

# MECANISMO DE ACCIÓN DEL ALUMINIO EN LA RAÍZ DEL ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)

**Autoría principal:** Idioleidy Álvarez Bello<sup>1</sup>

**Otros autores:** Inés Reynaldo Escobar, Ricardo Acevedo Rojas y Marlene Brito Riverón

**Colaboradores:** María del Carmen Risueño Almeida, Pilar Sánchez Testillano y Marta Arias

Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera a Tapaste, Km 3 y ½, San José de las Lajas, La Habana. Fax: 53 47 863867

<sup>1</sup> Dr.C. Autor de correspondencia. Correo electrónico [ialvarez@inca.edu.cu](mailto:ialvarez@inca.edu.cu)

**Dr.C. Idioleidy Álvarez Bello** (60 %). Fue la responsable de la investigación y concibió parte del plan experimental. Desarrolló los experimentos y el procesamiento de las muestras para microscopía óptica de luz y fluorescencia, así como para microscopía confocal. Realizó las observaciones al microscopio, el análisis estadístico de los resultados y la confección del documento de tesis.

**Dra. Inés Reynaldo Escobar** (15 %). Asesoró parte del diseño experimental de la investigación y el análisis de los resultados. Contribuyó con la confección y revisión del documento de tesis.

**Dr.C. Ricardo Acevedo Rojas** (5%). Asesoró la estructuración y revisión del documento de tesis.

**Tec. Marlene Brito Riverón** (5%). Abordó el montaje de algunos experimentos en el laboratorio y parte del procesamiento de las muestras.

## RESUMEN

La toxicidad por Al es el efecto más importante en los suelos ácidos y constituye el mayor factor limitante del crecimiento y la producción vegetal. Teniendo en cuenta que el estudio de este fenómeno en el arroz (*Oryza sativa* L.), posee un valor teórico práctico importante se condujeron varios experimentos para estudiar el mecanismo de acción del aluminio ( $Al^{3+}$ ) en la célula radical empleando para ello cultivares comerciales cubanos. Los experimentos realizados en condiciones controladas con diferentes concentraciones de aluminio, posibilitaron el estudio de indicadores de crecimiento y procesos celulares así como la determinación inmunohistoquímica de proteínas señalizadoras mediante el empleo de Técnicas de Microscopía óptica confocal y de fluorescencia. A través del estudio se demostró que el Al provocó modificaciones en la anatomofisiología del sistema radical y que el ángulo de curvatura radicular constituye un indicador visual de toxicidad por Al en la planta de arroz. Se evidenció el efecto tóxico del Al en los procesos de división y alargamiento celular y se examinaron diversos mecanismos, demostrándose que la vía de transducción de la señal de las MAP quinasas opera durante la respuesta citotóxica inducida por el Al en la especie *Oryza sativa* L. La integración de todos los resultados permitió establecer un modelo que explica el mecanismo de acción del ión  $Al^{3+}$ , en la célula radical de la planta de arroz. La presente investigación es el primer estudio en Cuba que aborda de forma integrada los efectos morfológicos y fisiológicos de la toxicidad provocados por el Al y brinda indicadores morfológicos de crecimiento como herramienta para identificar manifestaciones de toxicidad.

## COMUNICACIÓN CORTA

### Descripción del resultado

La acidificación de los suelos se ha intensificado en los últimos años, estimándose que aproximadamente el 30% de la superficie terrestre y el 50% de las tierras cultivadas están afectadas por este fenómeno y de estas últimas cerca de un 60% se localiza en las zonas tropicales y subtropicales, con grandes extensiones en América del Sur, África y Asia ([R`bia et al.](#), 2012). Aún cuando los suelos de Cuba no han sido de los más afectados por la acidez, diversos factores naturales y antrópicos han generado alrededor de 557 400 hectáreas de suelos alíticos con el transcurso de los años, los que se encuentran distribuidos en casi toda la isla, con una mayor incidencia en las provincias de Pinar del Río, Camagüey y Granma ([Hernández et al.](#), 2006).

El efecto más importante en los suelos ácidos es la toxicidad por Al y constituye el mayor factor limitante del crecimiento y la producción vegetal ([Liu et al.](#), 2008). Para la mayoría de las plantas, la raíz es el órgano más afectado por este ión, por lo que ha sido el material de estudio para la identificación de los diferentes mecanismos de tolerancia al Al.

Si bien en algunos cereales se ha abordado intensamente el papel de los ácidos orgánicos en la quelatación del Al intra y extracelular, poco se conoce acerca de otros mecanismos de tolerancia, como la unión del Al a la pared celular y a proteínas citoplasmáticas, así como la compartimentación del Al dentro de la célula. Por otro lado, se conoce que diferentes procesos y componentes celulares pueden ser alterados por este ión (Barceló y Postrieder, 2002) aspecto que ha limitado el estudio integrado de todos los posibles mecanismos celulares que se desencadena ante la presencia del Al, así como los involucrados en la transducción de la señal intracelular.

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

Por las razones anteriores se propuso realizar por primera vez un conjunto de investigaciones dirigidas a estudiar de forma integrada los efectos morfológicos y fisiológicos de la toxicidad provocada por el Al y demostrar que este ión activa la vía de las MAP quinasas como parte del mecanismo de señalización en la especie *Oryza sativa* L para proponer un modelo del mecanismo de acción del Al en la célula radical.

Para el desarrollo de las investigaciones se emplearon dos cultivares comerciales, el cultivar Jucarito-104 (J-104), que es empleado como patrón comercial por sus potencialidades en el rendimiento (Díaz y Morejón, 2002) y el cultivar INCA LP- 7, el cual exhibe cierto grado de tolerancia al estrés iónico (González *et al.*, 2002) y constituye actualmente el 10% de la producción de arroz del sector no especializado y el 30% del sector especializado (Cuba. MINAGRI, 2009).

Entre las metodología que se emplearon para las diferentes investigaciones se realizaron las técnicas convencionales para microscopía óptica de luz y campo oscuro, así como microscopía de fluorescencia e inmunohistoquímica para la microscopía confocal. Novedosamente, se utilizó por primera vez para el cultivo del arroz, una técnica con disminución progresiva de la temperatura que permitió una elevada resolución al microscopio y se describió un método para determinar morfométricamente la curvatura radical, aspectos que influyeron positivamente en la excelencia de los resultados.

El número de raíces que puede desarrollar una planta está determinado desde la formación del embrión, no obstante, los resultados demostraron una tendencia al incremento de esta variable cuando las plántulas fueron expuestas a diferentes concentraciones de Al, lo que permitió afirmar que la emisión de raíces adventicias constituye una respuesta adaptativa de la planta de arroz ante la toxicidad del Al.

A su vez, los cambios que se observaron en la longitud radicular del cultivar INCA LP-7, demostraron que el sistema radical de estas plantas está más preparado para garantizar la fijación de la planta al suelo e incrementar el área para la absorción de agua y nutrientes, por lo que responden mejor ante las condiciones de toxicidad por Al. Los resultados de esta investigación están publicados en *Botanical Studies* (2012, vol.53, no.1).

Entre las novedades, se describió por primera vez un procedimiento para determinar el ángulo de curvatura, resultado que se publicará en *la Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (2013, Vol.26 No.4) demostrándose que las plántulas del control en ambos cultivares exhibieron valores superiores a los 165° en el ángulo de curvatura radicular, sin embargo, las tratadas con el metal no superaron los 160° en ninguno de los casos, lo que permitió evaluar el ángulo de curvatura como un indicador de toxicidad por Al, a partir de este valor. La asociación entre el ángulo de curvatura radical y la tolerancia de las plantas al estrés por Al posee una aplicación práctica importante, por cuanto permite discernir entre variedades en condiciones de laboratorio, resultado que posee una repercusión económica al poder prescindir con alta confiabilidad del ensayo de campo.

La evaluación microscópica de la radícula permitió la observación de un engrosamiento entre el segundo y el cuarto milímetro del ápice en las plántulas tratadas con Al, región donde se localiza la zona de transición celular, lo que indicó la necesidad de estudiar la sección transversal del ápice radicular para conocer los daños provocados por el ión  $Al^{3+}$  en esta zona y determinar la magnitud del engrosamiento observado, como un posible indicador de tolerancia. Estos resultados indicaron que el cultivar J-104 fue el más afectado en este indicador de crecimiento, ya que la radícula de sus plántulas se engrosó de forma significativa ante concentraciones crecientes del ión, en relación con el cultivar INCA LP-7, el cual alcanzó un valor estable del diámetro radicular. La evaluación histológica de las secciones transversales permitió constatar mediante un estudio morfométrico que el engrosamiento de la sección transversal de la radícula surgió como consecuencia de un incremento en el ancho de las células protodérmicas y del meristemo fundamental.

La correspondencia entre el número y el diámetro de los vasos xilemáticos, para los dos cultivares, está entre los resultados publicados en *Cultivos Tropicales* (2005, Vol. 26, no.1, p.21-25.) y sugirió que las modificaciones se generaron en respuesta al aumento de la resistencia hidráulica de la raíz y que las plántulas desarrollaron un mayor número de vasos para aumentar la capacidad de transporte, teniendo en cuenta que la arquitectura del sistema vascular es compatible con las fuerzas necesarias para el transporte de la columna de agua. Por otro lado, el hecho de que el diámetro de los vasos disminuyera con el aumento en número de los mismos permitió sugerir que este fenómeno pudiera estar relacionado con la estabilidad de la columna, la cual es más estable cuanto menor es el diámetro del vaso.

Resulta importante notar que se detectaron rudimentos celulares aislados en medio de un tejido normal, donde las células vecinas mantenían su estructura. Teniendo en cuenta que la muerte celular selectiva en las plantas, es necesaria para el crecimiento y la supervivencia, se especuló que la desintegración de estas células, pudiera ser consecuencia del desarrollo normal de las plantas. La ausencia de este fenómeno en las radículas de las plántulas del control, permitió afirmar que la muerte celular observada en las radículas tratadas, no es una consecuencia del desarrollo de la planta, sino parte de la respuesta al estrés, que le permite acumular el aluminio en las vacuolas de células individuales. Probablemente estas células estuvieran destinadas a morir y de esta forma permitir al tejido circundante, sobrevivir al estrés impuesto.

Las paredes longitudinales de las células corticales más externas en las plántulas de los dos cultivares, expuestas a  $125 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{AlCl}_3$ , evidenciaron un engrosamiento, evidenciado a través del color cian que brindó la tinción con el azul de toluidina, resultados que se encuentran publicados en *Cultivos Tropicales* (2005, vol.26, no.4, p.61-64) . Este hallazgo, sugirió la presencia de alguna sustancia inducida por el Al, por lo que se procedió a determinar la deposición de calosa a través de la microscopía de fluorescencia. Como resultado se comprobó que el Al indujo la deposición de calosa en estas paredes celulares, con una mayor intensidad en el cultivar J-104, coincidiendo con los resultados obtenidos en ambos cultivares al analizar las alteraciones estructurales provocadas por el ión  $\text{Al}^{3+}$  en las paredes celulares.

Tomando en consideración que el crecimiento radical es el resultado de la división y el alargamiento de las células y las evidencias que se obtuvieron del efecto negativo de este ión en el crecimiento de la radícula se consideró conveniente evaluar el comportamiento de estos dos procesos ante la presencia del metal. En relación con el alargamiento celular, se demostró que el Al provocó una disminución en la longitud de las células corticales y un 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, sobre todo en el cultivar J-104. Este resultado evidenció que el efecto sobre el alargamiento celular incidió realmente en la inhibición del crecimiento radical.

La evaluación del índice mitótico como indicador del proceso de división celular demostró que el Al afecta sensiblemente la división de las células meristemáticas en el ápice radicular como consecuencia de su efecto tóxico, resultados que se encuentran publicados en *Cultivos Tropicales* (2012, Vol. 33(1): 35-40). Este comportamiento evidenció que las afectaciones del metal en este proceso celular también influyen en la inhibición del crecimiento radicular constatada.

Indudablemente la localización del Al en el interior de la raíz podía relacionar las evidencias obtenidas en cada cultivar y esclarecer algunas de las incógnitas del mecanismo de acción del Al. La tinción con Hematoxilina, fue empleada por primera vez para cultivares de arroz y demostró la ausencia del metal en la radícula de las plántulas del control, 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. Además se hizo evidente una coloración diferencial entre dosis y entre cultivares que permitió asignar un mayor nivel de tolerancia al cultivar INCA LP-7, resultados que serán publicados en la *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* (2013, Vol.26 No.4).

El hecho de que el cultivar INCA LP-7 exhibiera una menor cantidad de Al en su raíz sugiere la posibilidad de que fuera capaz de incorporar menos  $Al^{3+}$  o excluirlo más que el cultivar J-104 evidenciando una mayor tolerancia a este ión metálico. No obstante, existía la posibilidad de que se retuviera en el interior de su raíz una mayor cantidad de Al, como parte de un mecanismo de compartimentación celular, lo que se evidenció al localizar el Al con Morin, en secciones transversales de la raíz. Sin embargo, con estas evaluaciones y las determinaciones de número y tamaño de las vacuolas, se arribó a la conclusión de que el cultivar J-104 compartimenta el Al en el interior de las vacuolas para reducir la toxicidad del ión en el citoplasma, pero no funciona, al menos en esta especie como un mecanismo de tolerancia.

Para la concepción del mecanismo de acción fue necesario relacionar los efectos en las paredes celulares con las evidencias morfológicas encontradas hasta el momento, eslabón relacionado con la transducción de la señal. Tomando en consideración que las proteínas de fosforilación juegan un papel esencial en la regulación del estado fisiológico en respuesta al estrés, se determinó la activación de MAP quinasas ante la presencia de Al, en la zona meristemática de la raíz de ambos cultivares, resultados que fueron enviados a publicar a la revista *Functional Plant Biology*.

Al analizar la expresión de las proteínas 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 corroboró en ambos cultivares 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 estudio de la activación de MAP quinasas fosforiladas o activas (pMAPK) permitió conocer dentro de todas las proteínas, las que estaban activas y su localización, arrojando resultados novedosos para la especie. En las células meristemáticas de las plántulas de los controles se observaron escasas MAP quinasas fosforiladas en el citoplasma, en relación con la cantidad de MAP quinasas totales observadas en estas mismas células, lo que indicó que la mayoría de las MAP quinasas detectadas en el citoplasma se encontraban inactivas, Sin embargo en el núcleo de las plántulas tratadas con Al se evidenció una acumulación de proteínas fosforiladas, demostrándose que ciertamente se activa la cadena de señalización de esta proteínas.

Este hallazgo constituye un aporte teórico importante en la especie *Oryza sativa* L. pues se demostró por primera vez que el Al, como otros metales, activa la vía de señalización de las MAP quinasas, 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.

Las evidencias obtenidas como resultado de las investigaciones realizadas permitieron proponer un modelo que explica el mecanismo de acción del ión  $Al^{3+}$  en la célula radical de la planta de arroz y 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, los resultados obtenidos constituyen una alerta temprana al conocimiento de la acumulación de un metal que puede ser tóxico y causante de enfermedades del sistema nervioso central.

### Referencias bibliográficas

- (1) 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.
- (2) Cuba. MINAGRI. 2009. CAI Arrocero "Los Palacios". Informe de los resultados de la campaña de arroz de frío 2008-2009. 18 p.
- (3) Díaz S.; Morejón R. 2002. Comportamiento de variedades de arroz de diferente procedencia en la localidad de Los Palacios. *Cultivos Tropicales.* 23: 63-67.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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. *Biología Plantarum.* 52: 87-92.
- (7) R`bia O, Horchani F, Smida I, Mejri M, Aschi-Smiti S. 2012. Aluminium Phytotoxicity and Plant Acclimation to Acidic Soils. *Science Alert.*
- (8) 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.