

*Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas*

*Universidad de La Habana  
Facultad de Biología*

“Modificaciones anatomofisiológicas del sistema radical de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.), tratadas con aluminio”

*Tesis en opción al Grado Científico  
de  
Doctor en Ciencias Biológicas*

**Autor: M. Sc. Idioleidys Alvarez Bello**

Tutores: Dr. C. Inés María Reynaldo Escobar  
Dr. C. Ricardo Acevedo Rojas  
Asesor: Dr. C. Pilar Sánchez Testillano

*La Habana  
2010*

*“A mis pequeños tesoros*

*Ale y Leo”*

## SÍNTESIS

El trabajo tuvo como objetivo fundamental determinar las modificaciones que provoca el Al en la anatomía y la fisiología del sistema radical de plántulas de arroz de dos variedades, mediante su interacción con diferentes procesos celulares y la evaluación del papel de las MAP quinasas, como parte del mecanismo de acción del ión  $Al^{3+}$ . Para ello se evaluaron diferentes indicadores de crecimiento, la división y alargamiento celular, así como la activación de la vía de las MAP quinasas. Se demostró que el Al provocó modificaciones en la anatomofisiología del sistema radical de plántulas de arroz, evidenciándose que la variedad J-104 es más sensible que la INCA-LP7 a sus efectos tóxicos. Se demostró que el ángulo de curvatura radicular constituye un indicador visual de toxicidad por Al en la planta de arroz. Se evidenció el efecto tóxico del Al en los procesos de división y alargamiento celular, demostrándose que limitan el crecimiento de la célula y por tanto de la radícula. Se examinaron diversos mecanismos, demostrándose que la inducción de la síntesis de la calosa y el secuestro vacuolar provocan desórdenes fisiológicos, pero no participan en el mecanismo de tolerancia al Al. Se demostró que la vía de transducción de la señal de las MAP quinasas opera durante la respuesta citotóxica inducida por el Al en la especie *Oryza sativa* L y se estableció un modelo que explica el mecanismo de acción del ión  $Al^{3+}$ , en la célula radical de la planta de arroz.

## **ABREVIATURAS**

4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI)

Ácido desoxinucleico (ADN)

Ácido desoxiribonucleico (ARN)

Ácido indolacético (AIA)

Aluminio (Al)

Aminopropil trietoxisilano (APES)

Buffer fosfato salino (PBS)

Cadmio (Cd)

Cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ )

Cobre (Cu)

Difosfato de adenosina (ADP)

Difosfato de guanina (GDP)

Especies activas de oxígeno (ROS)

Factores de transcripción (FT)

Fosfoinositol piruvato ( $PIP_2$ )

Hidróxido de aluminio ( $Al(OH)^{2+}$ )

Hierro (Fe)

Inositol trifosfato ( $IP_3$ )

Niquel (Ni)

Paraformaldehído (PFA)

Plasmodesmos (PD)

Proteína activada por mitogen (MAP)

Proteína quinasa activada por mitogen (MAPK)

Proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)

Transportador de ácido indolacético (T-AIA)

Trifosfato de adenosina (ATP)

Trifosfato de guanina (GTP)

Zinc (Zn)

## 1. INTRODUCCIÓN

El aluminio se considera un “elemento beneficioso” para las plantas, porque en pequeñas dosis puede reducir la toxicidad provocada por el exceso de otros elementos como el calcio, el magnesio y el fósforo (Marschner, 1995; Bonilla, 2000). Sin embargo, es más conocido por su efecto perjudicial en los cultivos cuando sobrepasa los límites permisibles.

Este elemento en un suelo básico o neutro se encuentra formando distintos complejos, mientras que en un suelo ácido, donde el pH es inferior a 5, se libera haciéndose soluble su forma iónica  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , generalmente denominada  $\text{Al}^{3+}$ ; así puede ser absorbido por las plantas y ejercer en ellas su efecto tóxico (Sivaguru *et al.*, 2000b).

La acidificación de los suelos se han intensificado en los últimos años, estimándose que aproximadamente el 30% de la superficie terrestre y el 50% de las tierras cultivadas están afectadas por este fenómeno y de estas últimas cerca de un 60% se localiza en las zonas tropicales y subtropicales (Kochian *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2006).

Los suelos de Cuba no han sido de los más afectados por la acidez (Morales *et al.*, 2001), no obstante, diversos factores naturales y antrópicos han generado alrededor de 557 400 hectáreas de suelos alíticos con el transcurso de los años, los que se encuentran distribuidos en casi toda la isla, con una mayor incidencia en las provincias de Pinar del Río, Camagüey y Granma (Cuba. MINAGRI, 1999; CITMA, 2003; Hernández *et al.*, 2004, 2006).

La toxicidad por Al es el efecto más importante en los suelos ácidos y constituye el mayor factor limitante del crecimiento y la producción vegetal (Schwarzerová *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). Y para la mayoría de las plantas, la raíz es el órgano más afectado por este ión (Ma *et al.*, 2004; Wang y Kao, 2007), por lo que se han planteado diversas hipótesis acerca de los mecanismos de toxicidad en esta parte de la planta.

Se conoce que diferentes procesos y componentes celulares pueden ser afectados por el Al (Kochian, 1995; Barceló y Postrieder, 2002) y entre los más importantes se encuentran, el núcleo y la división celular (Matsumoto 2000; Silva *et al.*, 2000), la estructura de la membrana plasmática (Wagatsuma *et al.*, 1995; Ishikawa, *et al.* 1996; Zhang *et al.*, 1997), el movimiento de iones (Ryan y Kochian 1993), el estrés oxidativo (Yamamoto *et al.*, 2003), la dinámica del citoesqueleto (Blancaflor *et al.*, 1998, Sivaguru *et*

*al.*, 1999) y el continuo citoesqueleto- membrana- pared celular (Horst *et al.*, 1999), entre otros (Zheng y Yang, 2005, Liu *et al.*, 2008). Esto ha limitado el estudio integrado de todos los posibles mecanismos, de modo que falta mucho por conocer acerca de éstos.

El estudio de la tolerancia al Al ha alcanzado un avance considerable, sobre todo en algunos cereales (Matsumoto 2000, Ryan *et al.* 2001), donde se ha abordado intensamente el papel de los ácidos orgánicos en la quelatación del Al intra y extracelular. No obstante, poco se sabe acerca de otros mecanismos de tolerancia, como la unión del Al a la pared celular y a proteínas citoplasmáticas, así como la compartimentación del Al dentro de la célula (Barceló y Poschenrieder, 2002)

Durante las últimas décadas, bioquímicos, fisiólogos y biólogos a través del empleo de las técnicas moleculares han abordado las proteínas de fosforilación por su importancia en la regulación de la expresión génica y del estado fisiológico de las plantas en respuesta a varios estreses ambientales (Yuasa *et al.*, 2001). Se ha encontrado que las MAP quinasas juegan un papel esencial en los procesos de transducción de la señal intracelular relacionada con la respuesta a estreses bióticos y abióticos, como el ataque de patógenos (Jonak *et al.*, 1996), el frío (Mizoguchi *et al.*, 1996), la salinidad (Zhang *et al.*, 2000), la sequía (Fu *et al.*, 2002), la inundación (Huang *et al.*, 2002) y la toxicidad por metales pesados. Recientemente se ha demostrado que este mecanismo de señalización es activado por Zn, Fe, Cu y Cd, en las raíces de arroz (Yeh *et al.* 2003, 2004; Lin *et al.* 2005; Tsai y Huang 2006; Chen *et al.*, 2007). No obstante, no se conoce si la vía de señalización de las MAP quinasas se activa como parte del mecanismo de toxicidad que se desencadena ante la presencia del Al.

Debido a que el arroz (*Oryza sativa* L.) es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial y uno de los cereales más importantes por la amplia extensión de superficie en la que se cultiva (Rodríguez, 2003) y que en el ámbito científico, es considerado como planta modelo en monocotiledóneas (Simonovicova *et al.*, 2004; Ligaba *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006), el estudio de la toxicidad por Al en esta especie posee un valor teórico práctico importante. Sobre todo, si se tiene en cuenta que las investigaciones han estado encaminadas a la búsqueda de los genes que le confieren a esta especie, una mayor tolerancia al Al, entre los cereales de grano pequeño.

No obstante, no se han abordado con profundidad los efectos que este ión puede provocar en la arquitectura de la raíz, ni su relación con los diferentes procesos fisiológicos que tienen lugar en la misma, aún cuando el conocimiento detallado de las estructuras y los cambios que en ellas se producen, permiten interpretar correctamente cualquier respuesta fisiológica de la planta.

Por las razones antes expuestas, la presente tesis, propone la siguiente hipótesis:

“Las modificaciones en la anatomofisiología del sistema radical de plántulas de arroz, las alteraciones de los diferentes procesos celulares y la activación de la vía de las MAP quinasas, provocadas por el Al, se relacionan con la tolerancia al metal”.

### **Objetivo general**

Determinar las modificaciones que provoca el Al en la anatomía y la fisiología del sistema radical de plántulas de arroz de dos variedades, mediante su interacción con diferentes procesos celulares y la evaluación del papel de las MAP quinasas, como parte del mecanismo de acción del ión Al<sup>3+</sup>.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar diferentes indicadores de crecimiento anatomofisiológicos en el sistema radical de plántulas de arroz expuestas a diferentes concentraciones de Al.
2. Conocer el efecto del Al en los procesos de división y alargamiento celular en la radícula de plántulas de arroz.
3. Localizar el Al en el ápice radicular de plántulas de arroz expuestas a diferentes niveles de toxicidad.
4. Evidenciar el papel de la vía de señalización de las MAP quinasas ante la presencia del Al.

### **Novedad científica**

Se demuestra por primera vez que el Al activa la vía de las MAP quinasas como parte del mecanismo de señalización en la especie *Oryza sativa* L., con lo que se hace un nuevo aporte al conocimiento acerca de la toxicidad por Al en el arroz.

Es el primer estudio en Cuba, en el cual se abordan de conjunto los efectos morfológicos y fisiológicos de la toxicidad provocada por el Al en la planta de arroz y se caracterizan variedades comerciales cubanas de arroz en cuanto a su grado de tolerancia al metal.

### **Importancia teórica**

La tesis contribuye a un mejor conocimiento acerca de los efectos tóxicos del aluminio en la anatomía radical, como la base para explicar correctamente las respuestas fisiológicas que tienen lugar en las raíces de las plantas.

Se construyó un modelo del modo de acción del ión  $Al^{3+}$  en la célula radical de la planta de arroz, donde se integran diferentes mecanismos de toxicidad del Al y se demuestra el papel de las MAP quinasas, como parte del mecanismo de transducción de la señal.

### **Importancia práctica**

Los indicadores morfológicos de crecimiento pueden servir como herramienta para identificar manifestaciones de toxicidad por Al en el arroz.

El método de determinación del ángulo de curvatura radical constituye una herramienta promisoría para discernir entre variedades con diferentes grados de tolerancia al Al.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - El aluminio en el suelo

El aluminio (Al) es el metal más abundante y el tercer elemento en la corteza terrestre. El químico danés Hans Cristian Oersted aisló el Al por primera vez en 1825. Ya en 1918, se había relacionado con diferentes procesos patológicos importantes, tanto en el hombre como en otros grupos de animales (Haung, 1984) y en enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson (Crappier McLachlan, 1986).

A principios de siglo se comenzó a estudiar el Al en relación a su fitotoxicidad, aspecto que ha cobrado mayor importancia, ya que se ha determinado que diversos metales pueden actuar como limitadores del crecimiento de la plantas provocando por tanto, fuertes pérdidas económicas (Foy *et al.*, 1978; Poschenrieder *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 2006). Además, los vegetales son los productores primarios y por tanto, la vía de entrada a la cadena alimentaria del hombre, tanto directamente como a través de la carne de los herbívoros que consume.

En condiciones normales este metal se encuentra en el suelo formando diferentes complejos, pero ante condiciones de acidez, se propicia su liberación al medio, incrementándose así la concentración de su forma fitotóxica ( $Al^{3+}$ ), que es absorbida por las plantas, provocando en ocasiones daños irreparables (Zheng y Yang, 2005). Por esta razón el pH del suelo es uno de los factores más importantes que determinan la disponibilidad del metal y su asimilación por las plantas.

Se estima que un 40% del área cultivable en el planeta y quizás un 70% del suelo utilizado para la producción de alimentos, son zonas ácidas, donde el Al es uno de los factores que determinan las especies de plantas y su distribución (Hernández *et al.*, 2006).

Existen tres causas fundamentales que pueden generar acidificación del suelo, la primera es la aplicación de fertilizantes con carácter residual ácido, la segunda, la desecación de zonas pantanosas donde están presentes los materiales sulfhídricos y la tercera, los procesos erosivos en acrisoles y alisoles.

Se plantea que a medida que el horizonte A va lavándose y erosionándose, el horizonte B, que es alítico, se acerca a la superficie resultando más ácido y rico en Al cambiante. De esta forma se reduce la profundidad efectiva del suelo para las plantas y su sistema

radical se pone en contacto directo con el horizonte B, extremadamente ácido (Hernández *et al.*, 2006).

En el trópico, las abundantes precipitaciones han traído como consecuencia una acidificación del suelo por el lavado del mismo (Bertsch, 1995), no obstante, la actividad humana ha sido el factor determinante en la alitización de los suelos, debido a las grandes deposiciones de contaminantes ácidos, la producción de sustancias tóxicas que finalizan en las lluvias ácidas, la aplicación de fertilizantes a base de amonio y el cultivo intensivo de legumbres (Nouri y Reddy, 1995; Hernández *et al.*, 2006).

En materia de suelo, la cantidad de Al cambiante se mide como porcentaje de saturación en el suelo y se puede decir que la mayoría de los cultivos son sensibles a la acumulación de más del 50% de saturación por Al, valor que resulta el límite inferior para diagnosticar un suelo como alítico.

Específicamente para las gramíneas se conoce que el trigo y el sorgo toleran 10 y 15 %, el maíz un 40 % y para el arroz, aunque no se ha determinado con exactitud, se sabe que tolera más del 40% de saturación de Al en el suelo (Bertsch, 1995; Hernández *et al.*, 2006).

## **2.2. Características físico-químicas del Al**

La química del Al es bastante compleja, ya que debido a su alta carga iónica y su pequeño radio atómico, es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble.

Las soluciones acuosas de las sales de Al son ácidas y esto se debe a su hidrólisis. Este ión de poco volumen y mucha carga ejerce un fuerte campo eléctrico que atrae a los electrones, alejándolos de las moléculas de agua vecinas que se convierten en dadoras de protones (Jones *et al.*, 1998). Es un ión altamente hidratado que se comporta como un metal duro con una considerable afinidad por bases fuertes y grupos cargados negativamente.

Esta afinidad, que se da en grupos bien conocidos como efectivos agentes quelantes para el  $Al^{3+}$  y otros metales trivalentes como el  $Fe^{3+}$ , se pueden clasificar por orden decreciente según su afinidad al Al como glicoles, catecoles, hidroxiacidos alifáticos e hidroxiacidos aromáticos (Delhaize *et al.*, 1993)

Otros agentes quelantes para este tipo de metales trivalentes y que contiene estos grupos son el ácido cítrico, tartárico, glucónico, etc. Una importante consideración para definir a estos efectivos ligandos donadores es la competencia con hidrogeniones en solución acuosa, ya que sufren constantes protonaciones (Bartlett y Riego, 1997). Se considera que los más efectivos son los compuestos que contienen grupos hidroxil o fenil. También se han descrito compuestos inorgánicos capaces de quelar el Al como los grupos fluorhídrico y sulfato (Wagatsuma *et al.*, 1995).

La fuerte tendencia del Al a constituir formas hidrolíticas y la elevada insolubilidad del  $\text{Al(OH)}_3$ , presentan grandes interferencias para medir las constantes de estabilidad de los complejos de  $\text{Al}^{3+}$ . El Al es un elemento anfótero que puede actuar como catión  $\text{Al (H}_2\text{O)}^{3+}$  en medio ácido y como anión en medio básico. El punto de pH al cual se da la variación es 5. Cuando el pH es inferior a 5 el ión se encuentra mayoritariamente en forma de complejo hexahidrato octaédrico. Cuando disminuye el pH las cargas de protones van disminuyendo y las cargas positivas del Al fuerzan la hidrólisis de las moléculas de agua (Wagatsuma *et al.* (1995).

En estudios en los que se determina la forma de Al predominante a cada valor de pH se observa que cuando se encuentra en un medio muy ácido, el Al se presenta en forma iónica ( $\text{Al}^{3+}$ ), o bien en forma de monómero,  $\text{Al (OH)}_2^+$  y  $\text{Al (OH)}^{2+}$ . A valores entre 3,5 y 5 aumentan mucho los polímeros de hidróxidos de Al llegando a una concentración máxima. Cuando el pH ya es superior a 5, tanto las formas monoméricas, como los polímeros de hidróxidos disminuyen mucho y se incrementan los niveles de hidróxidos de Al altamente básicos, los cuales son muy insolubles y precipitan fácilmente, por lo que son muy poco disponibles para la plantas y por tanto no tienen mucho efecto sobre ésta. A pH neutro el Al se encuentra en la forma insoluble  $\text{Al (OH)}_3$ .

Según Wagatsuma *et al.* (1995), las formas iónicas polimerizadas son las mejor absorbidas por las plantas, ya que en plantas tratadas con polímeros de Al se presentaron los síntomas típicos de toxicidad, mientras que en los tratamientos con Al en la forma monomérica, no se reconoció ningún síntoma característico de toxicidad.

La toxicidad por Al difiere marcadamente con la forma química del Al con la que se trabaje. La más acusada por Al se ha visto que se produce a valores de pH bajos, donde predominan las formas poliméricas de hidróxidos de Al. De todas formas, el margen de pH

donde podemos detectar la máxima toxicidad depende de la especie y de la variedad en cuestión.

### **2.3. Incorporación del ión $Al^{3+}$ a la raíz**

Aunque se ha generalizado el criterio de que el ión  $Al^{3+}$  puede atravesar positivamente la membrana a través del gradiente de concentración (Ma *et al.*, 1998) mediante un transporte pasivo, existen algunos autores que plantean que pudiera estar mediado por transportadores o por proteínas canales (Ma y Hiradate, 2000; Kollmeier *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 1994, 2002).

Según Kollmeier *et al.* (2001), el Al entra y se une a la membrana plasmática (Horst, 1995) cambiando sus propiedades (Wagatsuma *et al.*, 1995) y activando segundos mensajeros como el calcio citosólico (Lindberg y Strid, 1997; Jones *et al.*, 1998; Zhang y Rengel, 1999) y el inositol trifosfato ( $IP_3$ ) (Haug *et al.*, 1994; Jones y Kochian, 1995) que funcionan como mediadores celulares generando una señal de transducción que permite la activación de determinados canales iónicos.

En este sentido, Ryan *et al.* (1997) realizaron un estudio en protoplastos aislados de ápices radiculares de un cultivar de trigo tolerante al Al, donde además de los canales aniónicos activados por Al extracelular fueron estudiados otros tipos de canales.

1. Canales iónicos activados por  $Al^{3+}$ , donde la proteína canal es activada directamente cuando se une  $Al^{3+}$  a su receptor y la señal de transducción está limitada a la membrana plasmática.
2. Canales aniónicos de baja conductancia, donde media un influjo y eflujo de aniones, exhibiendo poca inactivación con el tiempo. Su presencia en la membrana debe contribuir a los bajos niveles de ácidos orgánicos independiente de  $Al^{3+}$ .
3. Poros aniónicos corrientes: Aparecen casi instantáneamente después de la exposición con Al, se encuentran en el ápice radical y posibilitan la exudación de ácidos orgánicos. El complejo de eventos en cascadas que regula la apertura de este tipo de canal, puede estar relacionado con los requerimientos de  $Al^{3+}$  para la activación del mismo. Factores intra y extracelulares pueden modular la actividad de este canal, modificando la forma del poro.

También se ha explorado la posibilidad de que los canales aniónicos activados por Al, existan solamente en las células del ápice radical de los cultivares tolerantes, o en tolerantes y sensibles, pero con densidades diferentes (Piñeros y Kochian, 2001). No obstante, la base de la diferencia en la respuesta fisiológica, en cuanto a la absorción del Al, entre cultivares tolerantes y sensibles permanece desconocida.

#### **2.4. Transporte de Al dentro de la raíz**

Una vez incorporado el Al a la raíz, es transportado hacia el centro de la misma y posteriormente a la parte aérea de la planta y aunque se ha determinado que en especies no acumuladoras el transporte hacia el tallo y las hojas es escaso (Pietrazewska, 2001), los mecanismos que lo determinan no están claros aún. No obstante se han abordado cuatro factores que pueden ser los responsables de este transporte limitado:

1. La Banda hidrofóbica de Caspari en la endodermis puede actuar como barrera física para la entrada de Al en la estela de la raíz (Rengel, 1996).
2. La elevada afinidad del ión  $\text{Al}^{3+}$  por compuestos donores de oxígeno, como los ácidos carboxílicos, poligalacturónidos, heteropolisacáridos (Martin, 1986) y lípidos (Jones y Kochian, 1997), hace que se una a cargas negativas fijadas en el Espacio Libre de Donan del apoplasto celular (Horst, 1995) y la membrana plasmática (Jones y Kochian, 1997), excluyéndolo efectivamente del simplasto.
3. La permeabilidad al Al de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, puede ser difusa y quizás no existe un sistema efectivo de transporte a través de la membrana (Jones y Kochian, 1997).
4. Como la solubilidad del Al es dependiente del pH, cuando el Al entra al citoplasma con un pH neutral, la concentración de Al soluble decrece significativamente, lo que se traduce en bajo transporte del Al de la raíz al tallo (Rengel, 1996).

Recientemente se ha comprobado que el ión  $\text{Al}^{3+}$  puede entrar a la célula utilizando canales específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hossain *et al.*, 2005) y  $\text{Mg}^{2+}$ , teniendo en cuenta que el transporte de ambos es fuertemente inhibido por su presencia y que el diámetro que exhiben estas especies es similar (Guo *et al.*, 2004).

## 2.5. Localización del Al en la raíz

Para comprender la toxicidad por Al, es necesario conocer donde se localiza, no obstante la ausencia de un radioisótopo adecuado y su elevada afinidad por otras moléculas (MacDonald y Taylor, 1995) ha limitado su localización apoplástica y simplástica, provocando que no se pueda estimar la entrada total de del ión  $Al^{3+}$  a la raíz (Feng y Hiradate, 2000; Ma, 2000).

Ante esta disyuntiva, ha sido empleada la tinción con hematoxilina, como una forma conservadora de estudiar la sensibilidad a este metal en diferentes especies de plantas (Polle *et al.*, 1978; Carver *et al.*, 1988; Rincón y González, 1992; Delhaize *et al.*, 1993; Wagatsuma *et al.*, 1995).

Este compuesto tiene la propiedad de tornarse azul cuando forma el complejo, Hematoxilina-Al, cuya unión es específica y fundamenta su penetración y retención en las raíces (Cancado, 1999).

La intensidad del color en los ápices radicales teñidos puede ser una medida cuantitativa y directa de la sensibilidad al Al (Ruiz-Torres y Carver, 1992) porque los cultivares sensibles tienden a acumular mayor contenido de Al en los tejidos radicales (Polle *et al.*, 1978; Carver *et al.*, 1988; Doncheva *et al.*, 2005).

En líneas isogénicas de trigo con diferente grado de tolerancia al Al los ápices radicales de genotipos sensibles fueron teñidos con hematoxilina después de una corta exposición con Al y los ápices de plántulas tolerantes mostraron una tinción menos intensa (Delhaize *et al.*, 1993).

Resultados similares fueron obtenidos en un cultivar de trigo tolerante (Atlas 66) y uno sensible (Scout 66) expuestos a 20  $\mu M$  de Al (Sasaki *et al.*, 1999). Estos indicaron que en el trigo, la acumulación del Al en el tejido radical en crecimiento está relacionada con la sensibilidad diferencial de los genotipos, de forma que los cultivares tolerantes desarrollan un mecanismo que excluye el Al de los ápices radicales (Samuels *et al.*, 1997, Yamamoto *et al.*, 1994).

Para desentrañar los mecanismos de toxicidad hay que partir de que este elemento entra al citoplasma y se diferencia cuantitativamente entre Al simplástico y apoplástico, y en este sentido se han empleado diferentes técnicas para fraccionar el Al asociado a los constituyentes celulares.

Algunas evidencias indican que cantidades considerables de este elemento en el simplasto afectan el crecimiento y el funcionamiento celular (Delhaize *et al.*, 1993). En un estudio realizado hace algunos años, fue posible detectar mediante el empleo de microanálisis de rayos-X, una acumulación sustancial del Al en el simplasto de células (Lasof *et al.*, 1997) apicales de raíces de soya, expuestas al metal durante 4 horas.

Contradictoriamente, Horst (1995) y Rengel (1996) enfocaron su atención hacia otro punto. Según estos autores, la mayor cantidad de Al absorbido (30 y 90%) se localiza en el apoplasto, ya que este ión, bajo condiciones ácidas, se une fuertemente a cargas negativas en el espacio libre de Donnan. Otros estudios que abordaron con profundidad el continuo pared-membrana-citoesqueleto (Grabsky y Schindler 1998; Chong *et al.*, 1999) reafirmaron esta última teoría.

Aunque el mecanismo permanece desconocido y controversial (Kochian, 1995; Taylor, 1995; Sivaguru *et al.*, 1999b), los resultados obtenidos hasta el momento confirman la hipótesis de que la toxicidad por Al afecta importantes procesos que tienen lugar en el ápice radical, como la división y extensión celular, inhibiendo de manera importante el crecimiento de la raíz.

## **2.6. Principales síntomas de toxicidad por Al en las plantas**

### **2.6. 1 Inhibición del alargamiento radical**

La mayor consecuencia de la toxicidad por Al en las plantas, es la inhibición del crecimiento radical, la cual afecta subsecuentemente la absorción de agua y nutrientes por las raíces, incluso a concentraciones micromolares (Foy *et al.*, 1978).

En genotipos de maíz sensibles al Al se indujo inhibición del crecimiento radical a los 30 minutos de exposición con el metal (Sivaguru *et al.*, 2000). No obstante se conoce que la magnitud de la inhibición difiere entre especies y entre cultivares de la misma especie (Matsumoto, 2000).

Numerosas son las evidencias de que el ápice radical juega el papel principal en el mecanismo de percepción y respuesta al Al, sin embargo la zona más afectada dentro del ápice radical ha sido un tema controversial (Sivaguru *et al.*, 2000a). Ryan *et al.*, (1995) plantearon que la zona meristemática era la más sensible al Al, sin embargo la inhibición radical fue la misma en raíces de maíz intactas y decapitadas.

En un estudio realizado por Sasaki *et al.* (1996) en raíces de trigo sometidas a estrés por Al, se observaron cambios en la estructura de las células y aunque la longitud celular mostró un incremento normal en la zona de alargamiento, no fue así en la zona de transición, donde sí se afectó el alargamiento celular.

Este y otros hallazgos permitieron a Sivaguru y Horst (1998) concluir que la parte distal de la zona de transición, donde las células están en una fase preparatoria de alargamiento, es el blanco primario de acción del Al en raíces de maíz, hipótesis que ha sido ratificada hasta la actualidad por varios autores (Sivaguru *et al.*, 2000b; Ciamporová, 2002 y Zheng y Yang, 2005).

Considerando la compleja red de reacciones provocadas por este elemento tóxico y sus interacciones, se definen otros cambios provocados por el Al en determinadas zonas radicales e incluso de plantas completas que influyen de una forma u otra en el crecimiento limitado de la raíz (Bennet y Stewart, 1999).

En este sentido las concentraciones tóxicas de Al han provocado la aparición de grietas en la superficie radical de plantas de soya (*Glycine max*), maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Delhaize y Ryan, 1995; Budíková, 1999). Estas grietas no son más que la desintegración y muerte de las células de la epidermis, hipodermis y las capas corticales más próximas a éstas, ya que la expansión celular dentro del tejido radical puede ejercer un estrés mecánico causando destrucción de los tejidos periféricos de las raíces (Ciamporová, 2002).

Estos elementos son de mucha importancia para conocer como en células de una zona específica de la raíz pueden aparecer alteraciones estructurales en estadios tempranos de toxicidad por Al, que influyen indudablemente en la inhibición del alargamiento radical (Matsumoto, 2000).

Aunque las bases moleculares de la toxicidad por Al permanecen aún desconocidas, se sabe que su consecuencia fisiológica más importante, es el cese del crecimiento vegetal (Sasaki *et al.*, 1996; Blancaflor *et al.*, 1998).

### **2.6.2. Inhibición de la división celular**

La división celular es el otro componente que determina el crecimiento radical en las plantas (Opatrny y Opatrna, 1976) y puede ser fuertemente inhibido ante la presencia de una elevada concentración de Al en el medio (Bennet, 1998; Kawata *et al.*, 1980).



Clarkson (1965) informó que el bloqueo de este proceso, era el daño primario provocado por el Al, teniendo en cuenta la estrecha relación que había observado entre el cese del alargamiento radical y la desaparición de la figura mitótica. Esta hipótesis fue confirmada por Mariendfeld *et al.* (1995), quienes observaron una disminución en el crecimiento radical y en la actividad mitótica, lo que estuvo acompañado por un incremento de la vacuolización en células meristemáticas de avena (*Avena sativa*).

Otros hallazgos posteriores, tomaron en cuenta que la división celular es un proceso lento y el ciclo celular en las plantas es de aproximadamente 1 día, razón por la cual se determinó que no podía ser éste, el mecanismo primario ante la toxicidad del Al, al menos a corto plazo, lo que no contradice que la inhibición de la división celular puede jugar un importante papel en el mecanismo final de toxicidad por Al (Matsumoto 2000).

En un estudio llevado a cabo por Ryan *et al.* (1993) en el cultivo del maíz, la reducción del número de células proliferativas inducidas por Al estuvo acompañada por un acortamiento en la región de división celular y esto conllevó a especular que el proceso de división celular podía estar afectado por la interacción del Al con el ADN (Matsumoto *et al.*, 1977). Varios años después Sivaguru *et al.* (1999a), observó la rápida entrada del Al a las células y su localización cercana a los núcleos celulares, en células radicales de soya.

El mismo resultado fue observado en un cultivo de suspensión celular de *Catharanthus roseus*, pero además se pudo observar que la incorporación de histidina al ADN fue inhibida después de la exposición al Al durante 16 horas.

En este contexto, en raíces de cebada, la síntesis de ADN continuó después del tratamiento con Al, pero el tipo de ADN sintetizado tuvo una inusual composición de base, siendo metabólicamente inestable (Minocha *et al.*, 1992).

A partir de estos resultados las investigaciones centraron su atención en el núcleo celular, teniendo en cuenta que el Al podía inhibir la división celular mediante su interacción con algunos componentes nucleares y esto permitió sugerir que la toxicidad letal del Al podía estar asociada con esta interacción (Matsumoto, 2000).

El núcleo celular fue aislado en raíces de chícharo tratadas con  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , a pH 5,5 durante 1 día y fraccionado en sabia nuclear, cromatina y residuos nucleares, los que contenían la membrana nuclear. Excepto para los residuos nucleares, el 73% del total de Al incorporado al núcleo fue recuperado en la fracción de cromatina, la cual fue

posteriormente disociada en ADN y proteínas histonas y no histonas. Del Al disociado en la cromatina en un 94% fue recobrado en el ADN. La preferencia de unión del Al por el ADN fue abordada también en un experimento in vitro, donde la expresión de la información genética del ADN en el núcleo estuvo determinada por varios factores incluyendo la estructura de la cromatina y el enmascaramiento de ADN por histonas.

Estos resultados indicaron que la condensación y/o agregación de la cromatina puede ser también inducida por el Al.

Ante estos elementos no caben dudas que la inhibición de la división celular puede ser suficiente para inhibir completamente el alargamiento radical y provocar la muerte de la planta.

### **2.6.3. Cambios en las propiedades de la pared celular**

La pared celular es un importante blanco de acción del Al porque además de ser el primer sitio que se pone en contacto con el metal, cualquier modificación en su estructura, puede afectar de forma significativa el crecimiento celular.

Cuando las plantas crecen bajo condiciones de toxicidad por Al, se plantea que el ión  $Al^{3+}$  puede entrar rápidamente al simplasto (Lazof *et al.*, 1994; Taylor, 1995), no obstante entre el 30 y el 90% ha sido localizado en compartimentos extracelulares (Horst *et al.*, 1999; Schofield *et al.*, 2005).

En raíces de cebada (*Hordeum vulgare* L.) el 85-90% del Al incorporado a la raíz se localizó en la pared celular (Clarkson, 1967) y en *Chara arolina*, un 99.99% (Rengel, 1996), aspecto de gran interés teniendo en cuenta los efectos negativos que el Al puede ejercer sobre las propiedades mecánicas y químicas de la pared celular (Horst *et al.*, 1999, Vázquez *et al.*, 1999. Estos resultados apuntaron a que el Al podía estar afectando la extensibilidad de la misma y por tanto el crecimiento.

Con el propósito de aportar nuevos elementos en este sentido Kaku *et al.* (2002) estudiaron las propiedades de la pared en raíces de trigo y observaron que el Al modificó su composición y disminuyó su extensibilidad mecánica, por lo que las paredes celulares se hicieron más gruesas y rígidas.

Por otra parte las evidencias de Ma *et al.* (2004) indican que los cambios provocados por el Al en la viscosidad y elasticidad de la pared celular están relacionados con la inhibición

del crecimiento celular, sugiriendo que la pared, es un importante sitio de unión del Al que conduce además a la inhibición del alargamiento radical (Liu *et al.*, 2008).

Los iones del Al están cargados positivamente bajo condiciones ácidas en las formas  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$  y  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ , por lo que el Al se une con preferencia a los sitios cargados negativamente. Dentro de éstos, las pectinas son el principal candidato de unión, no solo para el  $\text{Al}^{3+}$  sino también para el  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que compiten entre ellos por los sitios cargados negativamente (Hossain *et al.*, 2005).

Según Francho *et al.*, (2002) el ion  $\text{Al}^{3+}$  tiene una mayor preferencia sobre el catión bivalente  $\text{Ca}^{2+}$  e incluso puede ser reemplazado por él (Blamey y Dowling, 1995). Cuando los iones  $\text{Ca}^{2+}$  son reemplazados por iones  $\text{Al}^{3+}$ , la pared celular se hace más rígida y se afecta el alargamiento celular, probablemente por la inhibición del movimiento de agua y nutrientes a través del apoplasto (Zheng *et al.*, 2005).

El desplazamiento del ión  $\text{Ca}^{2+}$  de la pared celular, como proceso relacionado con la toxicidad por Al no ha sido muy estudiado, no obstante, como este ión es un elemento imprescindible en muchos procesos de señalización en el citosol, es posible que los cambios en la concentración de calcio puedan alterar el metabolismo celular, alterando la transducción de señales dependientes de él (Haung, 1984; Taylor, 1995; Delhaize y Ryan, 1995; Rengel, 1996; Kochian, 1995; Jones *et al.*, 1998).

#### **2.6.4. Formación de calosa**

La inducción de la formación de calosa ( $\beta$ -1,3-glucano) y su acumulación en la pared celular, es un fenómeno muy sensible al estrés por Al y aunque no ha sido completamente dilucidado, una de las vías propuestas involucra a la enzima (1,3)  $\beta$ -D-glucano sintasa (Budiková, 1999). Esta enzima está asociada a la membrana plasmática y es activada por el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Matsumoto, 2000).

Desde hace algunos años se ha señalado que el estrés por Al genera deposición de calosa en raíces de soya (Wissemeier y Horst, 1995) y cultivos celulares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) (Taylor, 1995). Este fenómeno es más intenso en el ápice radical y principalmente en las capas celulares de la corteza externa de la raíz (Wissemeier y Horst, 1995).

Una correlación negativa fue observada entre la formación de calosa inducida por Al y el grado de resistencia a este metal en ápices radicales de maíz (Llugany *et al.*, 1995; Horst *et al.* 1997).

Por otra parte la concentración de calosa en el ápice radical de plantas de maíz permaneció constante durante varias horas después de transferir las raíces a una solución nutriente libre de Al (Matsumoto, 2000). Estos hallazgos evidenciaron que la deposición de calosa además de ser un indicador temprano de toxicidad, es un potente parámetro en la tolerancia al Al.

El hecho de que la calosa sea liberada de la membrana hacia el apoplasto fundamenta que se hayan observado deposiciones de calosa en las paredes celulares de las raíces de algunas plantas tratadas con Al (Matsumoto, 2000). En este contexto, Sivaguru *et al.* (2000b) evidenció que el Al indujo acumulación de calosa a nivel de los plasmodesmos, en raíces de trigo, lo que inhibió el alargamiento radical por bloqueo del tráfico de moléculas entre las células.

Este hallazgo y otros síntomas observados ante este estrés, como la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y agua, están sin lugar a dudas relacionados con el hecho de que la calosa ha sido considerada un eficiente bloqueador de la comunicación celular en las plantas.

#### **2.6.5. Alteraciones en el citoesqueleto**

Las interacciones de los iones  $\text{Al}^{3+}$  con la pared celular y la membrana plasmática, conllevan sin dudas a importantes cambios en el citoesqueleto, ya que junto a él, estas estructuras forman parte de una red dinámica que permite realizar varias actividades celulares como la división, la diferenciación y la biosíntesis de la pared (Taiz y Zeiger, 2006).

Jones y Kochian (1995), plantearon que el Al interfería de alguna forma en la función de los componentes del citoesqueleto, lo que estuvo sustentado en los abultamientos que a menudo observaron en los ápices radicales. Aunque atribuyeron estos resultados a la posibilidad de que microfilamentos y microtúbulos fueran blancos importantes en la toxicidad por Al en plantas, no brindaron elementos contundentes en este sentido (Bayley *et al.*, 1994).

En ese mismo año se informó que el Al incrementa la rigidez de la red de actina, por la formación de complejos Al-ATP o Al-ADP, lo cuales son más estables que los correspondientes complejos formados con el ión  $Mg^{2+}$ . Esto soporta la hipótesis que plantea que el Al desplaza al magnesio en los complejos con nucleótidos di o trifosfatos. (Grabski y Schindler, 1995).

Una posible interacción entre el Al y el fosfoinositol piruvato ( $PIP_2$ ) fue sugerida por Darnowski *et al.* (1996), la cual es capaz de romper los componentes de actina del citoesqueleto y otros autores han reportado que el Al inhibe la actividad de la fosfolipasa C. Ambos componentes pertenecen a la vía de transducción de la señal del inositol trifosfato, que como fue discutido por Kochian (1995), también está relacionada con el efecto del Al sobre el citoesqueleto.

Recientemente se ha demostrado que la orientación de los microtúbulos guarda una estrechamente relación con la expansión observada en las células radicales, sugiriendo que muy bajos niveles de Al en el citoplasma pueden romper toda la estructura de ensamble y desensamble de microtúbulos, lo que ocasiona un mal funcionamiento celular (Matsumoto, 2002).

Por otra parte Schwarzerová *et al.* (2002) informó un efecto similar en el citoesqueleto microtubular de suspensiones celulares de dos líneas de tabaco, donde una exposición prolongada al Al, resultó en una desorientación de estos elementos. En este caso los cambios observados estuvieron precedidos por una disminución en la viabilidad celular y un incremento en los niveles de  $\alpha$ -tubulina, hallazgos que permitieron concluir que el citoesqueleto microtubular es un sitio clave ante la toxicidad por Al. No obstante, según Zheng y Yang (2005) otras evidencias más convincentes deben obtenerse al respecto.

#### **2.6.6. Cambios en las propiedades de las membranas celulares**

La membrana plasmática constituye la primera barrera a la entrada del Al (Takabatake y Shimmen, 1997) y su efecto primario en la permeabilidad de la misma puede aparecer solo después de pocos minutos de exposición (Miller *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Esto está determinado por la capacidad que presenta el ión  $Al^{3+}$  para unirse a grupos carboxilos y fosfatos de la membrana plasmática respectivamente (Pietraszewska, 2001; Vitorello y Haug, 1999).

En un estudio realizado en raíces de cebada expuestas al Al, la cantidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a la fracción de la membrana disminuyó, sugiriendo que este constituyente pudo haber sido reemplazado por los iones  $\text{Al}^{3+}$  (Matsumoto, 2000).

En condiciones similares el mismo autor observó un incremento en la permeabilidad de la membrana a los no electrolitos y una disminución en la de los lípidos, evidenciando que el Al provoca alteraciones en la arquitectura de la membrana y en el funcionamiento de la misma, ya sea por reducción en la fluidez lipídica o por incremento en la densidad de empaquetamiento ante la presencia del ión (Nichol y Oliveira, 1995).

Se plantea en la literatura que otro posible efecto del Al puede estar relacionado con la formación de una capa de iones cargada positivamente, al unirse el Al con los fosfolípidos de membrana, lo cual puede retardar el movimiento de cationes e incrementar el de aniones a través de la membrana en proporción con sus cargas (Matsumoto, 2000).

En un experimento desarrollado en raíces de trigo (Olivetti *et al.*, 1995), se observó una despolarización máxima del potencial de membrana de 150 mV, en un cultivar tolerante ante  $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , sin embargo en el cultivar sensible la despolarización fue leve, lo que puede estar relacionado con los mecanismos de tolerancia que posee el primero.

Por otra parte, en células radicales de calabaza (*Cucurbita pepo*) tratadas con  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{AlCl}_3$ , se observó una reducción del potencial de superficie y de la actividad  $\text{H}^+$ -ATPasa. Ambos experimentos permitieron concluir que los cambios en la concentración de los iones, ya sea cerca o alrededor de las proteínas transportadoras o canales, puede alterar el movimiento de iones a través de la membrana (Ahn *et al.*, 2001)

El calcio actúa como mensajero secundario en la transducción de diferentes señales desde el medio exterior que rodea la célula a elementos del metabolismo de la misma. Este macronutriente entra a la célula a través de canales situados en la membrana plasmática y es transportado al exterior mediante una ATP-asa de Ca (Taiz y Zeiger, 2006). La distorsión de los niveles de calcio puede explicar muchos síntomas observados por toxicidad del Al (Ma *et al.*, 2002), ya que el calcio está implicado en diferentes procesos celulares.

Se ha comprobado que el Al altera la homeostasis del calcio bloqueando los canales desde el exterior de las células, no obstante, una vez que el ión  $\text{Al}^{3+}$  se encuentra en el citoplasma es capaz de bloquear estos mismos canales internamente (Ma *et al.*, 2002).

En células de tabaco tratadas con Al, se apreció una disminución de la concentración del calcio citosólico (Jones *et al.*, 1998), sin embargo, en células radiculares de *Secale cereale*, se ha visto un efecto contrario y además se incrementan con las concentraciones crecientes del metal (Ma *et al.*, 2002). En esta misma investigación las concentraciones de calcio eran mayores en plantas intactas que en protoplastos, lo cual podría deberse a una interacción de diferentes especies catiónicas de Al con la pared celular. Una relación similar había sido señalada por otros autores en plantas de trigo (Zhang y Rengel, 1999). De cualquier manera, el aumento o la disminución del calcio citosólico podría alterar los procesos metabólicos dependientes de calcio, los cuales están directa o indirectamente relacionados con la regulación de la división y el alargamiento celular (Delhaize y Ryan, 1995).

#### **2.6.6.1. Bomba protónica del tonoplasto**

Contrariamente a lo que sucede en la membrana plasmática, en el tonoplasto se incrementan las bombas de  $\text{H}^+$  dependientes de  $\text{PPi}$  y  $\text{ATP}$  cuando las plantas son tratadas con Al, resultado que fue revisado por Matsumoto (2000) en raíces de cebada.

Anterior a esta revisión, Lindberg y Strid (1997) midieron la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$  en el citosol de células radicales de trigo sometidas a  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  y observaron un incremento de la concentración de  $\text{H}^+$ , tanto en cultivares sensibles como tolerantes, pero solo en estos últimos los niveles retornaron a los valores iniciales.

En este contexto la inducción de bombas de  $\text{H}^+$  en el tonoplasto puede ser una respuesta adaptativa de las plantas al estrés por Al, relacionada con el papel de la vacuola en el almacenamiento de  $\text{H}^+$  y  $\text{Al}^{3+}$ , el cual puede ser transferido a ella, a través de la reacción de intercambio  $\text{Al}/\text{H}^+$  (Mariendfeld *et al.*, 1995; Barceló y Postchenrieder, 2002)

#### **2.6.6.2. Producción de radicales libres de oxígeno**

La interferencia del ión  $\text{Al}^{3+}$  con los lípidos de membrana puede generar la producción de radicales libre del oxígeno altamente tóxicos (Matsumoto, 2000), siendo este el principal

elemento que soporta la afirmación de que la membrana plasmática puede ser uno de los blancos de acción de este metal.

Hace más de una década un grupo de investigadores observó que en ápices radicales de soya, solo se observaba peroxidación lipídica cuando el tratamiento con Al fue prolongado, detectando además una estrecha relación entre este fenómeno y la inhibición del alargamiento radical, aspectos que le permitieron concluir que la producción de radicales libres de oxígeno no es más que una consecuencia del efecto primario del Al en la estructura de la membrana (Horst *et al.*, 1999)

Este fenómeno siempre estuvo relacionado con la toxicidad por Fe hasta que se demostró que en plantas de tabaco (Yamamoto *et al.*, 2002), el Al por si solo era capaz de inducir producción de especies activas del oxígeno, inhibiendo además la respiración. Estos aspectos estuvieron correlacionados con la inhibición del crecimiento celular y el alargamiento radical.

Boscolo *et al.* (2003) hallaron evidencias de que la actividad peroxidasa y superóxido dismutasa son inducidas en líneas de maíz sensibles al Al, después de 48 horas de tratamiento con  $36 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Al}^{3+}$ , no así en líneas tolerantes, lo que le permitió concluir que la producción de especies activas del oxígeno, no es la causa primaria de la inhibición del crecimiento radical.

Aunque se desconocen las bases moleculares, es evidente que existe una relación entre la toxicidad por Al y el estrés oxidativo (Yamamoto *et al.*, 2001) y que el exceso de metales pesados puede estimular la formación de radicales libre y especies activas del oxígeno, causando peroxidación lipídica, inactivación de enzimas y daños severos en las membranas celulares (Yeh *et al.*, 2007).

## **2.7. Las MAP quinasas**

Las proteínas de fosforilación juegan un papel esencial en la regulación de la respuesta de las plantas ante diversas situaciones de estrés. Entre éstas se encuentran las proteínas quinasas activadas por mitogen (MAP quinasas), cuya cascada de señalización es esencial en los procesos de transducción de la señal, ante un estímulo externo (Pearson *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2003).



Las MAP quinasas emplean diversas vías de transducción de la señal para regular distintas funciones celulares en respuesta a diferentes estímulos extracelulares. Estas realizan su función como parte de una cascada de proteínas quinasas, compuestas por MAPK, MAPKK y MAPKKK. Esta última activa la anterior por fosforilación de una treonina conservada o residuos de serina y subsecuentemente MAPKK activa las MAPK por fosforilación de una tirosina altamente conservada o residuos de treonina, traduciendo la información en forma de una cascada de fosforilaciones desde estas proteínas hasta los blancos de acción.

La cascada de MAP quinasas es una de las principales vías por la cual los estímulos extracelulares se traducen en respuestas intracelulares y representan un mecanismo de señalización conservado evolutivamente en células eucariotas (Tena *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000).

La activación de las mismas facilita su traslocación hasta el núcleo donde pueden fosforilar y activar factores de transcripción, modulando la expresión genética en respuesta al estrés (Jonak *et al.*, 2004).

### **2.7.1. Las MAP quinasas en las plantas**

Las MAP quinasas en las plantas fueron descubiertas por su capacidad de fosforilar proteínas asociadas a microtúbulos del citoesqueleto, las que se nombraron proteínas quinasas MAP2 (Ligterink, 2000). Esta proteína resultó ser idéntica a la proteína de 42 kD, previamente identificada como tirosina fosforilada ante una estimulación de células mitogénicas, por lo que la proteína MAP2 fue entonces renombrada proteína quinasa activada por mitogen (MAPK). Como el gen clonado tenía una alta homología con las proteínas quinasas FUS3 y KSS1, aisladas previamente en levaduras ante la presencia de otros estímulos (Courchesne *et al.*, 1989), entonces esta familia de proteínas quinasas no fue solo activada por mitogen, por lo que fueron nombradas proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) (Boulton *et al.*, 1990). MAPK y ERK son a menudo intercambiables, pero las ERK no son más que un grupo particular de isoformas dentro de la familia de la MAPK (Seger y Krebs, 1995).

Han sido aisladas 23 cadenas cADN de MAP quinasas, entre éstas, 9 en arábidoopsis, 5 en tabaco y 4 genes en alfalfa y genes simples de chícharo, perejil, petunia, avena y trigo

(Ligterink, 2000).

La familia completa de las MAP quinasas incluyendo las de levaduras, animales y plantas pueden ser divididas en tres grupos: proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK), proteínas quinasas reguladas por una señal extracelular (ERK) y las proteínas quinasas activadas por mitogen (MAPK).

Los miembros de la cascada de MAP quinasas de animales y hongos se encuentran en cualquiera de los subgrupos, sin embargo todas las aisladas en plantas se encuentran en la subfamilia de las ERK.

Evidencias experimentales de diferentes especies de plantas indican que varias vías de MAP quinasas pueden ser activadas en respuesta a cambios ambientales, hormonales y durante la división celular (Tena *et al.*, 2001; Jonak *et al.*, 2004).

La primera evidencia del papel de las proteínas de fosforilación en la regulación del ciclo celular de las plantas fue el hecho de que inhibidores de proteínas quinasas bloquearan la entrada en mitosis y desensamblaran la banda de profase (Katsuta y Shibaoka, 1992).

Posteriormente se comprobó que el tratamiento con un inhibidor de proteínas quinasas, podía prolongar la metafase (Wolniak y Larsen, 1995).

Según lo planteado por Wilson *et al.* (1998), las células de tabaco cultivadas en suspensión fueron detenidas en G1 en ausencia de fosfato y después de readicionar este compuesto, las células entraron nuevamente al ciclo celular y una MAP quinasa fue activada rápidamente durante este proceso. Como la activación ocurrió previa a la entrada de la célula en la fase S, los investigadores sugirieron que podía tener una función en la reactivación del ciclo celular. Esto sin embargo no ofreció pruebas contundentes sobre el papel de las MAP quinasas en el ciclo celular.

Posteriormente se estudió una MAP quinasa (MMK3) en Alfalfa y sus homólogos en tabaco NtF6 (Bogre *et al.*, 1999, Calderini *et al.*, 1998). Se encontró que los niveles de activación fluctuaron en dependencia del ciclo celular y las MAP quinasas fueron exclusivamente activadas en ana y telofase, desestabilizando los microtúbulos y bloqueando su activación en anafase. Durante la mitosis fueron localizadas en el fragmoplasto en anafase tardía y durante la telofase permanecieron localizados en el plato celular. Estos resultados fueron contundentes para sugerir que estas proteínas quinasas tenían una función en la citocinesis, aunque sus blancos son aún desconocidos.

En la actualidad se ha comprobado que también están relacionadas con la señal de transducción de las plantas en respuesta a patógenos (Tena *et al.*, 2001), sequía, salinidad, frío, inundación (Zhang *et al.*, 1997), estímulos hormonales (Jonak *et al.*, 2004) y a la toxicidad por algunos metales pesados (Ligterink, 2000, Sivaguru *et al.*, 2003)

### **2.7.2. Las MAP quinasas activadas por metales pesados**

Aunque los mecanismos moleculares de transducción de la señal activados por los metales pesados han sido ampliamente abordados en dicotiledóneas (Mittler, 2002; Moon *et al.*, 2003; Xiong y Yang, 2003; Mittler, 2004), en el arroz como planta modelo en monocotiledóneas, no está bien establecido el papel y la función de las MAP quinasas.

La primera MAP quinasa aislada en arroz, en el cultivar IR36, fue BWMK1 y en este estudio inicial se comprobó que fue inducida ante el ataque de un patógeno (*Magnaporthe grisea*) y por inundación mecánica (Huang *et al.*, 2002).

Después de esta primera evidencia de la existencia de éstas proteínas relacionada con los mecanismos de defensa en esta especie, se han estado identificando y caracterizando nuevas MAP quinasas, para lo cual se han estudiado diferentes estresores como, ácido jasmónico, ácido salicílico, ácido abscísico, etileno, peróxido de hidrógeno, elevadas concentraciones de sal y azúcar, sequía, temperaturas altas y bajas, dióxido de azufre y algunos metales pesados entre otros (Ligterink, 2000).

Con relación a éstos últimos, Jonak *et al.* (2004), observó la activación de MAP quinasas en plantas de alfalfa tratadas con cobre y cadmio. Y recientemente se demostró que además de estos metales, el hierro, el zinc y el níquel desencadenan vías de señalización donde participan estas proteínas, como parte del proceso de transducción de la señal, en las células radicales de la planta arroz (Yeh *et al.* 2003, 2004; Lin *et al.* 2005; Tsai y Huang, 2006).

Para que se desencadene la vía de señalización de las MAP quinasas, es necesaria la unión del Al o de otro ligando inducido por él, a los receptores de quinasas localizados en la membrana plasmática (Taiz y Zeiger, 2006). Estos receptores son proteínas transmembrana que perciben el estímulo en su dominio extracelular y transmiten la señal a través de su dominio citoplasmático (Morris y Walker, 2003)

Más de 600 receptores de este tipo han sido identificados en *Arabidopsis thaliana* y recientes estudios sugieren que se pueden ubicar dentro del reino de las plantas (Verica *et al.*, 2003; Shiu *et al.*, 2004).

El papel funcional de estos receptores aún no está bien definido. No obstante, los investigadores le han asignado a algunos de estos receptores celulares, funciones de señalización específicas en el control del desarrollo (Jinn *et al.*, 2000), la regulación de la reproducción (Takasaki *et al.*, 2000) y la nodulación (Nishimura *et al.*, 2002).

Los receptores de quinasas asociados a la pared celular representan una subfamilia de receptores de quinasas y son excelentes candidatos para moléculas señalizadoras, ya que comunican directamente la pared celular con el citoplasma (Kohorn, 2000; Verica *et al.*, 2003).

Recientes estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* han abordado su relación con el alargamiento celular, la morfogénesis (Lally *et al.*, 2001) y con la respuesta a diferentes estreses, entre los que se encuentran, la inundación, el ataque de patógenos (He *et al.*, 1998) y niveles tóxicos de ácido salicílico (Verica *et al.*, 2003) y AI (Sivaguru *et al.*, 2003)

## **2.8. La planta de arroz y su cultivo**

El arroz es originario del sureste de Asia, específicamente de la India Oriental, donde se cultiva desde tiempos inmemoriales. En América se conoce desde 1591, cuando fue traído por los conquistadores españoles. Actualmente se siembra en todo el mundo y en algunos países, constituye la base alimenticia de la población (Morita y Nemoto, 1995).

Hay dos especies cultivadas de arroz, una de origen asiático, *Oryza sativa* L. y la otra de origen africano, *Oryza glaberrima* Stend, pero la expansión del cultivo se debe a *O. sativa*, puesto que *O. glaberrima* sólo existe en el oeste de África (Hoshikawa, 1993).

*Oryza sativa* pertenece a las angiospermas, monocotiledóneas de la familia Poaceae. Es una gramínea anual, de tallos cilíndricos y huecos, compuestos de nudos y entrenudos. Sus hojas son alternas, envainadoras, con el limbo lineal, agudo, largo y plano. En el punto de reunión de la vaina y el limbo se encuentra una lígula membranosa, bífida y erguida que presenta en el borde inferior una serie de cirros largos y sedosos. El tamaño de la planta varía de 0,4 m hasta 0,7 m (Infoagro.com., 2003).

Las raíces son delgadas, fibrosas y fasciculadas y sus flores son de color verde blanquecino, están dispuestas en espiguillas cuyo conjunto constituye una panoja grande y terminal. Son estrechas y colgantes después de la floración y se encuentran organizadas en una inflorescencia en forma de panícula que se localiza sobre el vástago terminal. El grano de arroz es el ovario maduro (Infoagro.com., 2003).

El arroz se cultiva en una gran diversidad de condiciones ambientales ya que crece en un amplio rango de condiciones, que van desde los 45° de latitud norte hasta 40° al sur del Ecuador. También se afirma que el arroz se puede cultivar desde el nivel medio del mar hasta los 2500 m de altitud, lo cual permite que en las áreas arroceras, la temperatura y la longitud del día, al igual que las condiciones de disponibilidad de agua sean muy diversas (Infoagro.com., 2003).

El pH óptimo en el suelo para el cultivo del arroz es 6.6. No obstante, su cultivo está difundido en suelos grises, rojos, negros y lateríticos. La principal exigencia de los mismos es el alto contenido de materia orgánica y elevada capacidad de retención de agua, por lo que los más adecuados para el cultivo del arroz son los suelos arcillosos, no siendo prácticos los arenosos y los pantanosos (Infoagro.com., 2003).

Después del trigo, el arroz es el cereal más cultivado en el mundo y el principal sustento de gran parte de la población asiática y en América Latina, Brasil es el principal consumidor, con 47 kilos por habitante al año (Infoagro.com., 2003).

En Cuba se consumen alrededor de 150 000 toneladas anuales de arroz y solo el 25% es producido en la isla. La actual crisis mundial ha llamado a sustituir las importaciones de este cultivo, por lo que se genera actualmente un intensivo en la producción arroceras nacional, la cual está sustentada en cultivares obtenidas por los programas de mejoramiento genético. Entre los cultivares más recientemente introducidos se encuentran INCA LP-5 e INCA-LP7 y esta última constituye el 10% del sector no especializado y alrededor del 30 % del sector especializado por sus potencialidades de rendimiento, su resistencia a enfermedades y su tolerancia a condiciones adversas del medio, como la salinidad (Cuba. MINAGRI, 2009),

### **2.8.1. Morfología radical**

Las raíces de las plantas de arroz además de ser el soporte mecánico para la mayoría de ellas, posibilitan la incorporación del agua y los nutrientes, permitiéndoles crecer en un medio hostil y competitivo, donde los suplementos son limitados y variables (Bernasconi *et al.*, 1996).

La planta de arroz se caracteriza por tener un sistema radical compacto y superficial, probablemente porque crece en condiciones de inundación (Morita y Nemoto, 1995). No obstante, su estructura es similar a otras gramíneas, ya que la planta emite raíces seminales, nodales y laterales (Esau, 1965, Kawata *et al.*, 1979,).

La raíz seminal es la primera emergencia en la germinación de la semilla y solo se desarrolla una, que surge a partir del meristemo caulinar y emerge como una radícula durante la embriogénesis (Hoshikawa, 1993)

El embrión absorbe agua continuamente lo cual permite que cada célula crezca rápidamente. De esta forma se incrementa la presión en el interior del embrión, lo cual causa rompimiento de la parte basal de la coleoriza, por donde comienza a emerger la radícula que en un estadio superior será la raíz seminal.

La formación de esta estructura es extremadamente importante ya que es la responsable de la absorción primaria de nutrientes y agua durante el estadio de plántula, por lo cual es de naturaleza temporal (Hoshikawa, 1993). Generalmente son blancas, con ninguna o pocas ramificaciones y relativamente gruesas; a medida que la planta crece, se alargan, adelgazan y se vuelven flácidas (Esau, 1965)

La morfología e histología de la raíz seminal no difiere de las adventicias. Su diámetro después de la germinación tiende a ser considerablemente grande, en relación con las raíces adventicias que han emergido varios días después, pero posteriormente pasa a ser más fina, aunque existen algunas especies donde las capas corticales y correspondientes al esclerénquima, se hacen estratificadas (Hoshikawa, 1993). A menudo cuando la raíz se desarrolla bajo condiciones ambientales desfavorables, se presenta un engrosamiento secundario de la misma (Taiz y Zeiger, 2006).

A diferencia de la raíz seminal, una planta puede tener numerosas raíces nodales o adventicias para sustituir a la radícula. Se forman a partir de los nudos inferiores del tallo

joven, aproximadamente después de los 4 días de germinadas las semillas y en los primeros estadios de crecimiento son blanquecinas.

Cuando avanzan en su desarrollo se hacen más fuertes y se ramifican abundantemente. Las maduras son fibrosas, con raíces secundarias y pelos radicales (Hoshikawa, 1993). Estas raíces en el arroz, a pesar de tener muchas características comunes con las raíces de otras gramíneas, se distinguen por poseer un aerénquima muy desarrollado, lo cual es característico de las plantas acuáticas (Kono *et al.*, 1987) y ahí su adaptación a suelos inundados.

Actualmente no existe mucha claridad con respecto a la estructura histológica de las raíces adventicias de las plantas. Sin embargo a través de observaciones en tejidos individuales se ha podido comprobar que la estructura interna de las raíces adventicias son muy similares a las raíces descritas, de plantas superiores (Cutter, 1971).

### **2.8.2. Anatomía e histogénesis de las raíces**

La anatomía de las raíces seminales y nodales en la planta de arroz es similar a otros cereales. El meristemo apical está formado por la cofia en posición terminal, la cual está estructurada en varias capas de células paralelas a la superficie de la raíz, las que se diferencian más en la medida en que se alejan hacia el ápice (Cutter, 1971).

A continuación están las células iniciales a partir de las que se desencadenan los procesos de crecimiento y diferenciación y a partir de las cuales se derivan los tejidos que formarán la raíz. Este patrón celular abordado desde la Teoría de los histógenos, parte de tres regiones de iniciación, dermatógeno, periblema y pleroma, las que derivarán en protodermis, meristemo fundamental y procambium. Estos a su vez darán lugar a la epidermis, la corteza y el cilindro vascular, respectivamente, que son los tres sistemas de tejidos principales en una raíz diferenciada (Esau, 1965; Cutter, 1971).

La posición de cada tipo de tejido en la sección transversal de la raíz está muy bien regulada desde el embrión (Hoshikawa, 1993). Este desarrollo embriogénico ordenado hace que en la sección transversal de una raíz seminal de arroz, a nivel de la zona de transición, se puede observar la *protodermis*, como estructura más externa, seguida por el meristemo fundamental y el *procambium* donde se albergan los *vasos conductores* del protoxilema y el protofloema (Esau, 1965).

En este sentido, Morita *et al.* (2008) hace referencia a los términos de epidermis, corteza y cilindro central en el meristemo apical, sin embargo éstos términos son propios de tejidos radicales diferenciados y no de tejidos meristemáticos.

De forma general siempre se ha pensado que el diámetro radical a lo largo del eje principal disminuye hacia el ápice. Sin embargo, se ha comprobado que existe una gran cultivar de formas de desarrollo en este sentido. Algunas se ensanchan desde la parte basal hacia la punta y luego se hacen más finas, otras permanecen con un diámetro casi inalterable en toda su longitud y las que disminuyen gradualmente desde la base hasta el ápice (Kawashima *et al.*, 1973; Kawata y Matsui, 1975).

En las especies en las que el diámetro tiende a cambiar, se mantiene una estrecha relación entre el grosor y la corteza, específicamente con relación al número de capas celulares (Kawata *et al.*, 1980) y el grosor de la estela también varía en respuesta a cambios en el diámetro de la raíz (Kawata y Matsui, 1975; Mori, 1960)

El diámetro de la raíz adventicia se considera una variable importante porque describe cuantitativamente el sistema radical, ya que alguna variación del mismo puede contribuir a otras características, como la longitud y el grado de ramificación de las raíces. Además puede cambiar de acuerdo con la cultivar, el grado de mezcla entre ellas y con las condiciones del suelo (Kawata y Matsui, 1975).



### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Organización y desarrollo Nuclear del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), España y en el Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Para ello se emplearon plántulas de arroz (*Oryza sativa* L) de dos variedades comerciales cubanas.

La variedad Jucarito-104 (J-104), que es empleada como patrón comercial por sus potencialidades en el rendimiento (Díaz y Morejón, 2002). Y la variedad INCA LP- 7, obtenida en el Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, la cual exhibe cierto grado de tolerancia al estrés iónico (González *et al.*, 2002) y constituye actualmente el 10% de la producción de arroz del sector no especializado y el 30% del sector especializado (Cuba. MINAGRI, 2009).

#### **3.2. Condiciones experimentales**

Se desarrolló un experimento en el que se definieron 4 tratamientos, en los cuales el nivel de  $\text{Al}^{3+}$  en el medio de germinación fue de 0 (Control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ), respectivamente. Los mismos, se emplearon teniendo en cuenta que en estudios previos, niveles inferiores a 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  no fueron tóxicos y superiores a 125  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  provocaron daños severos en las plántulas (Alvarez *et al.*, 2005).

Las semillas de arroz se esterilizaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 15 minutos y se lavaron tres veces con agua esterilizada. Las semillas esterilizadas se colocaron en placas de Petri con papel de filtro, el que se humedeció diariamente con 1ml de la solución de  $\text{AlCl}_3$  empleada para la germinación de las semillas, en cada uno de los tratamientos, y con agua, para el control.

Se colocaron 25 semillas en cada placa de Petri, las que se pusieron de forma horizontal en una cámara de crecimiento con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y una temperatura noche/día de 21/26 °C. Las plántulas se evaluaron después de siete días de germinadas las semillas.

Para el estudio de los indicadores morfológicos del crecimiento radical, se tomaron al azar 20 plántulas por placa y para la evaluación de los indicadores celulares de crecimiento, la

localización del Al y el estudio de las MAP quininas, se tomaron al azar 10 plántulas por placa.

### **3.3. Efectos del Al en indicadores morfológicos del crecimiento radical**

Para evaluar el efecto del aluminio en los indicadores morfológicos, se desarrollaron tres réplicas del experimento referido en el epígrafe 3.2. Se muestrearon 20 plántulas por placa y un total de 60 por tratamiento, a las cuales se les tomó el sistema radical completo para realizar las evaluaciones de crecimiento.

#### **3.3.1. Determinación del número de raíces**

Como primer indicador morfológico de crecimiento se determinó el número de raíces adventicias. La determinación se realizó a través del conteo de todas las raíces adventicias emitidas en cada una de las plántulas.

#### **3.3.2. Determinación de la longitud de la radícula**

La longitud de la radícula, se evaluó como otro indicador de crecimiento. Para su determinación se seccionó la radícula del sistema radical y se colocó sobre papel milimetrado y para garantizar una correcta medición se fijó la base de la radícula en cero y se estiró la misma cuidadosamente hasta quedar lineal.

#### **3.3.3. Evaluación del engrosamiento de la radícula**

Las radículas se observaron al estereoscopio para evaluar su morfología externa y posteriormente se procedió a cuantificar el engrosamiento del ápice entre el segundo y el cuarto milímetro. Para ello se determinó el diámetro radicular a nivel del tercer milímetro del ápice radicular.

##### **3.3.3.1. Determinación del diámetro de la radícula**

Las determinaciones se realizaron en la sección transversal de la radícula. Para ello se colocó un micrómetro ocular al microscopio, el cual fue previamente calibrado para realizar las determinaciones de la sección circular de la radícula.

Las secciones transversales de la radícula se obtuvieron mediante el Procesamiento Tradicional para Microscopía Óptica empleado por Sam *et al.* (2003).

### 3.3.3.2. Procesamiento Tradicional para Microscopía Óptica

- *Fijación*

Las muestras recién tomadas de cinco milímetros de longitud se sumergieron en un tubo de Eppendorf (en hielo) con paraformaldehído (PFA) al 4% y se sometieron a un minuto de vacío, para facilitar la penetración del fijador en la muestra. Luego se mantuvieron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron tres veces durante 10 minutos, en tampón fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 5,5 (Panreac). Finalmente se almacenaron en PFA al 1% para evitar que se revertiera la fijación y posteriormente se procedió a deshidratar las muestras.

- *Deshidratación*

El protocolo para la deshidratación de las muestras fue el siguiente:

Etanol 30%	30 minutos a Temperatura Ambiente
Etanol 50%	30 minutos a Temperatura Ambiente
Etanol 70%	Toda la noche
Etanol 90%	60 minutos a Temperatura Ambiente
Etanol 100%	3 cambios de 60 minutos cada uno a Temperatura Ambiente
Etanol 100% / Óxido de Propileno (1:1) (v:v)	5 minutos a Temperatura Ambiente
Óxido de Propileno 100%	3 cambios de 10 minutos cada uno a Temperatura Ambiente

Una vez deshidratadas las muestras se procedió a infiltrar la resina.

- *Infiltración*

La infiltración se realizó de la siguiente forma:

Oxido de Propileno/ Epón (1:1) (v:v)	45 min. en agitación a Temperatura Ambiente
Epón puro	45 min. en agitación a Temperatura Ambiente
Epón puro	Una noche en agitación a 4 °C

Después de la infiltración se retiraron las muestras de la cámara fría y se llevaron a una estufa a 37°C, durante 2 horas, para eliminar la humedad que pudo adquirir la muestra durante la infiltración y evitar así la formación de burbujas en el bloque de inclusión.

- *Inclusión*

Transcurridas 2 horas se retiraron las muestras de los tubos de Eppendorf con un palillo y se colocaron en un molde de goma para bloques planos, asegurando la correcta orientación de las mismas. Una vez que las muestras estaban dentro de los pocillos, estos se rellenaron con la resina pura (Epón). Se introdujo el molde de goma en una estufa a 70°C y se mantuvo allí durante 24 horas, para lograr una correcta polimerización de la resina.

- *Seccionamiento y Tinción*

Los bloques de resina polimerizados se llevaron a una ultramicrotomo (LKB) y con una cuchilla de cristal se le realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor. Estos cortes se recogieron con ayuda de una pinza y se depositaron en un portaobjeto, al cual se le ha añadido previamente una gota de agua. El portaobjeto se pasó a una placa de calentamiento hasta que los cortes se secaron, con el propósito de garantizar una buena adhesión.

Una vez secos los cortes, se procedió a realizar su tinción y para ello se colocó una gota de una solución de azul de toluidina al 0,075% (m/v) encima de los cortes durante un minuto y luego se lavaron con agua destilada. Ya contrastados los cortes se observaron en un microscopio óptico de luz (Zeiss).

### **3.3.4. Evaluación de la deformación del ápice radicular**

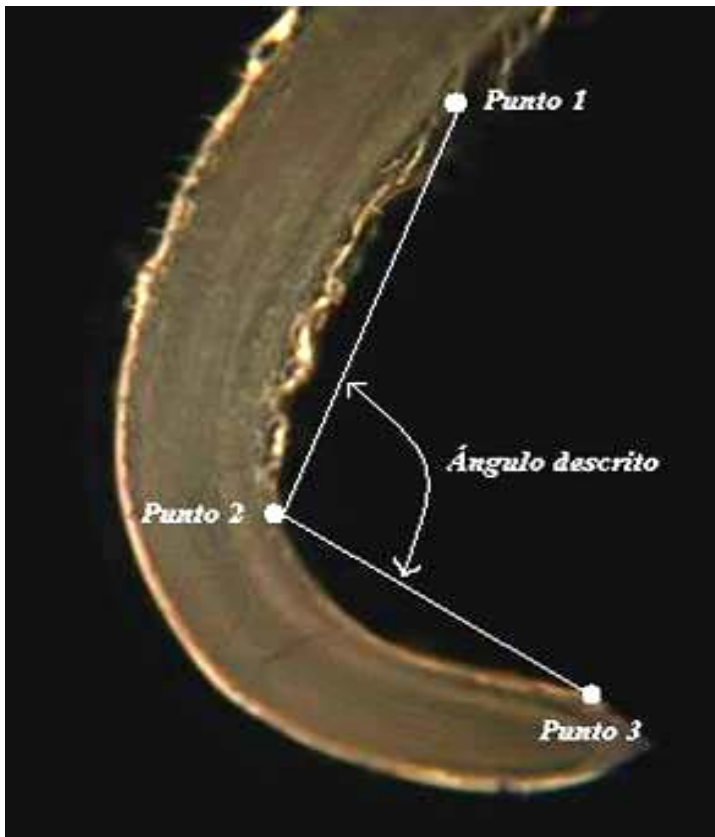
Para evaluar este parámetro se procedió a tomar una sección del ápice radicular de aproximadamente cinco milímetros. Las secciones apicales se colocaron en un portaobjeto con una gota de agua, para evitar su deshidratación. Posteriormente se observaron al estereoscopio y se fotografiaron con una cámara digital (DSC-S85; Sony, Tokyo) acoplada al mismo. Se obtuvieron imágenes digitales con una ampliación de 20x, las que se emplearon para determinar el cálculo del ángulo de curvatura de la radícula.

#### **3.3.4.1. Determinación del ángulo de curvatura radicular**

Las imágenes digitales de los ápices radiculares se exportaron al Programa Morfométrico ImageJ, por las posibilidades que brinda para cuantificar variables morfológicas.

Para determinar el ángulo de curvatura se procedió de la manera siguiente. Una vez

abierta una copia de la imagen de la radícula se seleccionó el instrumento “ángulo” que posee el programa en su barra de herramientas. Posteriormente se procedió a describir el ángulo a calcular, siempre por el lado cóncavo de la raíz (figura 1). Para ello se marcaron con un “clic” tres puntos sobre la imagen. El primero (Punto 1) en el borde de la radícula a 4 milímetros del ápice, el segundo (Punto 2) en el punto más interno de la curvatura y el tercero (Punto 3) donde la tangente trazada desde el punto anterior, toca el borde interno del ápice. Después de marcado el último punto, el programa muestra el valor del ángulo descrito. Los valores obtenidos de cada medición (60 mediciones por tratamiento) se analizaron estadísticamente.



**Figura 1:** Imagen digital del ápice radicular de una plántula de arroz, donde se representa el procedimiento seguido para determinar el ángulo de curvatura radicular, mediante el empleo del Programa Morfométrico ImageJ. 20x

### **3.4. Estudio de indicadores celulares de crecimiento ante la toxicidad por AI**

Los indicadores celulares de crecimiento fueron evaluados en tres réplicas del experimento referido en el epígrafe 3.2. El muestreo se realizó mediante la toma de la radícula de 10 plántulas por placa y un total de 30 plántulas por tratamiento.

Para nombrar el color resultante de la tinción con Azul de toluidina y con Orceína se empleó una escala de colores (Gotomy Color, 2009).

### **3.4.1. Evaluación de los cambios provocados por el AI en la pared celular**

Las paredes de células epidérmicas y corticales de las secciones longitudinales del ápice radicular de las plántulas expuestas a los diferentes niveles de AI, se observaron al microscopio óptico, con una ampliación de 100x.

Para la obtención de estas secciones semifinas se utilizó el procesamiento a bajas temperaturas empleado por Coronado *et al.* (2007), el que permitió una mayor resolución de la estructura celular.

#### **3.4.1.1. Procesamiento de muestras a bajas temperaturas**

Se utilizó la resina hidrofílica Lowicryl K<sub>4</sub>M, que polimeriza a -30°C, por lo cual la deshidratación se realizó con una disminución progresiva de la temperatura para lograr una correcta polimerización de esta resina. La infiltración y polimerización se llevó a cabo en un Sistema Refrigerado de Sustitución Automática (Leica, Viena).

- *Fijación*

La fijación se realizó como se describe en el epígrafe 3.3.3.2.

- ***Deshidratación a bajas temperaturas***

En este paso radica la diferencia fundamental con el Procesamiento Tradicional para Microscopía Óptica empleado por Sam *et al.* (2003).

Desde el comienzo de las deshidrataciones las muestras se depositaron en cápsulas. Se realizaron tres deshidrataciones a 0, -15 y -30°C durante 30 minutos cada una y los cambios fueron de 6 minutos a una temperatura de -150°C. Después de las deshidrataciones se procedió a infiltrar con la resina.

- *Infiltración en Lowicryl*

En este caso las muestras se infiltraron directamente en la resina Lowicryl K<sub>4</sub>M, en su estado líquido. No fue necesaria la presencia de un compuesto intermedio, porque la propia resina es compatible con el alcohol del interior de la muestra, procedente de las deshidrataciones.

- *Inclusión y polimerización*

Para la inclusión se empleó Lowicryl recién preparado, lo que garantizó una buena polimerización. Se utilizaron cápsulas de gelatina (Poliscience) de 0,5 mm de diámetro,

que se introdujeron en un contenedor dentro del equipo y en cada una de las cápsulas se añadieron dos gotas de Lowycril, para evitar la formación de burbujas. Entonces las cápsulas perforadas donde estaban las muestras se introdujeron en éstas. Así quedaron las perforadas dentro de las otras cápsulas tapadas herméticamente. Como la reacción es exotérmica, se dejaron en un recipiente con 15 mL de etanol. Cuando terminó la encapsulación se comenzó la polimerización con luz ultravioleta (Tubo: TWGW (Phylips, Bélgica)).

- *Seccionamiento y tinción*

Los bloques de resina ya polimerizados se llevaron al ultramicrotomo LKB y con una cuchilla de cristal, se le realizaron cortes semifinos de cinco micras de espesor. Estos cortes se recogieron con ayuda de una pinza y se depositaron en un portaobjeto, al cual se le había añadido previamente una gota de agua. El portaobjeto se pasó a una placa de calentamiento hasta que los cortes se secaron, con el propósito de garantizar una buena adhesión.

Luego se procedió a realizar su tinción para obtener posteriormente un mayor contraste. Para ello se colocó una gota de una solución de azul de toluidina al 0,075% (m/v) encima de los cortes durante un minuto y luego se lavaron con agua destilada. Ya contrastados se observaron en un microscopio óptico de luz (Zeiss).

### **3.4.2. Localización *in vivo* de calosa inducida por Al**

Las secciones transversales y longitudinales de 30 micras se obtuvieron en fresco en un micrótopo de vibración y se colocaron en un portaobjetos multipocillos recubiertos con una membrana de aminopropil trietoxisilano (APES) (Sigma, St Louis, MO/USA).

Posteriormente se lavaron con tampón fosfato  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 5,5 (Panreac), durante 10 minutos y se incubaron con una solución de Azul de anilina 0,05% (m/v) en fosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{PO}_4$ )  $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 8-9, durante 30 minutos. Luego se lavaron dos veces con agua destilada durante cinco minutos.

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioscope, Jena Germany) con un aumento de 100x y una iluminación ultravioleta, empleando un filtro de 395 nm que permite observar la emisión del complejo calosa-azul de anilina. Las

imágenes fueron tomadas por una cámara digital (DSC-S85; Sony, Tokyo) acoplada al microscopio.

### **3.4.3. Evaluación del efecto del AI en la orientación del crecimiento celular**

Para evaluar la contribución del alargamiento celular en el crecimiento de la raíz, se procedió a determinar el largo y ancho de las células del meristemo fundamental en cada uno de los tratamientos.

Primeramente, con un aumento de 10x y con ayuda de un micrómetro ocular, se localizó el área correspondiente a la zona de transición en la sección longitudinal del ápice, según Ciamporová (2002), la que se encuentra entre el segundo y el cuarto milímetro. Posteriormente se obtuvieron imágenes digitales de las células del meristemo fundamental de esta zona, con una ampliación de 1000x.

Las imágenes digitales se exportaron al Programa Morfométrico ImageJ, donde se utilizó el instrumento de “medición lineal”. El largo de las células corticales se determinó en todos los casos, de forma paralela al borde de la radícula y para el grosor celular de forma perpendicular, siempre por el centro de las células, lo que permitió homogenizar las mediciones. Se tomaron tantas imágenes como fue necesario para medir 200 células por tratamiento.

### **3.4.4. Evaluación del efecto del AI en el proceso de división celular**

Se cuantificó el índice de proliferación celular a través del cálculo del índice mitótico y para ello se empleó la técnica de tinción con orceína acético-clorhídrica según Matos y Molina (1997).

#### **3.4.4.1 Determinación del índice mitótico**

Los ápices radiculares de las plántulas muestreadas se seccionaron a cinco milímetros de longitud aproximadamente y se colocaron en un vial con una mezcla etanol-acética (3:1) durante 24 horas. Una vez fijadas las raíces, se pasaron a un vidrio reloj de cinco centímetros de diámetro, que contenía orceína en cantidad suficiente para cubrirlas. El vidrio reloj se llevó a la llama de un mechero de alcohol, mediante el empleo de una pinza



y se calentaron hasta que comenzaron a salir vapores de la orceína, pero sin llegar nunca a ebullición completa.

El protocolo desarrollado por Matos y Molina (1997) en sábila (*Aloe vera* L), indica que se debe realizar este proceso solo una vez para facilitar la entrada del colorante a la raíz. Sin embargo, la consistencia fibrosa de la radícula de arroz, conllevó a una modificación en la técnica, de manera que fueron necesarios tres calentamientos con intervalos de enfriamiento de 10 minutos cada uno, para lograr una adecuada coloración.

Una vez frío el ápice radicular (5 mm), se colocó en un portaobjetos y se seccionó con un bisturí por el segundo milímetro. Se tomaron los dos primeros milímetros y el resto se desechó. Se colocó un cubreobjetos sobre la sección de raíz y se golpeó con un lápiz la preparación, describiendo una espiral desde la periferia hasta la parte central del cubreobjetos y finalmente se aplastó la preparación con el pulgar colocando un papel de filtro sobre la misma. La presión se ejerció perpendicularmente a la preparación para evitar que el cubreobjeto se deslizará.

Los aplastados celulares se observaron con un aumento de 1000x en un microscopio óptico de luz (Zeiss) y se fotografiaron con una cámara digital (DSC-S85; Sony, Tokyo) acoplada al microscopio.

El número de células estadísticamente representativo se estimó de acuerdo a la fórmula

empleada por Matos y Molina (1997): 
$$n = Z^2 \frac{S^2}{e^2}$$
, donde Z tiene un valor de 1,96 según la estadística tabulada de la normal estándar y  $S^2$ , que significa la varianza muestral, es de 13,66. El error del muestreo ( $e^2$ ) es de 0,25. De acuerdo a esta fórmula, 1462 células por tratamiento es el valor mínimo de células que se deben analizar para obtener resultados confiables y se evaluaron tantos campos como fue necesario para contar 2000 células por tratamiento. Teniendo en cuenta que dentro de cada campo se contaron las células que se encontraban en mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) y en interfase.

Los cálculos del índice mitótico se realizaron a través de la ecuación utilizada por Matos y Molina (1997).

IM = M x 100/T, donde:

IM: Índice Mitótico,

M: Células en mitosis (profase, metafase, anafase y telofase) y

T: Total de células contadas (Mitosis + Interfase).

### **3.5. Estudio de localización del Al en la radícula**

Se emplearon dos técnicas diferentes, la tinción con hematoxilina, la que permitió estimar el grado de tolerancia de cada una de las variedades estudiadas y la tinción con Morin, la que permitió su ubicación dentro de la célula.

Se realizó el experimento que se describe en el epígrafe 3.2 y se muestreó la radícula de 10 plántulas por placa, para un total de 30 plántulas por tratamiento.

#### **3.5.1. Estimación del grado de tolerancia al Al**

##### **3.5.1.1. Tinción con Hematoxilina**

Las plántulas empleadas para esta evaluación fueron tomadas cuidadosamente de las cámaras y transferidas a una malla suspendida en un beaker con 200ml de agua destilada, de manera que el sistema radical se sumergiera completamente durante 15 minutos para eliminar el aluminio que no fue absorbido.

Posteriormente fueron colocadas en un beaker similar, con solución acuosa de hematoxilina [0,2% de hematoxilina (Merck) y 0,02% de yoduro de potasio (KIO<sub>3</sub>) m/v] en agitación lenta durante 20 minutos según Polle *et al.* (1978).

Después fueron colocadas nuevamente en 200 mL de agua destilada durante 15 minutos.

Una vez lavadas, las radículas se seccionaron a cinco milímetros de la punta y los ápices se fotografiaron con una cámara digital (DSC-S85; Sony, Tokyo) y un aumento de 20x en un estereoscopio (Zeiss).

Para nombrar el color del complejo Al-Hematoxilina en la radícula se empleó una escala de colores (Gotomy Color, 2009).

#### **3.5.2. Localización *in vivo* de Al en el interior de la raíz**

##### **3.5.2.1. Tinción con Morin**

El estudio de la localización *in vivo* de Al se realizó en las secciones longitudinales y transversales a nivel de la zona de transición de la radícula.

Las secciones longitudinales de 30  $\mu\text{m}$  se obtuvieron en fresco en el micrótomo de vibración. Una vez obtenidas las mismas, se colocaron en un portaobjetos multipocillos recubierto con APES (Sigma, St Louis, MO/USA). A continuación se lavaron con tampón fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> a pH 5,5 (Panreac) durante 10 minutos, se incubaron con 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Morin [2, 3, 4, 5, 7- pentahidroxi flavonona (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>)] durante 30 minutos a temperatura ambiente y finalmente se lavaron dos veces con agua destilada durante 10 minutos.

La localización del Al en las secciones transversales de los ápice radiculares se realizó de forma similar, pero en este caso las secciones fueron de 5  $\mu\text{m}$  y se obtuvieron a través del procedimiento descrito en el epígrafe 3.4.1.1.

Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia (Zeiss, Axioscope, Jena Germany) con iluminación visible y para ello se empleó un filtro de 420 nm. Las imágenes se tomaron una cámara digital (DSC-S85; Sony, Tokyo) acoplada al microscopio.

### **3.5.2.2. Evaluación del efecto del Al en la vacuolización celular**

Para evaluar los cambios provocados por el Al en las vacuolas, se procedió a determinar el número y el diámetro de las mismas, en las células del meristemo fundamental en cada uno de los tratamientos.

Primeramente, con un aumento de 10x y con ayuda de un micrómetro ocular, se localizó el área correspondiente a la zona de transición en la sección longitudinal del ápice entre el segundo y el cuarto milímetro. Posteriormente se obtuvieron imágenes digitales de las células del meristemo fundamental de esta zona, con una ampliación de 1000x.

Las imágenes digitales se exportaron al Programa Morfométrico ImageJ, donde se utilizó el instrumento "conteo" para determinar el número de vacuolas por célula. Para evaluar el diámetro de las mismas se empleó el instrumento "medición lineal" y en todos los casos se tomó el diámetro mayor de cada una de ellas, lo que permitió homogenizar las mediciones.

Se tomaron tantas imágenes como fue necesario para medir 200 células por tratamiento.

### **3.6. Efecto del Al en la activación de MAP quinasas**

Para determinar el efecto del aluminio en las MAP quinasas se localizaron las MAP

quinasas totales y las fosforiladas o activas, mediante el empleo de una técnica de inmunofluorescencia que se evaluó al microscopio confocal.

Para el estudio se realizó el experimento descrito en el epígrafe 3.2. Se seleccionaron los ápices radiculares de 10 plántulas por tratamiento, los que se seccionaron longitudinalmente con un grosor de 30  $\mu\text{m}$  en un micrótomo de vibración.

### **3.6.1. Inmunocitoquímica**

Las secciones longitudinales obtenidas en el micrótomo, se colocaron inicialmente sobre una gota de agua en un portaobjetos multipocillo, recubiertos con APES (Sigma, St Louis, MO/USA) y se dejaron secar al aire para garantizar la adhesión de los cortes y evitar su pérdida al retirar las gotas de los diferentes reactivos con la bomba de vacío. Luego se almacenaron a 4 °C hasta el día siguiente.

El procedimiento comenzó con tampón fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,5 (Panreac) durante cinco minutos y para facilitar la penetración del anticuerpo a través de la ruptura de las paredes celulares, las muestras se trataron con celulosa 2% durante 40 minutos y después con albúmina de suero bovino al 5% durante cinco minutos.

Posteriormente se incubaron durante 3 horas a 37 ° C, con los anticuerpos primarios puros, anti-ERK, el que reconoce las MAP quinasas totales y anti-pMAPK, el que solo se une a las MAP quinasas activas o fosforiladas. En los controles se utilizó albúmina de suero bovino al 5%.

Una vez que se incubaron las muestras con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con tampón fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> a pH 7,5 (Panreac), durante cinco minutos cada uno y seguido se incubó durante 45 minutos en cámara húmeda y oscura con el anticuerpo secundario en albúmina de suero bovino al 1%.

En este caso se empleó un Anticuerpo policlonal anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.), conjugado con oro de 10 nm (British Bicell, Cardiff UK). Después se realizaron 3 lavados de cinco minutos nuevamente y las muestras se incubaron con 4,6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) durante cinco minutos, compuesto que reconoce los núcleos celulares. Las secciones se lavaron con agua destilada durante 10 minutos y se montaron con Mowiol.

Las inmunofluorescencias se observaron al microscopio confocal. El mismo consta de un microscopio invertido Axiovert 135 (Zeiss), equipado para epifluorescencia con un objetivo de 63x con apertura numérica de 1,4 y que está acoplado a una cabeza de barrido láser confocal Bio-rad MRC-1000, provista de un láser de argón de 25 mW multilínea con emisión a  $\lambda$  de 488 y 514 nm. La captura de las imágenes se realizó bajo el control de un sistema informático y se utilizó el programa Bio-rad COMOS.

Se tomaron series de secciones de una micra.

### **3.7. Análisis estadísticos**

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los resultados experimentales del número de raíces, la longitud y el diámetro radicular, el ángulo de curvatura, el número y diámetro de las vacuolas, el largo y ancho de las células y el índice mitótico fueron sometidos a un análisis de varianza con arreglo bifactorial, donde los factores fueron las variedades y las concentraciones de Al. En los casos que se encontraron diferencias significativas, se compararon las medias según la Dócima de Tukey, para el 5% de probabilidad del error. Para el análisis estadístico fue utilizado el paquete estadístico STATGRAPHICS *Versión 4.1 en ambiente Windows*

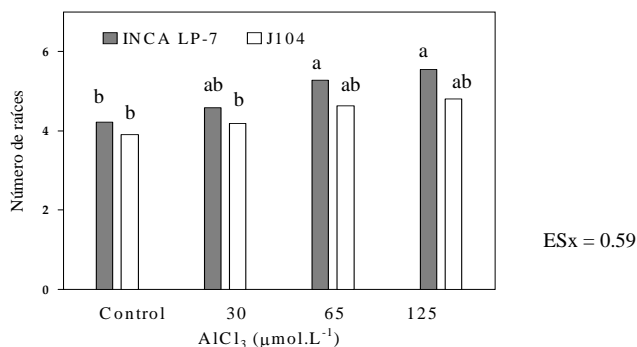
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efectos del Al en indicadores morfológicos del crecimiento radical

Es necesario destacar que no se produjo interacción entre las variedades y las concentraciones de Al para ninguna de las variables estudiadas. No obstante, se pudo constatar que las plántulas de arroz expuestas al metal exhibieron cambios apreciables en la estructura y en el desarrollo de su sistema radical.

Al determinar el número de raíces adventicias en cada plántula se pudo apreciar un incremento del mismo en la medida en que se intensificó la exposición al metal. No obstante las dos variedades exhibieron un comportamiento diferente para este indicador (Figura 2).

Las plántulas de la variedad INCA LP-7 que fueron crecidas con  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  no exhibieron diferencias en cuanto al número de raíces adventicias en relación con las del control. Sin embargo, a partir de  $65 \mu\text{mol.L}^{-1}$  se favoreció la rizogénesis, de manera que las plántulas expuestas a la concentración más tóxica del metal ( $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) emitieron un 32% más de estas raíces que las no tratadas (Figura 2).



**Figura 2:** Desarrollo del sistema radical de plántulas de arroz. Se representa el número de raíces emitidas por plántula, en las variedades INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (control), 30, 65 y  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Las barras indican las medias de 60 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a  $p < 0.05$ .

Sin embargo, este resultado no se puso de manifiesto en la variedad J-104, ya que aunque se observó una tendencia al incremento con las concentraciones del metal, el

número de raíces adventicias emitidas por cada plántula no difirió entre ninguno de los tratamientos (Figura 2).

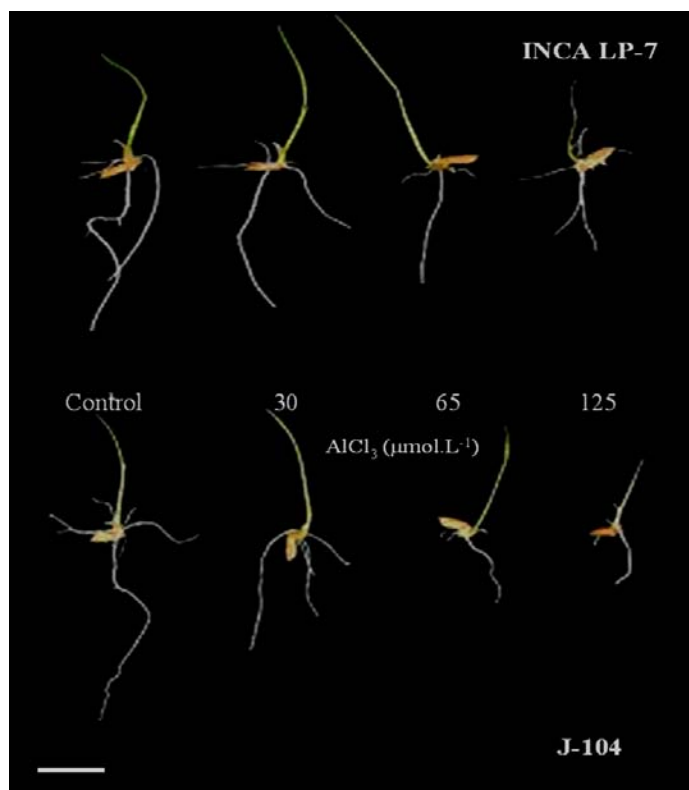
Los hallazgos anteriores evidencian que las plántulas de la variedad INCA LP-7 respondieron mejor ante las condiciones de toxicidad por Al, teniendo en cuenta los cambios observados en la longitud de la radícula en la medida en que se incrementaron las concentraciones del ión. De manera que estas plántulas fueron capaces de emitir un mayor número de raíces adventicias para garantizar la fijación de la planta al suelo y el área para la absorción de agua y nutrientes.

Cuando se determinó el crecimiento en longitud de la radícula se observó un comportamiento inverso al que se pudo apreciar en el indicador anterior (Figura 3). En esta evaluación, las dos variedades respondieron de forma diferente en la medida en que se intensificaron los niveles de exposición al  $Al^{3+}$ .

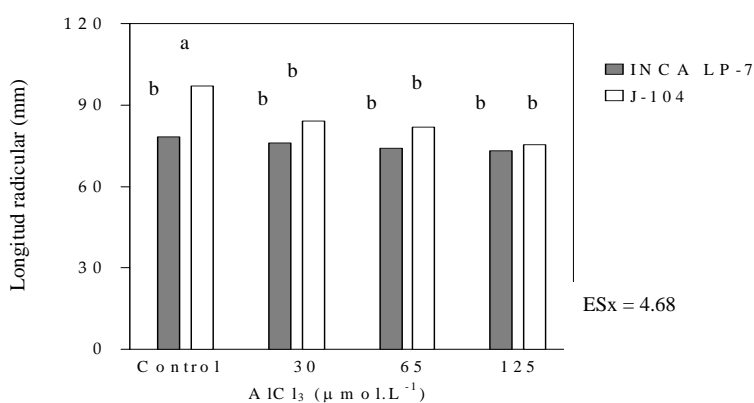
Las plántulas del control en la variedad J-104 exhibieron valores de longitud de la radícula, superiores a las de la INCA LP-7, como se puede apreciar en la Figura 4. Sin embargo, fueron las más afectadas por el ión  $Al^{3+}$ , ya que a  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  se observó una disminución significativa de este indicador en relación con el control. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre las tratadas con 30, 65 y  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , se observó una tendencia a la disminución del mismo con el incremento en los niveles de Al (Figura 4).

Este comportamiento indicó que  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  es suficiente para afectar la longitud radicular en la variedad J-104 y que a partir de esta concentración se mantiene el efecto inhibitorio del Al en el crecimiento de la radícula, de manera tal que en las plántulas expuestas a  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  se observó una reducción del 23% en relación con las plántulas no tratadas.

En la INCA LP-7 la longitud radicular no difirió entre ninguno de los tratamientos, por lo que esta variedad fue capaz de soportar dosis de hasta  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $AlCl_3$ , sin tener afectaciones en la longitud de su radícula (Figura 4).



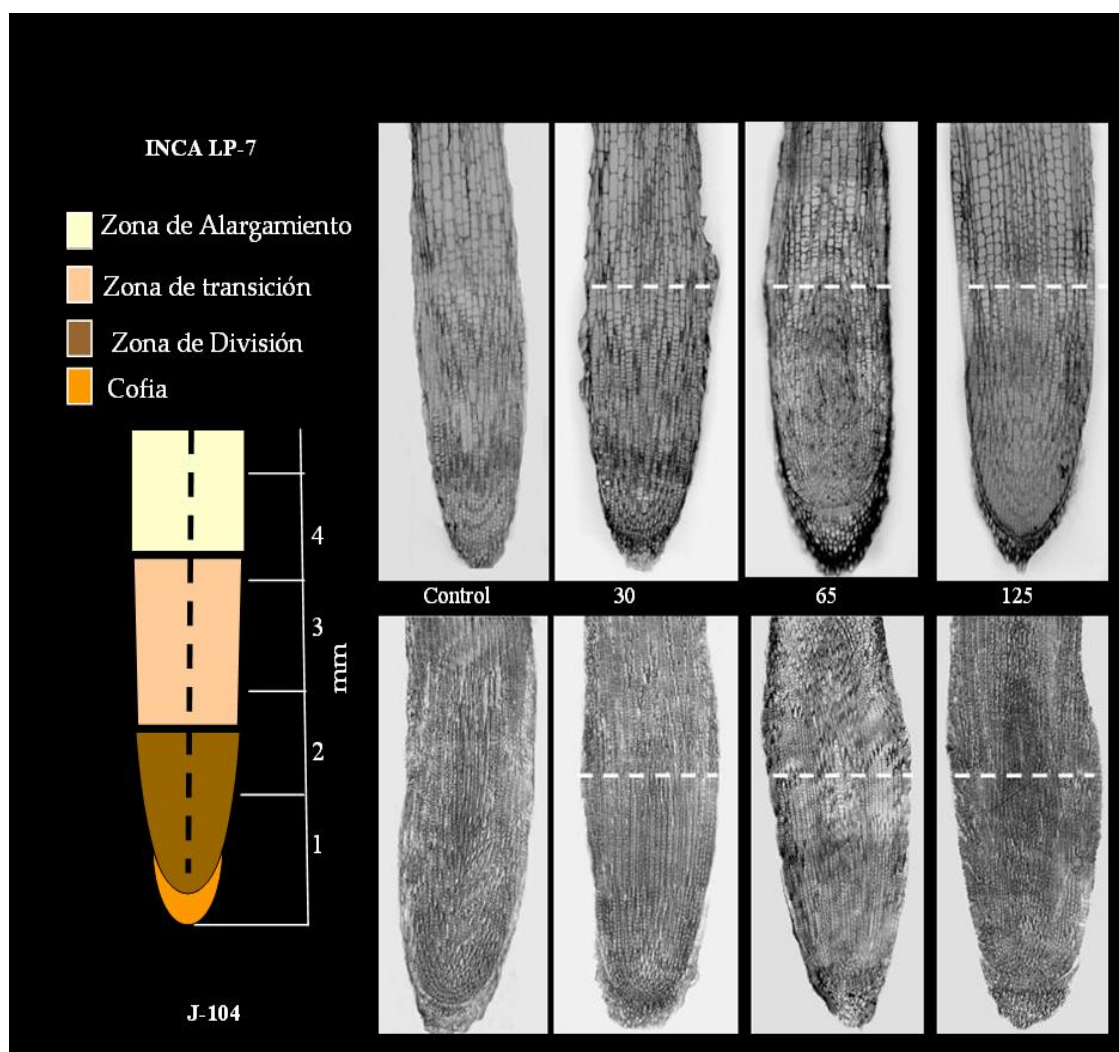
**Figura 3:** Fotografía de plántulas de arroz de las variedades: INCA LP-7 (arriba) y J-104 (abajo), tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Nótese una tendencia a la reducción de la longitud radicular con el incremento de los niveles de Al. La barra representa 5 cm.



**Figura 4:** Crecimiento radicular de plántulas de arroz. Se representa la longitud de la radícula de las plántulas de las variedades INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Las barras indican las medias de 60 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a  $p < 0.05$ .



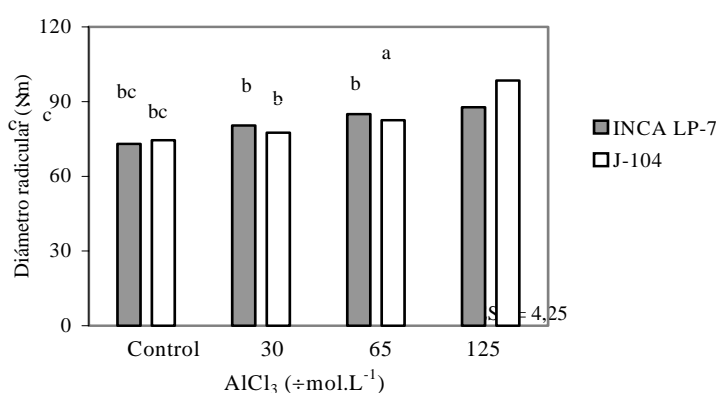
Al evaluar microscópicamente la radícula se detectó un abultamiento entre el segundo y el cuarto milímetro del ápice en las plántulas tratadas con Al, región donde se localiza la zona de transición celular, que no es más que la zona intermedia entre la de división y la de alargamiento, como se representa en el esquema de la Figura 5. También se pudo apreciar que el engrosamiento observado se intensificó con las concentraciones de  $Al^{3+}$  y se hizo más evidente en la variedad J-104.



**Figura 5:** Fotomicrografías de secciones longitudinales de ápices radiculares, correspondientes a plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104, expuestas a 0 (Control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $AlCl_3$  (40x). La línea discontinua de color blanco indica el centro de la zona de transición. A la izquierda, se muestra un esquema del ápice radicular de la plántula de arroz donde se representan las diferentes zonas de crecimiento.

Estos elementos indicaron la necesidad de estudiar la sección transversal del ápice radicular para conocer los daños provocados por el ión  $\text{Al}^{3+}$  en esta zona y determinar la magnitud del engrosamiento observado, como un posible indicador de tolerancia.

El estudio de las secciones semifinas transversales ( $1\mu\text{m}$ ) permitió cuantificar el cambio morfológico observado y evidenció un aumento en el diámetro de la zona de transición de la radícula de las plántulas tratadas con Al (Figura 6). No obstante, las dos variedades exhibieron un comportamiento diferente para este indicador.



**Figura 6:** Crecimiento en grosor del ápice radicular de plántulas de arroz. Se representa el diámetro de las radículas a nivel de la zona de transición en plántulas de las variedades INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Las barras indican las medias de 60 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a  $p < 0.05$ .

Las plántulas de la variedad J-104 que fueron expuestas a 30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , no exhibieron un incremento significativo en el diámetro en relación con el control, mientras que en las tratadas con 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  si se apreciaron diferencias significativas respecto al control y entre ellas (Figura 6). De manera que en las plántulas expuestas a la concentración más tóxica del ión (125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), el diámetro radicular llegó a incrementarse en un 32.21% en relación con las plántulas del control.

En la variedad INCA LP-7, las plántulas expuestas a la menor concentración del ión (30  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no mostraron un comportamiento similar a la J-104, ya que exhibieron un grosor radicular superior al control, sin embargo las plántulas tratadas con 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  aunque difirieron estadísticamente en relación con las no tratadas, no lo hicieron entre

ellas (Figura 6).

Estos resultados indican que la variedad J-104 fue la más afectada en este indicador de crecimiento, ya que la radícula de sus plántulas se engrosó de forma significativa ante concentraciones crecientes del ión, en relación con la INCA LP-7, donde se alcanzó un valor estable del diámetro radicular.

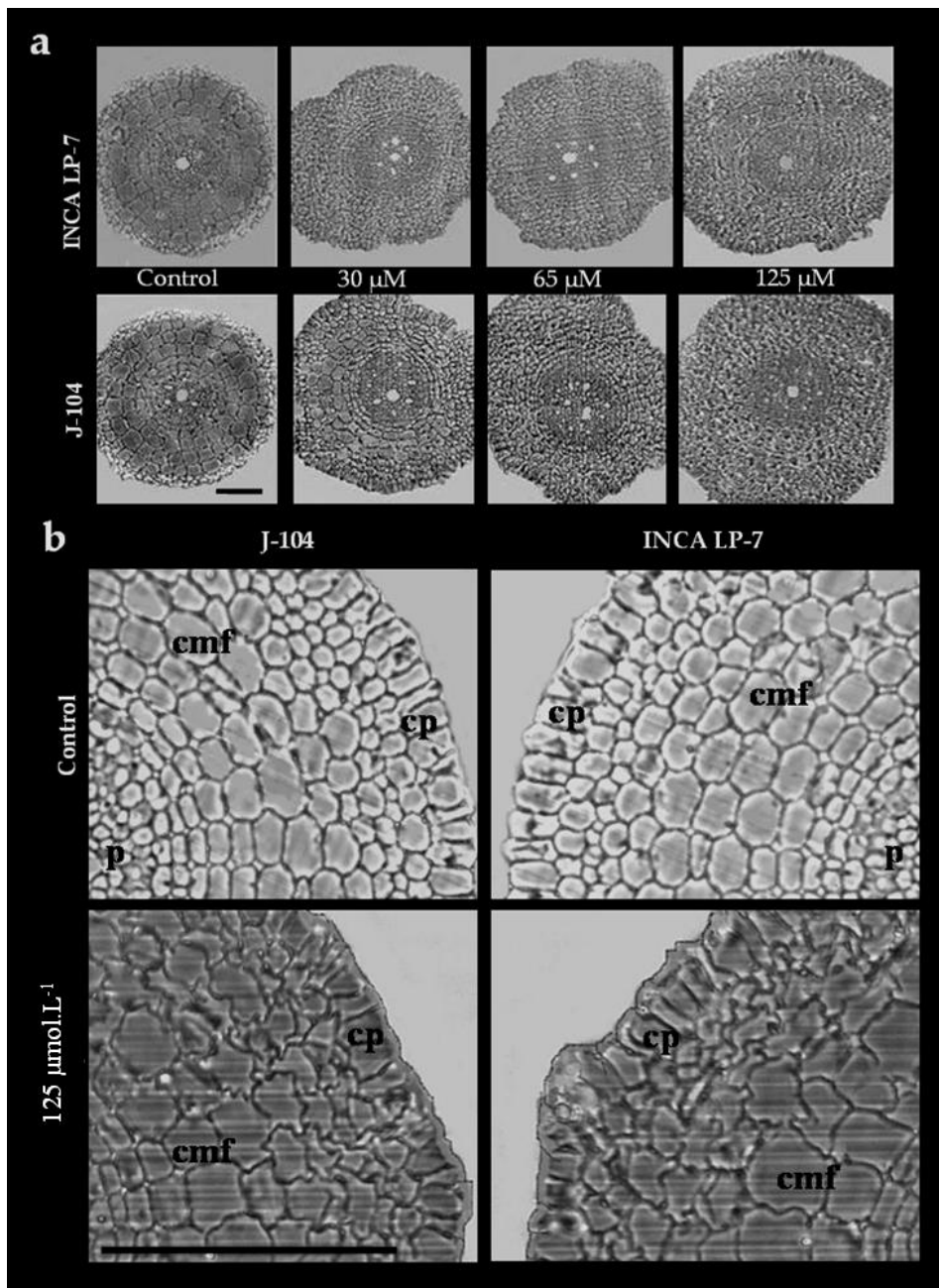
La evaluación histológica de las secciones transversales permitió detectar algunas alteraciones en la organización de los tejidos y las modificaciones estructurales responsables del incremento observado en el diámetro de la radícula.

La sección transversal de la radícula de las plántulas controles exhibió una estructura típica, donde las células protodérmicas forman una capa monoestratificada y mantienen su forma poliédrica, mientras las células del meristemo fundamental están distribuidas uniformemente en varias capas circulares alrededor del procámbium (Figura 7 a y b).

En las radículas de plántulas tratadas con las diferentes concentraciones del ión  $\text{Al}^{3+}$  se apreciaron diferentes cambios en este ordenamiento estructural. Aunque las células protodérmicas se mantuvieron formando una sola capa de células, se observaron deformes y ligeramente alargadas en sentido radial, mientras las células del meristemo fundamental más internas se expandieron radialmente y las más externas se observaron comprimidas y desorganizadas, lo que impidió definir las capas celulares observadas en el control (Figura 7b).

En la Figura 7 se puede apreciar como este desorden se hizo más evidente con el incremento en los niveles de  $\text{Al}^{3+}$ , de manera tal que en las plántulas de las dos variedades, expuestas a  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , es difícil definir las capas celulares dentro de la estructura radicular.

Lo anterior indica que este ión provocó cambios en la forma y en la organización de las células protodérmicas y del meristemo fundamental, en la sección transversal de la radícula y esto conllevó a un incremento en el diámetro de la misma, lo que impide sin lugar a dudas un adecuado crecimiento de la raíz.

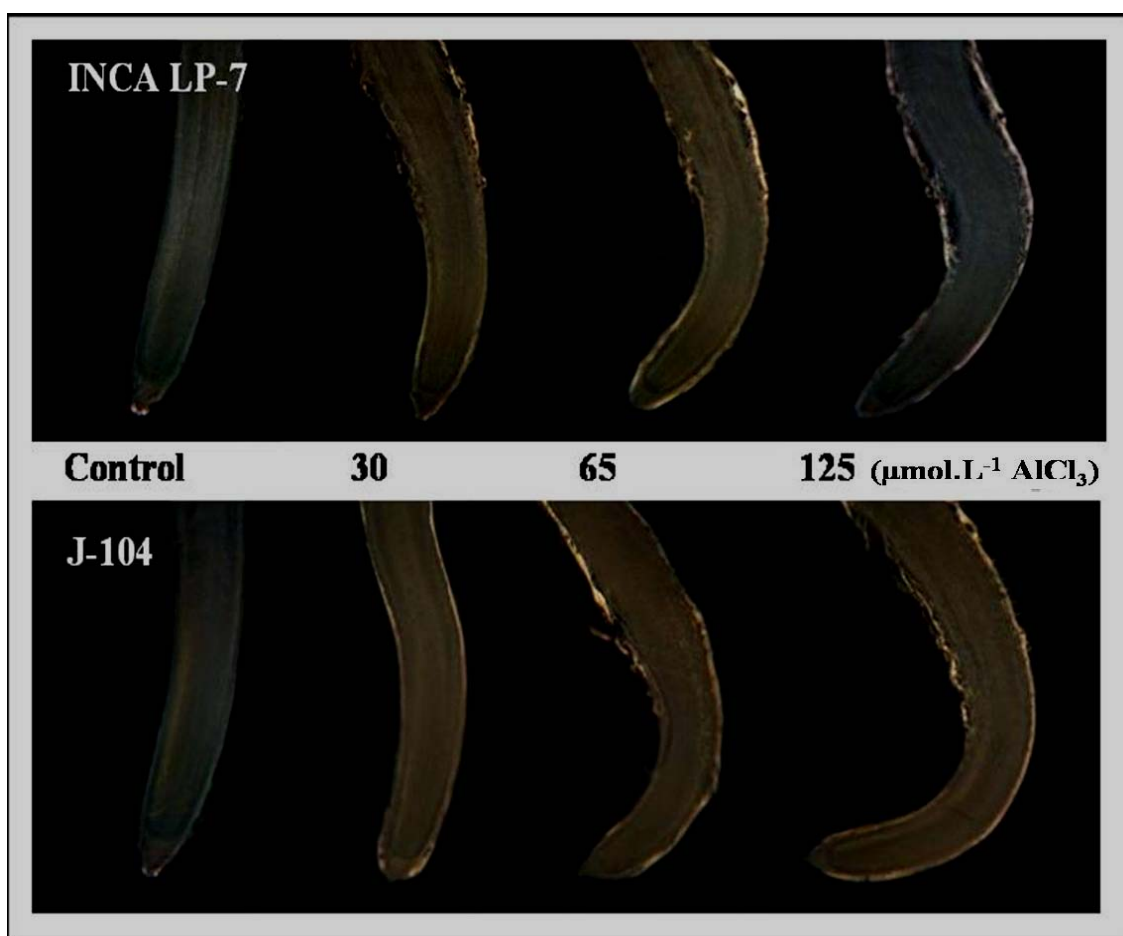


**Figura 7:** Modificaciones en la sección transversal de la radícula a nivel de la zona de transición. a) Secciones transversales de la radícula de plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (control), 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  (100x). (Nótese incremento del diámetro radicular con el aumento de las concentraciones de Al). b) Secciones transversales de plántulas tratadas con 0 (control) y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  (400x). (Nótese desorganización en las células protodérmicas (cp) y las del meristemo fundamental (cmf). p: procambium. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ ).

El procedimiento empleado para determinar el ángulo de curvatura a través de un estudio morfométrico fue descrito por primera vez en esta investigación y permitió cuantificar la

deformación de la radícula, de manera rápida y sencilla.

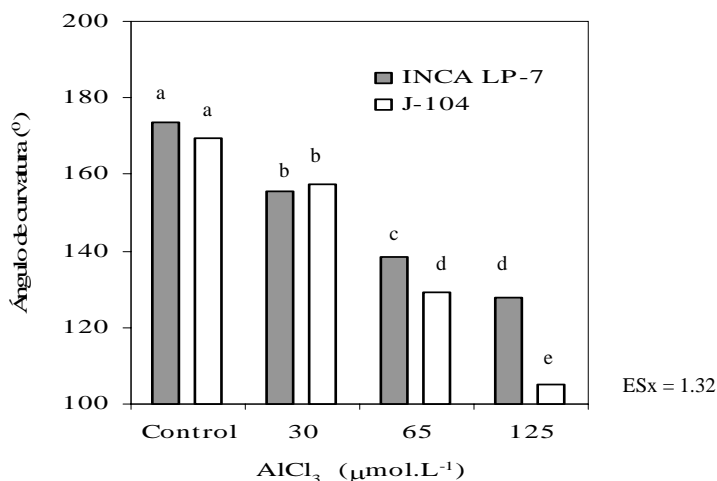
A través del mismo se pudo examinar minuciosamente la morfología externa de la radícula de las plántulas del control y se constató que los ápices aparecían con una ligera curvatura, como consecuencia de la respuesta gravitrópica de la radícula crecida en posición horizontal. Sin embargo, en las plántulas tratadas con  $\text{Al}^{3+}$ , en las que se debía esperar un comportamiento similar, se apreció una curvatura más acentuada que la observada en las plántulas del control.



**Figura 8:** Fotomicrografía de los ápices radiculares de plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104, expuestas a 0, 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . (Nótese como los ápices radiculares se curvan cuando las plántulas son expuestas al Al). (20x)

La variedad INCA LP-7 y la J-104 exhibieron una reducción significativa de este ángulo en las plántulas tratadas con las diferentes concentraciones del ión, en relación con las plántulas del control y entre ellas. Además, este crecimiento asimétrico de los ápices se

hizo más evidente con el incremento de los niveles de  $\text{Al}^{3+}$ , de manera que las plántulas expuestas a la concentración más tóxica del ión, exhibieron la mayor curvatura (Figura 9). El comportamiento anterior demostró que la curvatura radical puede ser un indicador sensible al ión  $\text{Al}^{3+}$ , si se tiene en cuenta que el ángulo de curvatura disminuyó significativamente, incluso cuando las plántulas fueron expuestas a  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Las plántulas del control en ambas variedades exhibieron valores superiores a los  $165^\circ$  en el ángulo de curvatura radicular, sin embargo, las tratadas con el metal no superaron los  $160^\circ$  en ninguno de los casos, lo que sugiere la posibilidad de evaluar el ángulo de curvatura como un indicador de toxicidad por Al, a partir de este valor.



**Figura 9:** Ángulo de la curvatura en el lado cóncavo del ápice radicular en plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104, expuestas a 0, 30, 65 y  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . (Nótese disminución en el ángulo de la curvatura con el incremento de la concentración de Al). Las barras indican las medias de 60 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a  $p < 0.05$ .

No obstante, los ápices radiculares de la variedad J-104 que fueron expuestos a  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , llegaron a describir ángulos cercanos a  $100^\circ$ , mientras que en la variedad INCA LP-7, escasas veces fueron inferiores a  $130^\circ$  (Figura 9). Este comportamiento evidencia que los ápices radiculares de la variedad J-104 fueron los más afectados por el efecto del ión  $\text{Al}^{3+}$ .

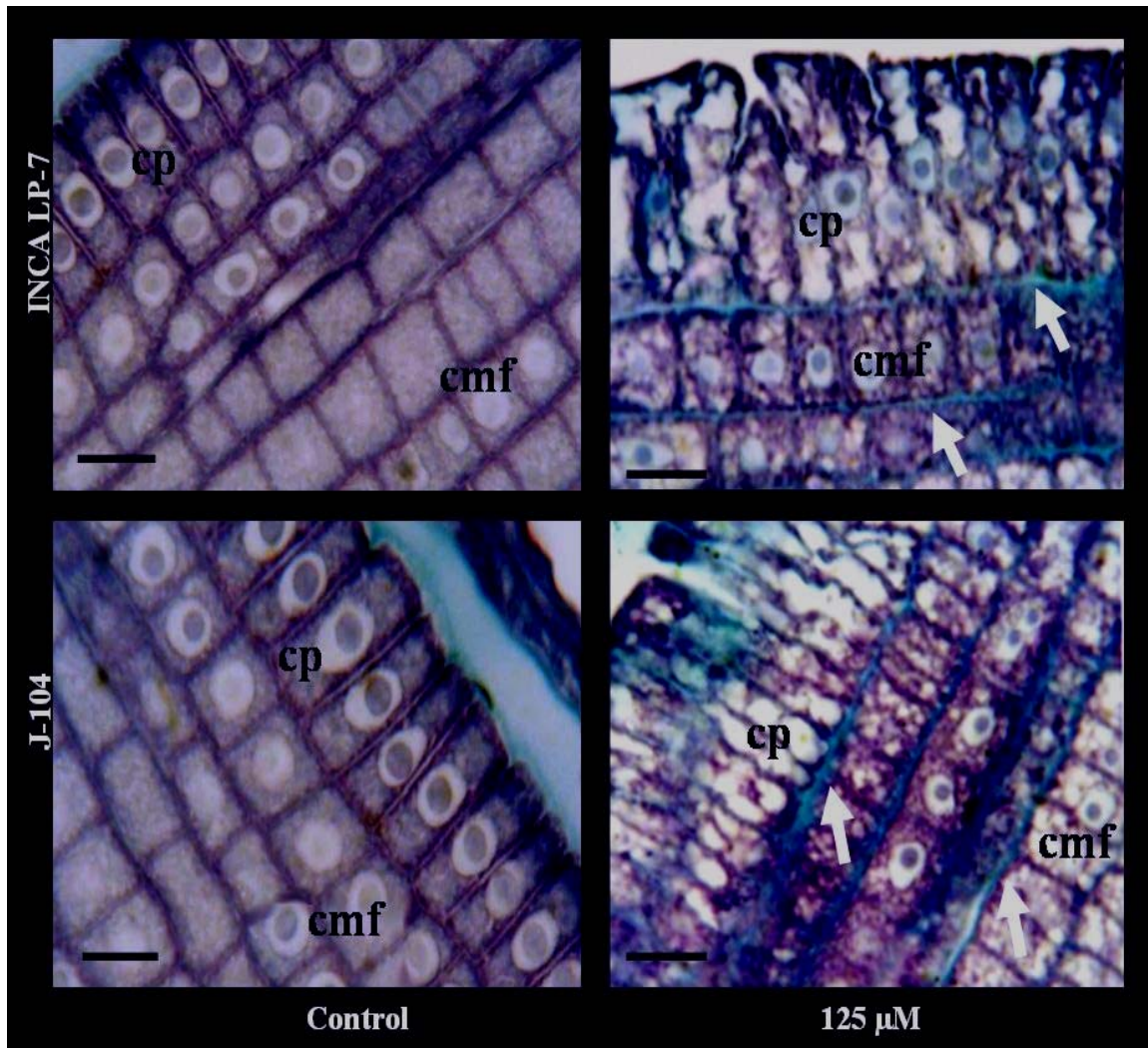
#### **4.2. Estudio de indicadores celulares de crecimiento ante la toxicidad por Al**

Los cambios provocados por el Al en la estructura de la célula y los procesos que tienen lugar en ella son la base para interpretar correctamente las alteraciones morfológicas y fisiológicas que evidencian las plantas cuando son expuestas a niveles tóxicos de este ión. Por lo que se estudiaron algunos indicadores celulares en las secciones longitudinales del ápice radicular para evaluar el efecto del Al en el crecimiento de la raíz. La resolución de las imágenes obtenidas por el microscopio óptico, no permitió cuantificar el grosor de la pared celular y por tanto no fue posible establecer una comparación entre las variedades, ni entre los diferentes tratamientos. No obstante, en las plántulas tratadas se pudieron apreciar modificaciones importantes en las paredes celulares (Figura 10).

A diferencia del control, en las plántulas expuestas a  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , las paredes longitudinales de las células corticales más externas se observaron engrosadas, lo que se evidenció a través del color cian que brindó la tinción con el azul de toluidina, como se puede apreciar en la Figura 10.

En la variedad INCA LP-7, solo las dos filas de células corticales más externas exhibieron esta modificación, mientras que en la J-104 también se observaron paredes celulares engrosadas en células corticales internas (Figura 10). Además se observó una disminución del grosor de la pared hacia el interior de la radícula, de forma tal que las células más externas exhibieron generalmente, paredes más gruesas que las más internas.

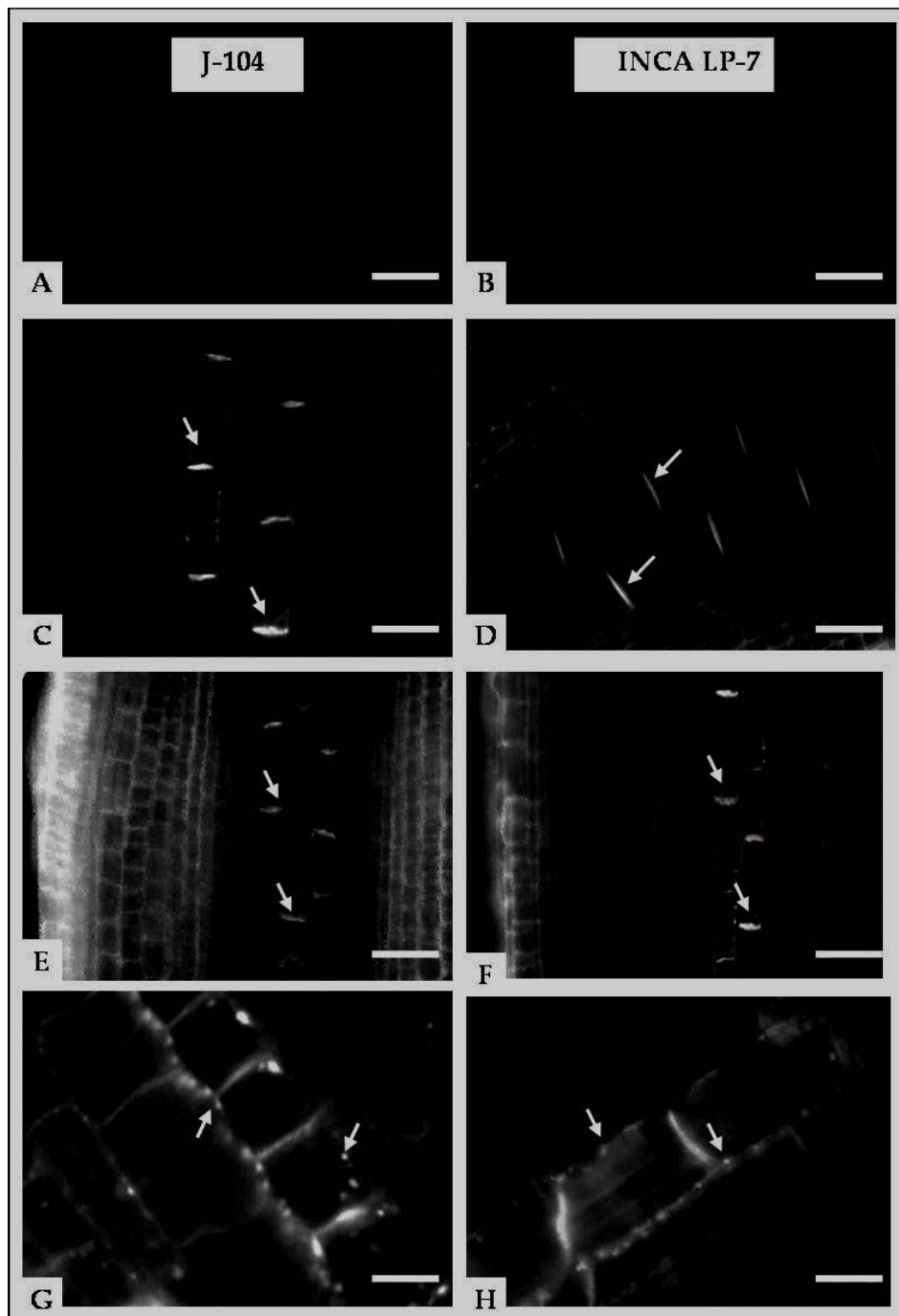
Los resultados anteriores indican que el Al provocó alteraciones en la estructura de la pared, lo que puede deberse a las interacciones del propio ión  $\text{Al}^{3+}$  o de otros compuestos, cuya síntesis es inducida por él, como la calosa.



**Figura 10:** Fotomicrografías de secciones longitudinales de la raíz de plántulas control y tratadas con  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Variedades J-104 e INCA LP-7. cp: células protodérmicas, cmf: células del meristemo fundamental. Las flechas indican el engrosamiento de las paredes celulares en las filas de células del meristemo fundamental. (Nótese ausencia de este engrosamiento en las secciones correspondientes a las plántulas controles de ambas variedades). La barra representa  $4 \mu\text{m}$ . (1000x).

El estudio de la calosa en el interior de la raíz brindó elementos que apoyan los resultados anteriores. En el mismo, el ión  $\text{Al}^{3+}$  indujo la formación de calosa dentro de la raíz, lo que se pudo apreciar a través de la señal fluorescente emitida por el complejo calosa-azul de anilina (Figura 11).





**Figura 11:** Fotomicrografías de fluorescencia correspondientes a la sección longitudinal de la radícula de plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104. A y B: Control negativo (Sin Al y sin azul de anilina). C y D: Control positivo (Sin Al y con azul de anilina). E-H: Radículas tratadas con  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  y contrastadas con azul de anilina. Las flechas indican la localización de calosa en el protofloema (C-F) y en las paredes de las células del meristemo fundamental (G y H). La barra representa  $20 \mu\text{m}$  (A-F) y  $5 \mu\text{m}$  (G y H).

En la radícula de las plántulas del control positivo (muestras no tratadas con Al, pero si incubadas con azul de anilina), solo se localizó la calosa en los elementos del protofloema (Figura 11 C y D), donde se ubica naturalmente obstruyendo los poros que forma esta estructura. Este comportamiento se pudo apreciar tanto en las secciones longitudinales de la radícula (Figura 11) como en las transversales (Figura 12).

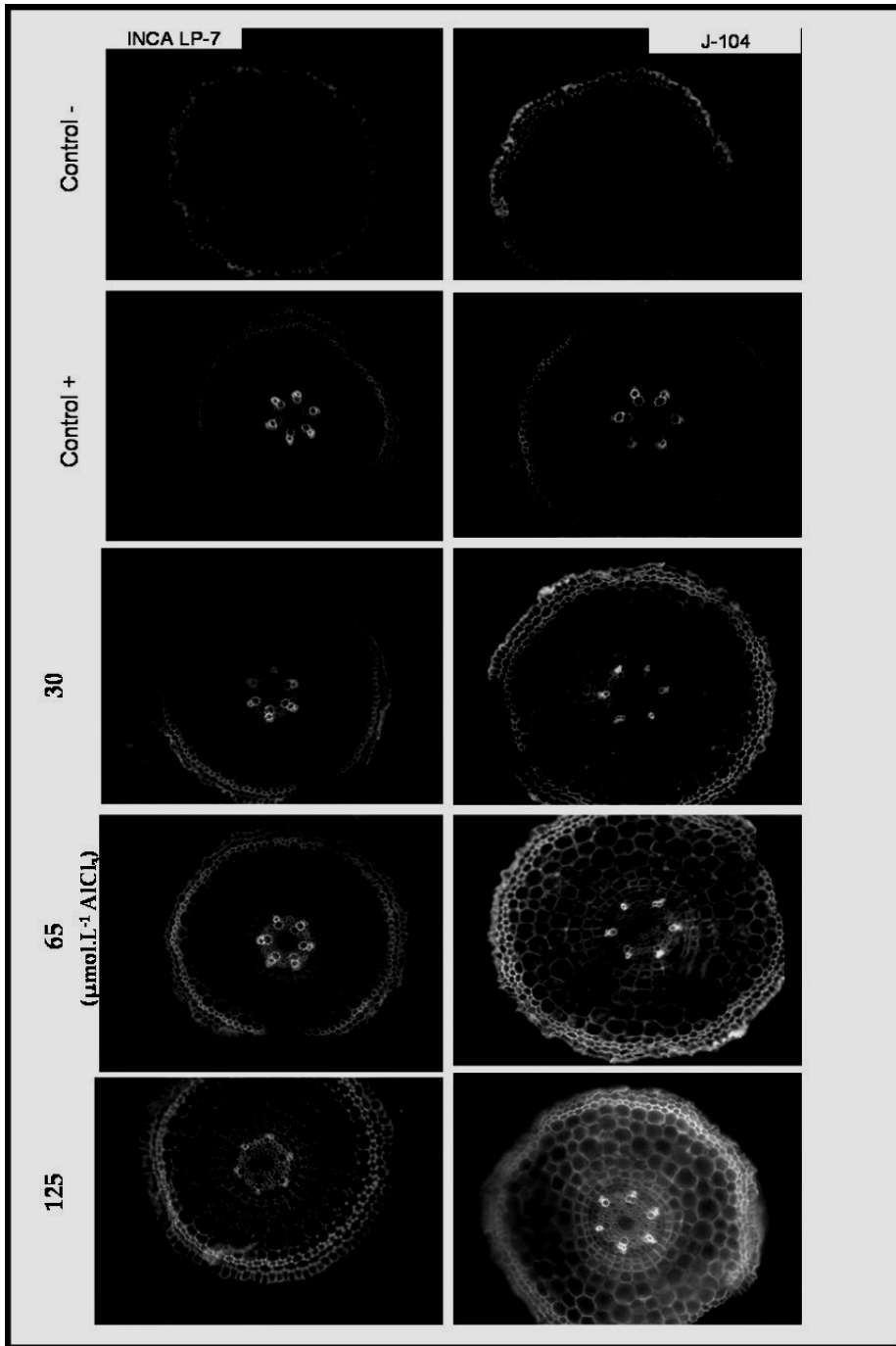
En la radícula de las plántulas estresadas se localizaron moléculas de calosa en la pared de las células del meristemo fundamental, lo que se evidenció a través de una señal fluorescente en forma de puntos, como se puede apreciar en la figura 11, donde las flechas indican la presencia de estas moléculas.

En la variedad INCA LP-7, la calosa se observó generalmente en las dos filas de células más externas, mientras que en la J-104, además, se hizo evidente su localización más al centro de la sección longitudinal (Figura 11 y 12). Esto indica que el ión  $Al^{3+}$  indujo la deposición de una mayor cantidad de calosa en las plántulas de la variedad J-104 que en la INCA LP-7, lo que está acorde con los resultados obtenidos en ambas variedades al analizar las alteraciones estructurales provocadas por el ión  $Al^{3+}$  en las paredes de estas células (Figura 10).

De forma similar se pudo apreciar una coincidencia entre la localización de la calosa inducida por el Al, en las paredes longitudinales de las células corticales y el engrosamiento observado en estas mismas paredes. Estos resultados indican la existencia de una posible relación entre la deposición de calosa a nivel de la pared celular y el engrosamiento de la misma como consecuencia de la toxicidad por Al.

La formación de calosa, como efecto provocado por este ión se constató en todos los niveles de Al impuestos, incluso en las plántulas que fueron crecidas con  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , como se aprecia en la Figura 12, lo que indica que este pudiera ser un elemento sensible ante la presencia del Al.

A partir de que el crecimiento radical es el resultado de la división y el alargamiento de las células y tomando en consideración las evidencias que se obtuvieron del efecto negativo de este ión en el crecimiento de la radícula se consideró conveniente evaluar el comportamiento de estos dos procesos ante la presencia del metal.



**Figura 12:** Fotomicrografías de fluorescencia correspondientes a la sección transversal de la radícula a nivel de la zona de transición en plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104.

De arriba abajo. Control sin Al y sin azul de anilina (Control -). Control sin Al y con azul de anilina (Control +). Nótese presencia de calosa en los elementos del protofloema, en ausencia del Al. Plántulas estresadas con 30, 65 y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Obsérvese fluorescencia en el protofloema y en el meristemo fundamental. (100x).

Al evaluar el efecto provocado por el Al en el alargamiento celular, se pudo apreciar una adecuada definición estructural de las células y los tejidos en la zona de transición de las secciones longitudinales de la radícula, la cual se conoce como la zona de mayor afectación ante la toxicidad por este ión (Figura 13).

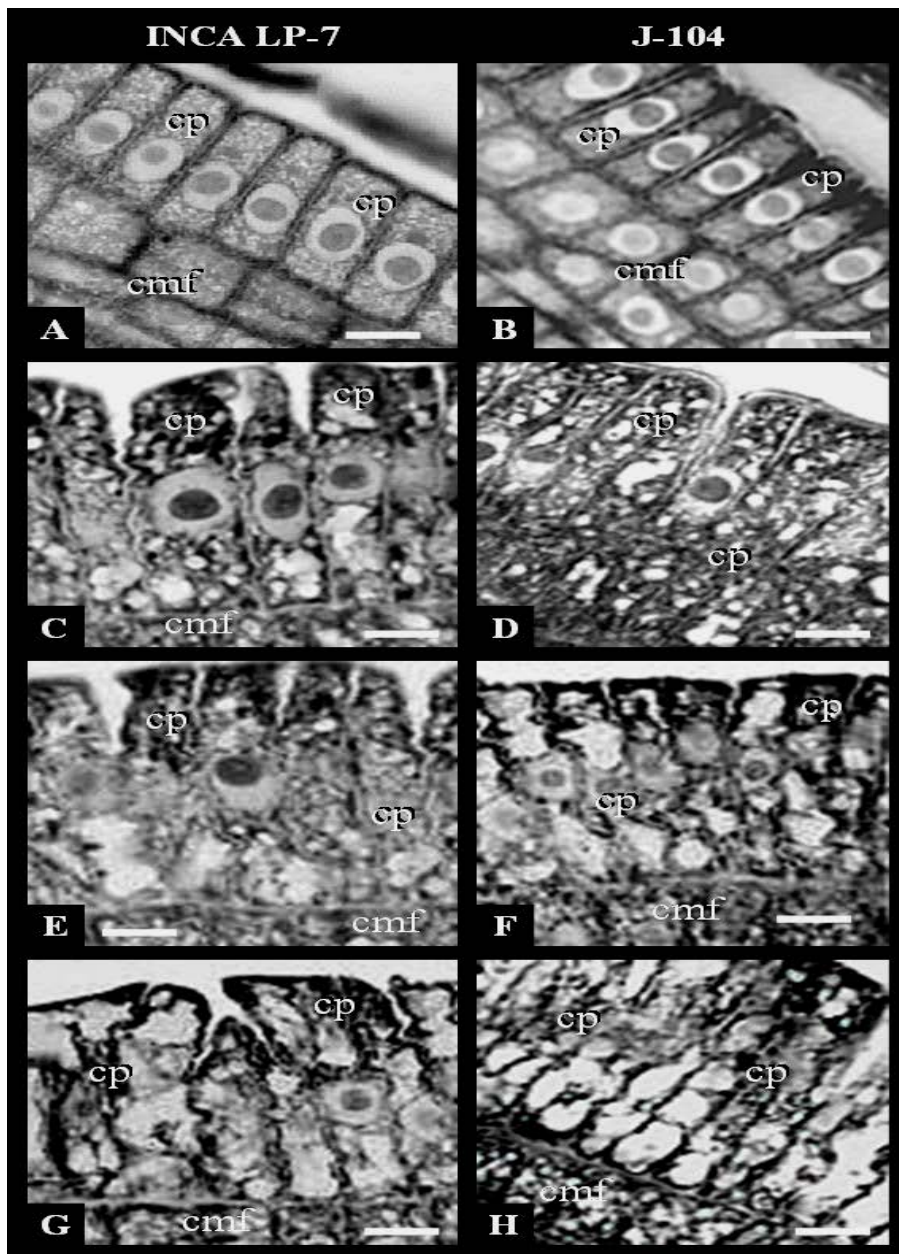
En las plántulas del control, las células protodérmicas se caracterizaron por tener una estructura poliédrica alargada y se encontraron agrupadas en una sola capa (Figura 13 A y B), sin embargo en las expuestas al metal, éstas se deformaron y exhibieron paredes muy irregulares, así como una expansión radial en su estructura (Figura 13 C-H).

Las células del meristemo fundamental mostraron un comportamiento similar, no obstante sus paredes se apreciaron menos irregulares, de modo que a pesar de la expansión radial que mostraron las mismas, este tejido conservó más la forma de sus células (Figura 14). Esto determinó que el acortamiento en longitud fue más evidente en estas células que en las protodérmicas.

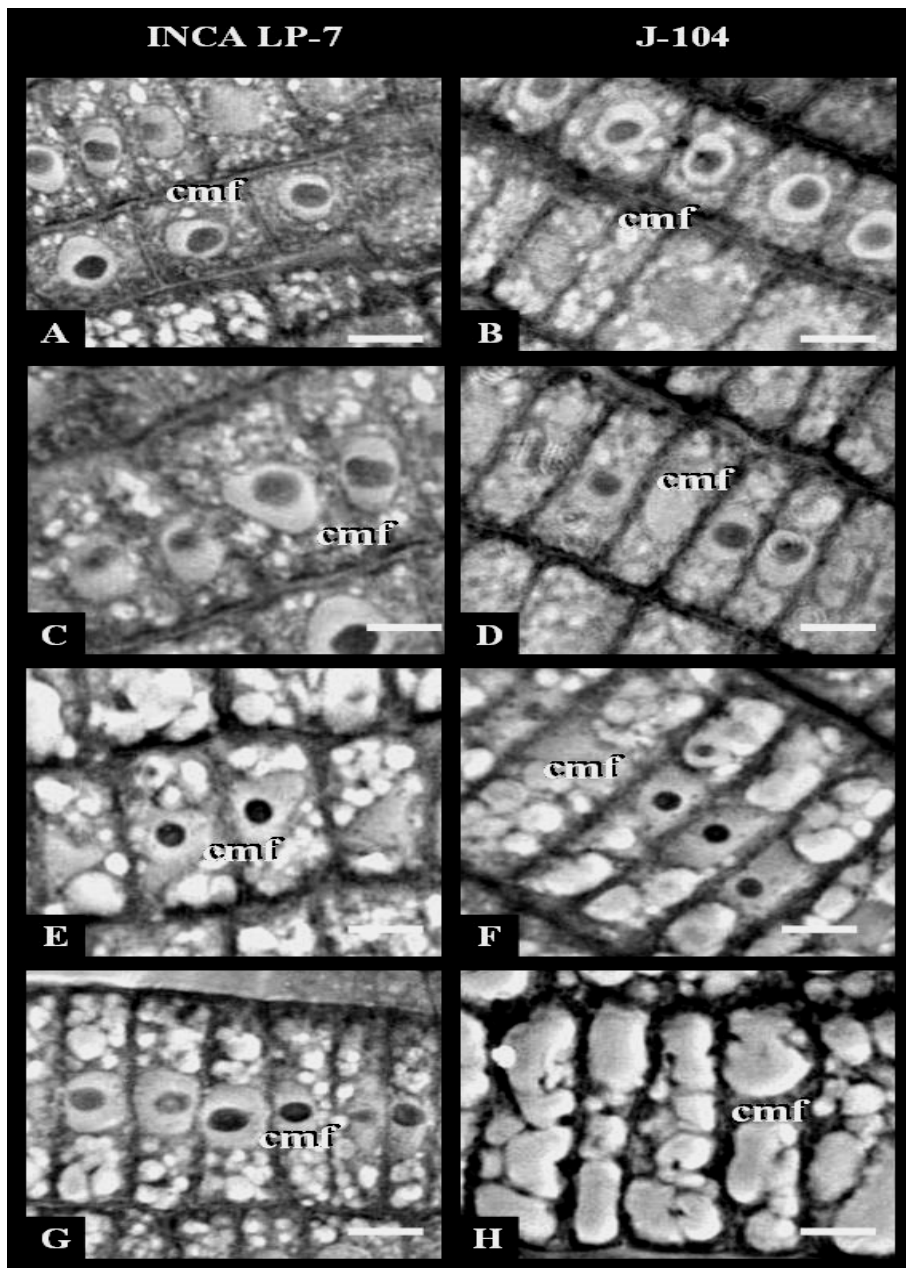
La toxicidad por Al se manifestó de forma similar en las células protodérmicas y del meristemo fundamental, en las dos variedades estudiadas. Además, se pudo constatar que en ambas variedades, las concentraciones crecientes del ión  $Al^{3+}$  acentuaron las alteraciones morfológicas en los dos tipos de células, sin embargo, el patrón de ordenamiento de las mismas en los tejidos no exhibió cambios apreciables ante la exposición con el metal (Figuras 13 y 14).

Teniendo en cuenta que las células del meristemo fundamental aportan más al crecimiento en grosor de la raíz y el hecho de que el acortamiento en longitud de las mismas fue más evidente que en las células protodérmicas, se consideró oportuno realizar en ellas un estudio morfométrico para determinar el efecto del Al en el alargamiento celular.

Como resultado del mismo se pudieron cuantificar las alteraciones observadas en la estructura de estas células y se demostró que la toxicidad del ión  $Al^{3+}$  afecta de forma significativa el alargamiento celular.



**Figura 13:** Fotomicrografías de células protodérmicas en la sección longitudinal de la raíz de plántulas de arroz expuestas a 0 (A, B), 30 (C, D), 65 (E, F) y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  (G, H). Variedades: J-104 e INCA LP-7. cp: célula protodérmica, cmf: célula del meristemo fundamental. (Nótese una capa de células protodérmicas poliédricas y uniformes en las plántulas del control (A y B), mientras que en las plántulas tratadas con Al, éstas se aprecian expandidas radialmente, deformadas, con paredes muy irregulares y una intensa vacuolización). La barra representa 2,5  $\mu\text{m}$ . (1000x)



**Figura 14:** Fotomicrografías de células del meristemo fundamental en la sección longitudinal de la radícula de plántulas de arroz expuestas a 0 (A, B), 30 (C, D), 65 (E, F) y 125  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$  (G, H). Variedades: J-104 e INCA LP-7. cp: célula protodérmica, cmf: célula del meristemo fundamental. (Nótese las células del meristemo fundamental en forma cúbica y ordenadas en las plántulas del control (A y B), mientras que en las plántulas tratadas con Al se aprecian ordenadas, pero expandidas radialmente y con una intensa vacuolización. La barra representa 2,5  $\mu\text{m}$ . (1000x)

El crecimiento en longitud de las células se redujo notablemente ante los niveles de Al empleados, no obstante se comportó de forma diferentes en cada una de las variedades