

(Figura 15).

Las plántulas de la variedad INCA LP-7 no exhibieron cambios en la longitud de las células cuando fueron expuestas a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 , sin embargo, en la J-104 a ese mismo valor, se observó una disminución en la misma (Figura 15). Esto indica que la concentración de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ resulta tóxica para esta última variedad, resultados que apoyan los obtenidos al analizar la longitud de la radícula (Figura 4).

Además, cuando las plántulas de la variedad J-104 fueron expuestas a la mayor dosis de Al ($125 \mu\text{mol.L}^{-1}$), la longitud celular se redujo casi un 40 % en relación con el control, mientras que en la INCA LP-7 la reducción fue de solo un 25.5% (Figura 15), lo que evidenció que la longitud de sus células, fue menos afectada ante la toxicidad del Al.

El grosor de las células del meristemo fundamental determinado a través del estudio morfométrico, arrojó un incremento importante ante la presencia del ión Al^{3+} (Figura 16). Para este indicador, las dos variedades estudiadas exhibieron un nivel de tolerancia similar, ya que ambas mostraron un aumento significativo del grosor celular cuando fueron expuestas a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ del metal.

No obstante, los resultados apuntan a que la J-104 fue la más afectada por el estrés iónico, pues el grosor celular se incrementó en un 70%, mientras que para la otra variedad el incremento fue de un 57% (Figura 16), elementos que sustentan los resultados obtenidos al analizar el grosor de la radícula (Figura 5 y 6).

La evaluación integral del estudio morfométrico, indicó que el Al provocó disminución en la longitud de las células corticales e incremento en el grosor de las mismas, de manera que dichas células se hicieron más cortas y anchas en la medida en que se incrementaron los niveles de la exposición al ión metálico, sobre todo en la variedad J-104, la que evidenció estas modificaciones a menores dosis del metal en relación con la INCA LP-7.

La inhibición del crecimiento observada en las radículas de las plántulas estresadas por el ión Al^{3+} se debe a la reducción detectada en la longitud y al engrosamiento de la misma, indicadores que sin lugar a dudas contribuyen decisivamente en este proceso.

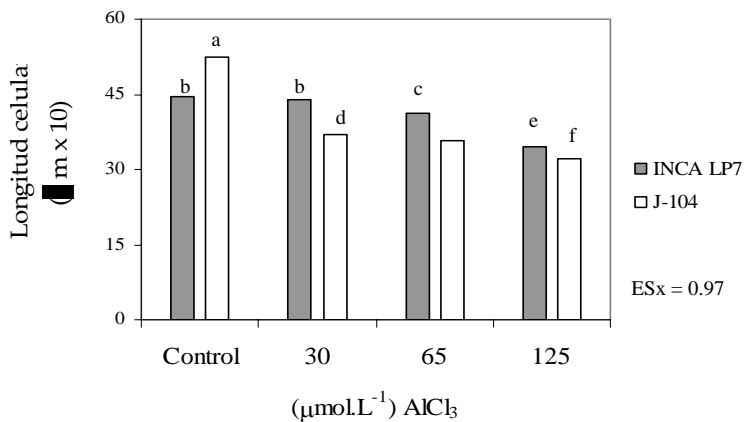


Figura 15: Longitud de las células del meristemo fundamental correspondientes a la zona de transición radicular de las variedades de arroz, INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Las barras indican las medias de 200 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a $p < 0.05$.

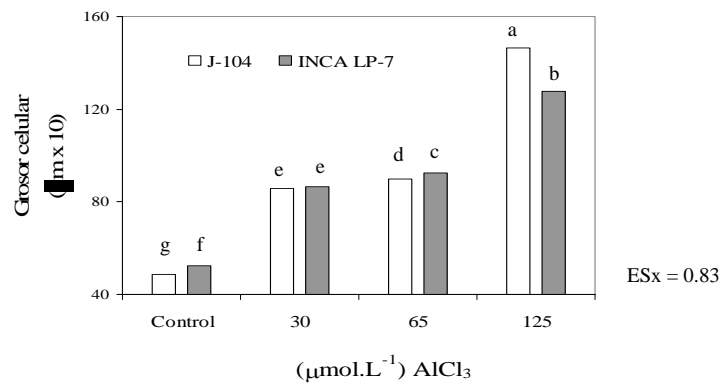


Figura 16: Grosor de las células del meristemo fundamental correspondientes a la zona de transición radicular de las variedades de arroz, INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Las barras indican las medias de 200 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a $p < 0.05$.

La división celular no es por sí misma un mecanismo de crecimiento, ya que no conduce necesariamente a un incremento en el tamaño; no obstante es un proceso que acompaña al crecimiento en los tejidos meristemáticos. Por este motivo el estudio del efecto del ión

Al^{3+} en la división celular estuvo confinado a la zona de división de la radícula, según la Figura 5 y se evaluó mediante la determinación del índice mitótico (IM), como indicador cuantitativo de este proceso celular.

La caracterización de los núcleos celulares, que se observaron de color rojo, permitió determinar con facilidad en ambas variedades las células que se encontraban en interfase, así como en las diferentes fases de la mitosis (profase, metafase, telofase y anafase) para su posterior evaluación.

La misma se realizó a través de la figura mitótica característica de cada fase, como se muestra en la Figura 17 y fue posible por las modificaciones realizadas a la técnica de tinción con orceína, la que permitió un adecuado contraste del material nuclear.

Al evaluar el índice mitótico como indicador del proceso de división celular, se pudo apreciar una disminución progresiva del mismo, con el aumento en los niveles de Al (Figura 18), lo que indica las afectaciones que puede provocar este ión en el crecimiento celular, debido a sus efectos tóxicos. Las dos variedades mostraron una reducción de este indicador ante la concentración de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 , sin embargo para los demás tratamientos exhibieron un comportamiento diferente (Figura 18). Lo anterior indica que esta dosis es suficiente para afectar la división de éstas células.

En la variedad INCA LP-7, las dosis de 65 y $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 no afectaron de forma significativa el índice mitótico, lo que indica que después de una reducción en el mismo, se alcanza una estabilidad en el proceso de división celular.

El comportamiento de la variedad J-104 fue diferente, ya que no se apreciaron diferencias significativas entre las plántulas tratadas con 30 y $65 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 , sin embargo las expuestas a $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ si evidenciaron una reducción de este parámetro (Figura 18). De manera el índice mitótico de estas plántulas se redujo un 40.2% en relación con las del control, mientras que en la INCA LP-7 lo hizo solo en un 21.7% (Figura 18).

Estos resultados están en total concordancia con la inhibición del alargamiento radical observado en la radícula de las plantas tratadas con Al.

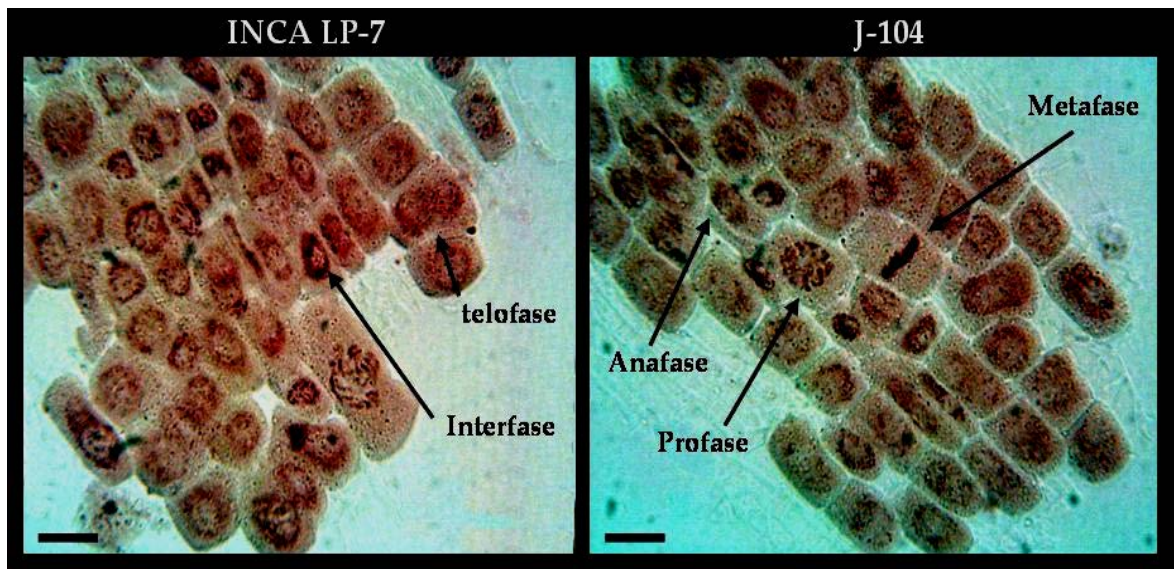


Figura 17: Imágenes de células en división correspondientes al ápice radicular de plántulas de arroz de las variedades INCA LP-7 y J-104, tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . (Nótese como el material nuclear se observa de color rojo debido a la tinción con orceína). Las flechas indican figuras representativas de cada una de las fases de la mitosis. La barra representa $2\mu\text{m}$. (1000x),

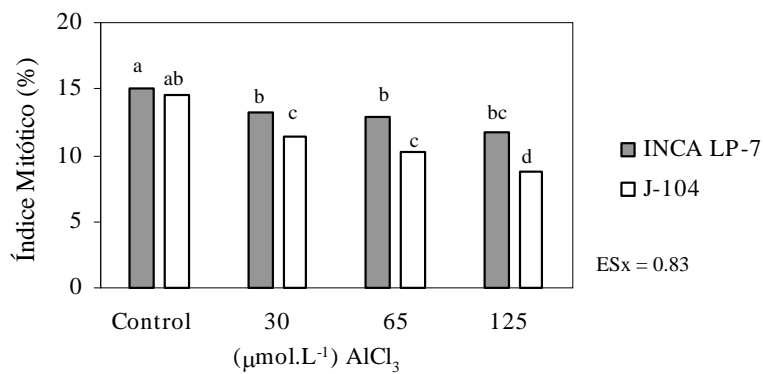


Figura 18: Comportamiento del índice mitótico (IM) en la zona de división de la radícula de plántulas de arroz de las variedades, INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (Control), 30, 65 y $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Las barras indican las medias de 2000 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a $p < 0.05$.

4.3. Estudio de localización del Al en la radícula

Para comprender todos los aspectos relacionados con la toxicidad del Al, es necesario conocer donde se localiza éste, una vez absorbido por la raíz. Para ello se realizó un estudio donde se demostró la localización de este elemento en el ápice radicular de las plántulas expuestas a diferentes concentraciones del metal, mediante la tinción con Hematoxilina.

Se constató la ausencia del metal en la radícula de las plántulas del control para las dos variedades estudiadas. Mientras que en las plántulas tratadas con Al se pudo apreciar la ubicación de este elemento en el ápice radicular a través de la coloración violeta oscuro que exhibió el complejo Hematoxilina-Al, como se puede apreciar en la Figura 19, donde además se hace evidente una coloración diferencial entre dosis y entre variedades.

En la variedad INCA LP-7, los ápices radiculares que fueron expuestos a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 , exhibieron una tenue coloración en la cofia (según el esquema de la Figura 5), mientras que en los expuestos a 65 y $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$, la misma se extendió al resto del ápice, en mayor medida para la última concentración (Figura 19).

En estas radículas la coloración no fue homogénea, sino que se pudieron apreciar numerosos puntos coloreados en todo el ápice, lo que indicó que el Al se ubicó de forma aislada dentro del tejido.

En las plántulas de la J-104 que fueron expuestas a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Al, se observó un comportamiento similar, ya que al igual que en la otra variedad, los ápices radiculares exhibieron solo la cofia coloreada.

Sin embargo, las plántulas expuestas $65 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mostraron una coloración homogénea en el primer centímetro del ápice, correspondiente a la zona de división y las tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ mostraron sus ápices completamente coloreados, lo que indica una mayor cantidad de iones dentro del ápice radicular (Figura 19).

Para complementar los resultados anteriores se determinó la localización de ión Al^{3+} *in vivo*, en las secciones longitudinales y para ello se utilizó la tinción con Morin, lo que permitió detectar su ubicación en los tejidos y en las células mediante una señal fluorescente.

La localización *in vivo* del ión al emplear esta técnica resultó coincidente con los resultados obtenidos anteriormente, que se exponen en la Figura 19.



Figura 19: Fotomicrografías de los ápices radiculares de plántulas de arroz tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Arriba la variedad INCA LP-7. (Nótese coloración en forma de puntos). Abajo la variedad J-104. (Nótese coloración homogénea). La barra representa 1mm. (20x)

En los ápices de las plántulas del control de las dos variedades no hay Al acumulado,

dado que no se observa señal fluorescente. Sin embargo, a la concentración de 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ se puede notar que el ión se acumula en la cofia y que llega a localizarse en todo el ápice cuando se imponen las mayores concentraciones del mismo (Figura 20).

Por otra parte, se pudo apreciar la misma localización en forma de puntos en los ápices de la variedad INCA LP-7 y de forma homogénea en la J-104, señalado en la Figura 20 con flecha y estrellas, respectivamente.

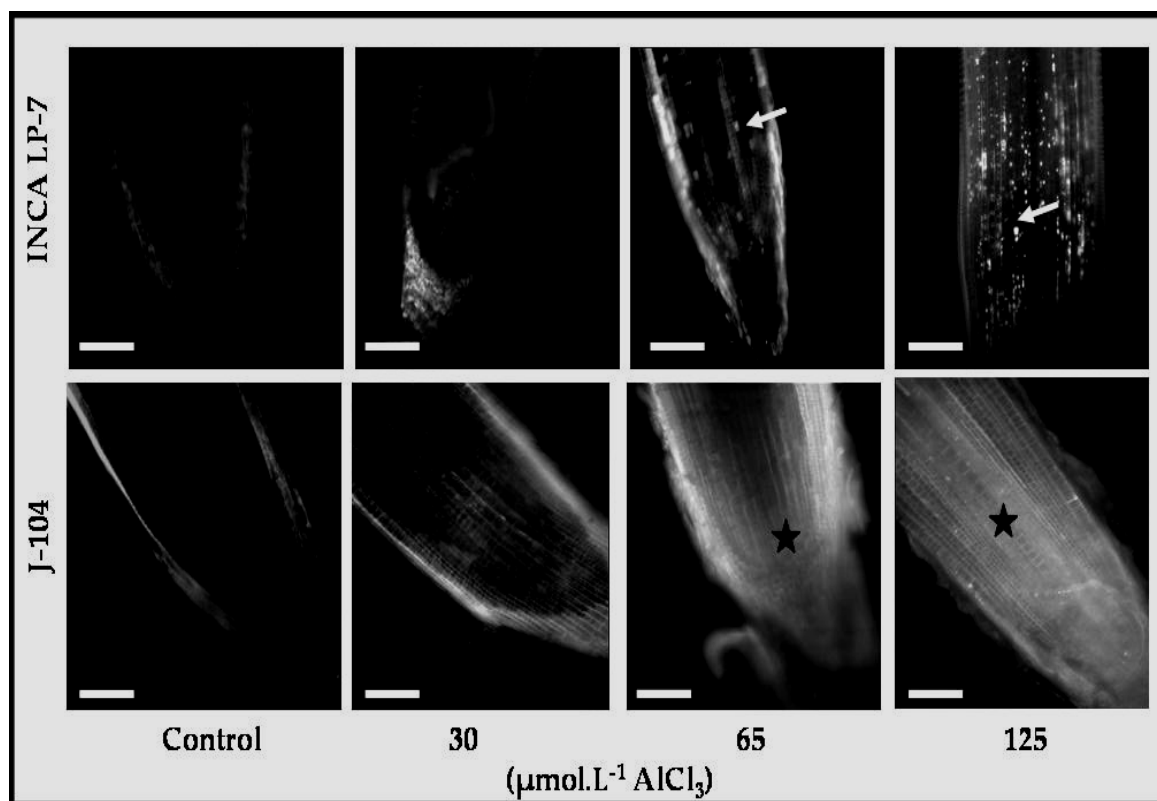


Figura 20: Fotomicrografías de fluorescencia del complejo Al-Morin, en las secciones longitudinales de los ápices radiculares de plántulas de arroz tratadas con 0 (control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AlCl_3 . Arriba la variedad INCA LP-7. Abajo la variedad J-104. Las flechas indican fluorescencia en forma de puntos y las estrellas fluorescencia de forma homogénea. La barra representa 20 μm

El hecho de que la variedad INCA LP-7 exhibiera una menor cantidad de Al en su radícula sugiere la posibilidad de que la misma es capaz de incorporar menos Al^{3+} o excluirlo más que la J-104, lo que pudiera hacerla portadora de una mayor tolerancia a este ión metálico.

Además la ausencia del ión en el interior de los ápices radiculares que fueron expuestos a $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 , está acorde con los resultados obtenidos, ya que a esta concentración son pocos los efectos tóxicos que ejerce el metal sobre las células y los tejidos de la radícula.

La localización de Al en la sección transversal de las radícula, contribuye sin lugar a dudas, a una mejor comprensión de la toxicidad provocada por este ión. Para ello, se evaluó la misma técnica de fluorescencia, pero en las secciones transversales del ápice radicular.

En las mismas se constató que en los ápices radiculares de la variedad INCA LP-7, el Al se ubica en las paredes de las células protodérmicas y en las células más externas del meristemo fundamental, lo que se evidenció a través de la fluorescencia emitida por el complejo Al-Morin (Figura 21).

Sin embargo, en la variedad J-104, además de esta localización en células protodérmicas y en las más externas del meristemo fundamental, se encontró también la acumulación de este elemento en las paredes y en el citoplasma de las células más internas del meristemo fundamental, las cuales se observaron fluorescentes (Figura 21).

Las observaciones anteriores evidencian que la variedad INCA LP-7 desencadena un mecanismo de exclusión para reducir la incorporación del ión al interior de la radícula, lo que sin dudas, la hace más tolerante.

Sin embargo, en la J-104 se localizó Al en las células meristemáticas más internas, lo que indica la ausencia de un mecanismo de exclusión.

No obstante, la presencia del metal en el interior de estas células, puede deberse a la activación de un mecanismo de compartimentación para reducir la toxicidad provocada por este ión en el citoplasma.

En las secciones ampliadas de los ápices radiculares correspondientes a la variedad J-104, se observaron pequeños depósitos de Al a diferencia de la INCA LP-7 (Figura 22). Estos aparecieron como puntos fluorescentes en las plántulas expuestas a $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 y se observaron dispersos en el interior de algunas células meristemáticas internas, indicando la presencia del ión Al^{3+} en el citoplasma.

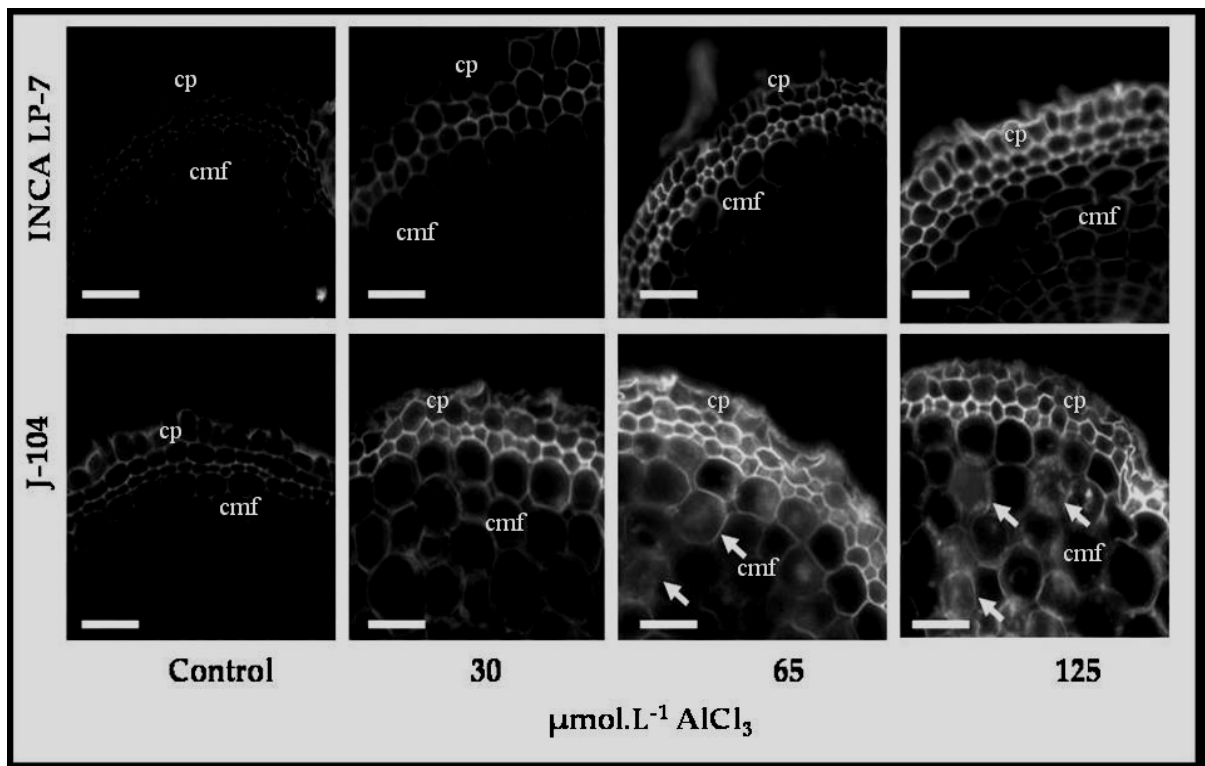


Figura 21: Fotomicrografías de fluorescencia del complejo Al-Morin en las secciones transversales a nivel de la zona de transición en los ápices radiculares de plántulas de arroz tratadas con 0 (control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AlCl_3 . Arriba la variedad INCA LP-7. Abajo la variedad J-104. Las flechas indican las células donde se localiza el Al. La barra representa 5 μm .

Es importante notar que estas células no mostraron un marcaje fino, sino pequeños cúmulos fluorescentes localizados dentro de la célula, lo que sugiere la presencia de varios iones Al^{3+} concentrados en un mismo lugar (Figura 22).

Este comportamiento permite sugerir que el ión Al^{3+} pudiera estar localizado en el interior de las vacuolas, como parte de un mecanismo de secuestro vacuolar que pudiera mantener los iones agrupados dentro de este organelo y así reducir la toxicidad que pueden provocar al resto de los componentes celulares.

Por esta razón se consideró conveniente investigar el efecto del Al en el número y el tamaño de estos organelos.

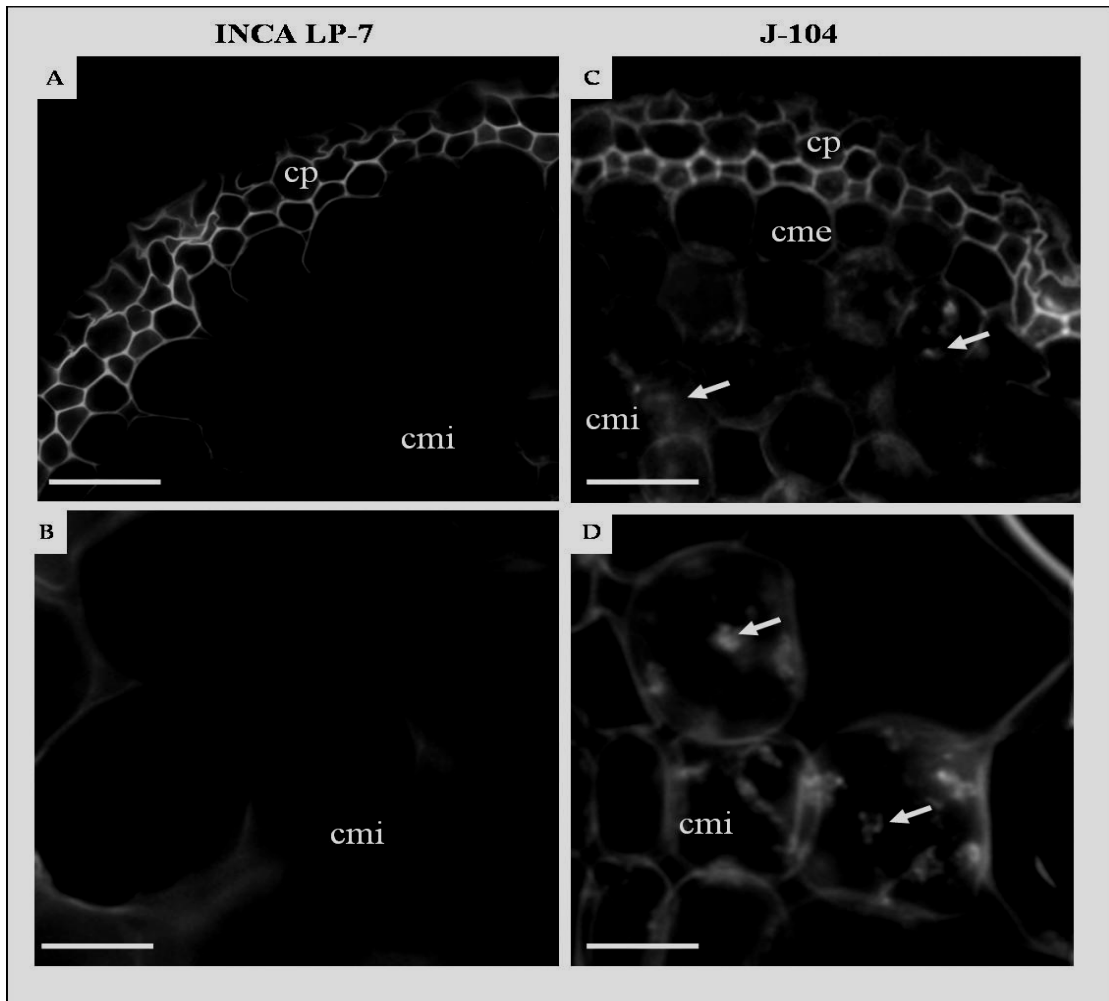


Figura 22: Fotomicrografías de fluorescencia del complejo Al-Morin en las secciones transversales de la radícula de plántulas de arroz tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Variedades: INCA LP-7 (A y B) y J-104 (C y D). Las flechas indican la localización del Al dentro de las células. cp: células protodérmicas, cme: células meristemáticas externas, cmi: células meristemáticas internas. La barra representa $5 \mu\text{m}$ (A y C) y $2,5 \mu\text{m}$ (B y D).

Las células del meristemo fundamental en las plántulas del control de ambas variedades mostraron una vacuolización discreta, caracterizada por escasa vacuolas de pequeño tamaño dispersas en el citoplasma. No obstante, al evaluar las secciones longitudinales de la radícula de las plántulas tratadas con el metal se pudieron apreciar cambios tanto en el número como en el tamaño de estos organelos (Figura 23).

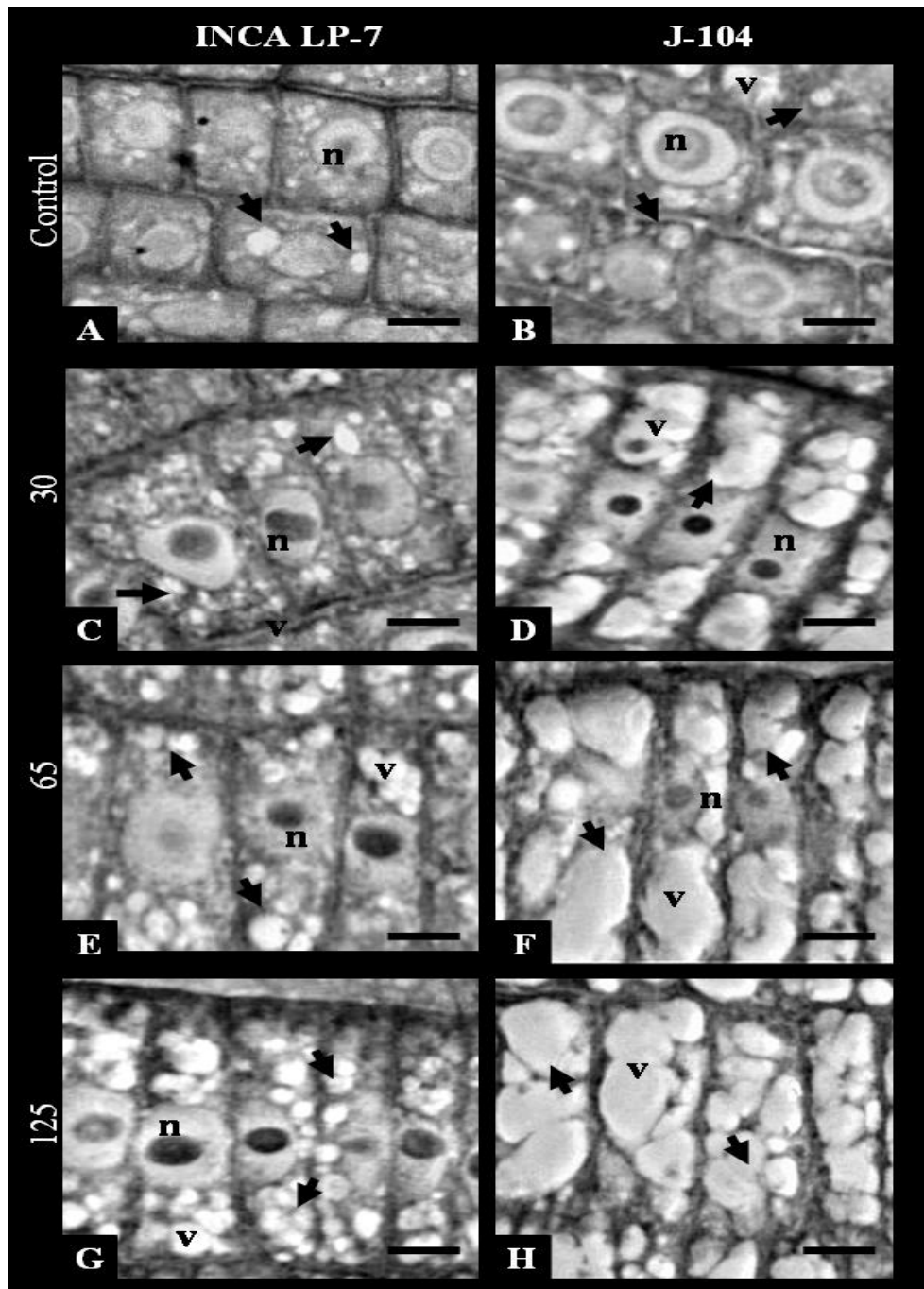


Figura 23: Fotomicrografías del meristemo fundamental de la radícula de plántulas de arroz tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Variedades: J-104 e INCA LP-7. Las flechas indican las vacuolas. (Obsérvese un incremento en la vacuolización del citoplasma cuando se elevan los niveles de Al, sobre todo en la variedad J-104). n: núcleo, v: vacuola. La barra representa 2,5 μm

Al evaluar el número de vacuolas en las células del meristemo fundamental, las dos variedades se comportaron de forma similar. En ellas, se pudo apreciar un aumento en el

número de estos organelos en todos los tratamientos respecto al control. Sin embargo, a partir de la concentración de $65 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no se produjeron modificaciones significativas (Figura 24).

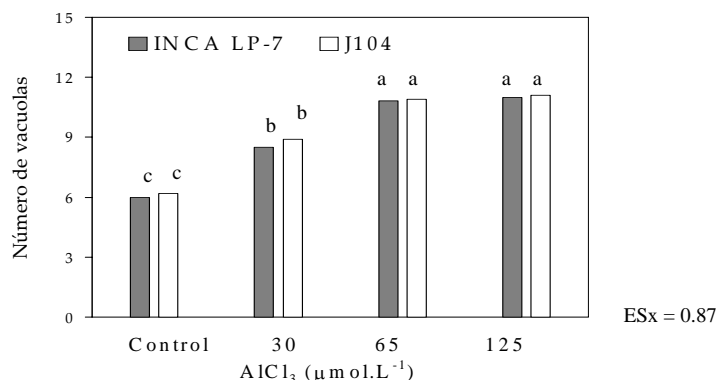


Figura 24: Número de vacuolas en las células del meristemo fundamental de la radícula de las variedades de arroz INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (Control), 30, 65 y $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . Las barras indican las medias de 200 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a $p < 0.05$.

El incremento en el número de vacuolas en las células del meristemo fundamental pudiera ser una respuesta diferencial de la planta para minimizar el efecto tóxico del Al en el citoplasma.

Al evaluar el tamaño de las vacuolas se pudo apreciar un aumento en el diámetro de las mismas en todos los tratamientos respecto al control. A la concentración de $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ las dos variedades exhibieron un valor estadísticamente semejante, sin embargo a dosis superiores el comportamiento resultó diferente. La variedad INCA LP-7 no mostró cambios en los valores del diámetro con el incremento de la concentración.

Sin embargo, la J-104, presentó un incremento del mismo conforme aumentaron los niveles de Al, de forma tal que las plántulas tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$, exhibieron vacuolas con un diámetro tres veces superior al de las células del control (Figura 25).

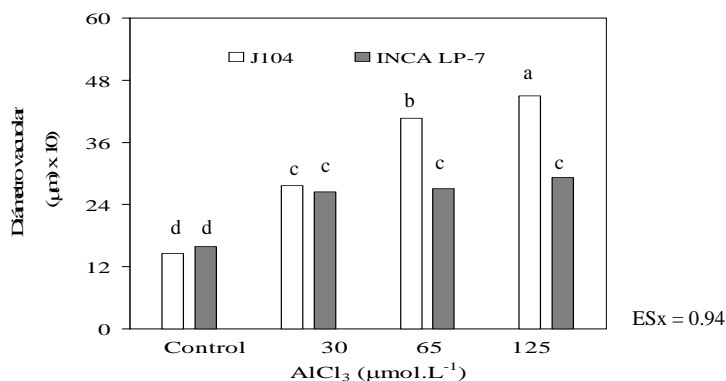


Figura 25: Diámetro de las vacuolas en las células del meristemo fundamental de la radícula de las variedades de arroz INCA LP-7 y J-104, tratadas con 0 (Control), 30, 65 y 125 µmol.L⁻¹ de AlCl₃. Las barras indican las medias de 200 valores y las letras diferentes representan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos según Tukey a p<0.05

Los cambios observados en el número y en el diámetro de las vacuolas refuerzan lo anteriormente planteado en relación con la posible tolerancia de la variedad INCA LP-7, ya que exhibió menos alteraciones en sus vacuolas. Sin embargo, en la J-104 se hizo evidente una intensa vacuolización en las células del meristemo fundamental ante la presencia del Al. Lo anterior sugiere la posibilidad de una mayor incorporación del ión al interior de las células en esta variedad, hallazgo que se corresponde con los resultados de la localización del ión Al³⁺ en estas mismas células (Figura 22).

4.4. Efecto del Al en la activación de MAP quinasas

Las proteínas de fosforilación juegan un papel esencial en la regulación del estado fisiológico y la expresión génica de las plantas en respuesta al estrés. Entre éstas se encuentran las MAP quinasas, cuya cascada de señalización es esencial en los procesos de transducción de la señal, ante la toxicidad por algunos metales pesados en plantas de arroz.

No obstante, no se conoce si la vía de transducción de la señal de las MAP quinasas opera durante la respuesta citotóxica inducida por el ión Al^{3+} .

Por esta razón se determinó inmunohistoquímicamente la activación de MAP quinasas totales y fosforiladas, en la zona de división de la radícula (según la Figura 5), en las plántulas del control y en las expuestas a dosis de $125 \mu mol.L^{-1}$ de Al, de las dos variedades.

Al analizar la expresión de las MAP quinasas totales (ERK) en las plántulas del control positivo (control con anticuerpo) se observó que las mismas se localizaron dispersas en toda la célula. Este hallazgo se observó en las dos variedades y se evidenció a través de una señal en forma de punteadura fina y dispersa, emitida en rojo por el fluorocromo Alexa 38 que está asociado al anticuerpo anti-ERK, el cual se une a todas las MAP quinasas, fosforiladas o no (Figura 26).

Las plántulas expuestas al ión Al^{3+} , exhibieron una localización de las MAP quinasas similar a la observada en las plántulas del control, donde ésta se apreció de forma dispersa en el citoplasma y en el núcleo de las células (Figura 26). Sin embargo, en este caso se localizó una mayor cantidad de MAP quinasas totales, ya que la intensidad en la fluorescencia fue superior a la observada en las plántulas del control, lo que sugirió la presencia de una mayor cantidad de estas proteínas ante la presencia del Al.

En algunos núcleos celulares de las dos variedades se evidenciaron más proteínas que en el citoplasma, de forma que éstos, se distinguen ligeramente dentro de las células por su elevada señal fluorescente en comparación con los núcleos correspondientes al tratamiento control (Figura 26).

Los indicios anteriores evidencian que el Al incrementó la cantidad de MAP quinasas en el citoplasma y en el núcleo. La localización citoplasmática se debe probablemente a la función que desempeñan en la fosforilación de proteínas en el citoesqueleto. Por otra parte, la intensa localización nuclear de las proteínas quinasas ante la presencia del Al, indica que además de cumplir sus funciones en la regulación del ciclo celular, otras quinasas pueden haber sido activadas en el núcleo probablemente para catalizar la fosforilación de factores de transcripción como parte del mecanismo genético de tolerancia al Al.

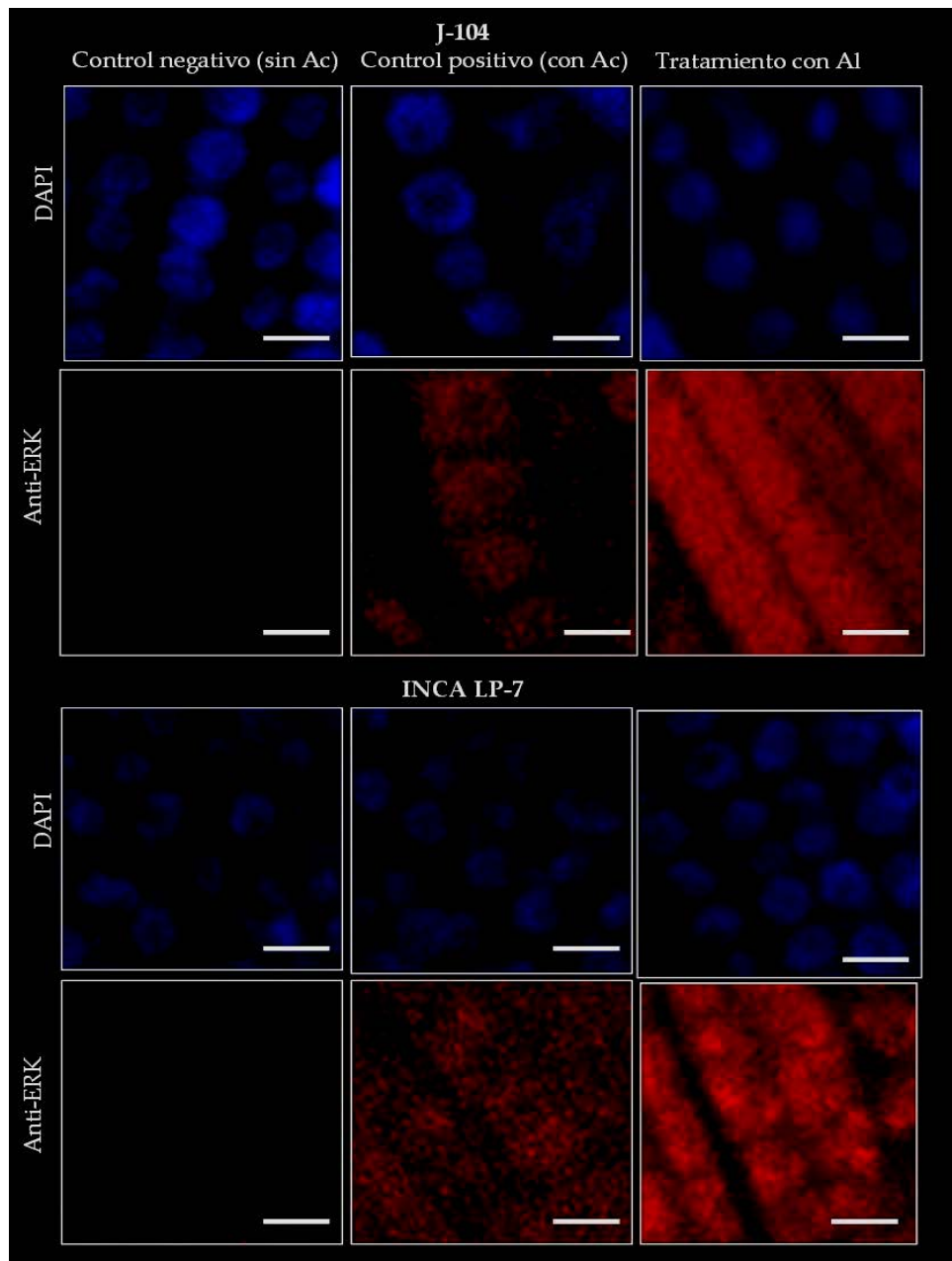


Figura 26: Fotomicrografías de células meristemáticas de la zona de división la radícula de plántulas de arroz, obtenidas en el microscopio confocal. En azul los núcleos celulares contrastados con DAPI y en rojo las MAP quinasas totales marcadas por el anticuerpo anti.ERK. Arriba, la variedad J-104 y abajo la variedad INCA LP-7, ambas con imágenes del control negativo (Control sin anticuerpo), control positivo (Control con anticuerpo) y de plántulas tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . La barra representa $5 \mu\text{m}$.

Se pudo apreciar una mayor localización de MAP quinasas totales, no solo en los núcleos de las plántulas tratadas con Al, sino también en algunos núcleos celulares del control positivo, como se muestra en la figura 27. Se comprobó además, que éstos se

encontraban en alguna fase de la división celular, ya que se observaron las figuras mitóticas representativas de alguna de ellas (Figura 27). Lo anterior se evidenció a través de la tinción con DAPI, compuesto que presenta una elevada afinidad por el material nuclear.

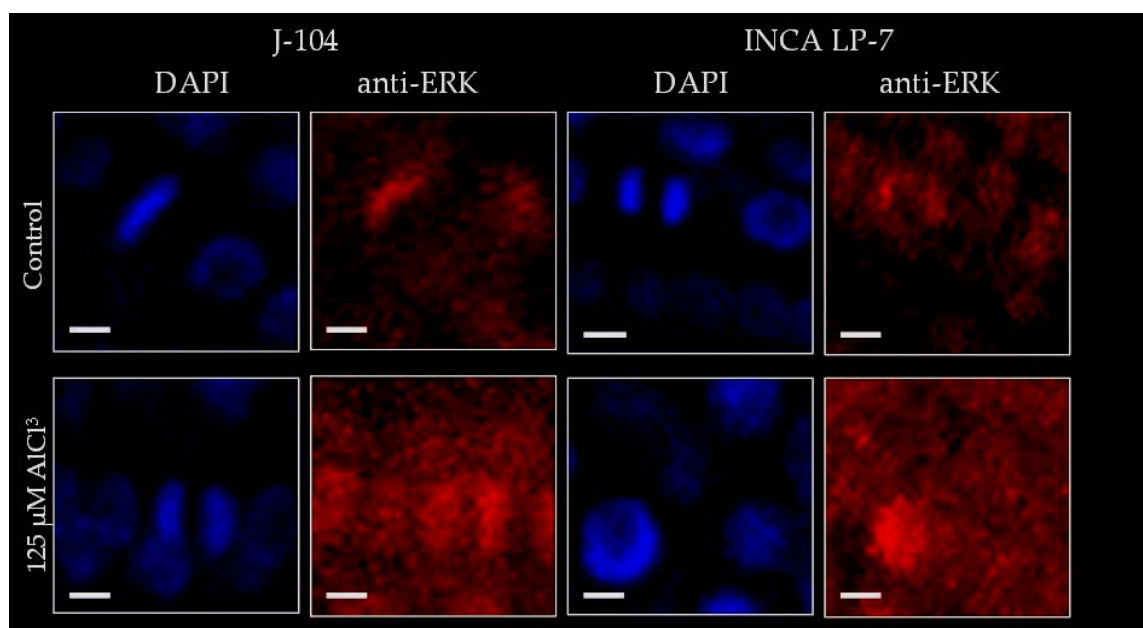


Figura 27: Fotomicrografías de células meristemáticas de la zona de división la radícula de plántulas de arroz, obtenidas en el microscopio confocal. . En azul los núcleos celulares contrastados con DAPI y en rojo las MAP quinasas totales marcadas por el anticuerpo anti-ERK. A la izquierda la variedad J-104 y a la derecha la INCA LP-7, ambas con imágenes del control positivo (Control con anticuerpo) y de plántulas tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . La barra representa $5 \mu\text{m}$.

Este resultado indica la presencia de MAP quinasas en los núcleos en división, aún cuando las plántulas crecieron en condiciones normales, lo que puede deberse al papel que se le ha asignado a estas proteínas, como reguladoras de la división celular.

El estudio de la activación de MAP quinasas fosforiladas o activas (pMAPK) permitió conocer dentro de todas las proteínas localizadas anteriormente, las que estaban activas y su localización. Al igual que en el estudio de las MAP quinasas totales, la localización de las MAP quinasas fosforiladas se evidenció por la señal en rojo emitida por el fluorocromo Alexa 38, pero conjugado en este caso al anticuerpo anti-pMAPK, que se une sólo a las proteínas activas o fosforiladas.

Se pudo apreciar que en las células meristemáticas de las plántulas del control de las dos variedades, se observaron escasas MAP quinasas fosforiladas en el citoplasma, en relación con la cantidad de MAP quinasas totales observadas anteriormente en estas mismas células.

Lo que indica que la mayoría de las MAP quinasas detectadas en el citoplasma se encontraban inactivas, no así en el núcleo, ya que se observó una mayor concentración de las MAP quinasas en este organelo.

Este resultado no contradice lo observado en el estudio de las MAP quinasas totales, donde se observó una mayor concentración de estas proteínas en los núcleos de las células en división (Figura 28).

En las plántulas de ambas variedades tratadas con el metal se observó que las MAP quinasas fosforiladas o activas se localizaron mayoritariamente en el núcleo, por lo que es posible que su función principal, ante estas condiciones de estrés, este relacionada con su actividad en este organelo.

Los resultados indican que las MAP quinasas totales fueron localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células meristemáticas de las plántulas del control y tratadas, ya que la activación de éstas en condiciones normales, puede conducir a otras respuestas celulares, que no están precisamente relacionadas con la toxicidad del Al, como son la diferenciación y la división celular.

Los resultados obtenidos demostraron que el Al es capaz de activar la fosforilación de las MAP quinasas en las células de la zona de división, en la radícula de las plántulas de arroz, lo que induce la activación de cascadas de señalización dirigidas al núcleo, el que está directamente relacionado con el mecanismo molecular de tolerancia al Al.

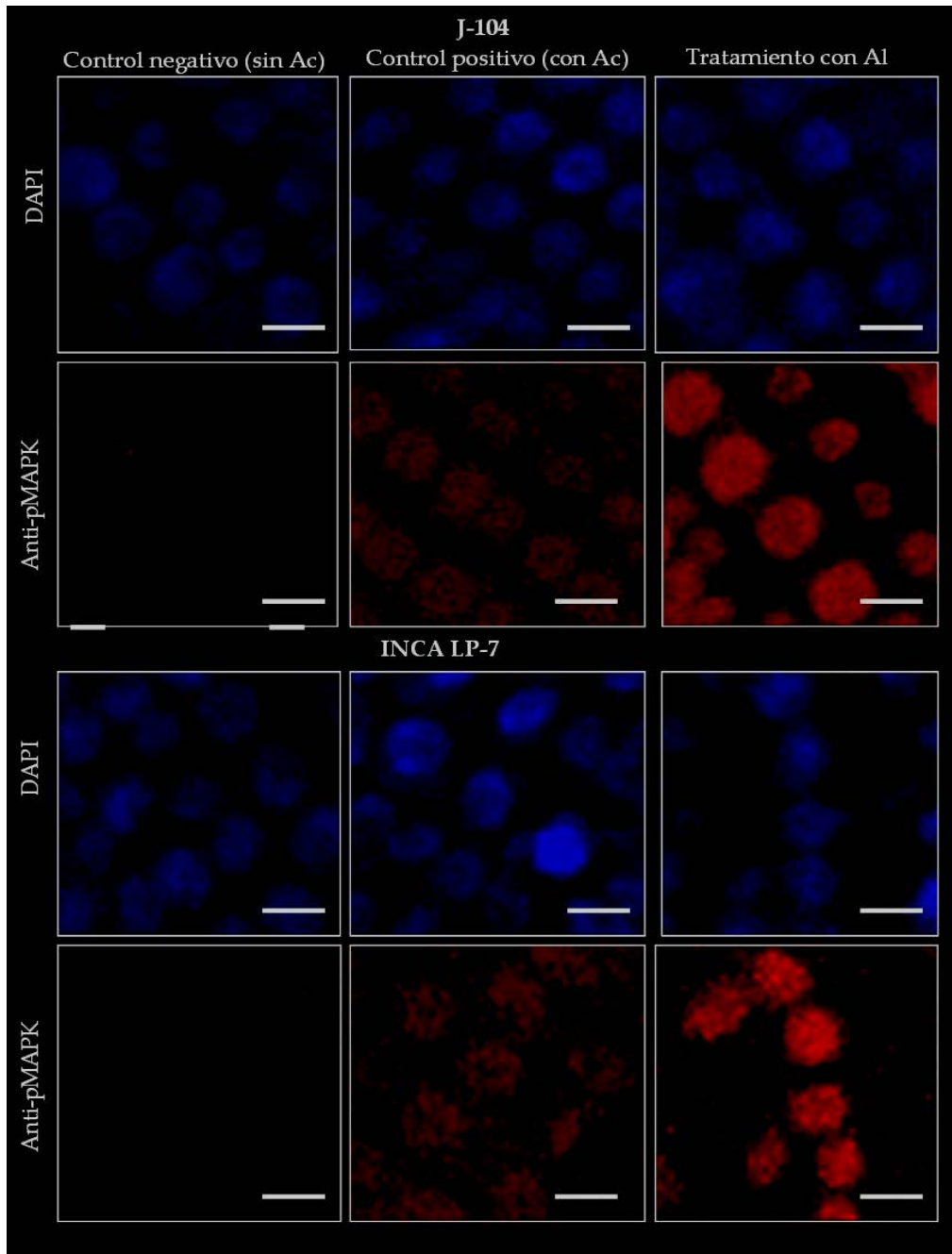


Figura 28: Fotomicrografías de células meristemáticas de la zona de división la radícula de plántulas de arroz, obtenidas en el microscopio confocal. En azul los núcleos celulares contrastados con DAPI y en rojo las MAP quinasas totales marcadas por el anticuerpo anti-pMAPK. Arriba, la variedad J-104 y abajo la variedad INCA LP-7, ambas con imágenes del control negativo (Control sin anticuerpo), control positivo (Control con anticuerpo) y de plántulas tratadas con $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de AlCl_3 . La barra representa $5 \mu\text{m}$.

5. DISCUSION

Hace algunos años se pensaba que todos los sistemas radicales eran grandes y muy ramificados, sin embargo, recientemente se ha visto que el desarrollo de los mismos está determinado por patrones característicos para cada especie, que a su vez dependen de la interacción con los factores bióticos y abióticos del suelo.

Dentro de los factores abióticos que más influyen, se pueden mencionar, la temperatura, el contenido de agua y de oxígeno, así como una elevada concentración de elementos químicos, entre los que se encuentran el aluminio y el hierro (Cox y Muday, 1994 y Vázquez, 1999).

El número de raíces que puede desarrollar una planta está determinado desde la formación del embrión, no obstante, en esta investigación se observó una tendencia al incremento de esta variable, cuando las plantas fueron expuestas a diferentes concentraciones de Al, aún cuando se ha hecho referencia a que los efectos tóxicos de este ión afectan el desarrollo de un sistema radical ramificado en algunas especies vegetales (Kochian., 1995).

La variedad INCA LP-7 exhibió un mejor comportamiento ante la presencia del Al, ya que sus plántulas emitieron un mayor número de raíces que las de la J-104. El incremento de este indicador se debe entre otras razones, a una respuesta de la planta en función de mantener la capacidad de absorción de agua y sales minerales que se ve afectada con la reducción en longitud, lo que se evidencia a través de la relación inversa que se establece entre el número de raíces emitidas por las plántulas y el crecimiento en longitud de sus radículas. Por otro lado, un mayor número de raíces adventicias garantiza la fijación de la planta al suelo y ambos elementos son indispensables para un exitoso desarrollo de la misma, sobre todo en condiciones de toxicidad por Al.

La respuesta diferencial entre las variedades sugiere que la emisión de raíces adventicias en respuesta a la toxicidad del Al, depende de la capacidad de la planta para responder ante el mismo, ya que éstas proliferan generalmente en respuesta a determinadas condiciones ambientales (Malamy y Berfeg, 1997), lo que le brinda una mayor fortaleza para enfrentar situaciones adversas.

En este contexto, se ha comprobado que el número de raíces por planta también puede cambiar en dependencia de las condiciones de crecimiento, así como de las condiciones fisiológicas de la semilla, la composición del suelo y los factores abióticos del medio (Kawata *et al.*, 1980).

Estos resultados permiten sugerir por primera vez, que el incremento en el número de raíces puede ser una respuesta adaptativa de la planta para su adaptación al medio, teniendo en cuenta que el desarrollo del sistema radical en el arroz es de vital importancia, ya que la planta adulta no desarrolla una raíz principal sino un sistema radical ramificado del cual depende su funcionamiento.

La radícula fue el centro de atención de esta investigación dentro del sistema radical, en primer lugar por la importancia que reviste en la fase de plántula y además porque garantiza una adecuada absorción de agua e iones en esta fase del desarrollo de la planta.

La primera evidencia de toxicidad fue la inhibición del crecimiento en la radícula de las plántulas expuestas al Al, alteración que se considera el síntoma más frecuente ante la presencia de este ión, ya que una reducción similar del crecimiento ha sido observada en diferentes especies de plantas (Matsumoto, 2000; Ciamporová, 2000; Tahara *et al.*, 2008). Esta inhibición del crecimiento puede variar con la concentración de Al en cada uno de los tratamientos y el tiempo de exposición al metal, similar a lo observado en plántulas de maíz (*Zea mays*) (Ciamporová, 2002). No obstante, estos parámetros no variaron durante el estudio, por lo que el comportamiento diferente que exhibió la longitud de la radícula en cada una de las variedades de arroz, sugiere que el crecimiento en longitud está determinado, para este cultivo, por el grado de tolerancia al metal. Aún más, cuando se ha visto que la intensidad de la inhibición puede diferir entre especies y entre variedades (Matsumoto, 2000).

El crecimiento radical es el resultado de la división y el alargamiento de las células radicales, razón por la que se evaluaron las afectaciones provocadas por el ión Al³⁺ en ambos procesos celulares.

Para la evaluación de los daños causados por el Al en la división celular se determinó el índice mitótico, como indicador de crecimiento, evidenciándose que el Al provoca una afectación importante en este proceso celular, ya que el porcentaje de células en la fase

mitótica disminuyó ante la presencia del ión. Sobre todo, en la variedad J-104, donde la reducción fue de un 40.2% mientras que en la INCA LP-7 fue de un 21.7 %, en relación con las plántulas del control.

La disminución de las células en mitosis sugiere la posibilidad de que el Al puede afectar algún elemento en la interfase que impida la entrada de la célula a la fase mitótica, hipótesis se basa en que el Al puede inhibir la división celular interfiriendo específicamente en la replicación del ADN.

Una vez que el ión Al^{3+} se encuentra dentro del núcleo tiene preferencia de unión por el ADN y su interacción con el mismo puede inducir cambios en la estructura de la cromatina e inhibir su actividad. Esto puede generar la síntesis de un ADN inestable, debido a una composición inusual de bases o impedir completamente la síntesis de una nueva cadena de ADN y por tanto la entrada en mitosis, similar a lo informado por algunos autores (Silva *et al.*, 2000; Matsumoto, 2000)

Por otro lado, el hecho de que el ciclo celular necesita varias horas para ser completado y el efecto del Al en la síntesis de ADN aparece después de varias horas de exposición con el metal (Kochian, 1995; Horst, 1995; Horst *et al.*, 1997), ha permitido a algunos autores afirmar que el papel primario en el estado inicial de inhibición del crecimiento radical, es el efecto sobre el alargamiento y no sobre la división celular.

Sin embargo, en una gran número de investigaciones se han apreciado algunas modificaciones en elementos relacionados con la división celular después de 24 horas de tratamiento con Al^{3+} , mientras que la inhibición de la elongación radical se ha hecho evidente en tiempos menores de 1 hora (Silva *et al.*, 2000). Por lo que en los estudios a corto plazo, los autores atribuyen la reducción del crecimiento radical a la inhibición del alargamiento, más que, a la inhibición de la división celular (Matsumoto, 2000).

Estudios que sustentan esta afirmación han sido realizados en *Allium sativum* (Clarkson, 1965), *Vigna unguiculata* (Roy *et al.*, 1989), *Avena sativa* (Horst *et al.*, 1983), *Hordeum vulgare* (Mariendfeld *et al.*, 1995), *Zea mays* (Nichol y Oliveira, 1995; Budiková, 1999) y *Allium cepa* (Ciamporová, 2002).

En el contexto de esta investigación, la inhibición de la división celular adquiere otra connotación en el mecanismo de toxicidad por Al, ya que el material nuclear puede

haberse afectado severamente como consecuencia del largo tiempo en que las plántulas estuvieron expuesta al metal.

El engrosamiento en la zona de transición del ápice radicular en las plántulas tratadas sugirió que el ión Al^{3+} podía estar provocando alteraciones en la orientación del crecimiento y por tanto en el alargamiento celular. Para demostrar la veracidad de la afirmación anterior se determinaron morfométricamente algunos parámetros celulares de crecimiento.

El análisis diferenciado de este indicador, demostró que las células se redujeron en longitud y crecieron en grosor, provocando una expansión radial de las mismas. Este desorden morfológico pudiera ser una característica común, al menos para las gramíneas que son expuestas a la toxicidad del Al, ya que resultados similares se obtuvieron en cebada (Nichol y Oliveira, 1995), trigo (*Avena sativa*) (Sasaki *et al.*, 1999) y maíz (*Zea mays*) (Sivaguru *et al.*, 1999; Blancaflor *et al.*, 1998).

Independientemente de las afectaciones que se constataron en el largo y en el ancho de las células del meristemo fundamental ante la presencia del Al, se pudo apreciar que el incremento del ancho se produjo en una magnitud superior que la reducción de la longitud celular. Esto indica que el Al afecta el alargamiento celular y que su efecto en la orientación del crecimiento, pudiera expresarse con mayor intensidad en el engrosamiento de la radícula y no en la reducción de su longitud

Por otro lado, la respuesta significativa observada tanto en el largo como en el grosor celular de las plántulas expuestas a la menor dosis de Al respecto a las del control, sugiere que $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Al pueden ser suficientes para romper la sensible dinámica de ensamble y desensamble de la red de microtúbulos y microfilamentos. Además, se evidencia la posibilidad de que el citoesqueleto pueda ser un blanco de acción importante ante la toxicidad provocada por el Al, como ha sido informado para otras especies (Baskin y Wilson, 1997; Horst *et al.*, 1999; Sivaguru *et al.*, 1999; Baluska *et al.*, 2000). Aún más, si se tiene en cuenta que el citoesqueleto es la red tridimensional de proteínas que conforman el citosol, la cual cumple un papel esencial en el mantenimiento de la forma celular entre otras funciones (Taiz y Zeiger, 2006).

A partir de estos elementos, la expansión celular que arrojó el estudio morfométrico pudiera ser explicada mediante la interacción del ión Al^{3+} con factores que influyen en la

organización del citoesqueleto, similar a como sucede en *Arabidopsis thaliana* (Baskin y Wilson, 1997), como los niveles de Mg^{2+} y Ca^{2+} en el citosol.

El Al puede unirse fuertemente a los microtúbulos y microfilamentos y sustituir los iones Mg^{2+} en los complejos con *nucleósidos di y trifosfatos*, lo que daría lugar a la formación de complejos con una razón de hidrólisis menor y por tanto no hidrolizables, Esto pudiera provocar rigidez y cambios en la orientación de los componentes del citoesqueleto, como ha sido informado por diferentes autores (Horst *et al.*, 1997; Grabsky y Schindler, 1998; Jones *et al.*, 1998). (Grabsky y Schindler, 1998).

Por otra parte, los cationes Ca^{2+} pueden ser reemplazados de la pared celular por el ión Al^{3+} , ya que aunque ambos compiten por el sitio cargado negativamente de las pectinas, éste pudiera tener una mayor preferencia sobre el catión bivalente Ca^{2+} . El reemplazo del Ca^{2+} puede acarrear alteraciones en la regulación y la orientación del crecimiento celular, a partir de que el Ca^{2+} está asociado a una gran cantidad de señales de transducción y procesos reguladores en las células vegetales, como ha sido afirmado por Jones *et al.* (1998).

Las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} pueden ser responsables de las afectaciones del transporte de las auxinas a través de la raíz y esto pudo provocar, en este caso, el engrosamiento de la radícula, ya que esta hormona además de determinar la respuesta gravitrópica de la misma a través de un transporte coordinado (Taiz y Zeiger, 2006), está relacionada con la regulación del crecimiento y la morfología de la raíz.

Como elemento novedoso se describió por primera vez un método para cuantificar el grado de curvatura de la radícula, ya que esta modificación se observó por otros investigadores en las raíces de maíz (Ciamporová, 2002), pero no se determinaron los valores, ni la variación del ángulo ante diferentes concentraciones de Al.

Independientemente de la curvatura observada en los ápices del control, como consecuencia de la respuesta gravitrópica de una raíz en posición horizontal, se pudo comprobar que este indicador cuantitativo, se incrementó ante los niveles de Al y desde las menores concentraciones. Además, la variedad más afectada fue la J-104, al exhibir una curvatura mayor que la INCA LP-7, elementos que indican que la curvatura radicular puede ser utilizada como un indicador visual de toxicidad.

Los cambios observados en el ángulo de curvatura de los ápices radiculares en las plántulas expuestas al Al, pudieran ser una consecuencia de las alteraciones provocadas por el metal en el transporte de auxinas, ya que desórdenes similares se observaron al emplear inhibidores del transporte de esta hormona en plantas de maíz (*Zea mays*) (Sivaguru, 1999b) y trigo (*Avena sativa*) (Kollmeier *et al.*, 2000).

La posible inhibición del transporte de auxinas en los ápices radiculares puede deberse al reemplazo de los iones Ca^{2+} por los iones Al^{3+} de los sitios de intercambio de la pared celular y la membrana plasmática (Wissemeier y Horst, 1995).

Este reemplazo puede generar un influjo inicial de Ca^{2+} y por tanto un incremento del Ca^{2+} citoplasmático, requisito que según algunos autores (Hossain *et al.*, 2005; Sivaguru *et al.*, 2000a), es indispensable para la activación de la enzima glucano sintasa en la membrana plasmática. De esta forma se activaría la síntesis de calosa inducida por Al, la cual que puede actuar como una barrera física que inhibe el transporte de auxina.

Aún cuando, Kolmeier *et al.* (2000) afirma que este mecanismo no está completamente esclarecido, el estudio de la calosa *in vivo*, aportó varios elementos que sustentan la hipótesis anterior.

La localización de las moléculas de calosa, a través de la fluorescencia del complejo calosa-azul de anilina, no resultó ser en forma de punteadura fina, como es característico de moléculas individuales, sino como pequeños cúmulos dispersos alrededor de las células. Este hallazgo indica que las mismas son inducidas por el Al y que pudieran depositarse con cierta preferencia en zonas específicas de la pared celular, las que pueden coincidir con las zonas de punteaduras, en las cuales se agrupan los plasmodesmos.

La deposición preferencial de calosa a nivel de estas estructuras puede causar un bloqueo efectivo del transporte de iones, péptidos, hormonas y ácidos nucleicos y por tanto de la comunicación intercelular, al igual que ha sido evaluado por algunos autores en otras gramíneas (Kauss *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2000; Sivaguru *et al.*, 2000a; Capaldi y Stefanuto, 2005; Hossain *et al.*, 2005).

El comportamiento diferente de las variedades estudiadas sustenta la hipótesis anterior, ya que en las plántulas de la variedad J-104, la calosa se observó en un mayor número de capas de células del meristemo fundamental. Lo anterior sugiere que puede haberse

provocado un bloqueo de estos comunicadores intercelulares y probablemente del transporte basípeto de auxinas. Esto pudiera traer como consecuencia que se produjera una acumulación de esta hormona en las células del meristemo fundamental, provocando la expansión celular a la que se hizo referencia anteriormente y quizás un transporte desbalanceado de la hormona provocó una mayor curvatura de los ápices radiculares.

Sin embargo, la variedad INCA LP-7 solo exhibió deposición de calosa en las dos primeras capas de células del meristemo fundamental, lo que evidencia que el transporte de las auxinas puede haber sido menos afectado por el Al y provocar una menor curvatura en la radícula de estas plántulas.

El bloqueo estructural de la comunicación intercelular a través de los plasmodesmos puede deberse a que la pared celular alrededor de éstos, se divide estructuralmente en un collar amorfo interno que está rodeado por una zona periférica, en la cual la calosa puede entremezclarse con el material fibrilar de la pared (Baluska *et al.*, 2000) y permanecer allí. Otro elemento que permite reforzar la hipótesis anterior, es que los transportadores de esta hormona en las membranas de células protodérmicas y del meristemo fundamental, pudieran estar localizados en zonas muy cercanas a los plasmodesmos, ya que una ubicación similar de estos transportadores ha sido informada en células meristemáticas de *Arabidopsis thaliana* (Muller *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*, 2000a).

Ambos elementos permiten sugerir que la deposición de moléculas de calosa en la pared que rodea el plasmodesmo, puede bloquear físicamente el poro y de esta forma reprimir la actividad de los transportadores de auxinas y de otros componentes celulares, lo que contribuyó a la inhibición del crecimiento.

Los resultados discutidos evidencian que aunque el mecanismo de síntesis de la calosa inducido por Al, puede provocar cambios estructurales en la pared celular, no interviene como mecanismo de tolerancia al metal. Esto se debe a que la variedad más afectada exhibió una mayor cantidad de calosa, lo que indica que es una consecuencia de los efectos provocados por el metal y no una modificación estructural para impedir la entrada del mismo a la raíz.

La localización del Al en la radícula, mediante la tinción con hematoxilina está acorde con los resultados anteriores, ya que cuando las plántulas de la variedad J-104 fueron expuestas a $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Al, los ápices radiculares tomaron una tonalidad azul-violeta,

lo que evidencia una mayor incorporación del ión a la radícula. Mientras los ápices de la variedad INCA LP-7, sólo llegaron a exhibir esta coloración en forma de puntos, lo que indica que la entrada del ión fue mucho más limitada.

Este colorante tiene la propiedad de tornarse azul-violeta cuando forma un complejo específico con el ión Al^{3+} , el que puede facilitar su penetración y retención en la raíz. Además, la intensidad del color en los ápices radicales teñidos, es una medida cuantitativa de la sensibilidad al Al, según algunos autores (Ruiz-Torres y Carver, 1992; Cancado *et al.*, 1999), lo que se debe a que los genotipos susceptibles tienden a acumular grandes cantidades del metal en los tejidos radicales. Por tanto, la tinción con hematoxilina, que ha sido una forma no destructiva de estudiar la sensibilidad al Al en varias especies de plantas (Delhaize *et al.*, 1993; Wagatsuma *et al.*, 1995; Cancado *et al.*, 1999; Gunsé *et al.*, 2003), permitió detectar si las variedades estudiadas absorbían más o menos Al.

Este hallazgo evidenció que la variedad J-104 no posee mecanismos eficientes de tolerancia, lo que la hace más vulnerable al efecto tóxico de este ión. No obstante, la localización del ión en la INCA LP-7 concuerda con el comportamiento que mostró esta variedad ante los indicadores de crecimiento y demuestra que la misma posee un mayor grado de tolerancia ante el estrés por Al.

Esto pudiera deberse a que posee la capacidad de excluir el Al de forma eficiente, mediante la exudación de compuestos orgánicos capaces de quelar el Al extracelularmente y formar complejos no tóxicos para las plantas, como se ha visto en diferentes investigaciones (Delhaize y Ryan, 1995; Kochian, 1995; Ma *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*, 2000; Matsumoto, 2000). Este mecanismo se puede relacionar con la existencia de canales aniónicos dependientes de Al en esta variedad, teniendo en cuenta que en plantas tolerantes de trigo (Ryan *et al.*, 1997) y maíz (Piñeros y Kochian, 2001) se ha evidenciado una elevada densidad de estos canales.

Otro elemento a destacar es que en los exudados radicales de algunas especies, se han identificado diferentes ácidos orgánicos inducidos por el Al, entre los que se encuentran el citrato, el malato y el oxalacetato (Delhaize y Ryan, 1995; Ma *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*, 2000; Matsumoto, 2000). En este caso pudiera ser más probable la exclusión del oxalacetato, el cual se ha detectado en otras gramíneas como el trigo y el arroz, además

ha jugado un papel importante en la detoxificación de cadmio y cobre (Kolmeier *et al.*, 2001; Ma y Miyasaka, 1998).

Teniendo en cuenta las consideraciones realizadas en relación con los posibles mecanismos de exclusión y los resultados obtenidos en los indicadores de crecimiento, se puede sugerir que esta técnica permitió confirmar el grado de tolerancia al Al de las variedades en estudio.

De forma similar se empleó esta técnica en raíces de trigo y maíz (Delhaize *et al.*, 1993), donde resultó ser una vía confiable y rápida para determinar la sensibilidad a este ión, entre los distintos genotipos.

El análisis de las secciones transversales de la radícula sustenta el análisis anterior. En las mismas se detectó el Al unido a las paredes de las células protodémicas y más externas del meristemo fundamental, para el caso de la variedad INCA LP-7, mientras que en la J-104, el Al fue transportado más al interior de la raíz, observándose también en las meristemáticas más internas.

La ubicación del Al se debe a que la pared celular posee una elevada densidad de cargas negativas, por lo que es un importante sitio de unión con otros iones (Sivaguru *et al.*, 2000b; Zheng *et al.*, 2005; Eticha *et al.*, 2005). Las interacciones que se producen con los componentes de la misma pueden restringir el ablandamiento de la pared y por tanto el crecimiento celular, como sucedió en las células radicales de trigo (Ma *et al.*, 2004) y maíz (Kochian *et al.*, 2004).

Los resultados permiten sugerir que, además de la acumulación de calosa a nivel de los plasmodesmos, la deposición de precipitados de Al, puede ser la causa fundamental de los cambios observados en las paredes longitudinales de las células del meristemo fundamental, ya que el Al puede alterar la composición de la pared, así como sus propiedades mecánicas (Sivaguru *et al.*, 2000b). Además, en los estudios de tolerancia a este metal, se ha abordado con mucha fuerza la interacción con los fosfatos (Ma *et al.*, 1997a; Ma y Miyasaka, 1998, Ma y Hiradate, 1998; Shen *et al.*, 2002).

Por lo que se puede inferir que el ión Al^{3+} pudo haber sido inmovilizado por los grupos fosfatos de la membrana plasmática, teniendo en cuenta que el Al tiene 560 veces más afinidad que el Ca por la fosfatidilcolina (Zheng y Yang, 2005) y permanecer en forma de

precipitados insolubles (fosfato de aluminio) en el apoplasto, como sucede en los tejidos radicales de trigo (Mariendfeld *et al.*, 1995) y maíz (Zheng *et al.*, 2005).

La deposición de precipitados insolubles de Al pudiera afectar la estructura de la pared celular de las células más externas del meristemo fundamental, haciéndola más gruesa y rígida, lo que disminuye la extensibilidad mecánica de la misma y conduce inevitablemente a la pérdida de la elasticidad necesaria para la elongación.

La formación de éstos compuestos puede ser una ventaja, si se tiene presente que generalmente, los precipitados que se forman no son tóxicos para las plantas (Zheng *et al.*, 2005). Además, puede retardar la entrada del ión al citosol, disminuyendo su efecto tóxico. Por otra parte, de esta forma se puede fijar el Al en las células más externas, para que solo pequeñas cantidades sean transportadas hacia la zona central de la raíz.

Liao *et al.*, (2006), desarrollaron un experimento en cebada que apuesta a esta teoría, en el que se sugirió que el fosfato de aluminio en la superficie radical puede secuestrar el Al para impedir su incorporación a la raíz. Resultados similares fueron observados en las células radicales en *Triticum aestivum* (Taylor, 1995), donde se hallaron acumulados importantes de precipitados insolubles de Al y fosfatos y en *Avena sativa* (Mariendfeld *et al.*, 1995) y *Zea mays* (Liao *et al.*, 2006), donde además fue encontrada una correlación positiva entre las concentraciones de Al y fosfato en la pared celular.

Los resultados de la localización de Al en ambas variedades, indican que ésta es una posibilidad para disminuir la incorporación del Al hacia el interior de la raíz, sobre todo en especies tolerantes, en las cuales se utiliza eficientemente el fósforo, que es escaso en este tipo de suelos y simultáneamente se detoxifica el ión Al^{3+} en aras de poder adaptarse a la hostilidad del mismo.

De todos los mecanismos de tolerancia al Al, los menos estudiados son los que se activan una vez que el ión está dentro de la célula, no obstante, se pudo apreciar un incremento en el número y en el diámetro de las vacuolas en las células de las secciones longitudinales de la radícula. Por otro lado, se definieron pequeños cúmulos de iones Al^{3+} dentro de las mismas células en las que el estudio microscópico arrojó una intensa vacuolización. Este resultado se hizo más evidente en la variedad susceptible y se incrementó con la intensidad de la exposición al metal, lo que permite especular su posible almacenamiento dentro de las vacuolas.

Los indicios anteriores, sugirieron la presencia del secuestro vacuolar, como un posible mecanismo de tolerancia al Al, aspecto que ha sido referido recientemente por algunos autores (Zheng y Yang, 2005; Shahk y Nongkynrih, 2007).

La hipótesis anterior se puede explicar ya que una vez que el ión Al^{3+} está dentro del citosol, se dispara la bomba de protones del tonoplasto (Morita *et al.*, 2008), lo que permite el almacenamiento del H^+ citosólico. En este caso el Al^{3+} puede ser transferido a la vacuola por una reacción de intercambio (Matsumoto, 2000). Esto permite mantener secuestrado al ión dentro de la vacuola y así minimizar su efecto tóxico sobre los diferentes componentes celulares, lo que puede constituir una respuesta adaptativa de la planta al estrés por Al y además puede mantener la homeostasis celular.

El incremento en la vacuolización celular funciona como una respuesta al estrés en algunas especies vegetales (Ouzounidou *et al.*, 1995; Ciamporová, 2002, Sam *et al.*, 2003) y se ha observado en las raíces de otras gramíneas en respuesta al Al, entre las que se encuentran, la cebada (Marienfeld *et al.*, 1995), el trigo (*Avena sativa*) (Matsumoto, 2000) y el maíz (*Zea mays*) (Budikova *et al.*, 1997; Votrubová *et al.*, 1997; Clune y Copeland, 1999; Vázquez *et al.*, 1999).

Los resultados indican que hay una mayor entrada del Al a las células de la variedad J-104 respecto a la INCA LP-7, razón por la cual esta variedad pudiera desencadenar un mecanismo de almacenamiento intracelular a través del secuestro vacuolar, el cual puede variar con las características de la exposición al metal, según refieren algunos trabajos (Eleftheriou *et al.*, 1993; Vázquez *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2008). Esto pudiera disminuir los efectos tóxicos que puede provocar el ión en el citoplasma, entre los que se encuentran los cambios en los planos de división de células meristemáticas, como ha sido observado en raíces de maíz (Budikova *et al.*, 1997).

No obstante, esta variedad fue la más afectada en todos los indicadores evaluados, lo que indica que el secuestro del ión en las vacuolas no funciona en estos genotipos como un mecanismo de tolerancia, ya que ni siquiera un intenso secuestro vacuolar permitió a la misma evadir los efectos tóxicos del metal. Por tanto, la J-104 no es capaz de tolerar las dosis de Al empleadas (30, 65 y 125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), teniendo en cuenta que la mayoría de los indicadores evaluados sufrieron una afectación evidente cuando las plántulas fueron

expuestas a la menor concentración del metal.

A partir de los indicios que arrojó la localización del Al en los ápices radiculares se sugiere que en el arroz, como en otras gramíneas, el mecanismo que debe desempeñar el papel fundamental en la tolerancia al Al, no es el secuestro vacuolar, sino los mecanismos de exclusión, ya que numerosas evidencias han sido expuestas en este sentido (Delhaize y Ryan, 1995; Kochian, 1995; Ma *et al.*, 1998; Sivaguru *et al.*, 2000a; Matsumoto, 2000). Diversos estudios genéticos y bioquímicos sobre la señalización del estrés han aportado evidencias que indican la importancia de las MAP quinasas en la regulación del estado fisiológico de la planta y su expresión génica en respuesta a varios estreses. La actividad de las MAP quinasas es regulada a través de una cascada de fosforilaciones, que puede conducir a varias respuestas celulares, como la diferenciación y la división celular, elemento que hizo pensar en una posible activación de las mismas ante la presencia del Al.

Recientemente se ha demostrado que la vía de las MAP quinasas, es activada en arroz (Yeh *et al.*, 2003, 2004) y en alfalfa (Jonak *et al.*, 2004) en respuesta a algunos metales pesados, como el Ni, Cu, Cd, Fe y Zn (Yeh *et al.* 2003, 2004; Lin *et al.* 2005; Tsai y Huang 2006). Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que la vía de transducción de la señal de las MAP quinasas opera durante la respuesta inducida por el Al^{3+} , razón por la cual su estudio constituye una novedad.

Se evidenció además que en las plántulas del control de las dos variedades estudiadas, las MAP quinasas totales, se encuentran dispersas en el núcleo y el citoplasma, en bajas concentraciones, lo que no contradice las funciones que les han sido asignadas por Chen *et al.* (2007), en estas estructuras celulares para garantizar un buen funcionamiento de la célula.

En los núcleos de las células en división se encontró una mayor cantidad de las mismas, lo que puede deberse a que estas proteínas, además de formar parte de cadenas de fosforilación activadas en respuesta al estrés, es posible que participen en la construcción del fragmoplasto o en la regulación del transporte de vesículas hacia el plato celular, como informaron algunos autores (Pitzschke y Hirt, 2006, Jonak *et al.*, 2004), lo que evidencia su función en la citocinesis y razón por la cual han sido identificadas por Ligterink, (2000) como reguladoras del ciclo celular en las plantas.

La presencia de las MAP quinasas totales en el citoplasma de las células puede deberse a su capacidad de fosforilar las proteínas del citoesqueleto, probablemente en función del crecimiento celular. Sin embargo su localización en el núcleo, puede responder a que estas proteínas, además de fosforilar, pueden ser fosforiladas y así son transportadas al núcleo celular, para activar factores de transcripción, en función de dar una respuesta adecuada ante la toxicidad por Al (Coronado *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008).

Los primeros estudios que relacionaron las MAP quinasas con el ciclo celular, fueron desarrollados por Katsuta y Shibaoka (1992), quienes observaron un bloqueo de la entrada en mitosis y desensamble de la banda de preprofase, al imponer un tratamiento con inhibidores de proteínas quinasas. En las mismas condiciones, Wolniak y Larsen (1995) detectaron prolongación de la metafase.

Independientemente de que el estudio de las MAP quinasas totales aportó elementos novedosos acerca de su distribución y sus posibles funciones dentro de la célula en condiciones normales, los resultados de la localización nuclear de las MAP quinasas activas en las plántulas tratadas con Al, demuestra que la vía de señalización de las MAP quinasas opera como parte del mecanismo de transducción de la señal que se desencadena ante la presencia del Al.

Otro elemento a destacar es que las plántulas, estuvieron un tiempo prolongado ante la presencia del Al y esto pudo provocar daños irreparables en las membrana. Lo anterior permite sugerir que la activación de la vía de las MAP quinasas, en este caso, también pudiera estar relacionada con el estrés oxidativo que se genera ante una prolongada exposición con el ión Al^{3+} , como sucede con otros iones metálicos, como el Cd^{2+} y el Cu^{2+} , los cuales inducen la generación de radicales libre y especies activas del oxígeno (Yeh *et al.*, 2007).

El Al puede ser incorporado a la células mediante transportadores y una vez que está en el citosol pudiera pasar a diferentes organelos, donde se generarían las especies activas del oxígeno, debido al potencial redox del metal o a los efectos del mismo sobre el metabolismo (Yeh *et al.*, 2007). El exceso de estas especies activas del oxígeno puede causar un desbalance en este potencial y desencadenar posibles vías de señalización, entre ellas la de las MAP quinasas, las que son transportadas al núcleo para activar allí factores de transcripción que regulan la expresión génica para la respuesta al estrés.

La activación de las MAP quinasas citoplasmáticas, permite sugerir que esta vía de transducción de la señal, también puede regular la organización del citoesqueleto, teniendo en cuenta que éste, no es más que una estructura dinámica de componentes proteicos y está formado fundamentalmente por microtúbulos y microfilamentos. Éstos han sido implicados en una amplia variedad de funciones celulares, entre las que se encuentra la expansión celular, fenómeno que se discutió con anterioridad.

Teniendo en cuenta las modificaciones estructurales detectadas ante la presencia del Al, así como las posibles consecuencias fisiológicas en el funcionamiento del mismo, se propone un modelo de acción del ión Al^{3+} en la célula radical de la planta de arroz (Figura 29). El mismo constituye una novedad, ya que por primera vez se integran los efectos del Al en la célula radical, haciendo énfasis en la relación estructura-función.

La explicación del mismo, es posible teniendo en cuenta que la pared celular es la primera estructura con la que interactúa el ión Al^{3+} y es portadora de una gran cantidad de cargas negativas, por lo que el ión Al^{3+} puede unirse a ella, a través de los sitios de unión del Ca^{2+} , los grupos fosfatos (Zheng *et al.*, 2005) y de forma preferencial a los grupo COO^- y OH^- de las pectinas, lo que sido informado por diferentes autores (Blamey y Dowling, 1995; Chan *et al.*, 1999; Sivaguru *et al.*, 2000b).

Los grupos COO^- y OH^- de las pectinas, también son sitios de unión de los iones Ca^{2+} y aunque ambos compiten por el sitio cargado negativamente de las pectinas, el ión Al^{3+} tiene una mayor preferencia sobre el catión bivalente Ca^{2+} (Hossain *et al.*, 2005), por lo que pudiera reemplazarlo de la pared celular [Figura 29 (3)].

La liberación de estos iones pudiera generar un incremento del Ca^{2+} citoplasmático y provocar alteraciones en la regulación y la orientación del crecimiento celular (Jones *et al.*, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que el Al puede bloquear los canales de Ca (Jones y Kochian, 1995) mediante su unión al sitio receptor del canal o interfiriendo en las proteínas asociadas al mismo (Rengel, 1996). Además, puede ocupar el sitio de unión del Ca^{2+} en enzimas y proteínas y desestabilizar el complejo que requieren las ATPasas de Ca^{2+} para su funcionamiento (Hossain *et al.*, 2005)

No obstante, es posible que la despolarización inicial de la membrana plasmática provocada por la interacción del Al, active algunos canales Ca^{2+} dependiente de voltaje y

se genere un pequeño influjo de este ión, como se ha comprobado en raíces de trigo (Lindberg y Strid, 1997), el cual pudiera ser suficiente para activar algunos mecanismos relacionados con la citotoxicidad del Al en la raíz, entre los que se puede encontrar, la síntesis de calosa.

Se ha visto que la calosa es sintetizada por la enzima glucano sintasa, la que se localiza en la membrana plasmática y se activa con un incremento en el Ca^{2+} citoplasmático (Sivaguru *et al.*, 2000a) (Figura 29 [3]).

A partir de los resultados, se puede sugerir que las moléculas de calosa sintetizadas pudieran acumularse en los plasmodesmos y causar la obstrucción del poro, lo que puede interrumpir la comunicación intercelular. Por otro lado, su posible ubicación alrededor del poro, pudiera bloquear los transportadores de auxinas, que en estas mismas células, pero en raíces de maíz, se localizan cercanos a los plasmodesmos (Horst *et al.*, 1997). De esta forma se puede limitar el transporte de la hormona, provocando inhibición en el crecimiento radicular.

Es importante notar, que la deposición de calosa pudiera generar un engrosamiento de la pared celular, al igual que los precipitados de Al, los que se pueden formar como consecuencia de la interacción del Al con el P, probablemente, como parte de un mecanismo de secuestro por fosfato (Figura 29 [3]).

Independientemente de que el ión Ca^{2+} está asociado a una gran cantidad de señales de transducción (Jones *et al.*, 1998; Hossain *et al.*, 2005), este ha sido considerado un elemento necesario pero no suficiente para la activación de diferentes sistemas de MAP quinasas (Ligterink, 2000).

Diversos receptores de quinasas se han encontrado como parte del mecanismo molecular y celular de respuesta ante un estímulo externo (He *et al.*, 1998, Sivaguru *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2008) y se ha demostrado que los receptores de quinasas asociados a las paredes celulares son una subfamilia de receptores que juegan un papel crítico dentro del mecanismo de comunicación en las plantas (Kohorn, 2000).

Algunos estudios en *Arabidopsis*, evidencian su relación con diferentes funciones, incluyendo la resistencia a patógenos (He *et al.*, 1998), la tolerancia a metales pesados (Sivaguru *et al.*, 2003) y el desarrollo de la planta (Wagner y Kohorn, 2001).

Lo anterior permite sugerir que la activación de las MAP quinasas ante la presencia del AI pudiera estar mediada por receptores de este tipo, que pueden unirse covalentemente a las pectinas de las paredes celulares, similares a los identificados en raíces *Arabidopsis thaliana* (Sivaguru *et al.*, 2003).

Los receptores de quinasas se dimerizan después de recibir la señal, así sus múltiples residuos de tirosina son autofosforilados y actúan como sitios ensambladores de diferentes complejos proteicos que están encargados de reclutar proteínas quinasas de las membranas, para iniciar la cascada de las MAP quinasas.

Esta vía de señalización está formada por una cadena de fosforilaciones (MAPKKK, MAPKK, MAPK) que tienen lugar en el citoplasma, de manera que pueden fosforilar a otras proteínas del citoesqueleto, probablemente en función del crecimiento celular (Figura 29 [5]).

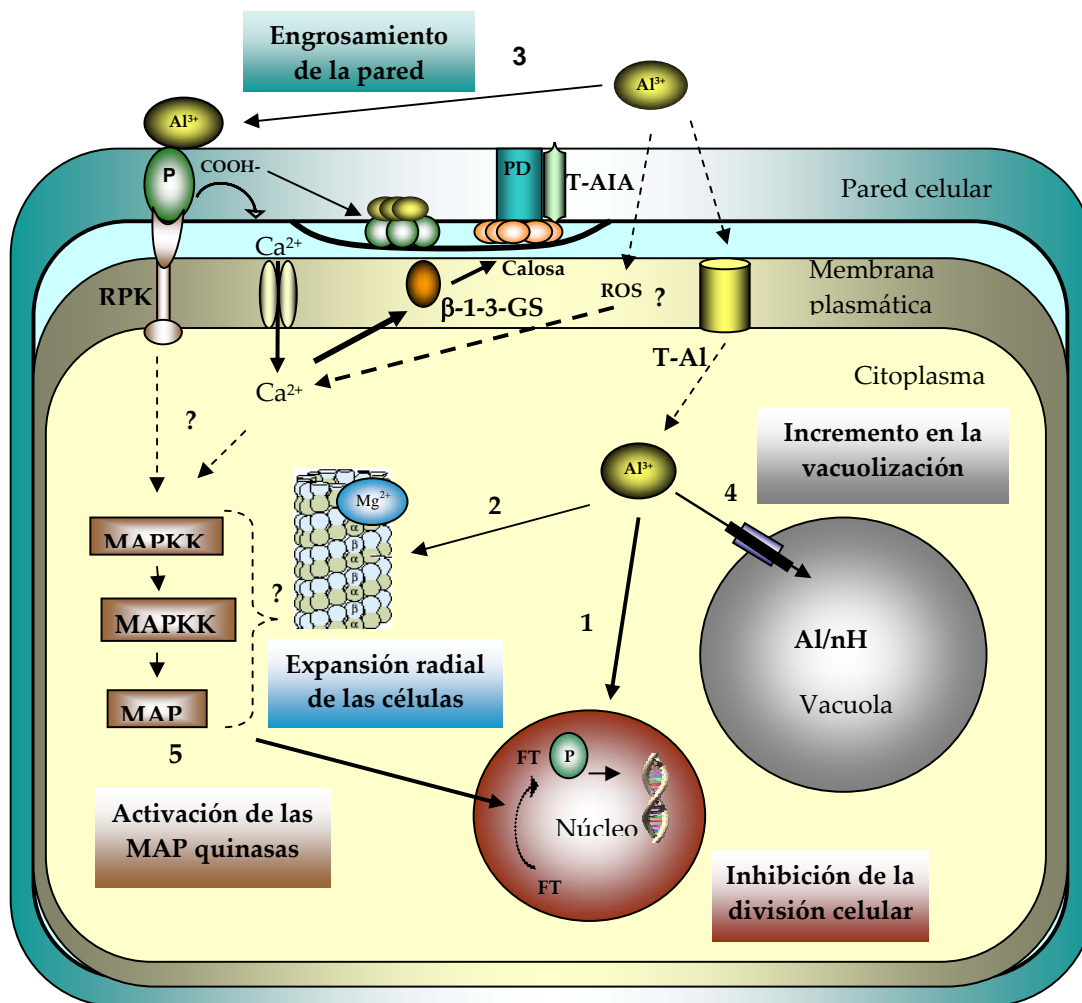


Figura 27: Modelo de acción del ion Al^{3+} en las células radicales del arroz. 1) El Al una vez incorporado al citosol a través de transportadores (T-Al) de membrana, es atraído químicamente por el núcleo, donde puede unirse al material nuclear e interferir en la replicación del ADN, lo que inhibe la división celular. 2) El Al citosólico puede desplazar a los iones Mg^{2+} de los GTP y GDP que enlazan los microtúbulos y los microfilamentos, lo que puede causar rigidez en la estructura del citoesqueleto y provocar cambios en su orientación que generan una expansión de la célula en sentido radial. 3) El Al puede interactuar con los componentes de la pared celular desplazando el ion Ca^{2+} de sus sitios de intercambio, así se genera un influjo inicial de este ion, lo que activa la enzima β 1-3 glucano sintasa (β -1-3-GS) responsable de la síntesis de la calosa. La calosa sintetizada puede acumularse alrededor de los plasmodesmos (PD), bloqueando el poro y los transportadores de auxinas (T-AIA) que se localizan cercanos a él. Esto provoca un engrosamiento de la pared, al igual que el precipitado insoluble depositado en el apoplasto como consecuencia de la interacción del Al con el P. 4) La entrada del Al al simplasto dispara la bomba de protones del tonoplasto como parte del mecanismo de secuestro vacuolar, donde el ion que puede ser transferido a la vacuola por una reacción de intercambio Al/nH, para minimizar su efecto tóxico sobre los diferentes componentes celulares y mantener la homeostasis celular. 5) El Al puede unirse a receptores de quinasas en la pared celular, los cuales disparan una serie de eventos que activa la cascada de señalización de las MAP quinasas, las que puede fosforilar proteínas en el citoesqueleto o ser transportadas al núcleo para activar allí factores de transcripción (FT) en función de la respuesta al estrés. El influjo de iones Ca^{2+} hacia el simplasto puede ser reforzado por la liberación de especies activas de

oxígeno (ROS) debido a que largo tiempo de exposición con el metal puede haber provocado un estrés oxidativo.

(Las líneas discontinuas indican las incógnita que aún posee el modelo y las líneas continuas representan los mecanismos que se activan por el Al sobre la base de las evidencias experimentales).

Lo anterior se fundamenta en que esta subfamilia de receptores de quinasas son proteínas transmembrana que perciben el estímulo en su dominio extracelular y trasmiten la señal a través de su dominio citoplasmático. Lo que permite confirmar que las moléculas que interactúan con la membrana y la pared celular no solo tienen un papel estructural, dado por sus dominios extracelulares, sino que también determinan su función a través del dominio citoplasmático y por ello pueden actuar en la comunicación entre apoplasto y citoplasma (Sivaguru *et al.*, 2003; Gouget *et al.*, 2006)

En relación con el mecanismo que involucra al citoesqueleto como blanco del Al, se postula que el Al puede incorporarse al citosol mediante transportadores de membrana y unirse fuertemente a los microtúbulos y microfilamentos, debido al desplazamiento de iones Mg^{2+} , por el ión Al^{3+} en los complejos con *nucleósidos di* y *trifosfatos* (Horst *et al.*, 1997; Grabsky y Schindler, 1998; Jones *et al.*, 1998). La misma se basa en que las sustituciones provocan rigidez en la estructura y cambios en la orientación de las mismas, probablemente por la formación de complejos no hidrolizables, ya que el ion Al^{3+} puede unirse 10^7 veces mejor que el Mg^{2+} a estos compuestos y la razón de hidrólisis del complejo formado con el Al, es 10^5 veces menor que la del complejo fisiológico con el Mg^{2+} (Grabsky y Schindler, 1998). (Figura 29 [2]).

Las MAP quinasas, además de permanecer en el citosol, pueden ser fosforiladas y dirigirse al núcleo para activar factores de transcripción, en función de dar una respuesta adecuada ante la toxicidad por Al (Coronado *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008) (Figura 27 [5]). También pueden permanecer en el núcleo por su responsabilidad en la regulación del ciclo celular, el cual se inhibe ante la presencia del Al, posiblemente por su interferencia en la replicación del ADN.

El núcleo posee una gran cantidad de cargas negativas (Silva *et al.*, 2000), por lo que puede atraer químicamente a los iones Al^{3+} , lo que puede justificar una acumulación preferencial alrededor del mismo y con ello la posibilidad de ser incorporados a través del poro e interactuar directamente con el material nuclear, impidiendo la entrada en mitosis

(Figura 29 [1]). Al no poder completarse el ciclo celular, inevitablemente se afecta el proceso de división celular, lo que contribuye a la inhibición del crecimiento radical.

Una vez que el ión Al^{3+} entra a la célula se produce un desbalance el pH citosólico, lo que puede conducir a una activación de la bomba de protones del tonoplasto, según lo informado por Morita *et al.* (2008), para almacenar el H^+ citosólico y recuperar la estabilidad del pH y en este contexto, el Al^{3+} pudiera ser transferido a la vacuola por un simporte con H^+ .

Es necesario destacar que aún cuando las evidencias obtenidas no apuntan al secuestro vacuolar como un mecanismo de tolerancia al Al, en las variedades estudiadas, el hecho de poder mantener secuestrado al ión Al^{3+} dentro de la vacuola permite minimizar su efecto tóxico sobre los diferentes componentes celulares (Figura 29 [4]).

De forma general, la mayoría de los indicadores evaluados en este estudio demostraron una mayor afectación en la variedad J-104, lo que permite afirmar que es más sensible que la INCA LP-7 ante la toxicidad del Al.

La evaluación morfológica de los sistemas radicales mostró un incremento en el número de raíces emitidas por las plántulas ante el aumento en la dosis de Al, de manera que pudiera ser una respuesta primaria de la planta para su adaptación al medio. Al mismo tiempo las raíces mostraron desórdenes morfológicos importantes que pudieran ser característicos de las gramíneas ante la presencia de este ión.

Como aspecto novedoso, los ápices radiculares se curvaron ante la presencia del metal, por lo que se sugirió que en la práctica, la curvatura radicular puede ser utilizada como un indicador de toxicidad al Al. Además, esta modificación puede ser cuantificada por el método que se describe para determinar el ángulo de curvatura de la radícula.

La reducción que se constató en la longitud radicular fue causada en primer lugar por la inhibición de la división celular, lo que se demostró a través de una reducción en el índice mitótico. También se comprobaron alteraciones en la orientación del crecimiento celular, fenómeno que estuvo dado por una reducción en longitud y una expansión en sentido radial de las células del meristemo fundamental, que condujeron al engrosamiento de la radícula. Ambas alteraciones se expresaron en la inhibición del crecimiento radicular.

El Al indujo la formación de calosa probablemente a nivel de los plasmodesmos en las paredes celulares y esta deposición puede haber limitado el transporte de las auxinas,

provocando una expansión celular y posiblemente la curvatura observado en los ápice radiculares.

Por otro lado, la localización del Al permitió, en primer lugar, demostrar que se acumula principalmente en las paredes de las células más externas del meristemo fundamental. Lo que se debe, probablemente, al funcionamiento de un mecanismo de secuestro por fosfatos en la cara externa de la membrana plasmática, lo que evita la entrada del metal al citosol y favorece su adaptación a la hostilidad del medio.

Por tanto, es posible que la deposición de calosa y la presencia de precipitados de fósforo en la pared celular hayan provocado un engrosamiento de la misma, lo que condujo a una disminución en su extensibilidad y por tanto a una inhibición del crecimiento celular.

En un inicio, se pensó en la posibilidad de un mecanismo de secuestro vacuolar para minimizar la citotoxicidad del ión Al^{3+} en el citosol. No obstante, los resultados que arrojó el estudio de la vacuolización indicaron que éste, no un mecanismo de tolerancia al Al en los genotipos estudiados.

Como aporte teórico importante, se demostró que el Al, como otros metales pesados, activa la vía de señalización de las MAP quinasas en el arroz, las que además de cumplir sus funciones en las condiciones normales de la célula, se activan ante la toxicidad de este elemento para regular la expresión genética en función de la respuesta al estrés.

Este cúmulo de evidencias permite conocer de forma integrada, como este ión tóxico interactúa con diferentes componentes en la célula radical, como parte de los mecanismos de toxicidad y tolerancia activados por él. Además, se demuestra la necesidad de conocer todo y cada uno de los cambios estructurales que se producen en la raíz de una planta, para llegar a comprender realmente los procesos fisiológicos que tienen lugar en ella.

6. CONCLUSIONES

1. El Al provocó modificaciones en la anatomofisiología del sistema radical de plántulas de arroz, sin embargo, no todas ellas, están relacionadas con la tolerancia al metal.
2. La localización del Al en la radícula y el menor grado de afectación en los indicadores de crecimiento anatomorfológicos demostraron que la variedad J-104 es más sensible que la INCA-LP7 a los efectos tóxicos del Al.
3. El incremento en el número de raíces adventicias como consecuencia de las afectaciones provocadas en el crecimiento radical, constituye una respuesta adaptativa de la planta de arroz ante la toxicidad del Al.
4. El ángulo de curvatura radicular constituye un indicador visual de toxicidad por Al en la planta de arroz y puede constituir una metodología de discriminación de tolerancia.
5. La respuesta diferencial provocada por el efecto tóxico del Al en los procesos de división y alargamiento celular, son indicadores de tolerancia que limitan el crecimiento de la célula y por tanto de la radícula.
6. La inducción de la síntesis de la calosa, el secuestro vacuolar y la activación de las MAP quinasas provocan desórdenes fisiológicos en la radícula, pero no participan en el mecanismo de tolerancia al Al.
7. 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.
8. Se estableció un modelo que explica el mecanismo de acción del ión Al^{3+} , en la célula radical de la planta de arroz.

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Continuar estudios de microscopía electrónica para determinar las alteraciones provocadas por este metal en la ultraestructura de la célula radical.
- ❖ Profundizar en los efectos tóxicos del Al y los mecanismos que se desencadenan en otras fases del cultivo.
- ❖ Se propone el empleo de la Tinción con Hematoxilina, como un método confiable y sencillo para determinar la sensibilidad al Al en el cultivo del arroz.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agrawal G.K., Iwahashi H., Rakwal R. **2003**. Rice MAPKs. **Biochem Biophys Res Commun.** 302: 171–180.
2. Ahn S.J., Sivaguru M., Osawa H., Chung G.C., Matsumoto H. **2001**. Aluminum inhibits the H⁺-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology.** 126: 1381–1390.
3. Alfano F., Russell A., Gambakdella R., Duckett J.G. **1993**. The actin cytoskeleton of the liverwort *Riccia fluitans*: effects of citochalasin B and aluminium ions on rhizoid tip growth. **J. Plant. Physiol.** 142: 569-574.
4. Alvarez I., Sam O., Reynaldo I. **2005**. Alteraciones celulares inducidas por el ión Al³⁺ en dos variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa* L.). **Cultivos Tropicales.** 26: 61-64.
5. Baluska F., Volkmann D., Barlow P.W. **2000**. Hormone-cytoskeleton interactions. In: Biochemistry And molecular Biology of plant hormone. (eds) Libbenga, M., Hall, P.J.J. Hooykaaseds. Elsevier Publishing, Leiden, The Netherland. 540 pp.
6. Barceló J., Postchenrieder C. **2002**. Fast root growth response, root exudates, and internal detoxification, as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environ. Exp. Bot.** 48: 75-92.
7. Bartlett R.J., Riego D.C. **1997**. Effect of chelation on the toxicity of aluminium. **Plant Soil.** 37: 419-423.
8. Baskin T.I., Wilson J.E. **1997**. Inhibitor of protein kinase and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. **Plant Physiol.** 113: 493 - 502.
9. Bayley P.M., Sharma K.K., Martin S.R. **1994**. Microtubule dynamics in vitro. In: Microtubule. (eds) Hyams, J.S., Lloyd, C.W. Wiley-Liss. 283 pp.
10. Bennet R.J. **1995**. The use of hematoxylin in screening perennial ryegrass (*Lolium perenne*) for aluminium tolerance. **S. Afr. J. Plant. Soil.** 12: 65 -72.
11. Bennet R.J. **1998**. The aluminium response network in wheat (*Triticum estivum* L.): Y.The root growth reaction. **S.Af. J. Plant. Soil.** 15: 38 - 45.
12. Bennet, R.J., Steward, A. **1999**. The aluminium response network in perenial reygrass (*Lolium perenne*): II. Water fluxes and ion transport. **S. Afr. J. Plant. Soil.** 16: 1-9.
13. Bernasconi P., Patel B.C., Reagen J.D. **1996**. The N-1-naphthylphthalamic acid protein is an integral membrane protein. **Plant. Physiol.** 11: 427 - 432.
14. Bertsch F. **1995**. La fertilidad de los suelos y su manejo. Asociación costarricense de la ciencia del suelo. San José, 157p.
15. Blamey F. P., Dowling A. J. **1995**. Antagonism between aluminum and calcium for sorption by calcium pectate. **Plant Soil.** 171: 137–140.
16. Blancaflor E., Jones, D.L., Girol, S. 1998. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminium induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiol.**, 118 (1): 159-172.
17. Bogre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollachek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., Heberle-Bors E. **1999**. A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. **Plant cell.** 11: 101-113.
18. Bonilla I. **2000**. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. (eds) Azcón, J., Talón, M. Universitat de Barcelona, 546 p.
19. Boscolo P. R. S., Menossi M., Jorge R. A. **2003**. Aluminium induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, 62: 181-189.
20. Boulton T. G., Yancopoulos G. D., Gregory J. S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J., Cobb M. H. **1990**. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinase involved in cell cycle control. **Science.** 249: 64-67.
21. Budiková S. **1999**. Structural changes and aluminium distribution in maize root tissues. **Biol. Plant.** 42: 259-266.

22. Budiková S., Ciamporová M., Ovécka M., Polonyi J. **1997**. Structural characterization of maize root tip cells under aluminium stress. **Acta FRN Univ. Comen.** 29: 47-52.
23. Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. **1998**. A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. **J. Cell Sci.** 111: 3091-3100.
24. Cançado G.M.A, Loguercio L.L., Martins P.R, Parentoni S.N., Paiva E., Borém A., Lopes M.A. **1999**. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays*L.). **Theor Appl Genet.** 99:747–754.
25. Capaldi F.R., Stefanuto S.A. **2005**. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. Vitorello. **Braz. J. Plant Physiol.** 17: 129-143.
26. Carver B. F., Inskeep W. P., Wilson N. P., Westerman R. L. **1988**. Seedling tolerance to aluminum toxicity in hard red winter wheat germplasm. **Crop Sci.** 28: 463–467.
27. Chan J., Jensen C.G., Jensen L.C., Bus M., Lloyd C.W. **1999**. The 65 kDa carrot microtubule, associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 14391-14936.
28. Chen P.Y., Huang T.L., Huang H.J. **2007**. Early events in the signalling pathway for the activation of MAPKs in rice roots exposed to nickel. **Functional Plant Biology.** 34: 995–1001
29. Chong, Y.C., Yamamoto, Y., Matsumoto, H. **1999**. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L) cells treated with a combination of aluminium and iron. **Plant cell. Environ.** 22: 1009 -1017.
30. Ciamporová M. **2000**. Diverse response of root cell structure to aluminium stress. **Plant Soil.** 226: 113 -116.
31. Ciamporová M. **2002**. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. **Biol. Plant.** 45: 161-171.
32. CITMA. Cuba. Estrategia Ambiental Nacional. Degradación de los suelos. Consultado el 26 de junio del **2003**. Disponible en: <http://www.Cuba.cu/ciencia/citma/AMA/ean.html>.
33. Clarkson D.T. **1965**. The effects of aluminium and some other trivalent metal cation on cell division in the root apices of *Allium cepa*. **Ann. Bot.** 29:309-315.
34. Clune T.S., Copeland L. **1999**. Effects of aluminium on corola roots. **Plant. Soil.** 216: 27-22.
35. Coronado M.J. Testillano P.S., Wilson C., Vicente O., Heberle-Bors E., Risueño M.C. **2007**. *In situ* molecular identification of the Ntf4 MAPK expression sites in maturing and germinating pollen. **Biol. Cell.** 99: 209–221.
36. Courchesne W.E., Kunisawa R., Thorner J. **1989**. A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. **Cell.** 58: 1107-1119.
37. Cox D.N., Muday G.K. **1994**. NPA binding activity is periferal to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton. **Plant. Cell.** 6:1941-1953.
38. Crapper McLachlan DR. **1986**. Aluminium in Alzheimer’s disease. **Neurobiol. Aging.** 7: 525-532.
39. Cuba. MINAGRI. **1999**. Instituto de Suelos. Nueva Clasificación de los suelos de Cuba. La Habana: Agrinfor, 64 p.
40. Cuba. MINAGRI. **2009**. CAI Arrocero “Los Palacios”. Informe de los resultados de la campaña de arroz de frío 2008-2009. 18 p.
41. Cutter E. **1971**. Plant anatomy: experiment and interpretation. 2. Organs. (eds) Edward Arnold, London. 343 p.
42. Darnowski D.W., Valenta R., Parthasarathy M.V. **1996**. Identification and distribution of profilin in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Planta.** 198: 158-161.
43. Delhaize E., Ryan P.R. **1995**. Aluminium toxicity and tolerance in plants. **Plant. Physiol.** 107: 315-321.
44. Delhaize M., Craig S., Beaton C.D., Bennet R.G., Jagadish V.C., Randall P.J. **1993**. Aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and distribution of aluminium in root apices. **Plant Physiol.** 103: 685-693.

45. Díaz S.; Morejón R. **2002**. Comportamiento de variedades de arroz de diferente procedencia en la localidad de Los Palacios. **Cultivos Tropicales**. 23: 63-67.
46. Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, Barcelo J. **2005**. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **J. Exp. Bot.** 56: 1213-1220.
47. Eleptherious E., Moustakas M., Fragikes N. **1993**. Aluminate- induced changes in morphology and ultrastructure of *Thinopyrum* roots. **J. Exp. Bot.** 44: 427-436.
48. Esau K. **1965**. Plant anatomy 2nd ed. Jonh Wiley y Sons, New York.
49. Eticha D., Sta A., Horst W.J. **2005**. Localization of aluminium in the maize root apex: can morin detect cell wall-bound aluminium? **J. Exp. Bot.** 56:1351–1357.
50. Feng J., Hiradate S. **2000**. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**. 211:355 –360.
51. Foy C.D., Chaney R.L., White M.C. **1978**. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Rev. Plant Physiol.** 29: 511-566.
52. Francho C. R., Charges A. P., Jorge R. A. **2002**. Ion exchange equilibria with aluminum pectinates. **Coll. surf. Physicochem. Eng. Aspects**. 204: 183–192.
53. Fu S.F., Chou W.C., Huang D.D., Huang H.J. **2002**. Transcriptional regulation of a rice mitogen-activated protein kinase gene, OsMAPK4, in response to environmental stresses. **Plant and Cell Physiology**. 43: 958–963.
54. González M.C., Cristo E., Pérez N., Delgado, P. **2002**. INCA LP-7, nueva variedad de arroz para suelos afectados por la salinidad. **Cultivos Tropicales**. 23: 89.
55. Gouget A., Senchou V., Govers F., Sanson A., Barre A., Rouge P., Pont-Lezica R., Canut H. **2006**. Lectin Receptor Kinases Participate in Protein-Protein Interactions to Mediate Plasma Membrane-Cell Wall Adhesions in Arabidopsis. **Plant Physiology**. 140: 81–90.
56. Gotomy Color. Escala de colores. Consultado el 15 de diciembre del **2009**. Disponible en: <http://gotomy.com/color.html>.
57. Grabsky S., Schindler M. **1998**. Aluminium induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant. Physiol.** 108: 897-901.
58. Gunsé B, Garzón T, Barceló J. **2003**. Study of aluminum toxicity by means of vital staining profiles in four cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **J. Plant Physiol.**
59. Guo T., Zhang G., Zhou M., Wu F., Chen J. **2004**. Effects of aluminum and magnesium on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**. 258: 241–248.
60. Haug A., Shi B., Vitorello V. **1994**. Aluminium interaction with phosphoinositide associated signal transduction. **Arch. Toxicol.** 69:1-7.
61. Haung A. **1984**. Molecular aspects of aluminium toxicity in plants. **Rev. Plant. Sci.** 1:345-373.
62. He Z.H., He D., Kohorn B.D. **1998**. Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. **Plant J.** 14: 55–63.
63. Hernández A., Ascanio M.O., Cabrera A., Morales M., Medina N. **2004**. Problemas actuales de calificación de suelos:énfasis en Cuba. Editorial Veracruzana, **Cuadernos Universitarios, México**. 221p.
64. Hernández A., Morales M., Ascanio M.O., Morell F. **2006**. Manual práctico para la aplicación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba Editado en la **Universidad de Nayarit, México**. 293p.
65. Horst W., Wagner A., Marschner H. **1983**. Effects of aluminium on root growth cell division rate and mineral element contents in roots of *Vigna unguiculata* genotypes. **Z. Pflanzenphysiol.** 109: 95-103.
66. Horst W.J. **1995**. The role of the apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants: a review. **Z Pflanzenernaehr Bodenkd.** 158: 419-428.
67. Horst W.J., Puschek A.K., Schmohl N. **1997**. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity maize. **Plant. Soil.** 192: 23-30.

68. Horst W.J., Schmohl N., Kollmeier M., Baluska F., Sivaguru, M. **1999**. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall-plasma membrane cytoskeleton continuum? **Plant Soil**. 215: 163-174.
69. Hoshikawa K. **1993**. Morphology and development of vegetative organs. In: Science of the Rice Plant: Morphology. (eds.) Matsuo T., Hoshikawa K. Food and Agriculture Policy Research Center, Tokyo, Japan. 686 p.
70. Hossain Z., Ohno T., Koyama H., Hara T. **2005**. Effect of enhanced calcium supply on aluminum toxicity in relation to cell wall properties in the root apex of two wheat cultivars differing in aluminium resistance. **Plant and Soil**. 276:193–204.
71. Huang H.J., Fu S.F., Tai Y.H., Chou W.C., Huang D.D. **2002**. Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive. **Physiologia Plantarum**. 114: 572–580.
72. Ichimura K., Tena G., Henry Y., Zhang Z., Hirt H., Wilson C., Morris P., Mundy J., Innes R., Ecker J. **2002**. Mitogen-activated protein kinase cascade in plants: a new nomenclature. **Trends Plant Sci**, 7: 301–308.
73. Infoagro.com. El cultivo del arroz. Consultado el 10 de junio **2003**. Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/arroz.htm>.
74. Ishikawa S., Wagatsuma T., Ikarashi T. **1996**. Comparative toxicity of Al³⁺, Yb³⁺ and La³⁺ to root-tip cells differing in tolerance to high Al³⁺ in terms of ionic potentials of dehydrated trivalent cations. **Soil Sci. Plant Nutr**. 42: 613-625.
75. Jinn T.L., Stone J.M., Walker J.C. **2000**. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. **Genes Dev**. 14: 108–117.
76. Jonak C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., Hirt H. **1996**. Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 93: 11274 - 11279.
77. Jonak C., Nakagami H., Hirt H. **2004**. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. **Plant Physiology**.136: 3276–3283.
78. Jones D.L., Kochian L.V. **1995**. Aluminium inhibition of the inositol 1, 4-5 triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in aluminium toxicity) **Plant. Cell**. 7:1918-1922
79. Jones D.L., Kochian L.V. **1997**. Aluminium interactions with plasma membrane lipids and enzyme metal binding sites and its potential role in Al-cytotoxicity. **FEBS Lett**. 400: 51-57.
80. Jones D.L., Kochian L.V., Gilroy S. **1998**. Aluminium induces a decreased in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. **Plant Physiol**. 116:81-89.
81. Kaku T., Tabuchi A., Wakabayashi K., Kamisaka S., Hoson T. **2002**. Action of xyloglucan hydrolase within the native cell wall architecture and its effect on cell wall extensibility in azuki bean epicotyls. **Plant Cell Physiol**. 43: 21–26.
82. Katsuta J., Shibaoka H. **1992**. Inhibition by kinase inhibitors of the development and the disappearance of the preprophase band of microtubule in tobacco BY-2 cells. **J.Cell.Sct**. 103: 397-405.
83. Kauss H., Waldmam T., Quader H. **1990**. Ca²⁺ as signal in the induction of callose synthesis. In Signal perceptions and Transduction in higher plants. (eds) R. Ranjeva, AM. Boudet. Springer-Verlag, Berlin. 230p.
84. Kawashima C., Ishihara K., Ogura T. **1973**. On the development of crown roots in various growth stages of the rice plant. **Proc.Crop. Sci. Soc. Japan**. 42:197-206.
85. Kawata S., Katano M., Yamazaki K. **1980**. The growing directions and the geotropic response of rice crown roots. **Japan. Jour. Crop.Sci**. 49: 301-310.
86. Kawata S., Matsui S. **1975**. The morphogenetic response of excised seminal roots of rice plant to the changing conditions of sugar supply in the *Scutellum* culture medium. **Proc.Crop.Sci.Soc. Japan**. 44: 293-300.

87. Kawata S., Morita S., Yawasaki. **1979**. On the number of vessels and sieve tubes in crown root of rice plants. **Japan. Jour. Crop. Sci.** 48: 502-509.
88. Kochian L.V. **1995**. Cellular mechanism of aluminium toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.** 46:237-260.
89. Kochian L.V., Hoekenga O.A., Piñeros M.A. **2004**. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.** 55:459–93
90. Kohorn B.D. **2000**. Plasma membrane-cell wall contacts. **Plant Physiol.** 124: 31–38.
91. Kollmeier M., Dietrich P., Bawer C., Horst W., Hedrich R. **2001**. Aluminium activates a citrate permeable anion channel in the aluminium sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminium-sensitive and aluminium-resistance cultivar. **Plant Physiol.** 126: 397-410.
92. Kollmeier M., Felle H.H., Horst W.J. **2000**. Genotypical difference in Al resistance of *Zea mays* (L) are expressed in the distal part of the transition zone is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by Al? **Plant. Physiol.** 122:945-956.
93. Kono Y., Yamauchi A., Nonoyama T., Tatasumi J., Kawamura N. **1987**. A revised experimental system of root soil interaction for laboratory work. **Environ. Control in Biol.** 25: 141-151.
94. Kumar K., Prabhakara Rao K., Sharma P., Sinha A.K. **2008**. Differential regulation of rice mitogen activated protein kinase kinase (MKK) by abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry.** 46:891- 897.
95. Lally D., Ingmire P., Tong Y., He H. **2001**. Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. **Plant Cell.** 13: 1317–1331
96. Lazof D., Goldsmith J., Linton R. **1997**. The in situ analysis of intracellular aluminium in plants. **Prog. Bot.** 58: 112-149.
97. Lee J.Y., Yoo B.C., Lucas W.J. **2000**. Parallel between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of informational molecules. **Planta.** 210: 177-187.
98. Liao H., Wan H., Shaff J., Wang X., Yan X., Kochian L.V. **2006**. Phosphorus and Aluminum Interactions in *Soybean* in Relation to Aluminum Tolerance. Exudation of Specific Organic Acids from Different Regions of the Intact Root System. **Plant Physiology.** 141: 674–684.
99. Ligaba A., Katsuhara M., Ryan P., Shibasaki M., y Matsumoto H. **2006**. The BnALMT1 and BnALMT2 Genes from Rape Encode Aluminum-Activated Malate Transporters That Enhance the Aluminum Resistance of Plant Cells. **Plant Physiology.** 142:1294–1303.
100. Ligterink, **2000**. Stress activated MAPKs in plants. Thesis Wageningen University. 176p.
101. Lin C.W., Chang H.B., Huang H.J. **2005**. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry.** 43: 963–968.
102. Lindberg S., Strid H. **1997**. Aluminium induced rapid changes in cytosolic pH and free calcium and potassium concentrations in roots protoplasts of wheat (*Triticum aestivum*). **Physiol. Plant.** 99:405-414.
103. Liu Q, Yang J.L, He L.S, Li Y., Zheng S.J. **2008**. Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. **Biologia Plantarum.** 52: 87-92.
104. Llugany M., Poschenrieder C., Barceló J. **1995**. Monitoring the aluminium-induced inhibition of root elongation in four maize cultivars differing in tolerance to aluminium and proton toxicity. **Physiol. Plant.**93: 265-271.
105. Ma J.F. **2000**. Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plants. **Plant Cell Physiol.** 41:383-390.
106. Ma J.F., Hiradate S. **2000**. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) **Planta.** 211: 355-360.
107. Ma J.F., Hiradate S., Matsumoto H. **1998**. High aluminium resistance in buck-wheat. II. Oxalic acid detoxifies aluminium internally. **Plant Physiol.** 117: 753-759.

108. Ma J.F., Shen R., Zhao Z., Wissuma M., Takenda Y., Ebitani T., Yono M. **2002**. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant Physiol.** 43:652-659.
109. Ma J.F., Shen R.F., Nagao S., Tanimoto E. **2004**. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. - *Plant Cell Physiol.* **45**: 583-589.
110. Ma J.F., Zheng S.J., Hiradate S., Matsomoto H. **1997a**. Detoxifying aluminium with buck wheat. **Nature.** 390: 569-570.
111. Ma Z., Miyasaka S.L. **1998**. Oxalate exudation by taro in response to Al. **Plant. Physiol.** 118: 861-865.
112. Macdonald T.L., Taylor G.J. **1995**. Kinetics of aluminium uptake by cellsuspension of *Phaseolus vulgaris* L. **J. Plant. Physiol.** 145: 327-334.
113. Malamy J.E., Berfeg P.N. **1997**. Down and out in Arabidopsis the formation of lateral roots. **Trends. Plant. Sci.** 2: 390-396.
114. Mariendfeld S., Lehman H., Stelzer R. **1995**. Ultrastructural investigation nad EDX-analysis of Al- treated oat (*Avena sativa*) roots. **Plant. Soil.** 171:167-173.
115. Marschner H. **1995**. Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd ed. AcademicPress, London.
116. Martin R.B. **1986**. The chemistry of aluminium as related to biology and medicine. **Clin. Chem.** 32: 1797-1806.
117. Matos A., Molina J. **1997**. Estudio citogenético de células radicales de *Aloe vera* L. **Rev. Fac. Agron.** 14:173-182.
118. Matsumoto H. **2000**. Cell biology of aluminium toxicity and tolerance in higher plants. **Int. Rev. Cytol.** 200:1-46.
119. Matsumoto H., Morimura S., Takahashi E. **1977**. Buinding of aluminium to DNA in pea roots nuclei. **Plant. Cell. Physiol.** 18: 987-993.
120. Miller D., Hable W., Gottwald J., Ellard-lvey M., Demura T., Lomax T., Carpita N. **1997**. Connections the hard wiring of the plant cell for perception, signaling, and response. **Plan. Cell.** 9: 2105-2117.
121. Minocha R., Minocha S.C., Long S.L., Shortle W.C. **1992**. Effects of aluminium on DNA synthesis, cellular polyamines, polyamine biosynthetic enzymes and inorganic ions in cell suspension cultures of a woody plant. **Physiol. Plant.** 85: 417-424.
122. Mittler R. **2002**. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Plant Physiol.** 7: 405–410.
123. Mittler R. **2004**. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.** 9: 490–498.
124. Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi- Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. **1996**. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA** 93, 765–769.
125. Moon H., Lee B., Choi G., Shin D., Prasad D.T., Lee O., Kwak S.S., Kim D.H., Nam J., Bahk J. **2003**. NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. **Proc Natl Acad Sci USA.**100: 358–363
126. Morales M., Hernández A., Vantour A. **2001**. El proceso de alitización y la clasificación de suelos alíticos en Cuba. Informe del Instituto de Suelos. MINAG, La Habana, 17p.
127. Mori T. **1960**. The relative growth of roots and shoot in rice plants. **Proc. Crop. Sci. Soc. Japan.** 29:69-70.
128. Morita A , Yanagisawa O, Takatsu S, Maeda S, Hiradate S. **2008**. Mechanism for the detoxication of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze). **Phytochemistry** 69:147–153.
129. Morita S., Nemoto K. **1995**. Morphology and anatomy of rice roots with special reference to coordination in organo-histogenesis. **Structure and function of roots.** 75-86.

130. Morris E.R., Walker J.C. **2003**. Receptor-like protein kinases: the keys to response. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6: 339–342.
131. Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennet M., Wisman E, Palme K. **1998**. AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. **EMBO J.** 17:6903-6911.
132. Nichol B.E., Oliveira L.A. **1995**. Effects of aluminium on the growth and distribution of calcium in roots of an aluminium sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare*). **Can. J. Bot.** 73: 1849-1858.
133. Nishimura R., Hayashi M., Wu G.J., Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Murakami Y., Kawasaki S., Akao S., Ohmori M., Nagasawa M. **2002**. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. **Nature.** 420: 426–429.
134. Nouri P.A., Reddy G.B. **1995**. Influence of acid rain and zone on heavy metals under loblolly pine trees: a field study. **Plant Soil**, 171:59-62.
135. Olivetti G.P., Cumming J.R., Etherton B. **1995**. Membrane potential depolarization of root cap cells precedes aluminium tolerance in snap bean. **Plant Physiol.** 109: 123-129.
136. Opatrny Z. and Opatrna J. **1976**. The specificity of the effect of 2, 4-D and NAA of the growth, micromorphology, and occurrence of starch in long-term (*Nicotiana tabacum* L.) cell strain. **Biol. Plan.** 18: 359-365.
137. Ouzounidou G., Ciamporova M., Moustakes M., Karataglis S. **1995**. Responses of maize (*zea mays* L.) plants to copper stress. I. Growth mineral content and ultrastructure of roots. **Environ. Exp. Bot.** 35:167-176.
138. Pearson G., Robinson F., Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K. **2001**. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev.** 22: 153–183.
139. Pereira L.M., Tabaldi L.A., Goncalves J.F., Jucoski G.O., Pauletto M.M., Weis S.N., Nicoloso F.T., Borher D., Rocha J.B.T., Schetinger M.R.C. **2006**. Effect of aluminum on d-aminolevulinic acid dehydratase(ALA-D) and the development of cucumber (*Cucumis sativus*). **Environ Exp Bot.** 57:106–115.
140. Pietraszewska T. **2001**. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica.** 48: 668-673.
141. Piñeros M.A., Kochian, L.V. **2001**. A patch-clamp study on the physiology of aluminium toxicity and aluminium tolerance in maize. Identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiol.** 125: 292-305.
142. Pitzschke A., Hirt H. **2006**. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Plant Physiology.** 141: 351–356.
143. Polle E., Konzak C.F., Kittrick J.A. **1978**. Visual detection of aluminium tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Sci** 18: 823–827.
144. Poschenrieder C.H., Massot N, Guevara P, Barceló J. **1992**. Mecanismos de toxicidad en el hombre, animales y plantas. **Cir Far.** 313: 27-42.
145. Rengel Z. **1996**. Uptake of aluminium by plant cells. **New Phytol.** 134: 389-406.
146. Rincón M., González R.A. **1992**. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiol.** 99: 1021–1028.
147. Rodríguez L. La acidez de los suelos. Veracruz. Consultado 30 de mayo **2005**. Disponible en: <http://www.casamag.com.mx/acidez.htm>.
148. Roy A.K., Shama A., Talukder G. **1989**. A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*. **Mutat. Res.** 227: 221-226.
149. Ruiz-Torres N.A., Carver B.F. **1992**. Genetic expression of aluminium tolerance in hard red winter wheat. **Cereal Res Com.** 20:233–240.
150. Ryan P.R., Delhaize E., Randall P.J. **1995**. Malate efflux from root apices: evidence for a general mechanism of Al-tolerance in wheat. **Aust J Plant Physiol.** 22: 531-536.

151. Ryan P.R., Di Tomaso J.M., Kochian L.V. **2001**. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **J. Exp Bot.** 44: 437-446.
152. Ryan P.R., Skerrett M., Findlay G.P., Delhaize E., Tyerman S.D. **1997**. Aluminium activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 6547-6552.
153. Sam O., Ramírez C., Coronado M.J., Testillano P.S., Risueño M.C. **2003**. Changes promoted by saline stress in tomato plant leaves: a subcellular and ultrastructural study. **Biologia Plantarum.** 47: 361-366.
154. Samuels T.D., Kucukakayuz K., Rincon M. **1997**. Al partitioning patterns and root growth as related to Al sensitivity and Al tolerance in wheat. **Plant. Physiol.** 113: 527-534.
155. Sasaki M., Yamamoto Y., Matsumoto H. **1996**. Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiol Plant.** 96: 193-198.
156. Sasaki M., Yamamoto Y., Matsumoto H. **1999**. Aluminium inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*triticum aestivum*) root. **Soil. Sci. Plant. Nutr.** 43: 469-472.
157. Schofield R.M., Pallon J., Fischesjo G. **2005**. Aluminium and calcium distribution patterns in aluminum intoxicated roots of *Allium cepa* do not support the calcium displacement hypothesis and indicate signal mediated inhibition of root growth. **Planta.** 175-180.
158. Schwarzerová K., Zlenkova S., Nick P., Opatrn Z. **2002**. Aluminium induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. **Plant and Cell Physiol.** 43: 207-216.
159. Seger R., Krebs E.G. **1995**. The MAPK signaling cascade. **FASEB J.** 9: 726-735.
160. Shakh J., Nongkynrih J.M. **2007**. Metal hyperaccumulation and bioremediation. **Biologia Plantarum.** 51: 618-634.
161. Shen R., Ma J.F., Kyo M., Iwashita T. **2002**. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. **Planta.** 215: 394–398.
162. Shibaoka H. **1994**. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubule: alterations in the crosslinking between microtubules and the plasma membrane. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.** 45:527-544.
163. Shiu S.H., Karlowski W.M., Pan R., Tzeng Y.H., Mayer K.F., Li W.H. **2004**. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. **Plant Cell.** 16: 1220–1234.
164. Silva I., Smyth J., Moxley D., Carter T., Allen N., Ruffy T. **2000**. Aluminium accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiol.** 123: 543-552.
165. Šimonoviková M., Tamás L., Huttová J., Mistrík I. **2004**. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. **Biol. Plant.** 48: 261-266,
166. Sivaguru M., Baluska F., Volkman D., Fell H.H., Horst W.J. **1999a**. Impacts of aluminium on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant. Physiol.** 119: 1073-1082.
167. Sivaguru M., Ezaki B., He Z.H., Tong H., Osawa H., Baluska F., Volkmann D., Matsumoto H. **2003**. Aluminum-Induced Gene Expression and Protein Localization of a Cell Wall-Associated Receptor Kinase in *Arabidopsis*. **Plant Physiology.** 132: 2256–2266.
168. Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluska F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D., Matsumoto H. **2000a**. Aluminium induced 1-3-B-D- Glucan inhibits cell to cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminium toxicity in plants. **Plant Physiol.** 124: 991-1005.
169. Sivaguru M., Horst W.J. **1998**. The distal part of the transition zone is the most aluminium sensitive apical root zone of *Zea mays* L. **Plant Physiol.** 116: 155-163.
170. Sivaguru M., Matsumoto H., Horst W. **2000b**. Control of the response to aluminium stress. In: *Plant Microtubule: Potential for biotechnology.* (Eds) P. Nick. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 209 p.
171. Sivaguru M., Yamamoto Y., Matsumoto H. **1999b**. Differential impacts on aluminium in microtubular organization depend on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. **Physiol. Plant.** 107:110-119.

172. Tahara K., Norisada M., Yamanoshita T., Kojima K. **2008**. Role of aluminum-binding ligands in aluminum resistance of *Eucalyptus camaldulensis* and *Melaleuca cajuputi*. **Plant Soil**. 302:175–187.
173. Taiz L., Zeiger E. **2006**. Plant cells. In: Plant physiology. (Eds) Sinaver Associates, Inc. 672 p.
174. Takabatake R., Shimmen T. **1997**. Inhibition of electrogenesis by aluminium in *characean* cells. **Plant Cell. Physiol**. 38: 1264-1271.
175. Takasaki T., Katsunori H., Suzuki G., Watanabe M., Isogai A., Hinata K. **2000**. The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma*. **Nature**. 403: 913–916.
176. Taylor G.J. **1995**. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium resistance. **Plant. Soil**. 171: 89-103.
177. Tena G., Asai T., Chiu W.L., Sheen J. **2001**. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. **Curr Opin Plant Biol**. 4: 392–400.
178. Tsai T.M., Huang H.J. **2006**. Effects of iron excess on cell viability and mitogen-activated protein kinase activation in rice roots. **Physiologia Plantarum** 127:583–592.
179. Vázquez M.D., Poschenrieder. C., Corrales. I., Barceló, J. **1999**. Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. **Plant. Physiol**. 199: 435-444.
180. Verica J.A., Chae. L., Tong. H., Ingmire P., He Z.H. **2003**. Tissue-specific and developmentally regulated expression of a cluster of tandemly arrayed cell wall-associated kinase-like kinase genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** .133: 1732–1746.
181. Vitorello V.A., Haug A. **1999**. Capacity for aluminium uptake depends on brefeldin A-sensitive membrane traffic in tobacco (*Nicotiana tabacum* L-CV, BY-2) cells. **Plant. Cell. Rep**. 18: 733-736.
182. Votrubová O., Ernohorska J., Hlídková R., Krabová Eliasová K. **1997**. The effect of aluminium on growth and structure of wheat root. **J. Appl. Genet**. 38:227-281.
183. Wagatsuma T., Ishikawa S., Obata H., Tawaraya K., Kathonda S. **1995**. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium toxicity in roots. **Plant. Soil** 171:105-112.
184. Wagner T.A., Kohorn B.D. **2001**. Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. **Plant Cell**. 13: 303–318.
185. Wang J.W. y Kao C.H. **2007**. Protective effect of ascorbic acid and glutathione on AlCl₃-inhibited growth of rice roots. **Biologia Plantarum**. 51: 493-500.
186. Wang J.W., Kao C.H. **2007**. Effect of aluminium on endosperm reserve mobilization in germinating rice grains. **Biologia Plantarum**. 49: 405-409.
187. Wilson C., Pfosser M., Jonak C., Hirt H., Heberle B., Vicente O. **1998**. Evidence for the activation of a MAP kinase upon phosphate-induced cell cycle re-entry in tobacco cells. **Phystol. Plant**. 102: 532-538.
188. Wissemeier A.H., Horst W.J. **1995**. Effect of calcium supply on aluminium-induced calose formation, its distribution and persistence in roots of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) **J Plant. Physiol**. 145: 470-476.
189. Wolniak S.M., Larsen P.M. **1995**. The timing of protein kinase activation events in the cascade that regulates mitotic progression in *Tradescantha* stamen hair cells. **Plant Cell**. 7: 431-445.
190. Xiong L., Yang Y. **2003**. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen activated protein kinase. **Plant Cell**. 15: 745–759.
191. Yamamoto Y., Kobayashi S., Devi R., Riklishi S., Matsumoto, H. **2002**. Aluminium toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**. 128: 63.

192. Yamamoto Y., Kobayashi Y., Matsumoto, H. **2001**. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiol.** 125:199-288.
193. Yamamoto Y., Rkiishi S., Chang Y.C., Ono K., Kasai M. and Matsumoto H. **1994**. Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells-correlation **Plant Physiology.** 19: 23-26.
194. Yeh C.M., Chien P.S., Huang H.J. **2007**. Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. **Journal of Experimental Botany** .58: 659–671.
195. Yeh C.M., Hsiao L.J., Huang H.J. **2004**. Cadmium activates a mitogen-activated protein kinase gene and MBP kinases in rice. **Plant & Cell Physiology.** 45:1306–1312.
196. Yeh C.M., Hung W.C., Huang H.J. **2003**. Copper treatment activates mitogenactivated protein kinase signalling in rice. **Physiologia Plantarum.** 119, 392–399.
197. Zhang A., Jiang M., Zhang J., Tan M., Hu X. **2006**. Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense and Acts Downstream of Reactive Oxygen Species Production in Leaves of Maize Plants. **Plant Physiology.** 141: 475–487.
198. Zhang G., Slaki J.J., Archambault D.J. **1997**. Alteration of plasma membrane lipids in aluminium-resistant and aluminium-sensitive wheat genotypes in response to aluminium stress. **Physiol. Plant.** 99: 302-308.
199. Zhang S., Liu Y., Klessig D.F. **2000**. Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. **The Plant Journal.** 23:339–347.
200. Zhang W.J., Rengel Z. **1999**. Aluminium induced an increase in cytosolic calcium in intact root apical cells. *Aust. J. Plant. Physiol.* 26:401-409.
201. Zheng S.J., Ma J.F., Matsumoto H. **1998**. High aluminium resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiol.** 117:745- 751.
202. Zheng S.J., Yang J.L. **2005**. Target sites of aluminum phytotoxicity. **Biologia Plantarum,** 49:321-331.
203. Zheng S.J., Yang J.L., He Y.F., Yu X.H., Zhang L., You J.F., Shen R.F., Matsumoto H. **2005**. Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance in Buckwheat. **Plant Physiology.** 138: 297–303.