soils.

Key words: white lupin, narrow-leaf lupin, aluminium, phosphate, citrate efflux.

RESUMEN

Se estudió la respuesta al aluminio (Al) en *Lupinus albus* cv. Victoria y *L. angustifolius* cv. Gungurru, utilizando *L. luteus* y *Hordeum vulgare* como control tolerante y susceptible, respectivamente. Los estudios se realizaron en solución nutritiva y en suelos con alto contenido de Al. En solución nutritiva, concentraciones de Al nominal entre 0 y 20 μ M permitieron discriminar la respuesta al Al entre las especies. Aluminio 10 μ M provocó 90; 40; y 10% de incremento en el crecimiento radical de *L. luteus*, *L. albus* y *L. angustifolius*, respectivamente, y 75% de reducción en *H. vulgare*. Concentraciones de Al de hasta 80 μ M estimularon la exudación de citrato en lupinos, no así en *H. vulgare*. En suelos con 27% de saturación de Al y suficientes en fósforo (P), la fitomasa aérea no se afectó significativamente en lupinos, y se redujo 90% en *H. vulgare*. En este suelo, la adición de P no afectó la fitomasa aérea en *L. albus*, y la incrementó 18% en *L. angustifolius*. Cuando ambas especies se establecieron en suelos con porcentajes de saturación de Al fluctuantes entre 0,1 y 42% y deficiente en P, la fertilización con P incrementó 22% la fitomasa aérea en *L. albus* y 131% en *L. angustifolius*, independiente de los tratamientos de Al. De acuerdo a estos resultados, *L. albus* y *L. angustifolius* pueden tolerar al menos 42% de saturación de Al en suelos con adecuada disponibilidad de P. La respuesta a este estrés dependería de la habilidad de las especies para acceder al P retenido en el suelo, en aquellos deficientes en P. La exudación de citrato a través de raíces sería al menos una de las estrategias utilizadas por ambas especies de lupino para tolerar concentraciones de Al fitotóxico en el suelo.

Palabras clave: lupino blanco, lupino de hoja angosta, aluminio, fosfato, citrato.

¹ Recepción de originales: 22 de enero de 2003.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: epenaloz@carillanca.inia.cl *Autor para correspondencia.

³ Universidad de Concepción, Facultad de Bioquímica y Biología Molecular, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

⁴ Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

INTRODUCCIÓN

Los suelos ácidos se distribuyen ampliamente alrededor del mundo, representando aproximadamente el 30% de la superficie arable (Von Uexküll y Mutert, 1995). En Chile, estos suelos se localizan principalmente en la zona centro-sur y sur, e imponen restricciones agronómicas entre las cuales la toxicidad por Al representa una de las principales limitantes para la producción de cultivos. En respuesta a este estrés, las plantas han desarrollado estrategias que les permiten destoxificar el Al, ya sea internamente o en la rizósfera (Marschner, 1986; Taylor, 1995; Kochian, 1995), o prevenir su incidencia mediante la alcalinización del pH alrededor de la raíz (Degenhardt *et al.*, 1998). Entre estas estrategias, la destoxicación externa del Al, o exclusión, parece ser uno de los mecanismos más ampliamente utilizados por la mayor parte de las especies estudiadas (Marschner, 1986).

La destoxicación externa del Al involucra la exudación de ácidos orgánicos desde los ápices radicales, definidos como sitios primarios de toxicidad por este metal en plantas (Delhaize *et al.*, 1993). Esta exudación es inducida por Al, cuyas propiedades estructurales le permiten formar compuestos altamente estables con ácidos orgánicos de cadena corta, reduciendo la actividad del Al fitotóxico (Al^{3+}) en la rizósfera. Entre éstos, el citrato, malato y oxalato corresponden a los ácidos carboxilados con mayor habilidad para formar complejos con este metal, atribuido a sus elevadas constantes de afinidad por Al^{3+} (Jones, 1998). La asociación entre Al y ácidos orgánicos se ha estudiado en diferentes especies, demostrándose que la exudación de ácidos orgánicos inducida por Al^{3+} desempeña un papel fundamental en la tolerancia a este estrés. La principal diferencia entre las especies corresponde a la identidad del ácido orgánico involucrado, informándose de exudados de malato en *Triticum aestivum* (Delhaize *et al.*, 1993), oxalato en *Fagopyrum esculentum* (Zheng *et al.*, 1998) y citrato en *Phaseolus vulgaris* (Miyasaka *et al.*, 1991) y *Zea mays* (Piñeros *et al.*, 2002).

Si bien no se dispone de información concluyente, las especies de lupino se consideran comparativamente tolerantes a Al^{3+} , con grados de tolerancia que difieren entre especies (Dracup *et al.*, 1998). Las evidencias que sostienen este argumento se han originado en estudios de inhibición del crecimiento radical en solución nutritiva, e indican que *Lupinus luteus* puede tolerar concentraciones de Al superiores a otras especies, como *Hordeum vulgare* (Grauer y Horst, 1990) y *L. angustifolius* (Carr y Sweetingham, 1994). Aun cuando se desconoce el o los mecanismos de tolerancia, la capacidad de muchas de estas especies para exudar cantidades significativas de ácidos orgánicos en la rizósfera sugiere que la excreción de carboxilados también podría operar en lupino en respuesta a este estrés. Esta hipótesis se evaluó en dos especies de lupino ampliamente cultivadas en suelos ácidos del sur de Chile, en un estudio que tuvo como objetivo comparar la respuesta de *L. albus* y *L. angustifolius* a concentraciones fitotóxicas de Al en hidroponía y suelos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro Regional de Investigación Carillanca, Temuco, perteneciente al Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Las especies evaluadas correspondieron a *L. albus* cv. Victoria y *L. angustifolius* cv. Gungurru, utilizando *L. luteus* cv. Aurea y *H. vulgare* cv. Libra como especies control, tolerante y susceptible, respectivamente.

Respuesta al aluminio en solución nutritiva

Las plantas se establecieron en una solución nutritiva basal compuesta de NH_4NO_3 0,25 mM, KNO_3 0,125 mM, $CaCl_2$ 0,25 mM, $MgSO_4$ 0,125 mM, KH_2PO_4 3 μ M, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 0,035 μ M, H_3BO_3 5 μ M, $ZnSO_4$ 1,52 μ M, $MnSO_4$ 2 μ M y Fe-EDTA 5 μ M, ajustada a pH 4,3. La semilla se desinfectó superficialmente con 70% etanol y 2% NaOCl y se germinó entre papeles absorbentes saturados con $CaSO_4$ 0,25 mM pH 4,3 por cuatro días a 25°C. Seis plántulas se transfirieron a envases de 3 L de capacidad mantenidos con aireación permanente, conteniendo solución nutritiva basal suplementada con Al ($AlCl_3$) 0, 10, 20, 40, 80 y

160 μM , con cuatro repeticiones. La solución se renovó cada 24 h para mantener el pH deseado, y evitar la generación de especies de Al no fitotóxicas como consecuencia de la incorporación de iones OH^- (Shuman y Wilson, 1994). Del mismo modo y para evitar la reducción en la concentración de Al^{3+} , se utilizó una solución nutritiva de baja fuerza y baja concentración de fosfatos (Blamey *et al.*, 1983; Shuman y Wilson, 1994). En esta solución se determinó la proporción de Al^{3+} mediante espectrofotometría de absorción atómica, utilizando la metodología descrita por Sadzawka *et al.* (2000). La respuesta a concentraciones fitotóxicas de Al se evaluó cuantificando la longitud de la raíz primaria en lupinos y la longitud de la raíz seminal más larga en *H. vulgare* transcurrido cuatro días de iniciados los tratamientos, y se expresó como crecimiento radical relativo (CRR) (Calba *et al.*, 1996).

Eflujo de ácidos orgánicos en respuesta a concentraciones fitotóxicas de aluminio

Para determinar la probable asociación entre la respuesta a Al y la exudación de ácidos orgánicos, se cuantificó citrato y malato en exudados radicales de plántulas mantenidas en solución nutritiva basal. La semilla se desinfectó superficialmente y se germinó entre papeles absorbentes estériles saturados con CaSO_4 0,25 mM pH 4,3, mantenidos en un envase de vidrio de 1 L de capacidad y 10 cm de diámetro suplementado con aire filtrado (0,45 μm). Transcurridos cuatro días a 25°C, las plántulas se instalaron en un disco de acrílico de 9 cm de diámetro, el que se fijó a la tapa del envase por medio de un soporte sellado en el centro. Sobre el disco de acrílico se hicieron perforaciones de tamaño suficiente para insertar el sistema radical y sostener el cotiledón en su parte superior. Se instalaron dieciséis plántulas por cada disco, cuyas raíces quedaron expuestas a 250 mL de solución nutritiva basal suplementada con cuatro concentraciones de Al (0, 40, 80 y 160 μM), mantenida en agitación suficiente para permitir la aireación. Transcurridas 24 h de adaptación, las plántulas se transfirieron a otro envase conteniendo solución nutritiva basal suplementada con el tratamiento respectivo de Al ajustado a pH 4,3, con tres repeticiones, y se incubaron por

24 h. Finalizado el período de exudación, la solución se liofilizó hasta aproximadamente 30 mL, se filtró a 0,25 μm y se almacenó a -20°C . La concentración de citrato y malato en los exudados radicales se cuantificó mediante métodos enzimáticos (Peñaloza *et al.*, 2000).

Efecto del citrato en la reducción de la fitotoxicidad por aluminio

Con el propósito de confirmar la capacidad del citrato para atenuar el efecto inhibitorio de Al^{3+} sobre el crecimiento radical, *L. albus* y *L. angustifolius* se mantuvieron en solución nutritiva basal pH 4,3 conteniendo Al 80 μM suplementada con citrato 0; 80; y 160 μM . Los tratamientos control correspondieron a Al 0 μM + citrato 0 μM , y Al 0 μM + citrato 80 μM . Se utilizaron envases de 3 L de capacidad con cuatro repeticiones por tratamiento, cada una con seis plántulas. La solución nutritiva se renovó cada 24 h, cuantificándose el CRR transcurridos cuatro días después de iniciado los tratamientos.

Respuesta de las plantas al contenido de aluminio en suelos

Para correlacionar los ensayos de corta duración con la respuesta de las especies en substrato sólido, ambos lupinos, incluidas las especies de referencia, se cultivaron en un suelo con 26,8% saturación de Al y 20 mg P kg^{-1} suelo (Cuadro 1, Andisol 1). El suelo se secó a temperatura ambiente, se tamizó a 2 mm, y se separó en cinco fracciones. Estas fracciones se incubaron por cuatro semanas con 0; 0,44; 0,88; 1,76; y 3,52 g de CaCO_3 kg^{-1} suelo, obteniéndose porcentajes de saturación de Al correspondientes a 26,8; 15,9; 9,5; 2,0; y 0,1%, respectivamente. Previo a la siembra, cada fracción se fertilizó con K (KOH), S y Mg ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}$, MgSO_4), equivalente a 30, 25 y 15 mg kg^{-1} suelo, respectivamente. La semilla se desinfectó superficialmente y se sembró en maceteros conteniendo 2,5 kg de suelo, el que se fertilizó superficialmente con 30 mg N (NaNO_3) kg^{-1} suelo. Los tratamientos consistieron en la combinación de cuatro especies y cinco niveles de Al, dispuestos en bloques completos al azar con cuatro repeticiones.

Cuadro 1. Propiedades químicas de los suelos utilizados en experimentos de invernadero.
Table 1. Chemical properties of the soils utilized in greenhouse experiments.

Propiedades ¹	Andisol 1 ²	Andisol 2 ³
pH (H ₂ O)	4,70	5,00
Nitrógeno, mg kg ⁻¹	18,00	20,00
Fósforo, mg kg ⁻¹	20,00	3,00
Calcio, cmol(+) kg ⁻¹	3,21	1,32
Magnesio, cmol(+) kg ⁻¹	0,48	0,49
Sodio, cmol(+) kg ⁻¹	0,09	0,13
Potasio, cmol(+) kg ⁻¹	0,37	0,44
Suma de bases	4,15	2,38
Aluminio de intercambio, cmol(+) kg ⁻¹	1,52	1,74
CIC ₄ efectiva	5,67	4,12
Saturación de aluminio, %	26,80	42,20
Cobre, mg kg ⁻¹	1,76	1,40
Fierro, mg kg ⁻¹	44,04	85,44
Manganeso, mg kg ⁻¹	9,96	3,56
Zinc, mg kg ⁻¹	0,28	0,12
Boro soluble, mg kg ⁻¹	0,40	0,84

¹ Para cada suelo, la caracterización química que se presenta corresponde a la fracción sin CaCO₃, analizada inmediatamente después de finalizado el período de incubación.

² Serie Victoria, Typic Durudand (CIREN, 1999).

³ Serie Malihue, Acrudoxic Fuldudands (CIREN, 1999).

⁴ Capacidad de intercambio catiónico.

Paralelamente, y con el propósito de determinar el efecto de la probable interacción entre la disponibilidad de fósforo (P) y la concentración de Al, *L. albus* y *L. angustifolius* se sembraron tanto en el Andisol 1, como en un suelo con 42,2% de saturación de Al y 3 mg P kg⁻¹ suelo (Cuadro 1, Andisol 2). Este suelo (Andisol 2) se incubó con CaCO₃ como se indicó anteriormente, obteniéndose porcentajes de saturación de Al correspondientes a 42,2; 26,6; 14,1; 3,5; y 0,1%, cuando se agregó 0; 0,44; 0,88; 1,76; y 3,52 g de CaCO₃ kg⁻¹ suelo, respectivamente. Previo a la siembra, cada fracción de suelos se fertilizó con S, K y Mg en las dosis indicadas, y se separó en dos sub-fracciones que correspondieron a dos niveles de fertilización con P (0 y 200 mg P kg⁻¹ suelo) aplicado como KH₂PO₄. Los tratamientos se dispusieron en un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones.

Transcurridos 45 días después de la emergencia (inicio de floración en lupinos), se removió la fitomasa aérea y radical y se determinó el peso

seco (70°C por 48 h). Ambos experimentos se realizaron en invernadero durante la primavera, con una temperatura media de 22°C y 70% humedad relativa registradas mediante un higrómetro. Los suelos utilizados en este estudio se caracterizaron de acuerdo a la metodología descrita por Sadzawka *et al.* (2000).

Análisis estadístico

La información de cada experimento se procesó estadísticamente mediante ANDEVA. Los tratamientos se ordenaron factorialmente para determinar el efecto de la especie y de las concentraciones de Al en ensayos en solución nutritiva, y de la especie, de los tratamientos de fertilización con P, de los tratamientos de saturación de Al y de la interacción de factores para cada tipo de suelo, en ensayos en suelo. Los resultados que se presentan corresponden al promedio del tratamiento con la desviación estándar, cuando el valor F indicó efecto significativo para promedio de factores, o para sus interacciones (P < 0,05).

RESULTADOS

Respuesta al aluminio en solución nutritiva

Expresado como CRR, ambas especies de lupino mostraron un comportamiento similar en concentraciones de Al por sobre 20 μM , en tanto que la diferencia fue significativa en presencia de Al 10 μM . Esta concentración provocó 90; 40; y 10% de incremento en el CRR de *L. luteus*, *L. albus* y *L. angustifolius*, respectivamente, y 75% de reducción en el CRR de *H. vulgare* (Figura 1). Concentraciones de Al inferiores a 20 μM afectaron significativamente el crecimiento radical de *H. vulgare*, consistente con lo esperado para una especie altamente susceptible a Al. La tendencia observada en la especie susceptible demuestra que una alta proporción del Al agregado correspondió a Al fitotóxico. En efecto, mediciones de especiación indicaron valores de Al^{3+} de 22,2; 50,5; y 105,5 μM para concentraciones de Al nominal de 40; 80; y 160 μM , respectivamente, confirmando la conveniencia de utilizar soluciones nutritivas de baja fuerza iónica con el propósito de disminuir la precipitación del Al^{3+} .

Eflujo de ácidos orgánicos en respuesta a concentraciones fitotóxicas de aluminio

La presencia de Al en la solución nutritiva estimuló la exudación de citrato en plántulas de *L. albus* y *L. angustifolius* mantenidas en condiciones asépticas por 24 h. Durante este período, la exudación de citrato se incrementó hasta 80 μM de Al, y no se afectó significativamente en concentraciones superiores. Esta misma tendencia se observó en *L. luteus*, en tanto que sólo niveles basales de exudación caracterizaron a *H. vulgare* (Figura 2A). La concentración de malato en los exudados radicales no se estimuló en presencia de Al en las cuatro especies, con tasas de exudación más bien características de difusión pasiva de metabolitos (Jones, 1998) (Figura 2B).

Efecto del citrato en la reducción de la fitotoxicidad por aluminio

La capacidad del citrato para reducir el Al fitotóxico se evaluó en solución nutritiva basal conteniendo Al 80 μM . Como se esperaba, la adición de citrato atenuó el efecto inhibitorio de concentraciones de Al fitotóxico sobre el creci-

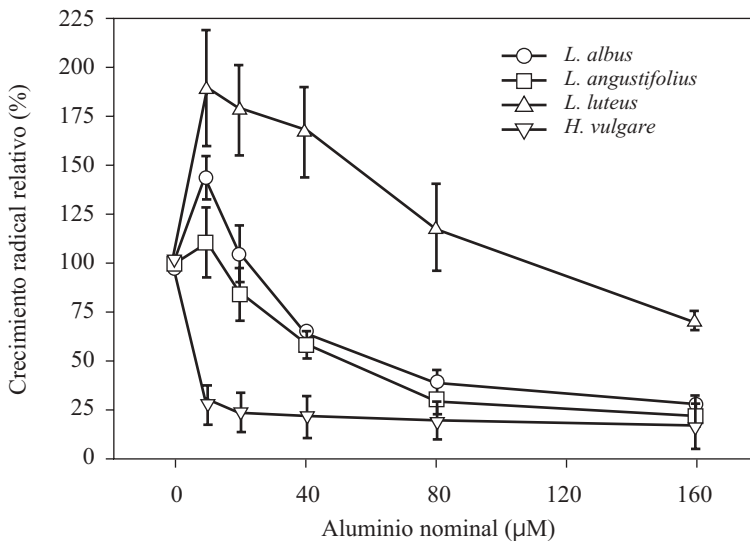


Figura 1. Efecto de concentraciones crecientes de Al sobre el crecimiento radical relativo de *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *Hordeum vulgare* mantenidos por cuatro días en solución nutritiva pH 4,3. Las líneas verticales indican la desviación estándar del promedio (n = 4).

Figure 1. The effect of increasing Al concentrations on root growth rate of *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* and *Hordeum vulgare* maintained for four days in a pH 4.3 nutrient solution. Vertical bars indicate the standard deviation of means (n = 4).

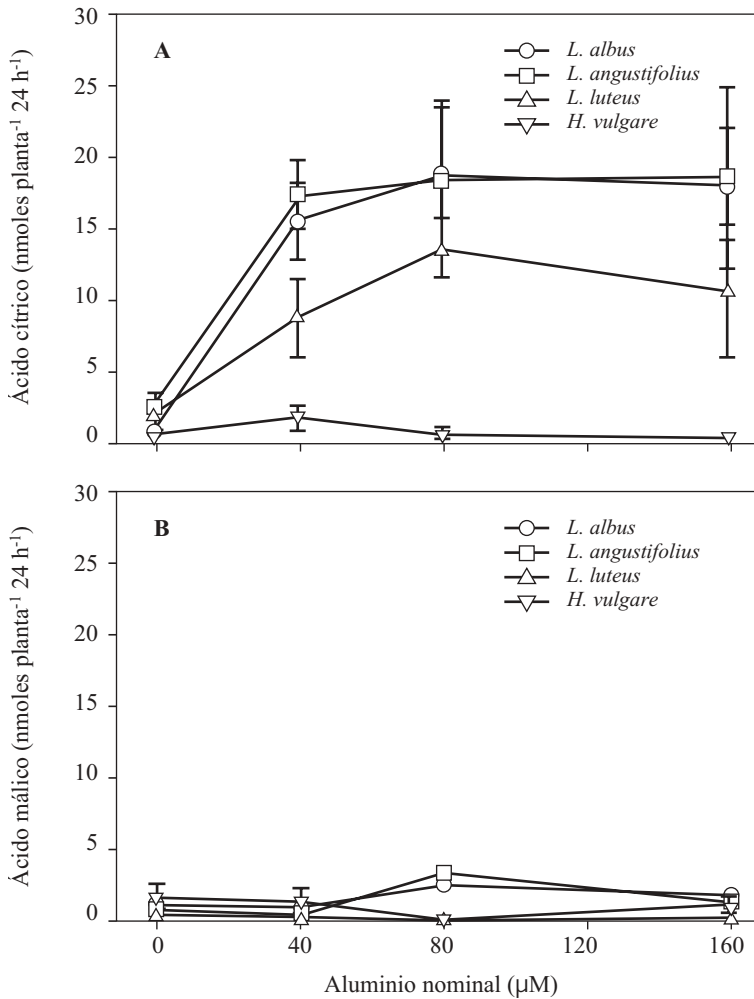


Figura 2. Tasas de exudación de ácido cítrico (A) y ácido málico (B) en *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *Hordeum vulgare* mantenidos por 24 h en diferentes concentraciones de Al en solución nutritiva pH 4,3. Las líneas verticales indican la desviación estándar del promedio (n = 3).

Figure 2. Efflux rates of citric acid (A) and malic acid (B) on *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* and *Hordeum vulgare* maintained at different Al concentrations for 24 h in a pH 4.3 nutrient solution. Vertical bars indicate the standard deviation of means (n = 3).

miento radical en ambas especies de lupino. El crecimiento radical prácticamente se restauró a nivel del control, cuando se adicionó citrato 80 µM a la solución nutritiva conteniendo Al 80 µM pH 4,3 (Figura 3 A, B).

Respuesta de las plantas al contenido de aluminio en suelos

La fitomasa aérea de ambas especies de lupino no se afectó significativamente ($P > 0,05$) dentro de los rangos de saturación de Al, que fluctuaron

entre 0,1 y 26,8% en suelos con 20 mg P kg⁻¹. La tendencia fue similar en la especie tolerante *L. luteus*, mientras que la fitomasa aérea se redujo 90% en presencia de 26,8% de saturación de Al, en la especie susceptible *H. vulgare* (Figura 4). En este suelo, la adición de 200 mg P kg⁻¹ no alteró la fitomasa aérea de *L. albus*, en tanto que, en promedio, ésta se incrementó 18% ($P < 0,01$) en *L. angustifolius*, independiente del porcentaje de saturación de Al ($P > 0,05$ para la interacción Al x P x especie) (Figura 5 A, B).

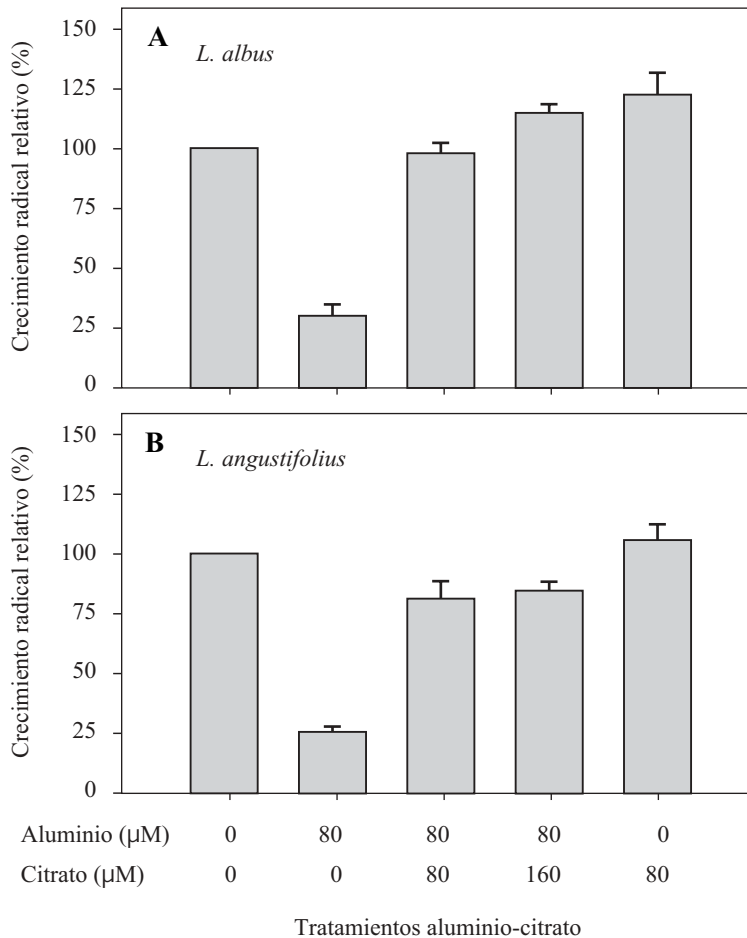


Figura 3. Efecto de la incorporación de citrato sobre la reducción de la fitotoxicidad por Al expresada como crecimiento radical relativo en *L. albus* (A) y *L. angustifolius* (B) mantenidos por cuatro días en solución nutritiva pH 4,3. Las líneas verticales indican la desviación estándar del promedio (n = 4).

Figure 3. The effect of citrate incorporation on reducing Al phytotoxicity expressed by root growth rate on *Lupinus albus* (A) and *L. angustifolius* (B) maintained for four days in a 4.3 pH nutrient solution. Vertical bars indicate the standard deviation of means (n = 4).

El comportamiento de ambas especies de lupino difirió significativamente cuando se cultivaron en un suelo con alta saturación de Al (42,2%) e inadecuada disponibilidad de P (3 mg P kg⁻¹ suelo). En este suelo, la fertilización fosfatada incrementó 22% la fitomasa aérea en *L. albus* y 131% en *L. angustifolius*, independiente del por-

centaje de saturación de Al (P > 0,05 para la interacción Al x P x especie (Figura 5 C, D). Aun cuando también se observaron incrementos en la fitomasa de raíces (17% en *L. albus* y 20% en *L. angustifolius*), el efecto promedio de los tratamientos de P sobre esta variable no fue estadísticamente significativo (P > 0,15).

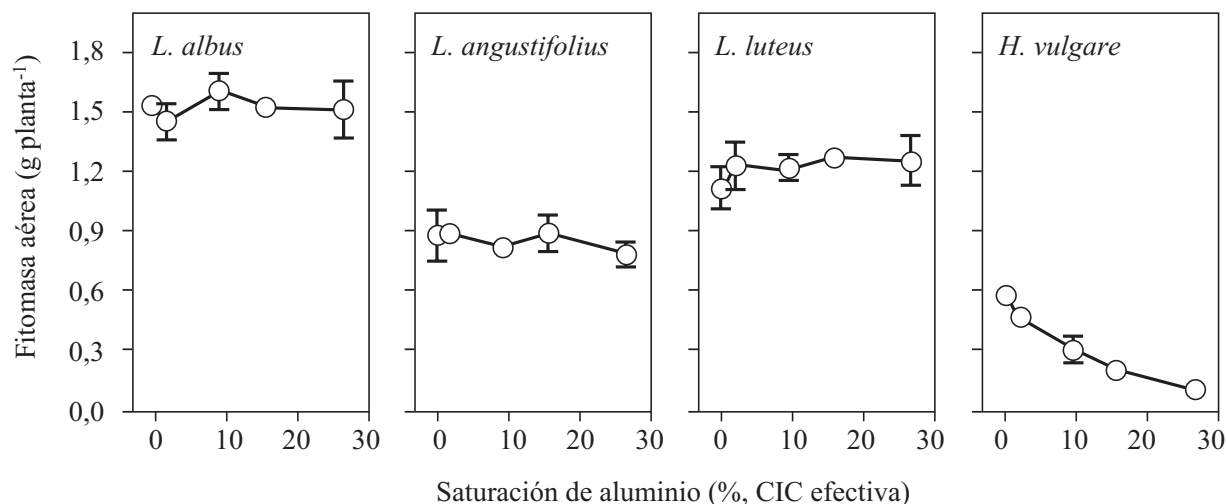


Figura 4. Fitomasa aérea de *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *Hordeum vulgare* mantenidos por 45 días en suelos con porcentaje de saturación de Al fluctuantes entre 0,1 y 26,8% (Andisol 1). Las líneas verticales indican la desviación estándar del promedio (n = 4).

Figure 4. Shoot biomass of *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* and *Hordeum vulgare* maintained for 45 days in soils with Al saturation ranging from 0.1 to 26.8% (Andisol 1). Vertical bars indicate the standard deviation of means (n = 4).

DISCUSIÓN

La inhibición del crecimiento radical representa una de las alteraciones morfológicas más evidentes y rápidas de las plantas a la presencia de Al fitotóxico (Ryan *et al.*, 1995). Utilizado como marcador fenotípico, este parámetro fue suficiente para discriminar las cuatro especies en un rango de Al nominal entre 0 y 20 μM (Figura 1). Dentro de este rango, *L. albus* incrementó significativamente el CRR, consistente con la tendencia que caracteriza a genotipos tolerantes (Sarkunan *et al.*, 1984; Lin y Myhre, 1991; Paliwal *et al.*, 1994; Piñeros *et al.*, 2002). Esta estimulación en el CRR fue de particular magnitud en *L. luteus*, y se asoció con una significativa resistencia a la inhibición del crecimiento radical en presencia de concentraciones fitotóxicas de Al, consistente con lo observado en esta especie por otros autores (Grauer y Horst, 1990). Aun cuando sus causas no se conocen con precisión, incrementos en la absorción de fosfatos (Nichol *et al.*, 1993), o reducción de la toxicidad por H^+ (Kinraide, 1993), se han indicado como probables factores asociados a esta respuesta. La particular ocurrencia de esta manifestación fenotípica ha sugerido su utilización como indicador de tolerancia en especies

vegetales (Paliwal *et al.*, 1994), de manera que, en función a este parámetro, *L. albus* sería comparativamente más tolerante a Al fitotóxico que *L. angustifolius*, en ensayos en solución nutritiva de corta duración.

Una de las estrategias utilizadas por las plantas para enfrentar concentraciones fitotóxicas de Al es la exudación de ácidos orgánicos de cadena corta a través de sus ápices radicales. Consecuentemente, la estimulación de la exudación de citrato observada en respuesta a concentraciones crecientes de Al (Figura 2) indica que esta estrategia contribuiría a conferir tolerancia a este metal también en *L. albus* y *L. angustifolius*, con una cinética de exudación similar a la informada en *Z. mays* (Piñeros *et al.*, 2002). Lo anterior se sustenta en la fuerte afinidad del citrato por el Al^{3+} , permitiéndole a este ácido orgánico formar complejos Al-citrato altamente estables y, por lo tanto, detoxificar el Al en la rizósfera (Jones, 1998). Esta misma estrategia también sería funcional en la especie tolerante *L. luteus*, en tanto que la ausencia de exudados de citrato o malato en *H. vulgare* se asociaría a su escasa habilidad para soportar concentraciones fitotóxicas de Al (Grauer y Horst, 1990). La afinidad Al-citrato se simuló

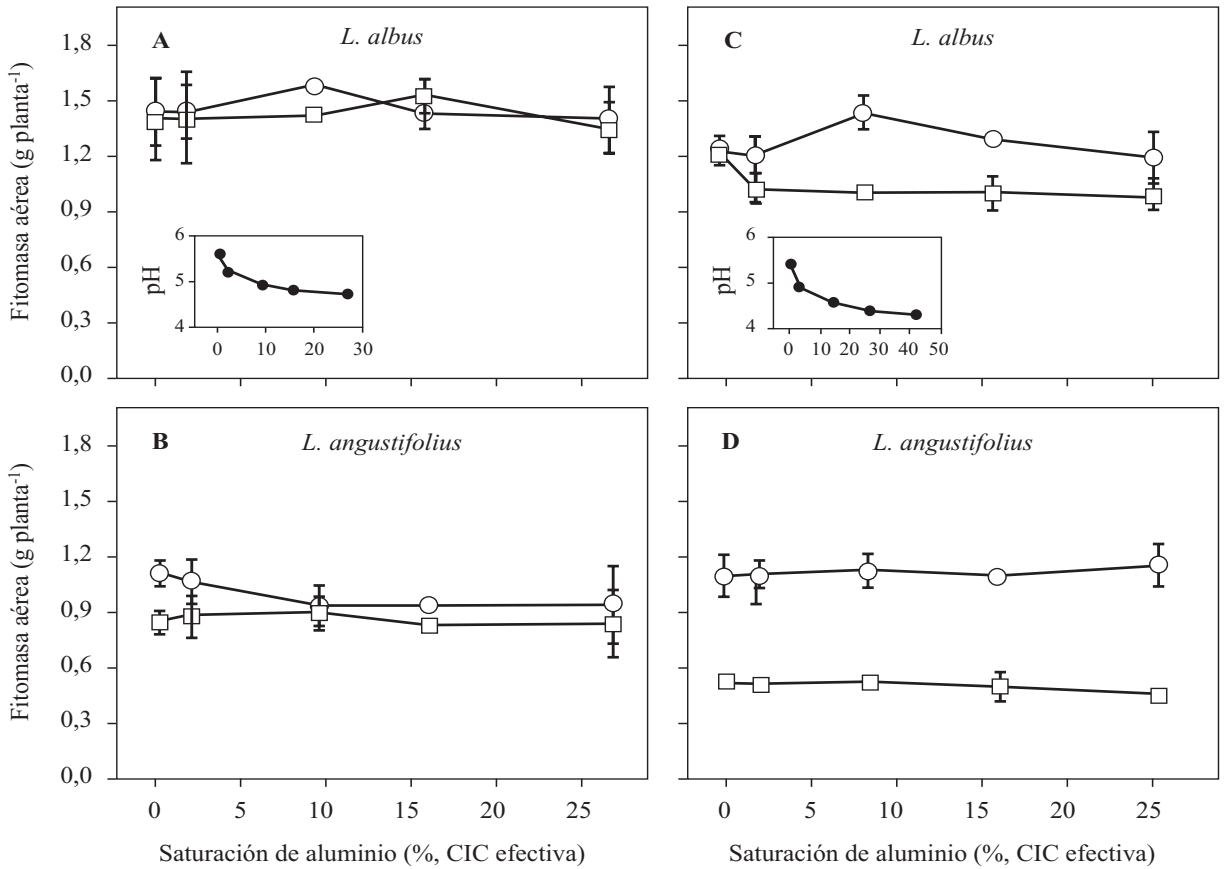


Figura 5. Fitomasa aérea de *Lupinus albus* y *L. angustifolius* mantenidos por 45 días en suelos con porcentaje de saturación de Al fluctuantes entre 0,1 y 26,8% (A, B: Andisol 1) y entre 0,1 y 42,2% (C, D: Andisol 2), fertilizados y no fertilizados con fosfatos. Las líneas verticales indican la desviación estándar del promedio ($n = 3$). Las figuras insertas en A y C corresponden al pH de los suelos Andisol 1 y Andisol 2, respectivamente, para cada tratamiento de saturación de Al.

Figure 5. Shoot biomass of *Lupinus albus* and *L. angustifolius* maintained for 45 days in soils with Al saturation ranging from 0.1 to 26.8% (A, B: Andisol 1) and from 0.1 to 42.2% (C, D: Andisol 2), fertilized and not fertilized with phosphate. Vertical bars indicate the standard deviation of means ($n = 3$). Inserts in A and C correspond to pH of soils Andisol 1 and Andisol 2, respectively, at each Al saturation treatment.

en solución nutritiva, demostrándose que la adición de citrato en concentraciones equimolares, fue suficiente para reducir el efecto inhibitorio del Al sobre el crecimiento radical de ambas especies de lupino (Figura 3).

No obstante la precisión de ensayos en solución nutritiva de corta duración para discriminar entre genotipos dentro de reducidos rangos de concentración de Al, la respuesta de las plantas a este metal puede ser significativamente afectada por el sustrato. En efecto, se ha demostrado que la impedancia física puede acentuar la exudación de

metabolitos que pudieran estar asociados con la tolerancia de las especies a Al (Horst *et al.*, 1990). Adicionalmente, la formación de complejos Al-citrato altamente estables depende de factores del suelo tales como la superficie de intercambio y la propiedad de adsorción, o de la degradación de ácidos orgánicos por microorganismos (Jones *et al.*, 1996; Jones y Kochian, 1996), de manera que el comportamiento de las plantas en solución nutritiva no sería necesariamente similar a aquel que ocurre en el suelo. Con el propósito de incorporar factores dependientes del sustrato en la discriminación de ambos lupinos, la respuesta a

Al se evaluó en un suelo ácido con porcentajes variables de saturación de Al. Expresado en función de la producción de fitomasa aérea, la respuesta no difirió entre especies de lupino dentro de un rango de Al fitotóxico fluctuante entre 0,1 y 26,8%, en donde *H. vulgare* redujo 90% su fitomasa (Figura 4). Esto indica que la tolerancia de *L. albus* y *L. angustifolius* al Al sería comparativamente similar a *L. luteus*, en suelos con porcentajes de saturación de Al de hasta 26,8% y con adecuada disponibilidad de fosfatos (20 mg P kg⁻¹).

Puesto que los suelos ácidos están frecuentemente asociados no sólo a concentraciones fitotóxicas de Al, sino también a reducida concentración de P disponible (Besoain y Sadzawka, 1999), las evaluaciones se extendieron a aquellos donde coexisten ambos estreses abióticos (3 mg P kg⁻¹ suelo y 42,2% saturación de Al) (Figura 5 C, D). El principal efecto observado en esta condición de suelo correspondió a los tratamientos de P, en tanto que el efecto promedio de los tratamientos de Al no alteró significativamente el comportamiento de las dos especies de lupino, y sólo la interacción Al x P x especie ($P = 0,07$) pudiera tener alguna relevancia. El efecto de los tratamientos de P fue de particular magnitud en *L. angustifolius*, especie que incrementó 131% la fitomasa aérea en respuesta a la fertilización fosfatada (Figura 5D). La respuesta comparativamente menor a la fertilización fosfatada observada en *L. albus* (22% de incremento en la fitomasa) se atribuye a la habilidad de la especie para movilizar el P retenido en el suelo (Gardner *et al.*, 1982) (Figura 5 C). Si se acepta la significancia para la interacción Al x P x especie ($P = 0,07$), una explicación razonable al comportamiento de *L. albus* en presencia de P pudiera estar en la estimulación del crecimiento inducida por Al. Aun cuando se requiere de experiencias adicionales para confirmarlo, la tendencia observada en presencia de P sugeriría que la estimulación del crecimiento, radical o aéreo, característica de genotipos tolerantes a Al (Marschner, 1986; Paliwal *et al.*, 1994), ocurriría sólo en aquellos con adecuada provisión de fosfatos.

Sobre la base de resultados que indican la presen-

cia de concentraciones de Al en el tejido foliar de lupinos que superan los 3000 mg kg⁻¹ (datos no presentados) sin evidencias típicas de fitotoxicidad descritas en estas especies (Snowball y Robson, 1986), es posible concluir que la exudación de citrato es, al menos, una de las estrategias utilizadas por ambas especies de lupino para tolerar el Al fitotóxico en el suelo. Además del mecanismo de exclusión del Al mediado por el citrato, la alta concentración de Al foliar detectada en lupinos sugeriría la presencia de un mecanismo interno de tolerancia que pudiera estar también operando en respuesta al Al fitotóxico en estas especies.

Aun cuando es modulada por un mecanismo diferente, la exudación de citrato también es funcional para movilizar fosfatos desde fuentes de P de baja solubilidad en *L. albus* (Gardner *et al.*, 1982). Si bien esta estrategia le permitiría a la especie tolerar los dos estreses ambientales más frecuentes en suelos ácidos, la reducción de la fitomasa observada en ausencia de P indica que la exudación de citrato en respuesta a la deficiencia de P estaría restringida en suelos extremadamente bajos en P disponible. Alternativamente, el volumen de substrato utilizado pudiera condicionar la producción de raíces proteoideas, estructuras especializadas en la síntesis y excreción de citrato en respuesta a la deficiencia de P en esta especie (Peñaloza *et al.*, 2002). De este modo, el comportamiento de *L. albus* en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio no necesariamente refleja una situación natural de cultivo, donde la especie pudiera expresar más adecuadamente esta estrategia adaptativa. En *L. angustifolius*, en tanto, la exudación de ácidos orgánicos es funcional principalmente en respuesta a concentraciones fitotóxicas de Al, de manera que más que la toxicidad por Al, la disponibilidad de P parece ser el factor limitante para el adecuado establecimiento de *L. angustifolius* en este suelo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Campex Semillas Baer por proveer la semilla de los cultivares de lupino utilizados en este estudio.

LITERATURA CITADA

- Besoain, E., y M.A. Sadzawka. 1999. Fenómenos de retención de fósforos en los suelos volcánicos y sus consecuencias. p. 23-36. *In* Besoain, E., Rojas, C. y Montenegro, A. (eds.), Las rocas fosfóricas y su posibilidades de uso agrícola en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.
- Blamey, F.P.C., D.G. Edwards, and C.J. Asher. 1983. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios, and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. *Soil Sci.* 136:197-207.
- Calba, H., B. Jaillard, P. Fallavier, and J.C. Arvieu. 1996. Agarose as suitable substrate for use in the study of Al dynamics in the rhizosphere. *Plant Soil* 178:67-74.
- Carr, S.J., and M.W. Sweetingham. 1994. Root elongation of *Lupinus angustifolius* and *L. luteus* differs in the presence of phytotoxic aluminum. p. 260. *In* Dracup, M. and Palta, J. (eds.) Proceedings of the First Australian Lupin Technical Symposium, Department of Agriculture, Western Australia, Australia.
- CIREN. 1999. Descripción de los suelos; materiales y métodos. Estudio Agrológico IX Región. Publicación CIREN N° 2. 326 p. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN), Santiago, Chile.
- Degenhardt, J., P.B. Larsen, S.H. Howell, and L.V. Kochian. 1998. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant alr-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physiol.* 117:19-27.
- Delhaize, E., P.R. Ryan, and P.J. Randall. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103:695-702.
- Dracup, M., N.C. Turner, C. Tang, M. Reader, and J. Palta. 1998. Response to abiotic stresses. p. 227-262. *In* Gladstones, J.S., Atkins, C.A. and Hamblin, J. (eds.). Lupin as a crop plant: Biology, production and utilization. CABI Publishing, New York, USA.
- Gardner, W.K., D.G., Parbery, and D.A. Barber, D.A. 1982. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* 68:19-32.
- Grauer, U.E., and W.J. Horst. 1990. Effect of pH and nitrogen source on aluminium tolerance of rye (*Secale cereale* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Plant Soil* 127:13-21.
- Horst, W.J., F. Klotz, and P. Szulkiewicz. 1990. Mechanical impedance increases aluminium tolerance of soybeans (*Glycine max*) roots. *Plant Soil* 124:227-231.
- Jones, D L. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.
- Jones, D.L., and L.V. Kochian. 1996. Aluminium-organic acid interaction in acid soils. I. Effect of root-derived organic acids on the kinetics of Al dissolution. *Plant Soil* 182:221-228.
- Jones, D.L., A.M. Prabowo, and L.V. Kochian. 1996. Aluminium-organic acid interaction in acid soils. II. Influence of solid phase sorption on organic acid-Al complexation and Al rhizotoxicity. *Plant Soil* 182:229-237.
- Kinraide, T.B. 1993. Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations. *Physiol. Plant.* 88:619-625.
- Kochian, L.V. 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237-260.
- Lin, S., and D.T. Myhre. 1991. Differential response of citrus rootstock to aluminum level in nutrient solution. I. Plant growth. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 14:1223-1238.
- Marschner, H. 1986. Mineral nutrition of higher plants. 674 p. Academic Press, London, UK.
- Miyasaka, S.C., J.G. Buta, R.K. Howell, and C.D. Foy. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. *Plant Physiol.* 96:737-743.
- Nichol, B.E., L.A. Oliveira, A.D.M. Glass, and M.Y. Siddigi. 1993. The effect of aluminum on the influx of calcium, potassium, ammonium, nitrate, and phosphate in an aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiol.* 101:1263-1266.
- Paliwal, K., M. Sivaguru, and A. Thiruselvi. 1994. Identification of an aluminum tolerant tropical cowpea cultivar by growth and biomass accumulation parameters. *J. Plant Nutr.* 17:367-376.
- Peñaloza, E., N. Carvajal, L.J. Corcuera, y J. Martínez. 2000. Exudación de citrato y actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa en raíces de lupino blanco en respuesta a variaciones en la disponibilidad de fósforo. *Agric. Téc. (Chile)* 60:89-98.
- Peñaloza, E., L.J. Corcuera, and J. Martínez. 2002. Spatial and temporal variation in citrate and malate exudation and tissue concentration as affected by P stress in roots of white lupin. *Plant Soil* 241:209-221.

- Piñeros, M.A., J.V. Magalhaes, V.M. Carvalho, and L.V. Kochian. 2002. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol.* 129:1194-1206.
- Ryan, P.R., E. Delhaize, and P.J. Randall. 1995. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196:103-110.
- Sadzawka, A., R. Grez, L. Mora, N. Saavedra, M. Carrasco, H. Flores, y C. Rojas. 2000. Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación, Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo, 63 p. Disponible en <http://www.inia.cl/~asadzawka/metodos2000-sep.pdf>. Leído el 26 de junio, 2001.
- Sarkunan, V., C.C. Biddappa, and K. Nayak. 1984. Physiology of aluminum toxicity in plants. *Curr. Sci.* 53:882-834.
- Shuman, L.M., and D.O. Wilson. 1994. Influence of phosphate and hydroxyl ions on aluminum toxicity in soybean and wheat. *J. Plant Nutr.* 17:345-365.
- Snowball, K., and A.D. Robson. 1986. Symptoms of nutrient deficiencies: Lupin. 83 p. University of Western Australia, Western Australia Press, Nedlands, Australia.
- Taylor, G.J. 1995. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. *Plant Soil* 171:89-102.
- Von Uexküll, H.R., and E. Mutert. 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171:1-15.
- Zheng, S.J., J.F. Ma, and H. Matsumoto. 1998. High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tip. *Plant Physiol.* 117:745-751.