

ALTERACIONES CELULARES INDUCIDAS POR EL IÓN Al^{3+} EN DOS VARIEDADES CUBANAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Idioleidy Álvarez[✉], Ofelia Sam e Inés Reynaldo

ABSTRACT. The aim of this work was to study some modifications provoked in rice root cells by aluminum exposure. An experiment was developed, where different $AlCl_3$ levels were employed to impose stress condition. Root apical segments were processed by a progressive low temperature method (PLT) and to cut the samples, they were included in LR white resin. Root sections were viewed with a Phase Contrast microscope. Some growth orientation changes were detected in epidermal and cortical cells, to contribute to cell elongation inhibition. Thickened cell walls and a vacuole size increase were observed, similar to other aluminum-stressed plants. Results showed that aluminum provoked some modifications in rice root cells, some of which are the structural cause of morphological root thickening and shortening previously observed in stressed rice roots in our laboratory.

Key words: *Oryza sativa*, metallic elements, stress, oxidation

RESUMEN. Con el propósito de estudiar las modificaciones, que a nivel celular provoca el aluminio en el sistema radicular del arroz, se desarrolló un experimento, en el cual se emplearon diferentes dosis de $AlCl_3$ para imponer la condición de estrés. Para el estudio los ápices radicales de las plántulas se procesaron por un método de disminución progresiva de la temperatura (PLT) y se incluyeron en resina Lowicryl para su posterior seccionamiento y observación al microscopio de Contraste de Fase. Se apreciaron cambios en la orientación del crecimiento de células epidérmicas y corticales, lo cual contribuyó a la inhibición del alargamiento celular. Las paredes de algunas células se observaron engrosadas e irregulares y se evidenció un incremento en el tamaño de las vacuolas, fenómeno observado también en otras plantas ante la exposición con aluminio. Los resultados obtenidos demuestran que el aluminio provoca alteraciones en las células radicales del arroz, algunas de las cuales son responsables estructuralmente de cambios morfológicos como el engrosamiento y acortamiento de las raíces, hallados con anterioridad en nuestro laboratorio para el cultivo del arroz ante este estrés.

Palabras clave: *Oryza sativa*, elementos metálicos, estrés, oxidación

INTRODUCCIÓN

Para la mayoría de las especies vegetales, la raíz es el órgano más afectado por el aluminio, siendo la inhibición del crecimiento radical el síntoma de toxicidad más frecuente (1). Además, se ha visto que las raíces se acortan y engrosan, lo cual afecta posteriormente la capacidad de la planta para la absorción de agua y nutrientes del suelo.

En el ámbito celular también se producen modificaciones como parte de la respuesta al estrés. Se ha planteado que en raíces de maíz, las células de la epidermis y corteza externa, sufren más cambios que las células corticales internas y del cilindro central (2), lo cual está relacionado con la entrada y acumulación de aluminio a lo largo del eje radical (3). En esta misma especie trata-da con aluminio, durante algunas horas se evidenció cómo

en la región apical, las células epidérmicas y corticales se observaron más anchas y altas que las células de las raíces control, lo que demostró que además de reducir la actividad mitótica (3, 4), el aluminio provoca cambios en la orientación celular, lo que conlleva a la inhibición del crecimiento por afectaciones en el alargamiento radical.

El incremento de la vacuolización celular ante el estrés por aluminio, es un efecto común en la mayoría de las especies vegetales (3). En algunas gramíneas como el maíz y la cebada, se ha podido apreciar este fenómeno en diferentes zonas radicales, como la cofia, epidermis y corteza (3, 5). También la estructura de la pared celular puede afectarse, a través de la inducción de síntesis de calosa, la cual es un indicador sensible, frecuentemente observado en las raíces dañadas por aluminio y que interrumpe la comunicación celular (6).

En nuestro país no se han presentado estudios acerca de los cambios celulares inducidos por este tipo de estrés en el cultivo del arroz, razón que conllevó a que se desarrollara esta investigación, con el propósito de estudiar las alteraciones celulares provocadas por exposición a diferentes niveles de aluminio en la raíz de dos variedades cubanas de arroz.

Ms.C. Idioleidy Álvarez, Investigadora; Dra.C. Ofelia Sam y Dra.C. Inés Reynaldo, Investigadores Titulares del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ ialvarez@inca.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó la especie *Oryza sativa* L. y se seleccionaron para el estudio los cultivares cubanos: J-104 e INCA LP-7.

Se desarrollaron tres tratamientos (pH 4), en los cuales el nivel de Al^{3+} suministrado al medio en forma de $AlCl_3$ varió en 0, 65 y 125 μM .

Se confeccionaron pequeñas cámaras de germinación en placas de Petri, donde se colocaron las semillas para su germinación. Se montaron 10 placas por tratamiento y se colocaron 25 semillas en cada una. Posteriormente estas se llevaron a la cámara de crecimiento, con 12 horas luz y 12 horas oscuridad, y una temperatura de 21/26°C (noche/día).

A los siete días de germinadas las semillas, los ápices radicales de 20 plántulas por placa, se seccionaron y fijaron en paraformaldehído 4 % y se incluyeron en resina Lowicryl (7). Después de confeccionados los bloques, estos se seccionaron en un ultramicrotomo *LKB* con cuchillas de vidrio y se obtuvieron secciones transversales de 1 μm de espesor, que se tiñeron con azul de toluidina al 0.1 % y se observaron en un microscopio de Contraste de Fase, *Olimpus*. Las imágenes se tomaron con una cámara digital acoplada al microscopio óptico.

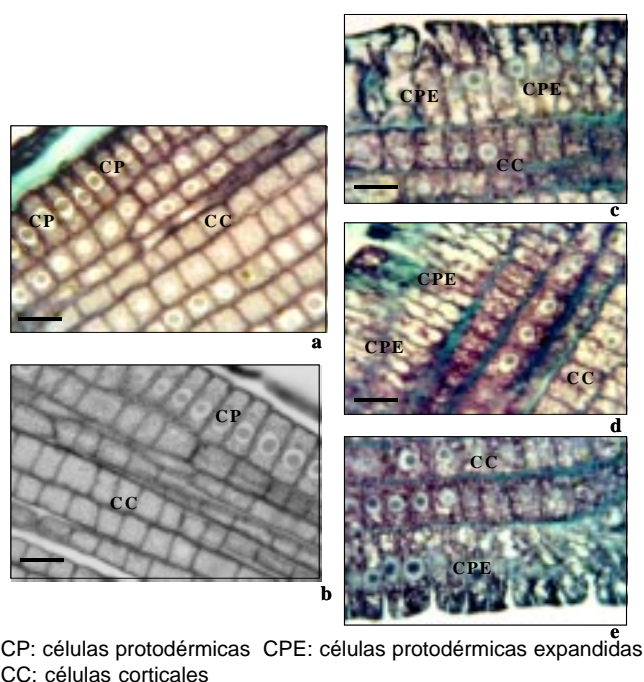
Se realizaron tres réplicas del experimento y se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expansión radial de células protodérmicas y corticales.
En las secciones longitudinales de ambas variedades, se observaron numerosos cambios a nivel celular con la imposición del estrés por aluminio.

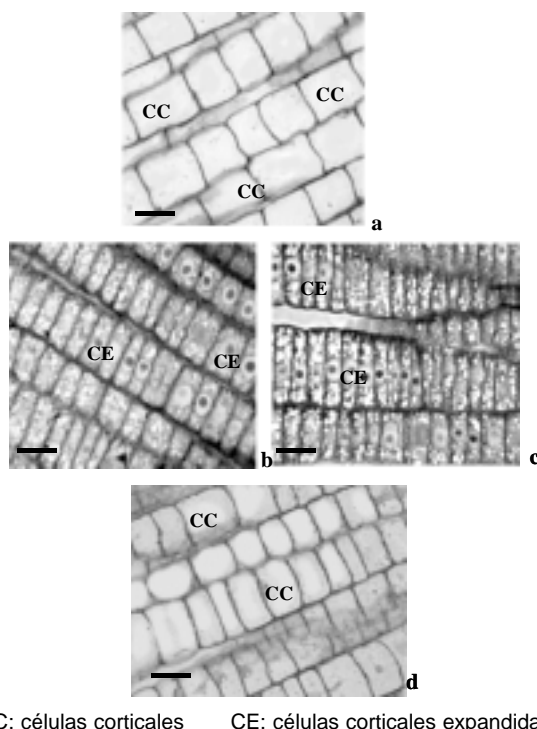
En la Figura 1 (a y b), se pueden apreciar imágenes de la radícula de plántulas no tratadas de las dos variedades en estudio. En ellas las células protodérmicas se encuentran formando una capa monoestratificada y exhiben una estructura rectangular con un núcleo concéntrico y bien definido. Sin embargo, en las plántulas tratadas con aluminio de estas mismas variedades (Figura 1 c, d y e), las células protodérmicas perdieron la uniformidad y se hicieron estrechas y alargadas, como resultado de una expansión de estas en sentido radial, lo que provocó un cambio apreciable en el aspecto del tejido.

Esta expansión radial observada como consecuencia de la exposición al aluminio, también se hizo evidente en las células corticales de las plántulas tratadas, para las dos variedades (Figura 2). Las radículas de las plántulas controles exhibieron células corticales de forma poliédrica, característica de este tipo celular, mientras que las que se sometieron a los diferentes niveles de estrés, mostraron células corticales dispuestas regularmente, pero mucho más anchas, como consecuencia de la expansión en sentido radial.



CP: células protodérmicas CPE: células protodérmicas expandidas
CC: células corticales

Figura 1. Microfotografías de las capas de células protodérmicas en las secciones longitudinales de la radícula en plántulas de las variedades J-104: control (a) y tratadas con 125 μM (c, d) e INCA LP-7: control (b) y tratadas con 125 μM (e). La barra representa 4 mm.100x



CC: células corticales CE: células corticales expandidas

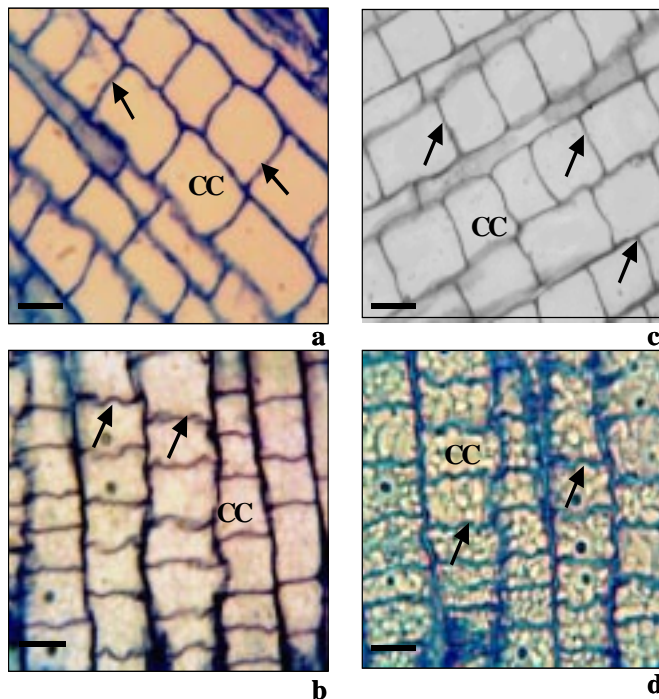
Figura 2. Microfotografías de las capas de células corticales en las secciones longitudinales de la radícula de plántulas de las variedades J-104: control (a) y tratadas con 125 μM (b) e INCA LP-7: control (d) y tratadas con 125 μM (c). La barra representa 4 mm.100x

Esto pudiera deberse a un decrecimiento en la actividad mitótica, teniendo en cuenta que en plántulas de maíz, el aluminio indujo una reducción en el número de células proliferantes, lo cual estuvo acompañado de un acortamiento de la zona meristemática (3).

Sin embargo, se ha observado una reducción en la región de alargamiento en raíces de cebada (8) y en células corticales de trigo (9) y maíz (10), lo cual sugiere que el aluminio además puede afectar la orientación del crecimiento celular.

Las modificaciones observadas pueden haber estado provocadas por una u otra influencia del aluminio, o por ambas, pero es un hecho de que son estas las responsables del crecimiento en grosor observado en experimentos anteriores (11) en las radículas de plántulas de arroz estresadas.

Cambios en las paredes celulares. En la Figura 3 se puede apreciar cómo en la radícula de las plántulas tratadas, algunas paredes de las células corticales se tornaron engrosadas e irregulares, mientras que en las plántulas controles estas células exhibieron paredes lineales y sin engrosamientos.



CC: células corticales CE: células corticales expandidas

Figura 3. Microfotografías de las capas de células corticales en las secciones longitudinales de la radícula de plántulas de las variedades J-104: control (a) y tratadas con 125 μ M (b) e INCA LP-7: control (c) y tratadas con 125 μ M (d). Obsérvese cómo las paredes (flechas) de las plántulas control son regulares, mientras que en las estresadas se encuentran de forma irregular. La barra representa 4 mm.100x

La pared celular interactúa de forma dinámica con el protoplasto y juega un papel fundamental en procesos fisiológicos como el crecimiento, la resistencia a enfermedades, maduración y abscisión entre otros (6). Se pudiera pensar que las irregularidades observadas en las paredes de células corticales surgen como consecuencia de cambios en su estructura, provocados por la unión del aluminio con algunos de sus constituyentes.

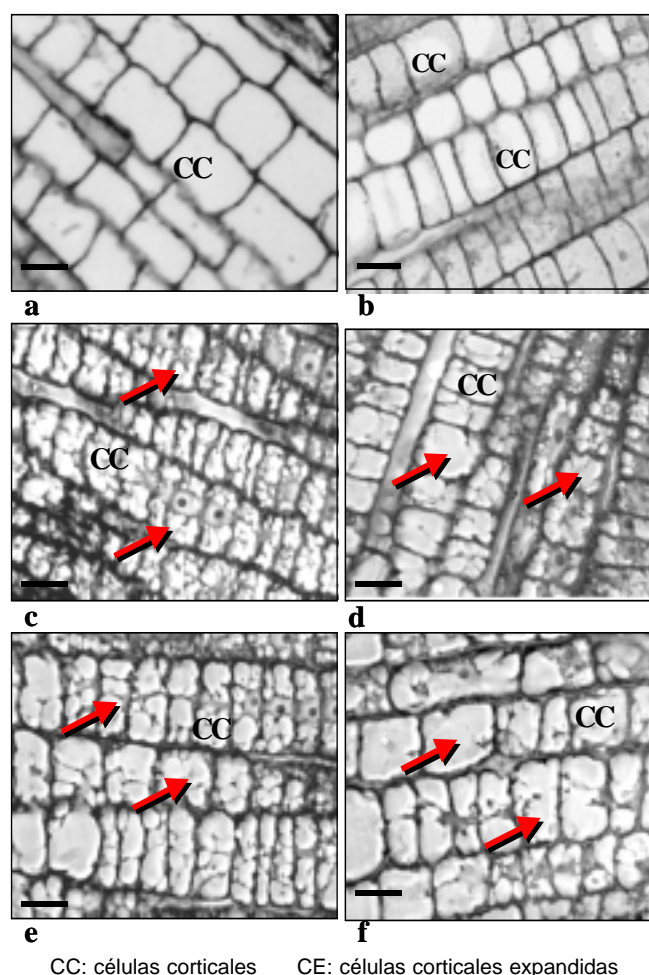
A nivel celular, uno de los sitios más susceptibles a ser afectados por este metal, es de hecho la zona apoplástica de la pared celular, donde este elemento se une de forma preferencial a grupos carboxílicos de la matriz péctica cargados negativamente y a sitios de unión del Ca^{+2} (11). Estas interacciones del aluminio pueden restringir o limitar la liberación de hemicelulosas, disminuyendo la extensibilidad de la pared y por tanto el crecimiento celular.

En células de maíz estresadas con cobre, la acumulación preferencial de la calosa inducida por el aluminio, alrededor de los plasmodesmos y depósitos de material denso entre la membrana plasmática y la pared celular, generalmente forman pequeños bulticos en las paredes celulares (3), aspecto que también pudiera haber contribuido al engrosamiento de la pared celular, observado en nuestro trabajo.

Los resultados obtenidos no permiten realizar una comparación entre variedades; sin embargo, evidencian que la posibilidad de que la inhibición del crecimiento celular haya estado determinada en gran medida por las modificaciones en la estructura y rigidez que el estrés por aluminio imprimió a la pared celular.

Efecto sobre la vacuolización celular. Se puede apreciar en la Figura 4, cómo las células corticales de las plántulas del control exhibieron una vacuolización característica de este tipo celular. Sin embargo, las células de las plántulas estresadas con 65 y 125 μ M mostraron cambios en el tamaño de las vacuolas, sobre todo para estas últimas.

Las dos variedades exhibieron vacuolas cada vez más grandes, en la medida en que se incrementaron las concentraciones de Al^{3+} , de forma tal que en ocasiones se llegaron a desplazar totalmente al núcleo, como se puede apreciar en las imágenes correspondientes a las plántulas estresadas con dosis de 125 mM de aluminio (Figura 4). Este resultado sugiere un posible mecanismo común en ambas variedades para disminuir el efecto tóxico del aluminio dentro de la célula, sobre todo porque se ha visto en otras monocotiledóneas que este fenómeno es una respuesta temprana de las células radicales al aluminio (12) y que puede relacionarse con el grado de tolerancia al aluminio mediante la capacidad que poseen las plantas para formar complejos con el metal, de forma que durante su transporte por el tonoplasto hasta la vacuola, resulten menos tóxicos para los componentes celulares (13). Resultados similares se observaron en células corticales del ápice radical en varias especies (14, 15), detectándose acumulación de aluminio en las vacuolas después de 24 horas de impuesto el estrés.



CC: células corticales CE: células corticales expandidas

Figura 4. Microfotografías de las capas de células corticales en las secciones longitudinales de la radícula de plántulas de las variedades J-104: control (a) tratadas con 65 μM (c) y 125 μM (e) e INCA LP-7: control (b), tratadas con 65 μM (d) y 125 μM (f). Obsérvese cómo las vacuolas aumentan de tamaño (flechas) cuando se incrementan las concentraciones de aluminio. La barra representa 4 μm .100x.

Se ha comprobado que los depósitos oscuros correspondientes a la acumulación del aluminio dentro de las vacuolas, en células apicales, varían con las características de la exposición al aluminio (3, 13), aspecto que también puede haber influido en nuestros resultados.

A través de todo el estudio se pudo comprobar la similitud con otras especies; el aluminio provoca importantes modificaciones celulares en las plántulas de arroz, las cuales pueden determinar sin lugar a dudas cambios morfológicos apreciables en ellas, como es la reducción del crecimiento y engrosamiento de las raíces, que dificultan el funcionamiento de la raíz como órgano y, por tanto, el exitoso desarrollo de la planta.

REFERENCIAS

1. Blancaflor, E.; Jones, D. L. y Girol, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminium induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, 1998, vol. 118, no. 1, p. 159.
2. Vázquez, M. D.; Poschenrieder, C.; Corrales, I. y Barceló, J. Change in apoplastic aluminium during the initial growth response to aluminium by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 199, p. 435-444.
3. Ciamporová, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue and cellular levels. *Biol. Plant.*, 2002, vol. 45, no. 2, p. 161-171.
4. Maltais, K. y Houde, M. A new biochemical marker for aluminium tolerance in plants. *Physiology Plantarum*, 2002, vol. 115, p. 81-86.
5. Pietraszewska, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, vol. 48, no. 3, p. 668-673.
6. Sivaguru, M.; Fujiwara, T.; Samaj, J.; Baluska, F.; Yang, Z.; Osawa, H.; Maeda, T.; Mori, T.; Volkmann, D. y Matsumoto, H. 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.*, 2000, vol. 124, p. 991-1005.
7. Sam, O.; Ramírez, C.; Coronado, M. J.; Testillano, P. S. y Risueño, M. C. Changes promoted by saline stress in tomato plant leaves: a subcellular and ultrastructural study. *Biología Plantarum*, 2003, vol. 47, p. 361-366.
8. Ciamporová, M. Diverse response of root cell structure to aluminium stress. *Plant Soil*, 2000, vol. 226, p. 113-116.
9. Ma, J. F. y Hiradate, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopirum esculentum* Moench). *Planta*, 2000, vol. 211, p. 355-360.
10. Piñeros, M. A. y Kochian, L.V. A patch-clamp study on the physiology of aluminium toxicity and aluminium tolerance in maize. Identification and characterization of Al^{3+} induced anion channels. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, p. 292-305.
11. Alvarez, I.; Sam, O. y Reynaldo, I. Cambios inducidos por el aluminio en la morfogénesis radicular del arroz. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 2, no. 1, p. 21-25.
12. Ciamporova, M. Diverse responses of root cell structure to aluminum stress. *Plant Soil*, 2000, vol. 226, p. 113-116.
13. Schwarzerova, K.; Zlenkova, S.; Nick, P. y Opatrn, Z. Aluminium induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant and Cell Physiology*, 2002, vol. 43, no. 2, p. 207-216.
14. Yamamoto, Y.; Kobayashi, Y. y Matsumoto, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminium, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, p. 199-288.
15. Sivaguru, M.; Baluska, F.; Volkman, D.; Felle, H. y Horst, W. Impacts of aluminium on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology*, 1999, vol. 119, no. 3, p. 1073-1075.

Recibido: 1 de diciembre de 2004

Aceptado: 5 de agosto de 2005