

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE METILACIÓN DE
PECTINAS DE LA PARED CELULAR EN CÉLULAS DE LA RAÍZ Y LA
TOLERANCIA AL ALUMINIO EN GENOTIPOS DE LAS ESPECIES DE ARROZ
Oryza sativa y *Oryza glumaepatula***

VANESSA REYES LOAIZA

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SANTIAGO DE CALI
2017**

**EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE EL GRADO DE METILACIÓN DE
PECTINAS DE LA PARED CELULAR EN CÉLULAS DE LA RAÍZ Y LA
TOLERANCIA AL ALUMINIO EN GENOTIPOS DE DOS ESPECIES DE ARROZ
Oryza sativa y *Oryza glumaepatula***

VANESSA REYES LOAIZA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
BIOLOGÍA**

Tutora: Thaura Ghneim Herrera Ph.D.

Co-tutora: Duina Posso Duque

CALI

2017

APROBADO POR:

Leonardo Herrera Orozco
Evaluador

Thaura Ghneim Herrera
Director del Proyecto.

Duina Posso Duque
Co-Director del Proyecto.

Cali, 10 de Enero de 2017

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Thaura Ghneim, no solo por su dedicación, compromiso y apoyo incondicional durante el proyecto, sino también por brindarme valiosas enseñanzas y consejos a lo largo de la carrera. A la profesora Duina Posso por su apoyo y orientación.

A Juliana Chaura por guiarme y acompañarme durante este proceso. A Sandra Moreno, José Sánchez y Camilo Montoya por su colaboración en el laboratorio. También, quiero agradecer a mi mejor amiga Katherine Rivera, quien me ha apoyado constantemente en todos los momentos de mi carrera.

Agradezco a Efraín Buritica de la Universidad del Valle, por la orientación en la microscopía confocal, a Andrés Torres de la Universidad del Cauca y Carlos Cardozo por sus consejos en el montaje de marcaje inmunohistoquímico. Al Dr. Leonardo Herrera por sus valiosas recomendaciones.

Finalmente agradezco a mis padres por su esfuerzo y su constante apoyo en todas las decisiones que he tomado en mi vida y por estar presentes en cada uno de los logros que he alcanzado.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	12
2	DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	14
2.1	Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.....	14
2.2	Marco teórico y estado del arte.....	15
2.2.1	Importancia del cultivo de arroz	15
2.2.2	<i>Oryza glumaepatula</i>	15
2.2.3	Aluminio como factor estresante en plantas.....	16
2.2.4	Síntomas de estrés por aluminio en plantas	16
2.2.5	Mecanismos de tolerancia al aluminio en arroz	17
2.2.6	Papel de la pared celular en la tolerancia al aluminio	18
2.2.7	Metilación de Pectinas	19
2.2.8	Anticuerpos para componentes específicos de la pared celular	20
2.2.9	Inmunofluorescencia como herramienta para el estudio de la tolerancia al aluminio	21
2.2.10	Tinción de hematoxilina para la evaluación de tolerancia al aluminio	21
2.2.11	Microscopía epifluorescente y confocal en estudios de Inmunofluorescencia.....	22
2.3	OBJETIVOS.....	23
2.3.1	Objetivo General	23
2.3.2	Objetivos Específicos	23
2.4	METODOLOGÍA PROPUESTA.....	24
2.4.1	Material vegetal.....	24
2.4.2	Esterilización	24
2.4.3	Montaje experimental	25
2.4.4	Medición del crecimiento de la raíz	25
2.4.5	Protocolo de tinción con hematoxilina	26
2.4.6	Fijación de las raíces para análisis de inmunofluorescencia.....	26
2.4.7	Protocolo de Inmunofluorescencia	27
2.4.8	Preparación de tejidos para observación en microscopio confocal....	28
2.4.9	Medición del tamaño celular y diámetro de la raíz	29

2.4.10	Medición de la intensidad de fluorescencia	30
2.4.11	Diseño experimental y análisis estadísticos	31
2.4.12	Matriz de marco lógico	32
2.5	RESULTADOS	35
2.5.1	Implementación de protocolo para obtención y manipulación de cortes semifinos 35	
2.5.2	Optimización de protocolo de inmunofluorescencia	38
2.5.3	Respuesta al estrés por aluminio en los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.....	41
2.5.4	Grado de metilación de pectinas	49
2.6	DISCUSIÓN.....	60
2.6.1	Respuesta al estrés por aluminio en los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.....	60
2.6.2	Metilación de las pectinas	64
2.7	CONCLUSIONES	68
2.8	RECOMENDACIONES.....	70
3	REFERENCIAS	71
4	ANEXOS 77	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones requeridas para la visualización óptima de los cortes en el microscopio confocal.	28
Tabla 2. Matriz de marco lógico	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tratamiento de las imágenes para el cálculo del área y diámetro celular.	30
Figura 2. Selección de áreas para medición de la intensidad.	31
Figura 3. Cortes durante y después de la optimización del protocolo.	37
Figura 4. Optimización del protocolo de inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7	40
Figura 5. Curvas de respuesta al aluminio.	43
Figura 6. Ligación de aluminio a raíces de Azucena, BGI9311, OG89 y OG130 observada mediante tinción con hematoxilina.	44
Figura 7. Tamaño promedio de las células del córtex para los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.	46
Figura 8. Cambio del diámetro de la raíz en respuesta al aluminio.	48
Figura 9. Relación JIM7/JIM5 en cada concentración para cada genotipo.	51
Figura 10. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo tolerante Azucena en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	52
Figura 11. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo tolerante Azucena en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	53
Figura 12. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo susceptible BGI en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	54
Figura 13. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo susceptible BGI en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	55
Figura 14. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo tolerante OG89 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	56
Figura 15. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo tolerante OG89 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	57
Figura 16. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo susceptible OG130 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio	58
Figura 17. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo susceptible OG130 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio.	59

ANEXOS

Anexo 1. Representación esquemática de la organización de las capas celulares en un corte transversal en raíz.	77
Anexo 2. Protocolo de inmunofluorescencia modificado.....	77
Anexo 3. Presencia de aerénquima en corte transversal de una raíz de BGI tratada con aluminio 100µM.....	79

RESUMEN

El arroz es considerado uno de los cereales más tolerantes al estrés inducido por aluminio (Famoso et al., 2010). Sin embargo, aún no se conocen con claridad los mecanismos involucrados en dicha tolerancia. Diversos estudios sugieren que la tolerancia al aluminio parece estar relacionada con la composición de la pared celular, específicamente con el contenido de pectinas y el grado de metilación de las mismas (Yang et al., 2008). El poder identificar un mecanismo asociado a la tolerancia diferencial observada en los genotipos de arroz, brindaría información que podría emplearse en la identificación de variedades cultivables en los suelos ácidos.

Por lo anterior, en este proyecto se evaluó la relación del grado de metilación de pectinas de la pared celular en células de la raíz y la tolerancia al aluminio en los genotipos Azucena y BGI (*O.sativa*) y OG89 y OG130 (*O.glumaepatula*). Para ello se confirmó la tolerancia diferencial entre los genotipos mediante una curva de respuesta a concentraciones de aluminio de 0 μM y 100 μM y ensayos de tinción con hematoxilina. Adicionalmente mediante mediciones del diámetro y del tamaño celular, se evaluaron los cambios potencialmente inducidos por el aluminio en estos parámetros. Finalmente, se prepararon cortes de las raíces de las plantas expuestas al aluminio, y se trataron con un protocolo de inmunofluorescencia con los anticuerpos JIM5 y JIM7, específicos para evaluar el estado de metilación de las pectinas. Usando microscopia confocal se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por los anticuerpos en cada corte y se calculó el grado de metilación como el índice relativo de fluorescencia JIM7/JIM5.

Los resultados obtenidos en la curva de respuesta al aluminio confirmaron tanto la tolerancia de los genotipos Azucena y OG89, como la susceptibilidad de BGI y OG130. La tolerancia diferencial de los genotipos también fue ratificada por los patrones de tinción con hematoxilina y los cambios observados en el diámetro radicular y el tamaño de las células de la raíz. En cuanto al grado de metilación de las pectinas, se observó que los genotipos tolerantes de ambas especies presentaron un mayor grado de metilación de pectinas que los genotipos susceptibles, el cual parece estar asociado a diferencias constitutivas en la composición de la pared celular. Por otro lado, en el genotipo más susceptible al aluminio, BGI, se observó desmetilación de las pectinas en respuesta al aluminio. Los patrones de metilación de pectinas coincidieron con los patrones de ligación de aluminio a la pared celular observados mediante tinción con hematoxilina.

Nuestros resultados permiten concluir que existe una relación entre el grado de metilación de pectinas y la tolerancia diferencial exhibida por los genotipos estudiados. Sin embargo, para determinar si efectivamente la metilación de pectinas es un mecanismo de tolerancia, es necesario realizar otros experimentos, evaluando otros parámetros.

Palabras clave: Arroz, tolerancia, hematoxilina, metilación, pectinas, *Oryza sativa*, *Oryza glumaepatula*, anticuerpos monoclonales.

ABSTRACT

Rice is considered one of the most tolerant cereals to aluminum stress (Famoso et al., 2010). However, the mechanisms involved in such tolerance are not fully understood. Several studies have suggested that aluminum tolerance is related to the cell wall composition, specifically with the pectin content and its degree of methylation (Yang et al., 2008). The identification of the mechanisms associated to the differential tolerance observed in rice genotypes, would provide information valuable for the identification or breeding of rice cultivars for acid soils.

In this project we evaluated whether there is any relationship between the degree of methylation of cell wall pectins in root cells and the level of aluminum tolerance observed in the genotypes Azucena and BGI (*O. sativa*) and OG89 and OG130 (*O. glumaepatula*). With this aim, the differential aluminum tolerance reported for the four genotypes was confirmed by exposing them to aluminum (100 μM Al^{3+}) and by staining their roots with hematoxylin, which revealed the degree of aluminum ligation to cell walls. Morphological and structural root changes caused by aluminum stress were estimated by measuring the root diameter and root cell dimensions. The degree of pectin methylation of root cell walls was assessed by staining with the specific monoclonal antibodies JIM5 and JIM7.

The results obtained confirmed that Azucena and OG89 are relatively tolerant to aluminum, while BGI and OG130 are susceptible. The differences in tolerance seem to be related to the degree of pectin methylation in the root cell walls.

Key words: Rice, tolerance, hematoxylin, methylation, pectins, *Oryza sativa*, *Oryza glumaepatula*, monoclonal antibodies.

1 INTRODUCCIÓN

El aluminio es uno de los elementos más tóxicos que limita la producción de cultivos alrededor del mundo (Horst et al., 2010). Este se encuentra mayormente concentrado en los suelos ácidos, que representan un 40% de la superficie agrícola. Dentro de los cultivos más afectados en todo el mundo, se encuentra el arroz, que es una de las fuentes principales de energía y vitamina B para el consumo humano (FAO, 2004).

Estudios previos han confirmado que el arroz es uno de los cereales más tolerantes a la condición de estrés que supone el aluminio en los suelos ácidos (Famoso et al., 2010). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos específicos de tolerancia que presenta este cereal. Yang et al., 2008 demostraron que los cambios en la composición de la pared celular, específicamente relacionados con el grado de metilación de las pectinas, podrían estar involucrados con la tolerancia diferencial observada entre genotipos de arroz. De ser cierto lo anterior, se podría establecer si diferentes especies muestran mecanismos diferenciados a nivel radicular, particularmente a nivel de la pared celular, lo cual podría emplearse como un test diagnóstico de tolerancia aplicable a la identificación de variedades aptas para los suelos ácidos.

La tolerancia y susceptibilidad en diferentes genotipos se ha visto asociada a un mayor y un menor grado de metilación, respectivamente (Yang et al., 2008). Estos grados de metilación son evaluados mediante la expresión de JIM7 y JIM5, dos anticuerpos monoclonales específicos que se unen a las pectinas dependiendo de su grado de metil-esterificación. JIM7 une específicamente a las pectinas con un alto grado de metil-esterificación mientras que JIM5 se une a las pectinas con un bajo grado de metilación (Willats et al., 2000). En diferentes estudios como los de Eticha et al., 2005, Yang et al., 2008 e incluso en uno más reciente (Li et al., 2016), se ha visto que los genotipos tolerantes presentan una mayor expresión de JIM7 mientras que las susceptibles presentan una mayor expresión de JIM5.

Basado en lo anterior, con este proyecto se busca establecer si efectivamente la tolerancia diferencial a concentraciones fitotóxicas de aluminio observada entre genotipos de la especie cultivada *Oryza sativa* (BGI y Azucena) y la especie silvestre *Oryza glumaepatula* (OG130 y OG89) se relaciona con el grado de metilación de las pectinas que componen la pared de las células de la raíz. Para ello se confirmó la tolerancia diferencial de los genotipos mediante una curva de respuesta y se evaluó el grado de metilación de las pectinas a partir de la intensidad de la fluorescencia presente en cortes semifinos de las raíces de plantas sometidas a concentraciones contrastantes de aluminio (0 y 100 μ M), tratados con los anticuerpos monoclonales específicos JIM 5 que se une a las

pectinas con bajo grado de metil-esterificación y JIM 7, el cual se liga a las pectinas metil-esterificadas.

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, el arroz es una fuente muy importante de energía y vitaminas para el consumo humano (FAO, 2004). Sin embargo, su producción en Colombia particularmente en la región de los Llanos Orientales, se ha visto limitada debido a las altas concentraciones de aluminio presentes en los suelos ácidos característicos de esta zona (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013). Esto hace necesario el desarrollo de estudios que permitan identificar o desarrollar variedades tolerantes a este tipo de estrés, lo cual contribuiría al aumento en los rendimientos de producción de este cultivo no solo a nivel nacional sino en todo el mundo ya que los suelos ácidos abarcan el 40% de la superficie agrícola (Casierra-posada, 2007).

Aunque se ha demostrado que el arroz es uno de los cultivos más tolerantes al estrés por aluminio (Famoso et al., 2010), todavía no se conocen en profundidad todos los mecanismos específicos que contribuyen con la tolerancia observada en este cereal. De ahí que desarrollar un proyecto que involucre la investigación de los posibles mecanismos involucrados en la tolerancia al aluminio resulta realmente importante.

De acuerdo a estudios recientes como los llevados a cabo por (Yang et al., 2008) se ha reportado que los efectos dañinos causados por las concentraciones fitotóxicas de aluminio, se relacionan principalmente con el ligamiento de este elemento a la pared celular de las células de la raíz. Este fenómeno de ligación está relacionado con la composición de la pared celular, especialmente con el contenido de pectinas y el grado de metilación de éstas. Un estudio previo realizado en arroz indica que este mecanismo podría explicar las diferencias en tolerancia al aluminio observadas entre genotipos de *Oryza sativa* L. (Yang et al., 2008), la especie cultivada de arroz.

Es por lo anterior, que e el problema a tratar en este proyecto de investigación es evaluar si las diferencias en la tolerancia al aluminio observadas entre *Oryza sativa* L. y la especie silvestre *Oryza glumaepatula* Steud, se relacionan con una composición diferencial de la pared celular, específicamente con el grado de metilación de pectinas. Para ello, se utilizaron dos anticuerpos monoclonales específicos JIM5 y JIM7 diseñados para unirse a las pectinas dependiendo del grado de metilación de las mismas, que permitieron evaluar las diferencias entre

los genotipos de cada especie con tolerancia contrastante a concentraciones fitotóxicas de aluminio.

Este proyecto proveerá información sobre un mecanismo estructural propuesto como posible explicación para la tolerancia diferencial al aluminio, importante en la identificación de variedades cultivables en los suelos ácidos tropicales.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 Importancia del cultivo de arroz

Los cereales suplen cerca del 56% de la energía y 50% de la proteína que se consume en el mundo (Cordain, 1999). En la mayoría de países latinoamericanos, incluyendo a Colombia, el arroz representa una de las mayores fuentes de alimento y suple el 20% de las necesidades alimenticias de las poblaciones de escasos recursos (Zorrilla et al., 2013).

El arroz en conjunto con el maíz y el trigo comprenden aproximadamente el 75% de la producción de cereales a nivel mundial (Cordain, 1999). El arroz se cultiva principalmente en Asia, pero también en América, Europa, y algunas partes de África, donde también representa la fuente principal de energía y vitamina B (Zibae, 2013).

En Colombia la producción de arroz es afectada por una serie de factores bióticos (plagas por insectos, malezas y fitopatógenos) y abióticos (alta temperatura, exposición a metales tóxicos) (FEDEARROZ, 2010), dentro de los cuales las concentraciones fitotóxicas de aluminio en los suelos, especialmente en los Llanos Orientales, limita el crecimiento de este cultivo (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013). Adicionalmente, cabe destacar que esta problemática no es exclusiva en el territorio colombiano, sino que abarca la mayor parte de la producción de cultivos a nivel mundial, ya que cerca del 40% de los suelos arables alrededor del mundo son ácidos (Casierra-posada, 2007).

2.2.2 *Oryza glumaepatula*

Dentro del género *Oryza* existen diferentes especies, la mayoría silvestres (Vaughan et al., 2005). Una de ellas es *Oryza glumaepatula* Steud., una especie originaria de Suramérica que se encuentra establecida en diversos ambientes incluyendo aquellos donde los suelos ácidos con altas concentraciones de aluminio están presentes, lo que indica su capacidad de soportar este tipo de estrés (Posso, Llano, Londoño, Lentini, & Ghneim, 2013).

Estudios sobre tolerancia al aluminio en esta especie se han venido desarrollando en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Icesi, lográndose identificar genotipos con tolerancia contrastante que serán utilizados en este proyecto (OG89 y OG130). Estos estudios previos han permitido establecer las concentraciones óptimas de aluminio para observar una respuesta contrastante, el tiempo de incubación óptimo y las condiciones de crecimiento más adecuadas ((Posso et al., 2013), (Tello, 2015))

2.2.3 Aluminio como factor estresante en plantas

El aluminio es el elemento metálico de mayor abundancia en la tierra (Cai et al., 2011), y se encuentra en la forma Al_2O_3 , en un poco más del 15% de la superficie terrestre (Casierra-posada, 2007). Esta forma es insoluble en los suelos, no participa en los ciclos biogeoquímicos y no representa ningún peligro para las especies vegetales (Cai et al., 2011). Sin embargo, cuando el pH de los suelos se torna ácido, alcanzando valores por debajo 5.5 (Cai et al., 2011), el aluminio se solubiliza en los suelos en su forma Al^{3+} , resultando en uno de los principales factores limitantes en la producción de cultivos a nivel mundial (Horst et al., 2010), ya que más del 40% de los suelos usados en agricultura son ácidos (Samac & Tesfaye, 2003).

En su forma Al^{3+} , el aluminio llega a ocupar más de la mitad de los sitios de intercambio iónico en el suelo, lo que genera el desplazamiento de los cationes nutritivos como el magnesio, el calcio y el potasio y da lugar a una disminución en la disponibilidad de los nutrientes esenciales para las plantas, generando síntomas de deficiencias en las mismas (Casierra-posada, 2007). Adicionalmente, la acumulación de aluminio en el sistema radicular incrementa la rigidez de la pared celular mediante el ligamiento a residuos de pectina, lo cual inhibe el relajamiento de la pared celular requerido para el crecimiento de las raíces (Wang et al., 2015). Esto irrumpe con la dinámica de absorción de agua y desencadena una serie de síntomas que afectan el adecuado desarrollo y crecimiento de la planta (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013).

2.2.4 Síntomas de estrés por aluminio en plantas

Las plantas tienen la capacidad de responder a las diversas condiciones ambientales que les impone su entorno, mediante modificaciones a nivel morfológico y fisiológico (Villamizar, 2012). Sus estructuras aéreas y subterráneas son capaces de enfrentar condiciones de estrés tanto biótico como abiótico (Fang et al., 2013). Sin embargo, algunos cambios en la morfología debido a estos factores puede traer desventajas en el desarrollo de las plantas, tales como los que ocasiona el aluminio en su forma Al^{3+} (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013).

Es importante tener en cuenta, que no todas las especies vegetales presentan el mismo grado de susceptibilidad frente a este elemento, ya que este también depende de otras variables como genotipo, las condiciones de crecimiento, la concentración del aluminio disuelto en el suelo, y el tiempo de exposición al mismo (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013). No obstante, la mayoría de especies incluyendo el arroz presentan un síntoma clave de toxicidad por aluminio que es la reducción del sistema radicular (Alvarez et al., 2012), el cual está asociado a los efectos del aluminio sobre la dinámica del intercambio de cationes en la pared celular, cambios en el potencial de membrana, inducción de estrés oxidativo y reemplazo de Mg^{2+} y Fe^{3+} en algunas reacciones celulares (Carreño & Chaparro-giraldo, 2013).

La reducción del sistema radicular se ha visto involucrada con la ligación del aluminio en la zona distal de transición (ZDT) de la raíz que se ubica entre los tres primeros milímetros después del ápice (Horst et al., 2010). En un estudio realizado en maíz, se demostró que aplicar aluminio solo en esta zona inducía la misma disminución del crecimiento que si se aplicaba aluminio en 10mm de la raíz (Horst et al., 2010). La reducción del crecimiento radicular se asocia a los procesos celulares que se llevan a cabo en esta zona, en donde las células cambian su modo mitótico y se someten a una fase de rápida elongación (Sivaguru, Liu, & Kochian, 2013).

Adicional a la disminución del crecimiento del sistema radicular se han reportado otros síntomas como la fragilidad de las raíces y un engrosamiento tanto de los ápices como de los pelos radiculares, así como también un cambio en la coloración la cual adquiere un tono marrón (Mossor-Pietraszewska, 2001).

2.2.5 Mecanismos de tolerancia al aluminio en arroz

Los mecanismos asociados a la tolerancia al aluminio identificados en varios cultivos pueden ser clasificados como internos o externos (Zheng et al., 2005). Los mecanismos externos consisten en la exclusión del aluminio desde las células de la raíz e incluyen: 1) la exudación de ácidos orgánicos y fosfatos, 2) el incremento de pH en la rizósfera, y 3) la permeabilidad selectiva en la membrana plasmática para reducir la entrada de los iones Al^{3+} al interior de las células (Zheng et al., 2005). Por otro lado, los mecanismos internos se caracterizan por proveer resistencia a los iones de aluminio una vez estos han ingresado al citoplasma celular. El secuestro de iones de aluminio al interior de las vacuolas y la activación de procesos metabólicos en el citosol que hacen frente a estos iones, son dos de los mecanismos que se incluyen dentro de esta categoría (Zheng et al., 2005).

Si bien se conoce que el arroz es uno de los cultivos con mayor tolerancia a la toxicidad por aluminio (Famoso et al., 2010), aún no están claros los mecanismos

específicos involucrados en su tolerancia. Aunque los mecanismos anteriormente mencionados han sido bien documentados en otras especies, estos no han demostrado ser determinantes en las respuestas de tolerancia en genotipos de arroz. Sin embargo, en un estudio realizado por (Wang et al., 2015) se mostró que los genotipos susceptibles de arroz tienen un mayor porcentaje de pectinas y posiblemente una mayor proporción de pectinas no metiladas que contribuyen a una mayor ligación del aluminio a la raíz como lo indica (Eticha et al., 2005) . Esto coincide con un trabajo realizado por (Yang et al., 2008) en el cual se indica que diferencias en el grado de metilación de las pectinas de la pared celular está asociado con el grado de tolerancia en genotipos de arroz, observándose un mayor porcentaje de pectinas no metiladas en un genotipo susceptible de arroz. Esto indica que dinámicas en la composición diferencial de la pared celular entre genotipos de arroz, suponen un mecanismo de tolerancia clave en este cereal.

2.2.6 Papel de la pared celular en la tolerancia al aluminio

La pared celular es la primera estructura de las raíces en tener contacto con el aluminio, de manera que es allí donde ocurren los primeros cambios que posteriormente se reflejan en la disminución de la elongación longitudinal de las raíces (Souza, Cambraia, & Ribeiro, 2016). El aluminio tiende a acumularse en esta estructura alterando la viscosidad y elasticidad requeridas para que el proceso de extensión se lleve a cabo con normalidad. Esto se debe a que la acumulación de este elemento interfiere con el recambio adecuado de los componentes necesarios para el mantenimiento de la rigidez óptima de la pared celular (Ma, Shen, Nagao, & Tanimoto, 2004).

La unión del aluminio a la pared celular ocasiona un endurecimiento de la misma que se asocia al desbalance iónico de calcio y la producción de callosa que engrosa la pared celular (Jones et al., 2006), e inhibe el intercambio de componentes celulares entre células adyacentes (Panda, Baluska, & Matsumoto, 2009).

El aluminio se une principalmente a los grupos carboxilos cargados negativamente presentes en la matriz péctica de la pared celular; la carga negativa de las pectinas depende del grado de metilesterificación de las mismas, que puede ser modificado por la actividad de la pectin-metilesterasa (PME) (Pelloux et al., 2007). El grado de metilesterificación determina la cantidad de aluminio que se puede unir a estas (Eticha et al., 2005). Adicionalmente, la desmetil-esterificación de las pectinas puede dar lugar a la formación de las “egg-box”, que son estructuras formadas a partir de enlaces de Ca^{2+} , que favorecen la gelatinización de las pectinas y la degradación de las mismas, dando lugar a la alteración de la rigidez y la textura de la pared celular (Pelloux et al., 2007).

En algunos estudios se ha demostrado la importancia de las pectinas en la tolerancia al aluminio, se ha observado que genotipos de especies tolerantes al aluminio presentan un menor contenido de pectinas y un mayor grado de metilesterificación de las mismas, lo que parece influir en la exclusión del aluminio, pues al estar metiladas, el aluminio es incapaz de unirse a los grupos carboxilos y por tanto no causar efectos fitotóxicos en las plantas ((Yang et al., 2008), (Eticha et al., 2005)).

2.2.7 Metilación de Pectinas

La pared celular vegetal es una compleja estructura macromolecular compuesta por polisacáridos, proteínas, compuestos aromáticos y alifáticos, cuya función radica principalmente en la protección celular (Marcus, Vale, Knox, Shewry, & Tosi, 2015).

Entre los polisacáridos se encuentran las pectinas, que comprenden diversos tipos estructurales de polisacáridos, dentro de los cuales se incluyen los homogalacturanos, xylogalacturanos, apiogalacturanos y rhamnogalacturanos (Hosmer & Mohnen, 2009). Estos polisacáridos, constituyen gran parte de la matriz de la pared celular y el espacio intercelular entre estas. En dicotiledóneas las pectinas representan aproximadamente el 30% de los componentes de la pared celular, mientras que en monocotiledóneas de la familia Poaceae representan el 10% (Hosmer & Mohnen, 2009).

En estudios realizados por (Wang et al., 2015), se ha propuesto que la metilación de las pectinas puede ser un mecanismo importante de tolerancia al aluminio en especies de arroz, ya que el grado de metilación y la ligación de aluminio a estos polisacáridos varía en gran medida entre los genotipos con tolerancia diferencial. En general se ha reportado que los genotipos susceptibles tienen una mayor proporción de pectinas no metiladas en comparación con los genotipos tolerantes ((Yang et al., 2008), (Li et al., 2016)).

El grado de metilación está relacionado con la disponibilidad de grupos carboxilos cargados negativamente, a los cuales el catión Al^{3+} es atraído y se une con mayor facilidad (Yang et al., 2008). Sin embargo, las pectinas no son los únicos componentes de la pared celular a los cuales se liga el aluminio, ya que se ha reportado en otras especies que el 45% del aluminio absorbido se liga a las hemicelulosas, mientras que solo el 20% se liga a las pectinas (Yang, Zhu, Peng, et al., 2011).

Adicionalmente, el grado de metilación de las pectinas se ha visto asociado a distintos procesos de protección de la planta frente a diversos factores como el

ataque a patógenos, la sequía y el frío. En un estudio realizado por (Lionetti, Bellincampi, & Cervone, 2012), se identificó que la de-esterificación de las pectinas mediada por PME aumenta la susceptibilidad de la pared celular al ataque por patógenos. También, se ha documentado que las pectinas presentes en las paredes celulares Tipo I y el grado de metilación de las mismas son un elemento clave en el estatus hídrico de la matriz péctica durante el estrés generado en condiciones de sequía. Adicionalmente en estudios realizados bajo condiciones de frío, se ha encontrado que las especies más tolerantes responden a esta condición con un aumento en el contenido de pectinas, especialmente de xilogalacturanos y homogalacturanos, presentándose un mayor grado de esterificación en esta última (Gall et al., 2015) .

Los estudios de metilación de pectinas no sólo se han realizado en arroz, sino en otro tipo de cereales como el maíz y el trigo. En estos estudios se ha demostrado tanto el grado de metilación de pectinas como su relación con otros componentes asociados a la pared celular. Por ejemplo en un estudio realizado en maíz se encontró que el genotipo susceptible Lixis, no sólo presentó mayor contenido de pectinas en la zona de transición distal sino también un bajo grado de metilesterificación lo que da lugar a una carga negativa que promueve un mayor grado de unión de Al^{3+} a la pared celular; adicional a ello, se observó una mayor síntesis de callosa en este cultivar, que se asocia a la sensibilidad al aluminio (Eticha et al., 2005).

En un estudio realizado por Ye et al., 2011 en dos genotipos de trigo con tolerancia diferencial, se comprobó el efecto negativo del aluminio sobre la elongación de la raíz, el cual se relaciona con la composición química diferencial en los ápices radicales inducida por el efecto fitotóxico de aluminio. Estudios adicionales se han realizado en arroz, no sólo para identificar el mecanismo de tolerancia sino para evaluar la heredabilidad del mismo, Chang et al., 2015 demostraron que la subespecie japónica es tolerante al aluminio y la Indica susceptible. Sin embargo los híbridos entre variedades de estas subespecies heredan la característica susceptible de la variedad indica.

2.2.8 Anticuerpos para componentes específicos de la pared celular

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de un hibridoma generado a partir de la fusión de una célula inmune específica y una célula cancerígena. Esta célula híbrida se divide indefinidamente de manera que cada una de las células producidas son clones que secretan el anticuerpo específico (Pandey, 2010).

Se han descrito diferentes marcadores para los distintos componentes de la pared celular, los cuales han permitido el desarrollo de varios estudios relacionados con las dinámicas de la pared celular, frente a diversos factores, en diferentes

especies y genotipos de las mismas (Marcus et al., 2015) . En estudios donde se ha evaluado el grado de metilación de pectinas, utilizan JIM5 y JIM7, dos anticuerpos monoclonales específicos que se unen a pectinas con bajo grado de metil-esterificación y pectinas altamente esterificadas, respectivamente (Yang et al., 2008).

Tanto JIM5 como JIM7 y el anticuerpo secundario Goat IgG anti-Rat conjugado con fluoresceína de isotiocianato serán utilizados en este proyecto, pues permitirán evaluar el grado de metilación de las pectinas en los genotipos de arroz con tolerancia diferencial al aluminio. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos anticuerpos no pueden brindar información específica acerca de la distribución espacial de las pectinas ni del desarrollo del estado de metilesterificación (W. Willats & Knox, 2003).

2.2.9 Inmunofluorescencia como herramienta para el estudio de la tolerancia al aluminio

La inmunofluorescencia es una técnica de marcaje en la cual se emplean anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes, las cuales permiten identificar la presencia de algún proceso específico mediante la unión de los anticuerpos, ya sea de manera directa o indirecta, a los antígenos o moléculas de interés (Robinson, Bs, & Kumar, 2009). Generalmente en esta técnica, los anticuerpos están conjugados químicamente a moléculas fluorescentes como la fluoresceína de isotiocianato (FITC), de manera que al unirse a la molécula de interés se puede identificar su ubicación mediante la detección de la fluorescencia (Costa & Plazanet, 2016). Esta técnica es muy usada en estudios de la pared celular debido a que permite ver en detalle su microestructura además de localizar polímeros específicos en diferentes partes del tejido (Costa & Plazanet, 2016).

En el estudio llevado a cabo por (Yang et al., 2008), se realizó un proceso de inmunofluorescencia indirecta en donde se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios JIM5 y JIM7, y el anticuerpo secundario anti-rat IgG conjugado con FITC, con el fin de evaluar la relación entre el grado de metilación de las pectinas y la tolerancia diferencial entre genotipos de arroz, ya que tanto JIM5 como JIM7 son anticuerpos específicos para las pectinas de la pared celular (Yang et al., 2008).

2.2.10 Tinción de hematoxilina para la evaluación de tolerancia al aluminio

La hematoxilina es un compuesto que se obtiene de la especie arbórea *Haematoxylum campechianum*, conocida comúnmente como palo de Campeche.

Este compuesto ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de estudios histopatológicos e histoquímicos gracias a la capacidad de teñir diferentes tejidos mediante la unión a distintas moléculas (Avwioro, 2011) .

Este compuesto es utilizado para evaluar el grado de tolerancia de las especies vegetales al aluminio. La hematoxilina tiene la capacidad de unirse al aluminio y formar un complejo que se torna de color azul, lo que permite evaluar la penetración y retención de este metal en los tejidos. Así mismo, la intensidad de la tinción sirve como un indicador directo del grado de tolerancia, pues a mayor intensidad de la tinción mayor es la presencia de aluminio en los tejidos; siendo esto una característica común en variedades susceptibles a este elemento (Cancado et al., 1999).

2.2.11 Microscopía epifluorescente y confocal en estudios de Inmunofluorescencia

Para la detección de la presencia de moléculas fluorescentes en tejidos, se pueden utilizar técnicas de microscopía, que involucran el uso de microscopios especializados como el de fluorescencia y el confocal (Spring, 2003).

El microscopio de fluorescencia puede revelar la presencia de una única molécula fluorescente a partir de un proceso que involucra la excitación de la muestra con la longitud de onda requerida y la separación de las fluorescencias emitidas. No obstante, a pesar de que las moléculas fluorescentes se pueden detectar con gran facilidad por debajo del límite de difracción del objeto, este microscopio no puede proporcionar una resolución espacial por debajo de este límite (Spring, 2003).

A diferencia del microscopio de fluorescencia, el microscopio confocal crea imágenes espaciales muy detalladas de la muestra en observación, que no se pueden distinguir nítidamente en otro tipo de microscopio (Semwogerere & Weeks, 2005). Adicionalmente, en el confocal, es posible cuantificar la señal de fluorescencia y asociar las diferencias en emisión al proceso en estudio (Semwogerere & Weeks, 2005).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Establecer si la tolerancia diferencial a concentraciones fitotóxicas de aluminio observada entre genotipos (BGI 9311 y Azucena) de *Oryza sativa* y (OG130 y OG89) *Oryza glumaepatula* se relaciona con el grado de metilación de las pectinas que componen la pared de las células de la raíz.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar la tolerancia diferencial y de crecimiento en las especies *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*.

Indicadores:

- Reducción del crecimiento del sistema radicular en las plantas sometidas a estrés por aluminio.
 - Tinción observable con hematoxilina.
 - Alteración de los patrones de extensión celular.
- Optimizar un protocolo de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (JIM 5 y JIM 7) para la identificación del grado de metilación de pectinas.

Indicadores:

- Protocolo en el cuál se definan las condiciones, pasos y reactivos para la ligación de los anticuerpos en los tejidos del sistema radicular.
 - Tinción observable de las raíces sometidas a tratamiento de aluminio y control.
- Evaluar el grado de metilación de pectinas en las paredes de las células radicales de los genotipos susceptibles (OG89 y BGI 9311) y tolerantes (OG130 y Azucena) al aluminio, mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Indicador: Observación de la presencia de los anticuerpos monoclonales en los cortes de raíces mediante microscopía confocal.

- Identificar si las diferencias en tolerancia a concentraciones fitotóxicas de aluminio se relacionan con el grado de metilación de pectinas en la pared celular de las células de la raíz.

Indicador: Observación de la intensidad de la fluorescencia y comparación de la misma entre las raíces de los genotipos tolerantes (Azucena y OG89) y susceptibles (BGI 9311 y OG130).

2.4 METODOLOGÍA PROPUESTA

2.4.1 Material vegetal

Se usaron semillas de dos genotipos de *Oryza glumaepatula* con niveles de tolerancia contrastante al aluminio (OG89, tolerante y OG130, susceptible), previamente identificados por (Posso et al., 2013). De igual manera se escogieron semillas de genotipos con tolerancia contrastante de la especie *Oryza sativa* (Azucena, tolerante y BGI9311, susceptible) (Famoso et al., 2010). Estas semillas se obtuvieron de la colección *Oryza* existente en la Universidad Icesi.

2.4.2 Esterilización

Por cada genotipo se seleccionaron 30 semillas y se esterilizaron con protocolos específicos dependiendo de la especie, para garantizar un buen porcentaje de germinación.

Las semillas de *O. glumaepatula* se expusieron a un choque térmico de 50°C durante 24h previo al proceso de esterilización. Pasadas las 24 horas las semillas se escarificaron y se pusieron en tubos de ensayo en grupos de a 6. Una vez escarificadas se inició el proceso de esterilización con el siguiente protocolo:

1. Lavado con agua estéril durante 3 minutos.
2. Lavado con nistatina (150 µl/ 100 ml) durante 10 minutos.
3. Lavado con solución desinfectante (4ml hipoclorito de sodio 1%, 1 pellet de hidróxido de sodio, 3g de cloruro de sodio, en 100 ml de agua estéril).
4. Lavado con hipoclorito de sodio 1% durante 20 minutos.
5. Breve lavado con agua estéril.

Paralelo al proceso de esterilización de las semillas de *O. glumaepatula* se realizó el protocolo de esterilización para las semillas de *O. sativa*, el cual consistió en la transferencia de las semillas a dos Erlenmeyer con magnetos, a los cuales se adicionaron 50 ml de hipoclorito de sodio al 2,5%. Los Erlenmeyer se pusieron en una plancha de calentamiento con agitación constante y una temperatura promedio de 37°C, durante 30 minutos. Posterior a ello se realizaron 3 lavados, cada uno de 5 minutos, con agua estéril autoclavada.

Una vez terminado el proceso de esterilización, las semillas se colocaron sobre algodón húmedo en cajas Petri autoclavadas. Las cajas se envolvieron en aluminio y se incubaron en un horno a una temperatura de 37°C. Se dejaron en estas condiciones durante 3 días para dar promover la germinación. Finalmente, una vez germinadas, las plántulas se expusieron a la luz para promover la síntesis de clorofila.

Es importante resaltar que la esterilización se realizó al interior de la cabina de flujo laminar para garantizar mayor esterilidad en el proceso.

2.4.3 Montaje experimental

Las plantas se cultivaron en condiciones hidropónicas. Después de la germinación y una vez las plántulas desarrollaron la raíz principal, fueron colocadas en una base de foami e introducidas en beakers de vidrio con solución nutritiva Kimura B durante dos días, en los cuales se cambió gradualmente el pH antes de transferirlas a los tratamientos a pH 4.0.

Completados los dos días, 10 plántulas de cada genotipo fueron transferidas al tratamiento de estrés por aluminio (100 μM) en solución Kimura B pH 4.0 y otras 10 al control con Solución Kimura B pH 4.0 durante 5 días. La distribución de las plantas en los tratamientos se realizó de manera aleatoria. Es importante resaltar la selección de la concentración de aluminio de 100 μM se basó en estudios previos realizados en el laboratorio de fisiología vegetal de la Universidad Icesi ((Tello, 2015) (Posso et al., 2013)). Esta concentración permite observar la tolerancia diferencial entre genotipos (Tello, 2015).

Durante la exposición a los tratamientos, las plantas estuvieron bajo condiciones controladas de luz (12 horas luz/oscuridad), temperatura (entre 30°C y 32°C) y pH (4.0).

2.4.4 Medición del crecimiento de la raíz

La construcción de una curva de respuesta que se realizó previamente al inicio de este trabajo de grado, permitió establecer que 5 días de exposición de las plántulas, a concentraciones fitotóxicas de aluminio son suficientes para observar la tolerancia diferencial en cada uno de ellos y por tanto evaluar la respuesta de metilación.

La curva de respuesta fue realizada por Posso y colaboradores (2017) en el Laboratorio de Fisiología Vegetal. Como estudiante tesista participé en su construcción y el análisis de imágenes digitales. Para la construcción de la curva, se fotografió el sistema radicular de las plantas antes de exponerlas a los tratamientos; registro que se tomó como día 0 para el análisis posterior. Nuevamente se tomaron fotografías de las plántulas cada 5 días hasta el día 20 después de haber sido expuestas a los tratamientos. A fin de observar cambios en el crecimiento de las raíces, se analizaron las imágenes mediante el software Rootreader2D v.4.3.2 (Clarck & Kochian, 2006) , que permitió medir la longitud del sistema radicular que según Posso et al, 2013 es el parámetro óptimo para

observar las diferencias del crecimiento radicular entre los genotipos tolerantes y susceptibles de las dos especies en estudio.

2.4.5 Protocolo de tinción con hematoxilina

Una vez establecido el tiempo de exposición óptimo al aluminio para observar diferencias en la respuesta de los genotipos, se procedió a establecer un segundo experimento para evaluar la respuesta a nivel de ligación de aluminio (tinción con hematoxilina), cambios en el grado de metilación de pectina (JIM5 y JIM7), y cambios en el diámetro y volumen celular. En este experimento, las plántulas de cada genotipo fueron sometidas a un tratamiento de estrés por aluminio (100 μ M) en solución Kimura B pH 4.0 y otras 10 al control con Solución Kimura B pH 4.0 durante 5 días, siguiendo los pasos indicados en la sección 2.4.3.

Las raíces de las plántulas fueron teñidas con hematoxilina, para establecer de manera cualitativa si las diferencias en el grado de tolerancia al aluminio exhibida por Azucena, OG89, BGI9311 y OG130, se relacionan con diferencias en la ligación de aluminio a los tejidos de estos genotipos.

Una vez se completaron los 5 días del tratamiento se seleccionaron 5 raíces de cada genotipo por tratamiento, las cuales se tiñeron teniendo en cuenta el protocolo estandarizado por Posso, 2013.

Cada raíz seleccionada fue cortada a 2cm desde el ápice de la raíz, estos fragmentos se lavaron en tubos Falcon con 25 ml de agua destilada con agitación continua durante 15 minutos. Luego las raíces se secaron empleando Kimwipes y se tiñeron sobre cajas Petri con una solución de hematoxilina (0,2% (p/v) y Ioduro de potasio (0,02% (p/v) por 20 min.

Completado el proceso de tinción, las raíces se lavaron con 35 ml de agua destilada con agitación continua durante 15 min y se observaron bajo un estereoscopio acoplado a una cámara Nikon SM28000, y se fotografiaron haciendo uso del Software Nis elements BR.

Una vez fotografiada las raíces, se realizaron cortes semifinos a mano en los primeros tres milímetros sobre el ápice, sección de la raíz correspondiente a la zona distal de transición, con el fin de observar los patrones de tinción interna en cada uno de los genotipos. Los cortes se observaron bajo el microscopio Nikon Eclipse 55i trinocular en condiciones de luz blanca, y se fotografiaron mediante el software Nis elements F v.3.2.

2.4.6 Fijación de las raíces para análisis de inmunofluorescencia

Cinco raíces de cada genotipo fueron seleccionadas y seccionadas manualmente en fragmentos de 2,5 cm de longitud. Los segmentos se almacenaron en solución fijadora. La solución fijadora se preparó según las concentraciones indicadas por Yang et al., 2008: paraformaldehído al 4% en PIPES 50 mM, sulfato de magnesio (MgSO₄) 5mM, EGTA a pH 6.9, en agua destilada.

Con estos segmentos se realizaron cortes semifinos a mano que posteriormente fueron tratados con el protocolo de inmunofluorescencia. Los cortes semifinos se realizaron a mano alzada sobre una caja Petri de vidrio haciendo uso de cuchillas Minora y bajo la observación de la raíz en un estereoscopio. Para asegurar que los cortes se realizaban en la zona de los tres milímetros después del ápice, se pegó con cinta debajo de la caja Petri un cm² de papel milimetrado; de manera que al observar por el estereoscopio, se pudiera determinar con mayor precisión el grosor de los cortes.

Con ayuda de un pincel número 000, se trasladaron los cortes desde la caja de Petri a los pozos de una placa ELISA, que contenían 20 µl de solución fijadora. Cada pozo tenía asignada la nomenclatura (genotipo y concentración) y el anticuerpo con el cual se tratarían los cortes de cada pozo. La distribución de los cortes para una misma concentración y genotipo se realizó de manera aleatoria.

Los cortes se dejaron 24 horas en solución de fijación a 4°C antes de ser tratados con el protocolo de inmunofluorescencia.

2.4.7 Protocolo de Inmunofluorescencia

Los cortes realizados previamente y contenidos en solución de fijación se trataron con un protocolo de tinción con anticuerpos basado en el trabajo de Yang et al., 2008. Los cortes contenidos en la placa de ELISA con solución fijadora, se lavaron después de 24 h con 30 µl de buffer fosfato salino (10X pH 7.4) o PBS (por sus siglas en inglés) durante 3 minutos. Después de este tiempo, los cortes se trasladaron de los pozos a portaobjetos con ayuda de una micropipeta de 200 µl. Usando una micropipeta de 2.5 µl se retiró cuidadosamente el exceso de PBS, procurando que los cortes no se deshidrataran.

Con el fin de bloquear uniones inespecíficas de los anticuerpos se agregaron 30 µl de albumina sérica bovina al 0,2% en PBS (10X pH 7.4) y se esperó por 30 minutos. Nuevamente se retiró el exceso de solución con ayuda de la micropipeta de 2.5 µl. Luego se inició el proceso de incubación por 2h con los anticuerpos primarios JIM5 y JIM7. Para ello se agregó a cada placa 30 µl de anticuerpo diluido 1:10 en albumina sérica bovina 0,2% en PBS (10X pH 7.4). Este proceso de incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente y oscuridad. Culminado el periodo de incubación, se retiró el exceso de anticuerpo primario realizando 3 lavados de 5 minutos con PBS (10X pH 7.4); en cada lavado se agregaron 30 µl

de PBS y se retiró el exceso del mismo. Luego se adicionaron 30 μ l de anticuerpo secundario (anti-rat IgG conjugado con fluoresceína de isotiocianato) diluido 1:50 en albumina sérica bovina 0,2% en PBS (10X pH 7.4). La incubación se llevó a cabo por dos horas a 37°C. Es importante resaltar que este proceso se debe realizar en incubadora para garantizar su eficacia.

Finalmente se realizaron tres lavados con PBS (10X pH 7.4) durante 5 minutos y se retiró el exceso. Para realizar el montaje se adicionaron 20 μ l de una solución 50:50 PBS/ Solución fijadora en los portaobjetos y se pusieron los cubreobjetos. Para evitar el secado de los cortes se selló el cubreobjetos con una capa doble de esmalte transparente.

Los anticuerpos primarios JIM5, JIM7 y el secundario que se utilizaron en este proyecto se obtuvieron del Complex Carbohydrate Research Center de la Universidad de Georgia mediante el servicio Carbosurce que ahí se ofrece (University of Georgia, 2016).

Con la finalidad de corregir la autofluorescencia de los tejidos radiculares se incluyó un control de tinción, para lo cual cortes obtenidos de las plántulas sometidas a los distintos tratamientos fueron procesados empleando el mismo proceso de tinción pero sin incubarlos en presencia de JIM5 o JIM7.

2.4.8 Preparación de tejidos para observación en microscopio confocal

Después de realizar el montaje de las muestras tratadas con los anticuerpos, se realizó una observación inicial en el microscopio Nikon Eclipse 55i trinocular con contraste de fase de fluorescencia que dispone la Universidad Icesi, con el fin de comprobar la emisión de fluorescencia. Posteriormente, los montajes se llevaron a la Universidad del Valle sede San Fernando y se observaron en el microscopio confocal (LSM 700). Haciendo uso del software Zen 2009 se tomaron las fotos de los cortes con las siguientes condiciones:

Tabla 1. Condiciones requeridas para la visualización óptima de los cortes en el microscopio confocal.

Parámetro	Valor
Laser	488nm
Diafragma de punto	350.8
Ganancia(Master)	726

Ganancia de compensación	0
Ganancia digital	1.2
Velocidad	1

2.4.9 Medición del tamaño celular y diámetro de la raíz

Para evaluar alteraciones del aluminio en la extensión de la pared celular, se midió el diámetro de las raíces y el tamaño celular en la región del córtex (Anexo 1). Para ello, las fotografías obtenidas previamente se analizaron con el programa ImageJ (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) delimitando de manera circular el área de cada célula (Figura 1-A). En el caso de células irregulares se utilizó la herramienta de selección manual para delimitar el área. Se utilizaron 10 imágenes correspondientes a cada accesión en cada uno de los tratamientos (control y 100 $\mu\text{M Al}^{3+}$).

En cada imagen analizada, se seleccionaron 5 raíces y se midió la longitud transversal de las mismas (Figura 1-B). Se analizaron 10 imágenes para cada accesión en cada tratamiento para los días 0 y 5 de exposición a los tratamientos.

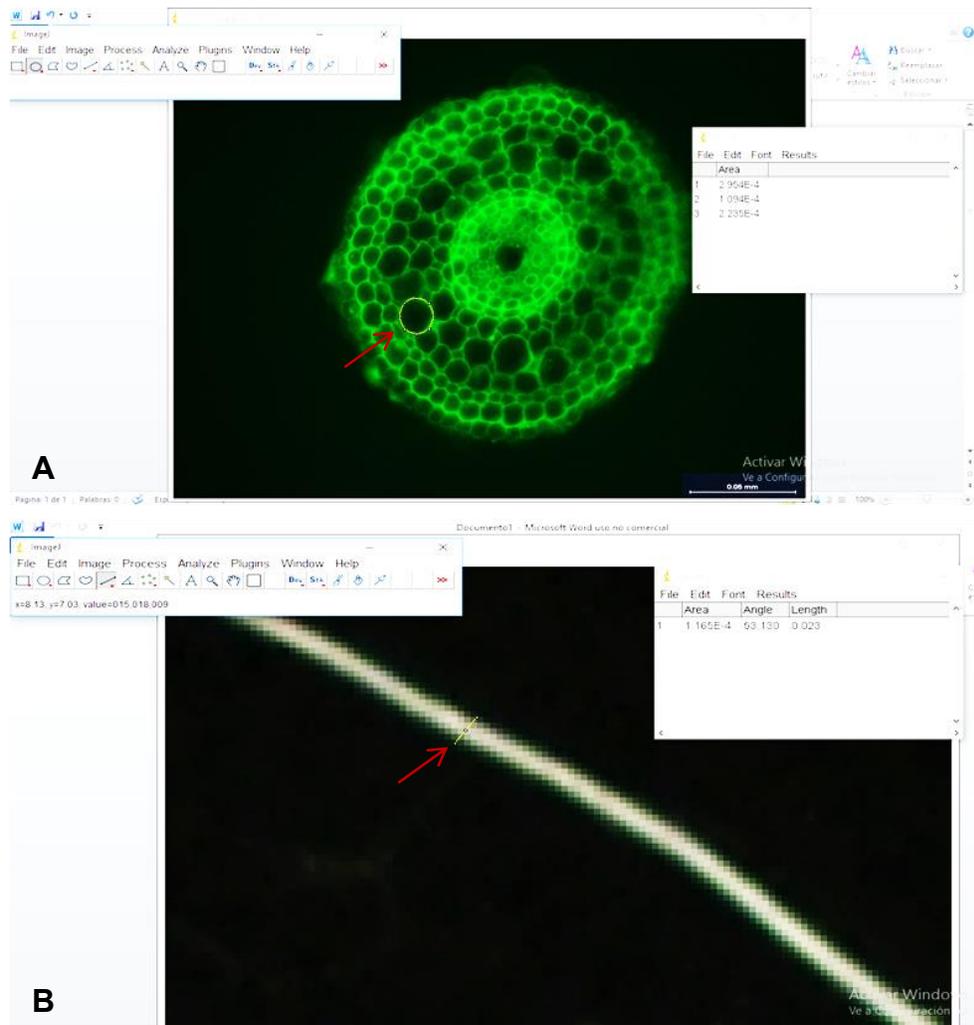


Figura 1. Tratamiento de las imágenes para el cálculo del área y diámetro celular. Con ayuda de la herramienta de selección circular del programa ImageJ, se midió el área de cada célula en el córtex de la raíz (A). El diámetro se cuantificó delimitando la longitud transversal de la raíz (B).

2.4.10 Medición de la intensidad de fluorescencia

Para comparar el grado de metilación de pectinas en la pared celular de las células de la raíz, se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por los anticuerpos mediante el análisis de las fotografías obtenidas en el microscopio confocal. Este análisis se realizó con el programa Nis Elements BR (Nikon Corporation, 2014).

En cada fotografía se tomaron 5 medidas de fluorescencia, a partir de áreas seleccionadas en la región del córtex de la raíz (Figura 2). Para cada genotipo

se analizaron 5 imágenes por tratamiento y anticuerpo específico (JIM5, JIM7) y los controles (cortes de cada tratamiento sometido al proceso de tinción sin JIM5 o JIM7).

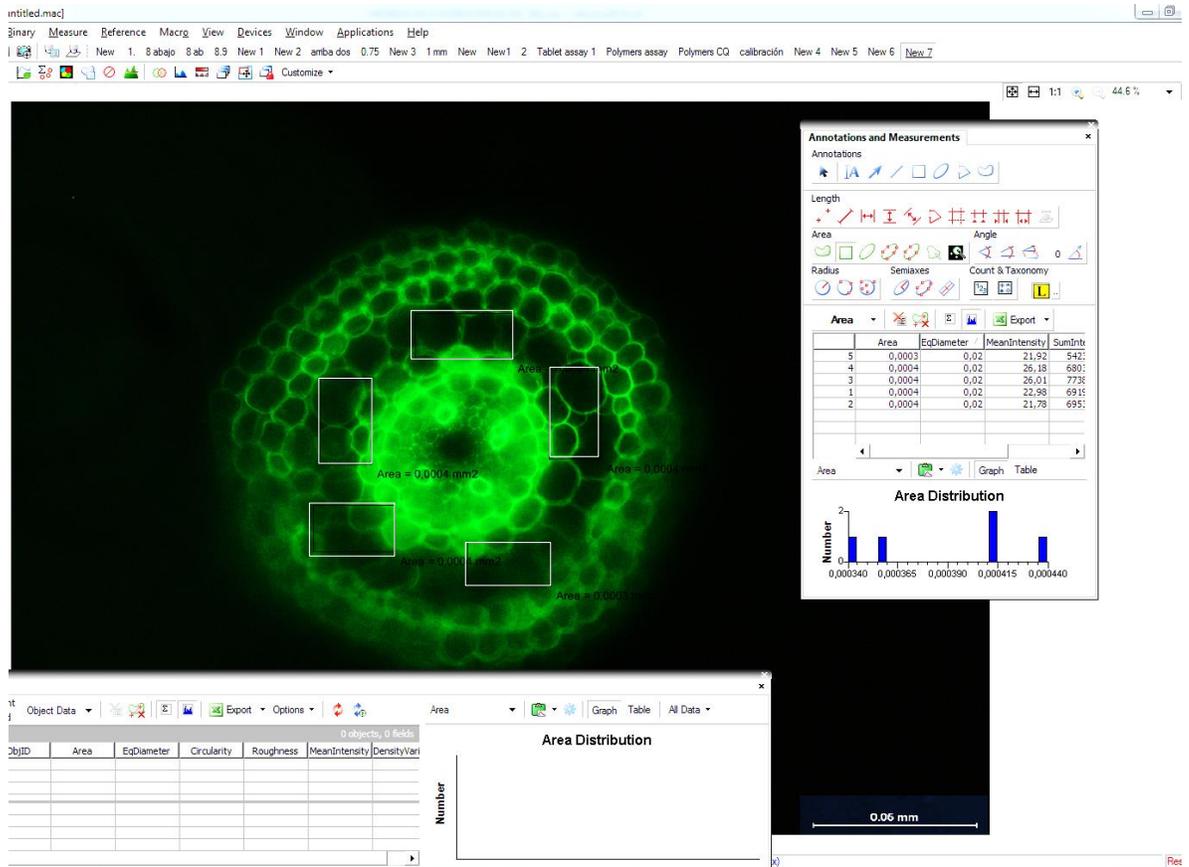


Figura 2. Selección de áreas para medición de la intensidad. Se realizaron 5 rectángulos en el córtex y se midió la intensidad en el área delimitada por estos.

2.4.11 Diseño experimental y análisis estadísticos

Se realizó un diseño factorial de 2 factores: genotipo y concentración de aluminio, con 4 y 2 niveles, respectivamente. Para cada nivel de tratamiento se tomaron medidas repetidas en dos ocasiones (0 y 5 días de exposición a los tratamientos). Para el análisis del crecimiento de las raíces se evaluaron 10 réplicas, mientras que el análisis histológico con hematoxilina y los anticuerpos se consideraron 5 réplicas.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Minitab 17.1.0. (Minitab Inc., n.d.)

Previo a los análisis estadísticos, las respuestas de crecimiento radicular fueron normalizadas con respecto al día 0, para cada plántula en cada tratamiento con el fin de eliminar las diferencias iniciales exhibidas en el desarrollo radicular, como se muestra a continuación:

$$\text{Normalización} = \frac{\text{Longitud día } x}{\text{Longitud día } 0}$$

La existencia de diferencias significativas en la respuesta de crecimiento de raíces en los tratamientos de aluminio se evaluó mediante una prueba T para datos pareados, dado que cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los datos de intensidad de fluorescencia cumplieron con los supuestos de normalidad y se evaluó la existencia de diferencias significativas en las respuestas de los distintos genotipos bajo los diferentes tratamientos, mediante un modelo lineal general y prueba de comparación de Tukey.

Los valores del diámetro de raíces no cumplieron con el supuesto de normalidad, por tanto se ajustaron mediante una transformación de Johnson Posteriormente, se analizaron con un modelo lineal general y pruebas de comparación de Tukey para establecer la existencia de diferencias significativas. Los datos del tamaño celular no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza, por lo que las diferencias entre los datos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis.

2.4.12 Matriz de marco lógico

Tabla 2. Matriz de marco lógico

<p>Evaluación de la relación entre el grado de metilación de pectinas de la pared celular en células de la raíz y la tolerancia al aluminio en genotipos de las especies de arroz <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i></p>
<p>Objetivo General: Establecer si la tolerancia diferencial a concentraciones fitotóxicas de aluminio observada entre genotipos de <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza</i></p>

glumaepatula se relaciona con el grado de metilación de las pectinas que componen la pared de las células de la raíz.

Objetivos específicos:	Actividades	Indicadores	Supuestos
<p>Confirmar la tolerancia diferencial de crecimiento en las especies <i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i>.</p>	<p>Selección, esterilización y germinación de semillas.</p> <p>Toma de medidas radiculares antes y después de la exposición al estrés.</p> <p>Preparación de cultivos hidropónicos.</p> <p>Traspaso de las plántulas a los cultivos hidropónicos y exposición a tratamiento durante 3 días.</p> <p>Tratar las raíces con una solución fijadora.</p> <p>Obtener cortes de las raíces y exponerlos a un protocolo de inmunofluorescencia.</p>	<p>Reducción del crecimiento del sistema radicular en las plantas sometidas a estrés por aluminio.</p> <p>Incremento en el número de pelos radicales.</p>	<p>Contar con el material vegetal requerido.</p> <p>Disponibilidad del material para la elaboración de los cultivos hidropónicos.</p> <p>Contar con elementos de medición de longitudes.</p>
<p>Optimizar un protocolo de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (JIM 5 y JIM 7) para la identificación del grado de metilación de pectinas.</p>	<p>Realizar una búsqueda bibliográfica sobre diferentes protocolos de inmunofluorescencia específicos para la identificación del grado de metilación de pectinas.</p> <p>Germinación de semillas de los genotipos de la especie</p>	<p>Protocolo en el cuál se definan las condiciones, pasos y reactivos para la ligación de los anticuerpos en los tejidos del sistema radicular.</p>	<p>Disponibilidad de los reactivos y los anticuerpos requeridos en el protocolo.</p> <p>Viabilidad de los anticuerpos.</p> <p>Obtención de los cortes ultrafinos de las raíces.</p>

	<p><i>Oryza sativa</i> y <i>Oryza glumaepatula</i>.</p> <p>Someter las raíces de las plantas a los pasos propuestos en el protocolo.</p> <p>Ajustar inconsistencias en el protocolo para su optimización.</p>	<p>Tinción observable de las raíces sometidas a tratamiento de aluminio y control.</p>	<p>Contar con la disponibilidad de la persona encargada de realizar los cortes ultrafinos.</p> <p>Contar con el material vegetal requerido.</p>
<p>Evaluar el grado de metilación de pectinas en las paredes de las células radicales de los genotipos susceptibles (89 y BGI) y tolerantes (130 y Azucena) al aluminio, mediante ensayos de inmunofluorescencia.</p>	<p>Someter las raíces a estrés fitotóxico por aluminio y condiciones control.</p> <p>Obtener los cortes ultrafinos de las raíces tratadas con solución de fijación.</p> <p>Tratar los cortes ultrafinos acorde con el protocolo de inmunofluorescencia previamente estandarizado.</p> <p>Observar los cortes tratados con los anticuerpos mediante microscopia confocal.</p>	<p>Observación de la presencia de los anticuerpos monoclonales en los cortes de raíces mediante microscopia confocal.</p>	<p>Disponibilidad y buen estado del microscopio confocal.</p> <p>Buena conservación de los cortes de raíces tratados con el protocolo.</p>
<p>Identificar si las diferencias en tolerancia a concentraciones de fitotóxicas de aluminio se relacionan con el grado de metilación de</p>	<p>Observar bajo el microscopio y mediante programas de análisis de imágenes las diferencias de la ligación de los anticuerpos a los tejidos radicales entre los</p>	<p>Observación de la intensidad de la fluorescencia y comparación de la misma entre las raíces de los</p>	<p>Disponibilidad y buen estado del microscopio confocal.</p> <p>Habilidades en el manejo de un programa de análisis de</p>

pectinas en la pared celular de las células de la raíz.	distintos genotipos.	distintos genotipos.	imágenes para establecer la comparación del grado de metilación de pectinas.
---------------------------------------------------------	----------------------	----------------------	------------------------------------------------------------------------------

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Implementación de protocolo para obtención y manipulación de cortes semifinos

Para el desarrollo de este proyecto fue necesario implementar un protocolo de obtención y manipulación de cortes semifinos, con el fin de poder observar la ligación del aluminio al interior del tejido radical mediante tinción con hematoxilina, y la metilación de las pectinas, mediante el uso de anticuerpos monoclonales.

En la mayoría de estudios histológicos el proceso de obtención de cortes consta de diferentes etapas, desde la inclusión de las muestras en resinas especiales y posterior corte con instrumentos especializados como el ultra-micrótopo.

Sin embargo, no en todos los estudios utilizan cortes obtenidos a partir del micrótopo. En diversos estudios, como el de Yang et al., 2008 se han obtenido excelentes resultados a partir de cortes hechos a mano, si bien estos estudios no especifican las condiciones ni las herramientas que se deben usar para la obtención y manipulación de los cortes.

Dado que en el laboratorio no se disponía de un ultramicrotopo, decidimos obtener los cortes semifinos a mano alzada. En un primer intento, ensayamos incluir las raíces de arroz en un bloque con agar al 3%, con el objetivo de facilitar la manipulación de las muestras y obtener varios cortes de forma simultánea.. No obstante, el agar a esta concentración no mostró la rigidez necesaria para soportar la presión ejercida durante la ejecución de los cortes. Por tanto, se optó por obtener cortes a mano "alzada" con ayuda de una cuchilla menor y un estereoscopio.

La primera etapa del proyecto de grado (2 semanas), se concentró en la optimización de un procedimiento para la obtención de los cortes a mano alzada. Nuestro protocolo final incluye el corte de las raíces con la ayuda de un estereoscopio, con las muestras de raíces mantenidas en cajas de Petri de vidrio con un volumen pequeño de agua (20 µL). La obtención de cortes completos y

finos requiere el recambio constante de cuchillas Minora. La manipulación de los cortes también es fundamental para mantener la integridad de los mismos durante los procedimientos de tinción. En nuestro protocolo empleamos un pincel número 000 para transferir los cortes desde la caja Petri hacia los portaobjetos o las placas Elisa. La metodología implementada para la obtención de los cortes semifinos fue exitosa (Figura 3). En un inicio los cortes quedaban gruesos y poco a poco se lograron manipular las muestras de tal forma que se lograron obtener cortes semifinos completos, los cuales fueron tratados posteriormente con los protocolos de tinción con hematoxilina y los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7.

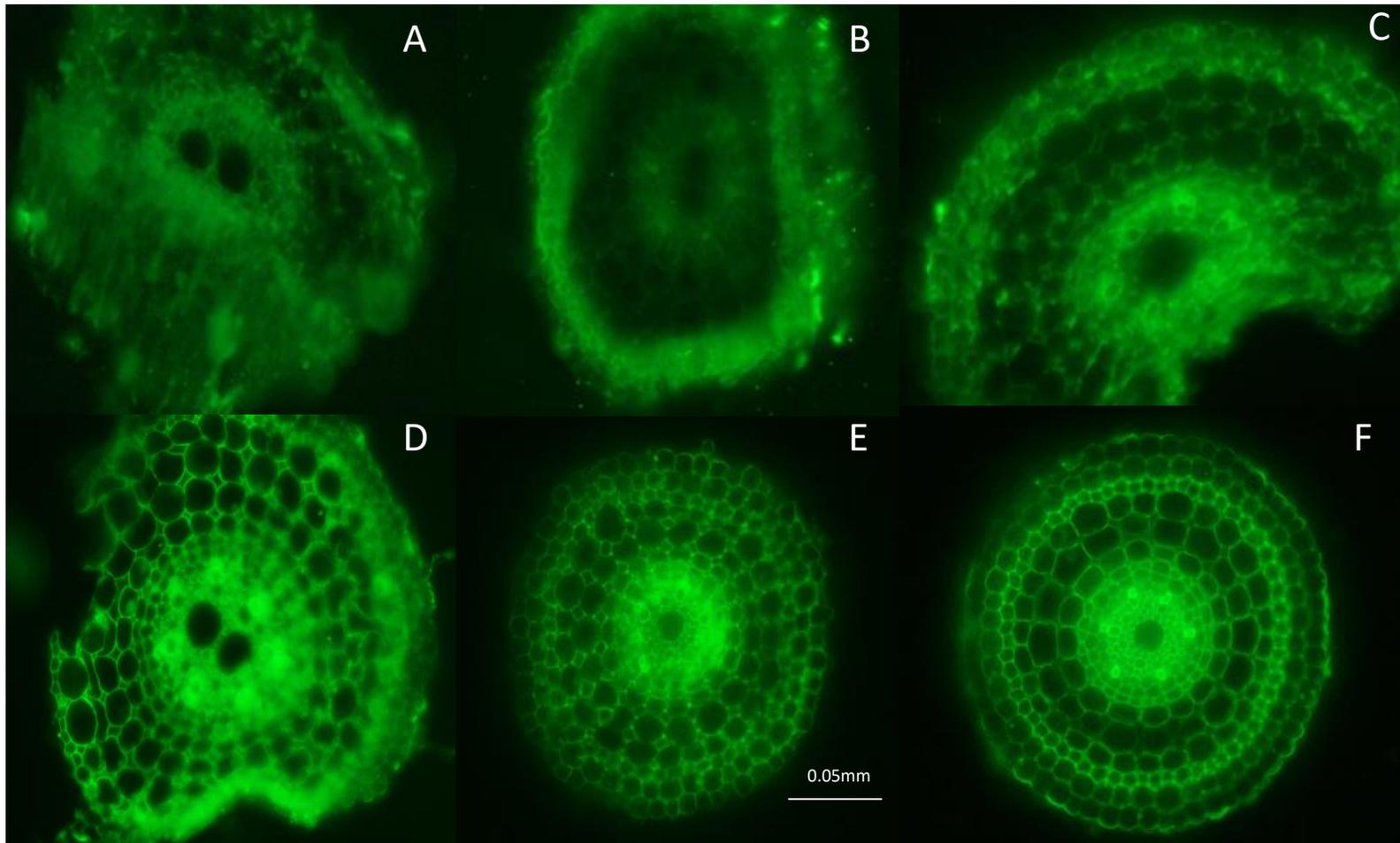


Figura 3. Cortes durante y después de la optimización del protocolo. Cortes obtenidos durante la implementación del protocolo (A, B, C). Cortes obtenidos aplicando el protocolo optimizado y la manipulación adecuada (D, E, F). Fotografías tomadas a 40x, la barra de escala mide 0,05mm.

2.5.2 Optimización de protocolo de inmunofluorescencia

Para evaluar el grado de metilación de pectinas, se realizaron modificaciones al protocolo de tinción publicado por Yang et al., 2008. En el protocolo original los cortes son expuestos a una solución fijadora (paraformaldehído 4% en 50mM PIPES, MgSO₄ 5mM y EGTA 5mM, pH 6.9) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavan repetidamente con buffer fosfato salino (PBS) y se bloquean con albumina sérica bovina al 2% en PBS durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se incuban por dos horas con los anticuerpos JIM 5 y JIM 7 diluidos 1:10 en albumina sérica bovina al 2% en PBS. Después de ello las muestras se lavan 3 veces con PBS y se incuban con el anticuerpo secundario anti-rat IgG conjugado con fluoresceína de isotiocianato durante dos horas a 37°C y finalmente se montan en portaobjetos y se observan bajo el microscopio.

Al aplicar este protocolo a nuestras muestras no se observó emisión de fluorescencia (Figura 4). De manera que se ajustaron diferentes parámetros del mismo (tiempos de incubación, volumen de soluciones, implementos) hasta obtener una metodología óptima para evaluar el grado de metilación de pectinas de la pared celular mediante tinción con JIM5 y JIM7.

El primer cambio, consistió en extender el tiempo de incubación en la solución fijadora de 1h a 24 h, empleando 30 μ l de solución fijadora a 4 °C.

Posteriormente se estableció que la concentración y pH del buffer PBS, óptimos para los lavados y la preparación de la albumina sérica y dilución de los anticuerpos, son 10X y 7,4 respectivamente.

Los tiempos de lavado también fueron ajustados. El primer lavado que se realiza con PBS debe tener una duración de 3 minutos, y los lavados para quitar exceso de anticuerpos 5 minutos cada uno. Es importante resaltar que en los procesos de lavados se retiró el exceso de PBS con ayuda de una micropipeta de 2.5 μ l, procurando que los cortes nunca se secan.

Para la incubación con los anticuerpos se establecieron las condiciones y los implementos necesarios para desarrollar estos pasos con mayor efectividad. Para la incubación con los anticuerpos primarios se adicionaron 30 μ l de anticuerpos a cada muestra y la incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente y en completa oscuridad durante dos horas. La incubación con el anticuerpo secundario (anti-rat IgG conjugado con fluoresceína de isotiocianato) diluido 1:50 en albumina sérica bovina 0,2% en PBS (10X pH 7.4) se realizó a la temperatura indicada en el protocolo de Yang et al., 2008. Sin embargo, es importante resaltar que este proceso se realizó en incubadora. Durante los primeros ensayos, este paso se hizo en horno y en plancha de calentamiento y no se pudo observar fluorescencia en los cortes.

Finalmente para realizar el montaje se adicionaron 20 μ l de una solución 50:50 PBS/ Solución fijadora en los portaobjetos y se colocaron los cubreobjetos. Para evitar el secado de los cortes se selló el cubreobjetos con una capa doble de esmalte transparente.

Los ajustes realizados al protocolo originalmente propuesto por Yang et al. (2008) permitió observar la emisión de fluorescencia luego del tratamiento de los cortes con los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7. (Figura 4).

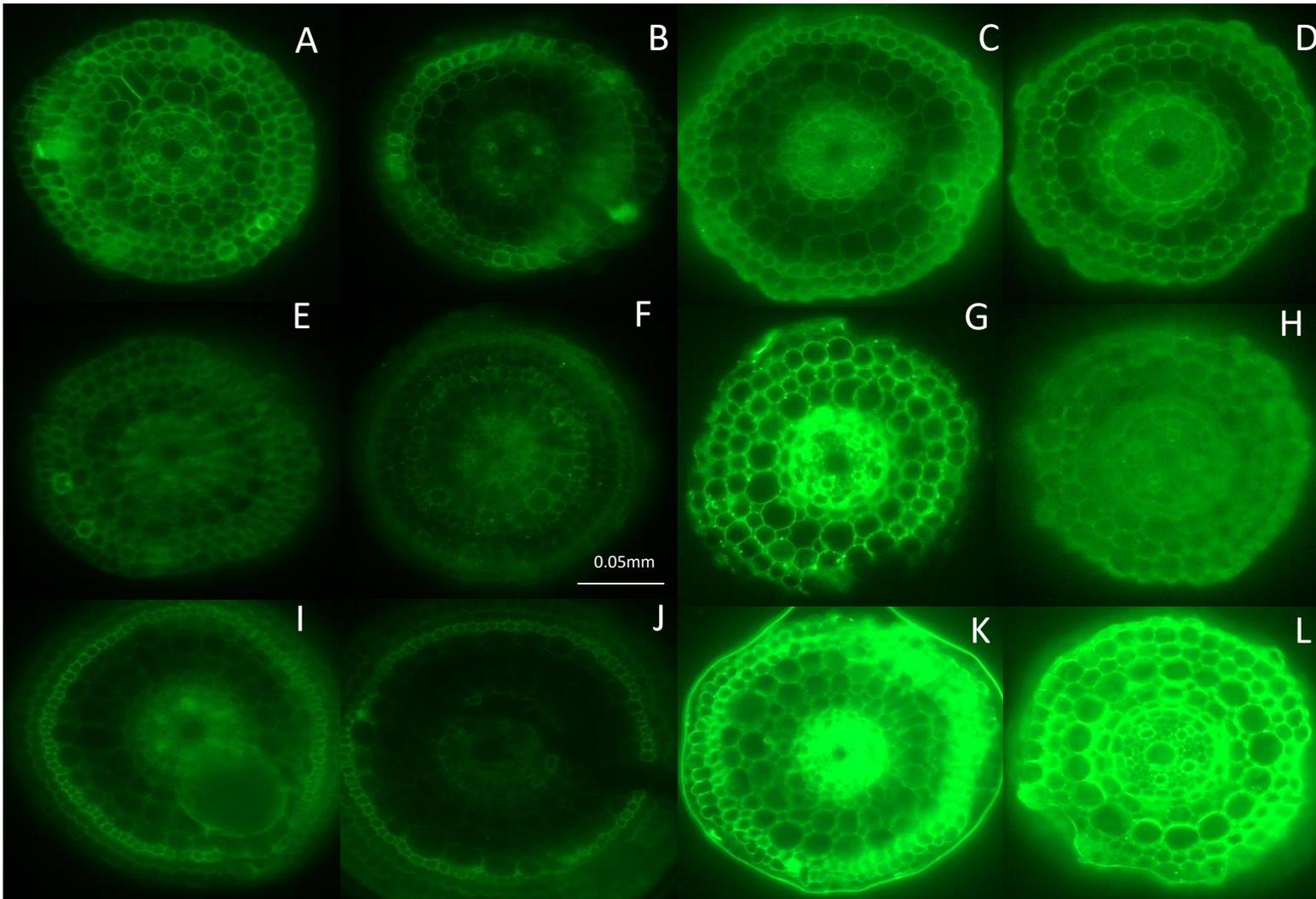


Figura 4. Optimización del protocolo de inmunofluorescencia con los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7. (A, B, E, F, I, J) Muestras tratadas con el protocolo propuesto por Yang et al. (2008) sin optimizar. (A-B) Control de tinción, cortes sometidos al procedimiento de tinción excepto incubación con JIM5 y JIM7. Cortes incubados en presencia de JIM5 (E-F) y JIM7 (I-J), obsérvese la ausencia de fluorescencia. (C, D, G, H, K, L) Muestras tratadas con el protocolo optimizado. (C-D) Controles de tinción, Cortes incubados en presencia de JIM5 (G) y JIM7 (K-L).

2.5.3 Respuesta al estrés por aluminio en los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.

Con el fin de confirmar la respuesta contrastante al aluminio exhibida por los genotipos de *O. sativa* (Azucena y BGI) y *O. glumaepatula* (OG89 y OG130) estudiados, se construyeron curvas de respuesta al aluminio (0 μM y 100 μM). Para ello se evaluaron las diferencias en el crecimiento del sistema radicular a través del tiempo (0-20 días) empleando como medida la longitud total del sistema radical (LSR). Las curvas de respuesta permiten observar el comportamiento a través del tiempo de los genotipos expuestos a aluminio y por tanto brindan información acerca del momento de activación de los mecanismos de tolerancia al estrés por aluminio.

Las curvas presentadas en la Figura 5 fueron construidas con los datos de LSR corregidos por los valores iniciales al día 0 (normalizados día 0), por ello el punto inicial presenta valor 1 para cada uno de los genotipos. Valores superiores a 1 en los puntos correspondientes a los días 5, 10, 15 y 20 indican crecimiento de las raíces, mientras que valores iguales a 1 para tales puntos indican que el crecimiento de las raíces fue inhibido por la exposición a 100 μM Al^{3+} .

En Azucena (Figura 5-A), se observó que el crecimiento no fue afectado significativamente por la exposición 100 μM Al^{3+} , lo que indica que este genotipo es tolerante a esta concentración de aluminio. En contraste, BGI mostró una clara susceptibilidad al estrés inducido por esta concentración de aluminio, observándose diferencias estadísticamente significativas a partir del día 5 de exposición al estrés (Figura 5-B).

En los genotipos de *O. glumaepatula* se observó comportamientos contrastantes. Para OG89 (Figura 5-C) se observó inhibición del crecimiento en los primeros 5 días de exposición al Al^{3+} (LSR=1), pero el crecimiento fue recuperado a partir de este punto, lo que podría indicar la activación de posibles mecanismos de tolerancia. No obstante, OG89 no mostró el mismo nivel de tolerancia que Azucena.

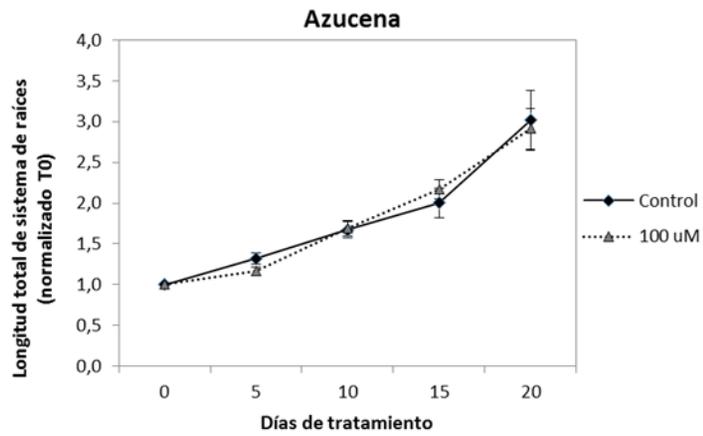
En contraste con OG89, el crecimiento radicular de OG130 (Figura 5-D) fue inhibido por el aluminio desde el inicio del experimento, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el tratamiento de aluminio para el día 0. La tolerancia al estrés inducido por la exposición al aluminio también fue evaluada cualitativamente mediante tinción de las raíces con hematoxilina (Figura 6). La tinción con hematoxilina permite observar la inclusión del aluminio en las células de la raíz. La hematoxilina vira a color azul cuando forma complejos con aluminio. La reacción entre la hematoxilina y el aluminio es específica (baja interferencia debido a otros compuestos) y permite evaluar la penetración y retención de estos complejos en los tejidos de raíz. Entre mayor la

intensidad de la tinción, mayor es el contenido de aluminio en el tejido, lo cual ha mostrado estar asociado a una mayor susceptibilidad (Cancado et al., 1999).

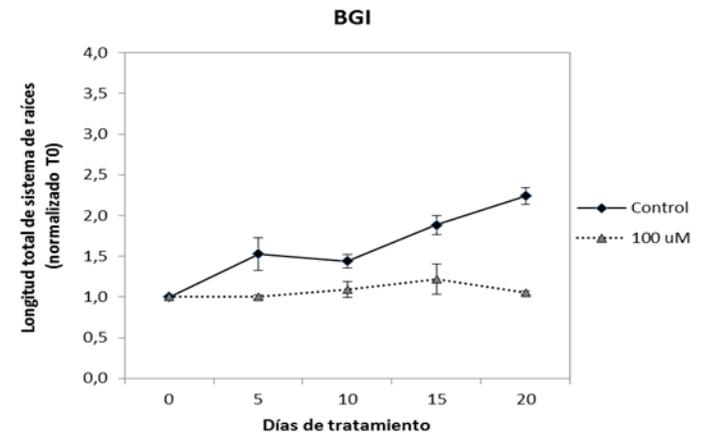
En este estudio, las raíces colectadas de plantas sometidas a estrés por aluminio mostraron una mayor intensidad de tinción con hematoxilina comparadas con los controles para todos los genotipos estudiados (Figura 6) Sin embargo, se observa una mayor intensidad en los genotipos OG130 y BGI, confirmando la susceptibilidad de los mismos (Figura 6). A fin de evaluar la penetración del aluminio al interior de la raíces y su ligación a las paredes celulares, se realizaron cortes transversales de las raíces teñidas (Figura 6). Para todos los genotipos estudiados se observó tinción azul en los tejidos internos de la raíz (esclerénquima, córtex, estela) (Anexo1), lo que indica que el aluminio penetra las raíces. Sin embargo, la tinción es más intensa en BGI en todas las capas celulares, lo que confirma su mayor susceptibilidad.

OG130 a pesar de ser susceptible no presenta una tinción tan pronunciada como BGI, aunque hay acumulación de aluminio en el haz vascular. Para los genotipos Azucena y OG89 la tinción fue menos intensa y se restringió al haz vascular y al esclerénquima.

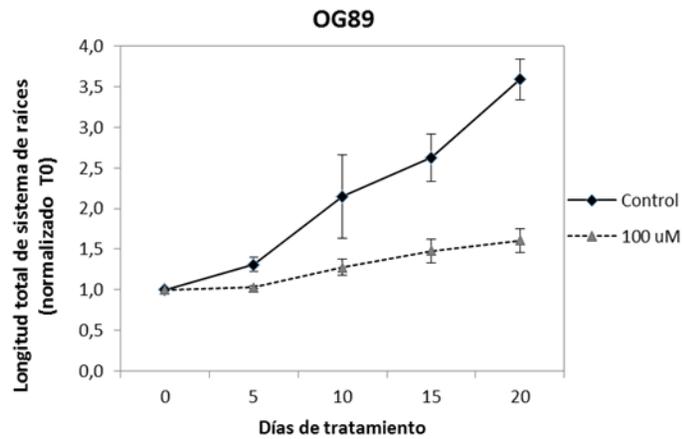
A



B



C



D

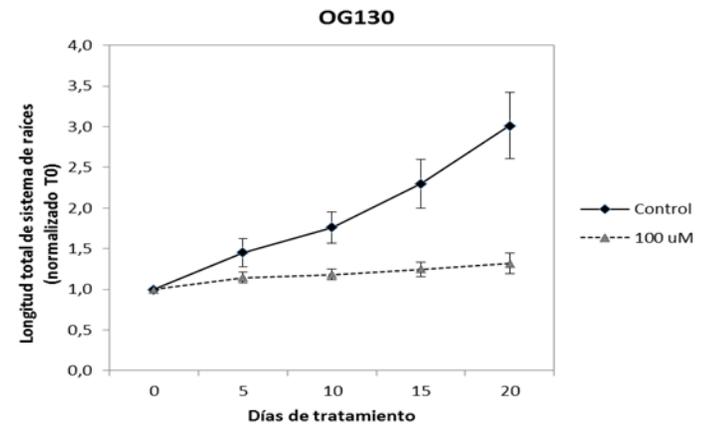


Figura 5. Curvas de respuesta al aluminio. Evaluación del cambio del crecimiento del sistema radicular (LSR) a lo largo del tiempo, en dos concentraciones de aluminio ($0\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$).

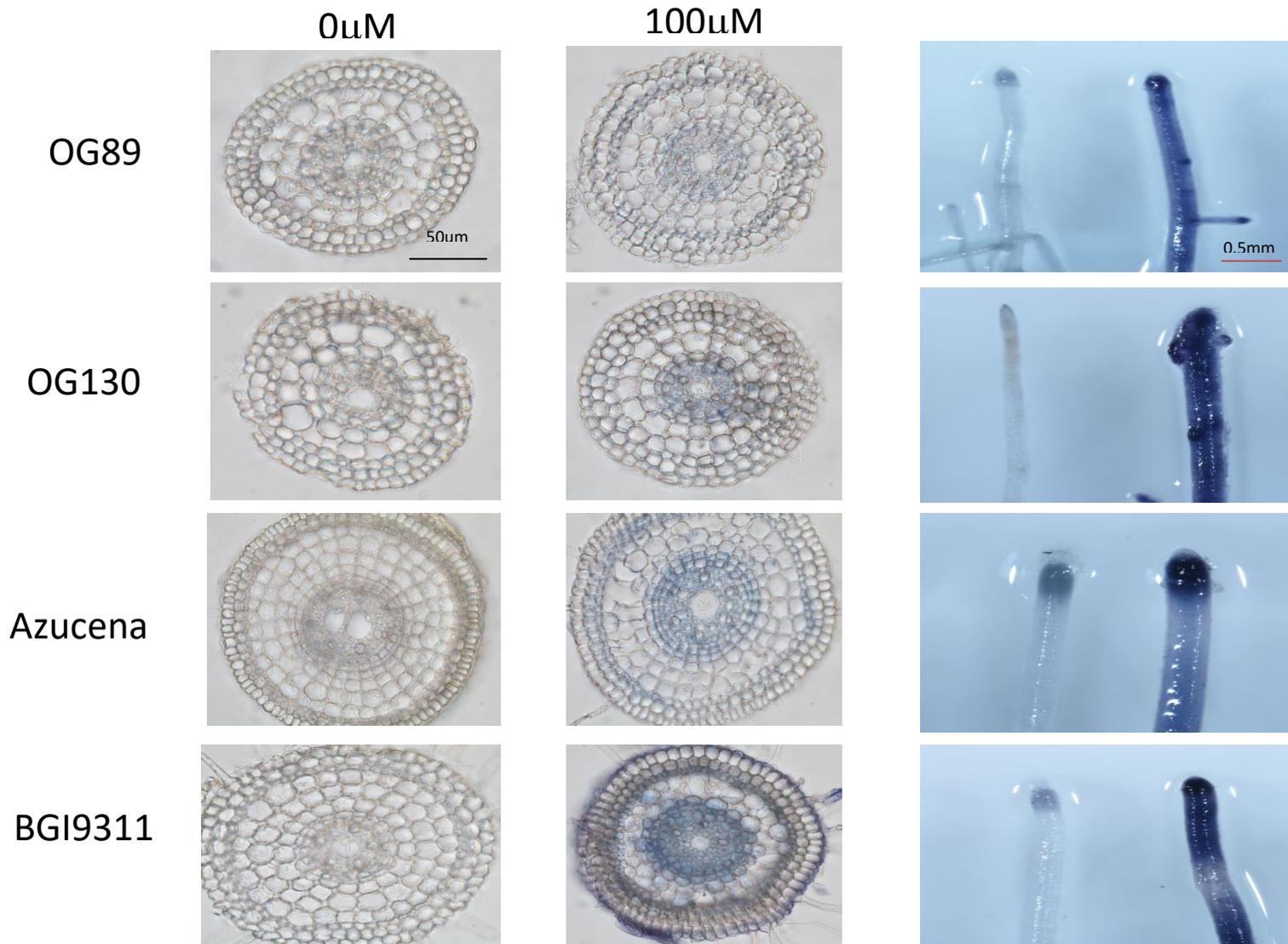


Figura 6 Ligación de aluminio a raíces de Azucena, BGI9311, OG89 y OG130 observada mediante tinción con hematoxilina. Vista interna y externa de la tinción en los diferentes genotipos.

El aluminio no solo afecta el crecimiento longitudinal de la raíz, también altera los patrones de extensión de la pared celular, por lo cual el tamaño celular y el grosor de la raíz pueden verse afectados. Con el fin de evaluar estos efectos potenciales del aluminio en el sistema radicular de los genotipos estudiados, se cuantificó el tamaño celular promedio de las células del córtex y el diámetro de las raíces.

En la Figura 7, se puede observar un aumento significativo ($p < 0,001$) del tamaño celular en respuesta al aluminio en los genotipos tolerantes Azucena (Figura 7-B) y OG89 (Figura 7-A). En contraste, BGI (Figura 7-D) y OG130 (Figura 7-C) muestran una disminución significativa ($p < 0.001$) del tamaño celular.

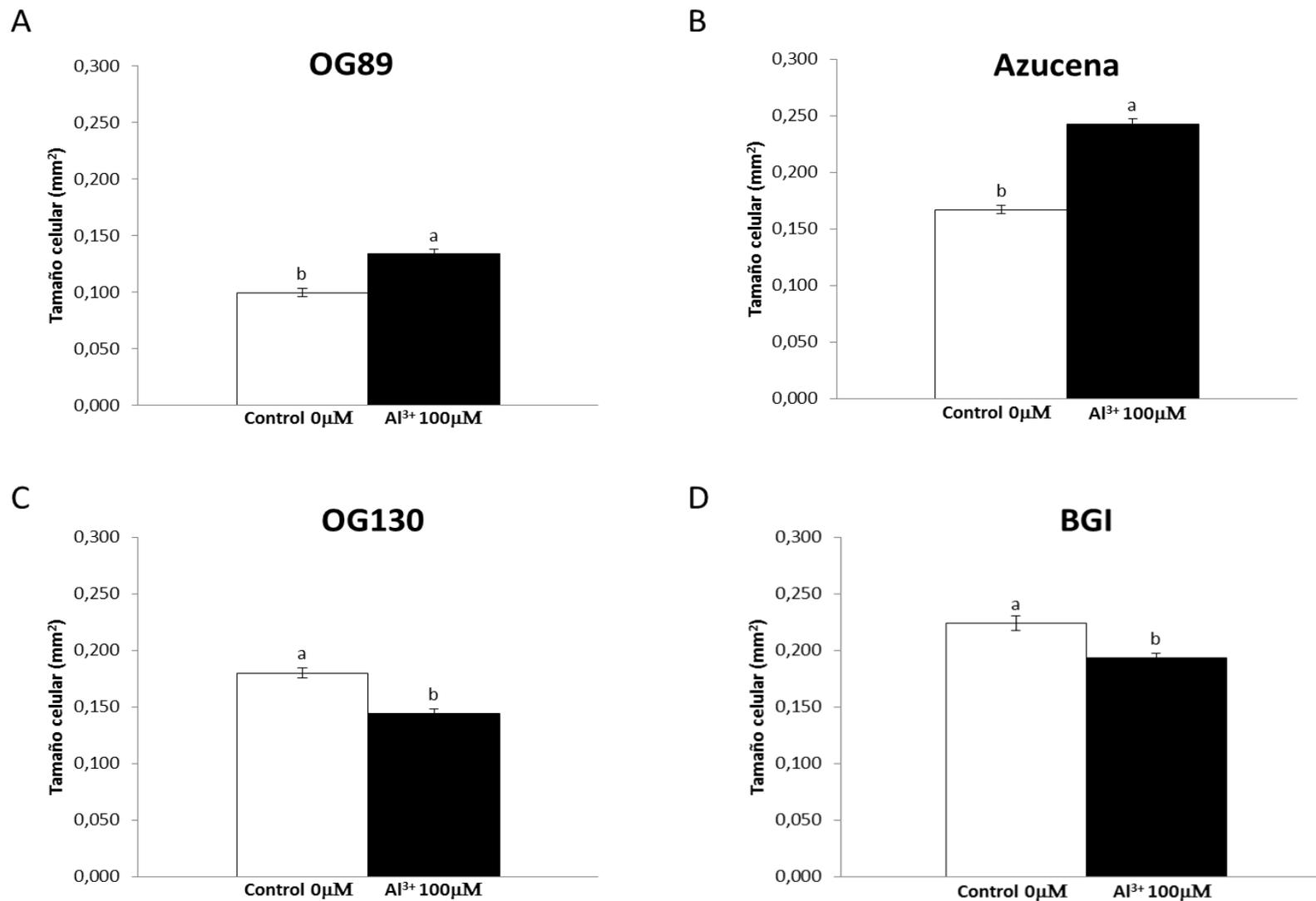


Figura 7. Tamaño promedio de las células del córtex para los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.

En relación al diámetro de la raíz se observaron respuestas diferenciales entre los genotipos (Figura 8). En los genotipos de *O. sativa*, Azucena (Figura 8B) y BGI (Figura 8D), se detectó un aumento significativo en el diámetro en respuesta al tratamiento con 100 μM Al^{3+} . Para los genotipos de *O. glumaepatula*, OG89 (Figura 8A) y OG130 (Figura (8C)), se observó un incremento en el diámetro de las raíces durante los cinco días de incubación pero este no es inducido por la exposición al aluminio puesto que se observan cambios similares en los tratamientos control y de aluminio.

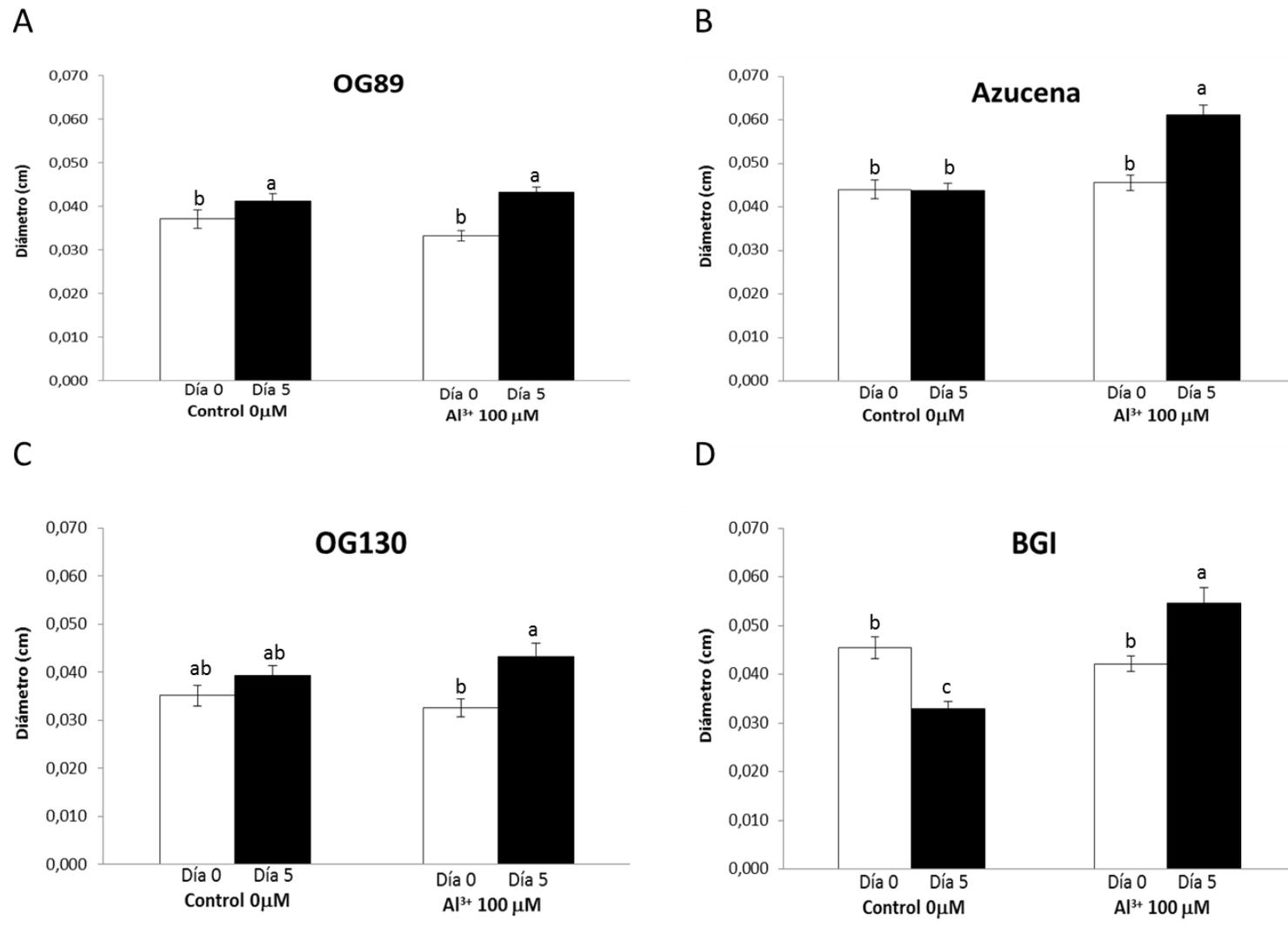


Figura 8. Cambios del diámetro de la raíz en respuesta al aluminio.

2.5.4 Grado de metilación de pectinas

Diversos estudios han propuesto que la tolerancia diferencial al aluminio exhibida por especies de plantas está asociada a diferencias en el grado de la metilación de las pectinas que constituyen la pared celular de las células radiculares. Por ello, en este estudio se evaluó el grado de metilación de pectinas mediante ensayos de inmunohistoquímica, utilizando los anticuerpos monoclonales específicos JIM7 y JIM5 que se unen a las pectinas con un grado alto y bajo de metilación, respectivamente. La ligación de cada anticuerpo a las pectinas correspondientes se observa como emisión de fluorescencia.

Para cada genotipo, se realizaron cortes de raíces expuestas a cada tratamiento y se trataron con los anticuerpos JIM5 y JIM7 por separado. Los cortes tratados en la inmunohistoquímica se observaron en un microscopio confocal y se fotografiaron con el fin de comparar la intensidad de la fluorescencia de los anticuerpos y la variación de la misma en respuesta al tratamiento con aluminio.

Los tejidos radiculares de arroz exhiben autofluorescencia, por lo tanto, para cada genotipo se corrigió la fluorescencia emitida por cada anticuerpo monoclonal restando la autofluorescencia del tejido. Para la preparación de estos blancos, cortes de las raíces de cada genotipo fueron sometidos al protocolo de tinción de inmunohistoquímica pero omitiendo la incubación en presencia de JIM5 y JIM7.

Las paredes celulares de las células radiculares contienen pectinas y estas pueden exhibir diferentes grados de metilación aún en ausencia de aluminio. La evaluación de los cortes de los distintos genotipos mostró emisión de fluorescencia para JIM5 y JIM7 tanto en los tratamientos control (sin aluminio) como aluminio ($100 \mu\text{M Al}^{3+}$) y cambios en la emisión de fluorescencia fueron observados para cada uno de los anticuerpos en cada uno de los genotipos en respuesta al aluminio, específicamente en la zonas del córtex (Figuras 10-17). Dado que el objetivo de este estudio es establecer si diferencias en el grado de metilación de las pectinas se relacionan con la tolerancia diferencial al aluminio, consideramos calcular un índice relativo de fluorescencia JIM7/JIM5 que permitiera establecer los cambios en el grado de metilación en respuesta al tratamiento con aluminio. Para el cálculo del índice se consideró específicamente la zona del córtex. Valores de este índice superiores a 1 indican mayor abundancia de pectinas metiladas, mientras que valores menores a 1 indican mayor abundancia de pectina no-metiladas.

Los resultados obtenidos (Figura 9) muestran que la susceptibilidad al aluminio exhibida por BGI está acompañada por una disminución significativa en la fluorescencia de JIM7 respecto a JIM5 (índice 0,5) bajo el tratamiento de aluminio. Es interesante notar que el aumento de pectinas no-metiladas revelada por la tinción con JIM5 coincide con el patrón de tinción con hematoxilina, lo cual indica

un mayor ligamiento de aluminio en los tejidos constituidos por pectinas con bajo grado de metilación.

En contraste Azucena, OG89 y OG130 mostraron un ligero incremento en el índice de intensidad relativa de fluorescencia JIM7/JIM5 luego de exponer las plantas por 5 días al aluminio, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 9).

La observación detallada de los cortes con aumento 100X en el microscopio confocal, reveló diferencias en la distribución de pectinas metiladas/no-metiladas en las paredes celulares. Para todos los genotipos, la emisión de fluorescencia de JIM7 aumentó en la región del córtex, luego de la exposición al aluminio. En Azucena y BGI, se observó una mayor emisión de fluorescencia para JIM7 en los espacios intersticiales (Figuras 11 y 15).

En Azucena (Figura 10), no se observan cambios en la composición de pectinas inducidas por aluminio. Sin embargo, se observa una mayor presencia de JIM7 en ambas concentraciones de aluminio, especialmente en la región del córtex, lo que sugiere una posible composición constitutiva de mayor cantidad de pectinas metiladas para esta accesión en dicha región. Cuando se enfoca a 100X (Figura 11), se puede observar un patrón de ligación de JIM7 diferencial entre la concentración 0 μM y 100 μM Al^{3+} que corresponde a los espacios intersticiales. En cuanto a JIM5, se observó un leve aumento de este anticuerpo en la zona del haz vascular, es decir un mayor grado de pectinas no metiladas en esta zona bajo el tratamiento de 100 μM Al^{3+} .

En BGI (Figura 12), se observó una disminución de emisión de fluorescencia de JIM7 en el tratamiento de 100 μM Al^{3+} en comparación con el tratamiento control, lo que indica una disminución en el grado de metilación de las pectinas inducido aparentemente por el efecto fitotóxico de aluminio. También se observó un aumento de JIM5 en el tratamiento 100 μM Al^{3+} , lo que indica que el grado de metilación de las pectinas es menor. Estos cambios son evidentes en la Figura 13, correspondiente al aumento 100X de la región del córtex.

En el genotipo tolerante de *O. glumaepatula* OG89 (Figura 14) se observó un aumento tanto de JIM7 como de JIM5 en el córtex bajo el tratamiento de aluminio (Figura 15). En OG130 (Figura 16) también se observó un aumento de la emisión de fluorescencia de ambos anticuerpos, pero relativamente mayor para JIM7 en el tratamiento de aluminio (Figura 17).

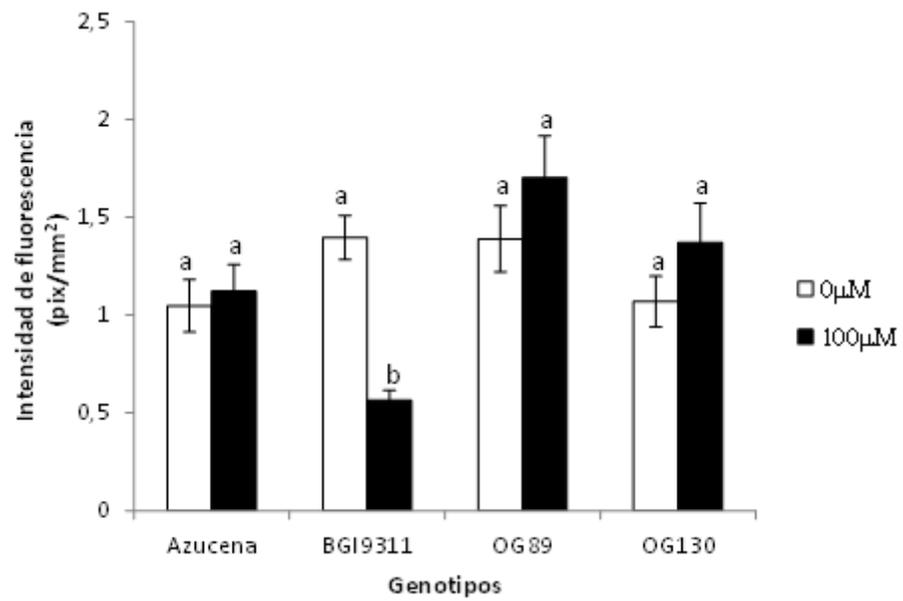


Figura 9. Relación JIM7/JIM5 en los tratamiento control y 100 μM Al³⁺ para cada genotipo. Se observó una disminución significativa de este parámetro para el genotipo susceptible BGI en 100μM.

Azucena

Control

JIM 5

JIM 7

0 μ M

100 μ M

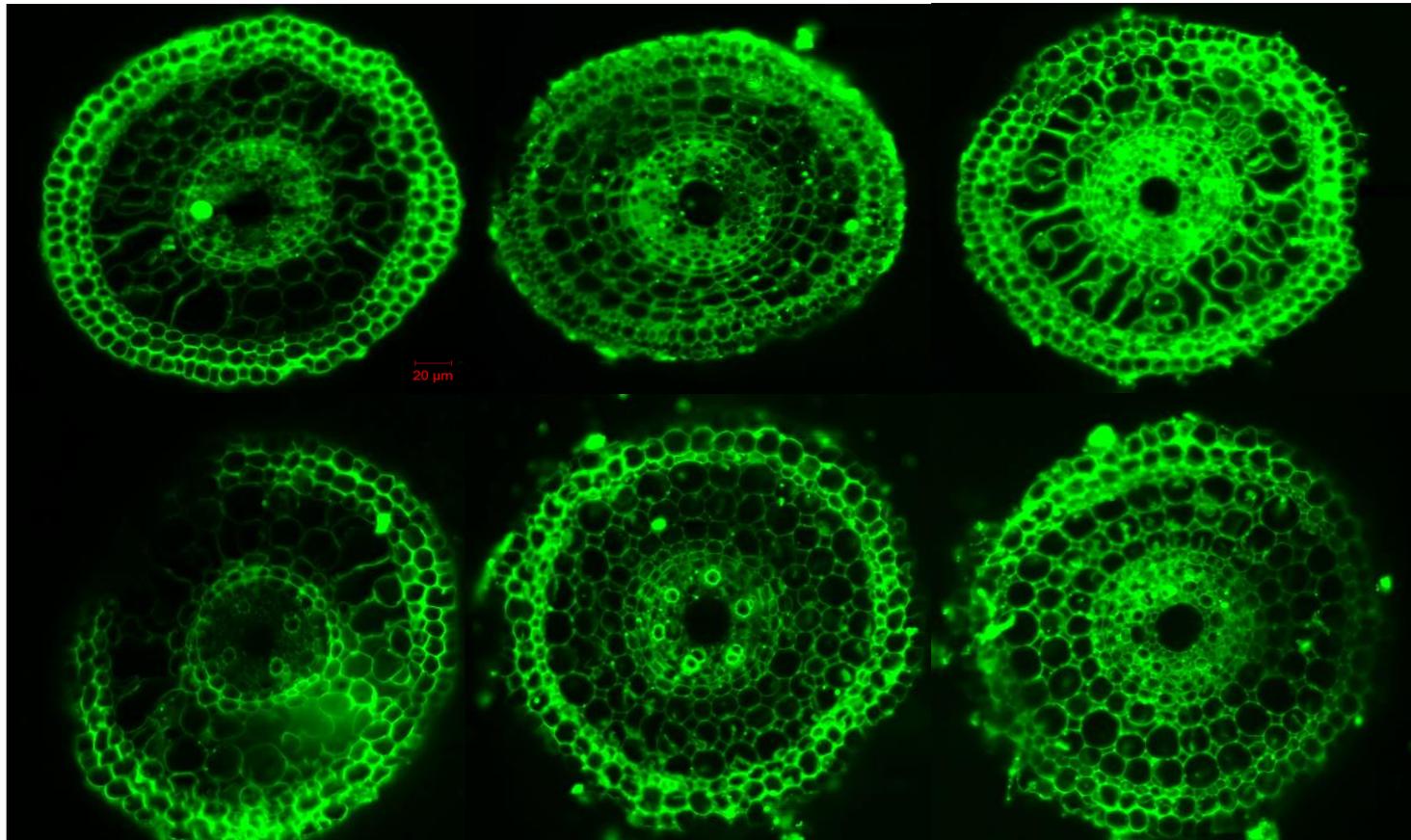


Figura 10. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo tolerante Azucena en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. No hay variación del contenido de pectinas entre los tratamientos, pero hay mayor presencia de pectinas metiladas (JIM7) que no metiladas (JIM5) en ambas concentraciones. Escala 20 μ m.

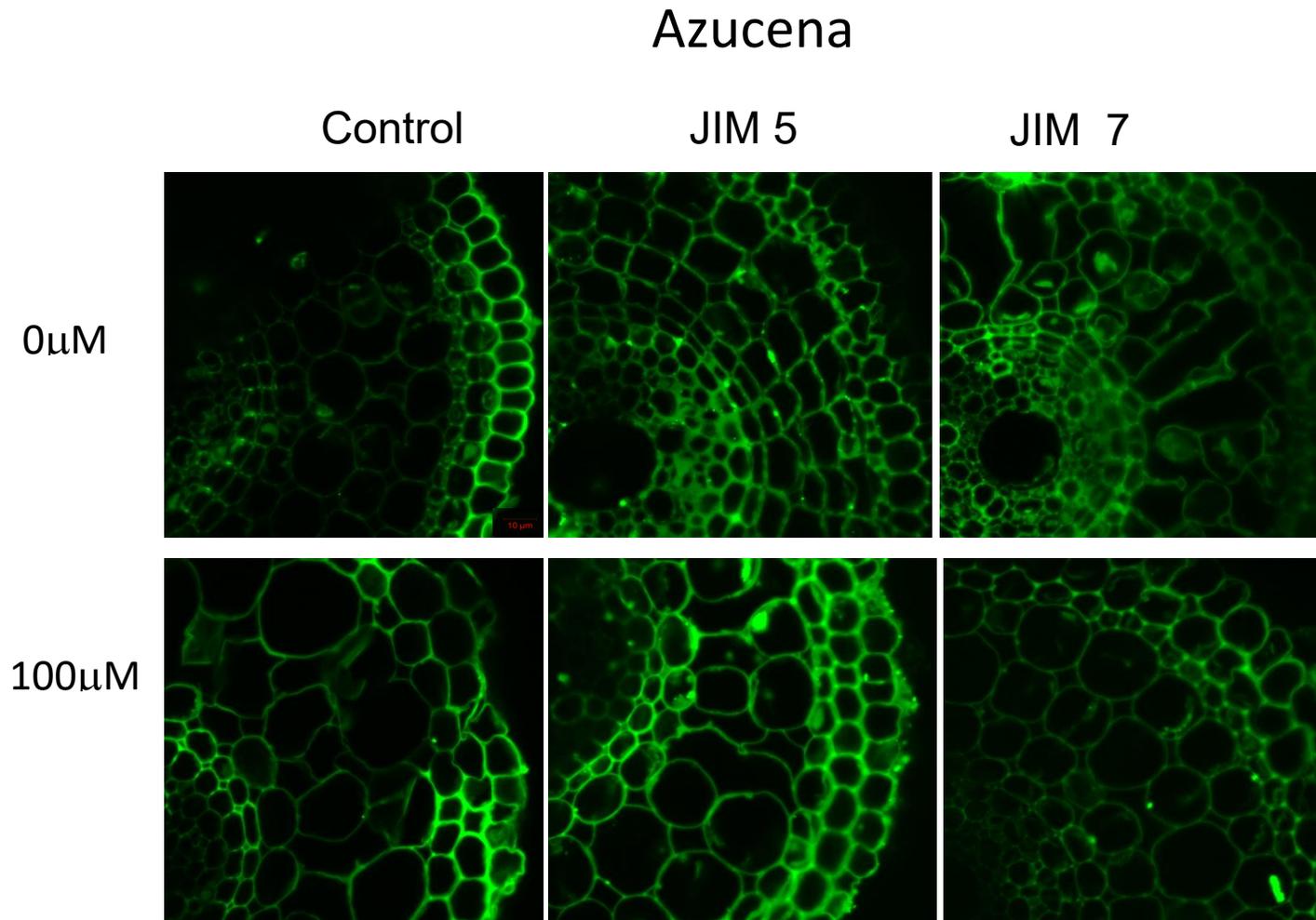


Figura 11. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo tolerante Azucena en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. No hay variación del contenido de pectinas entre los tratamientos. Ligación diferencial de JIM7 en los puntos de intersección entre células en el esclerénquima. Escala 10 μ m.

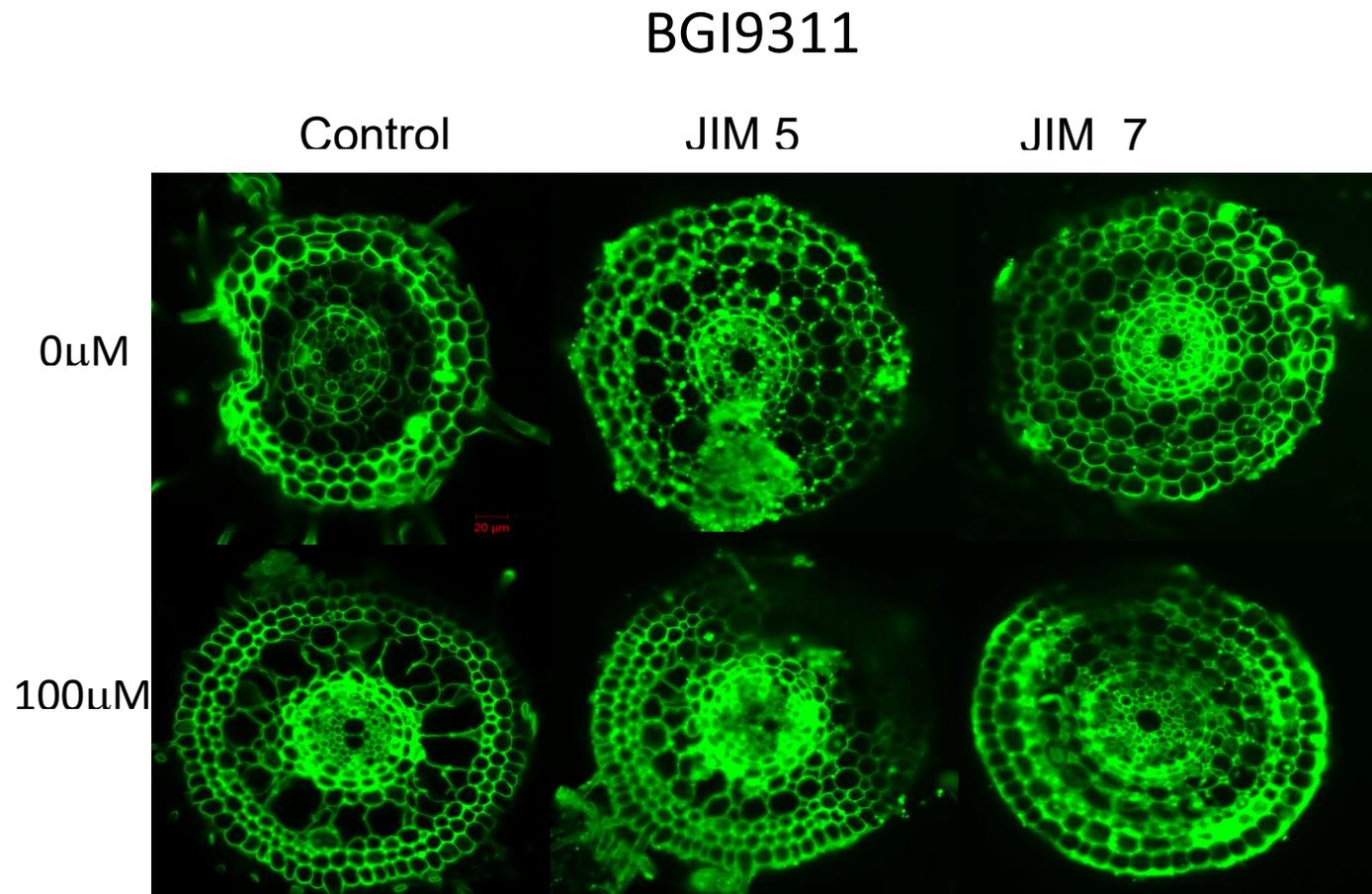


Figura 12. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo susceptible BGI en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Aumento de pectinas bajas en metilación (JIM5) en 100 μ M de aluminio. Y disminución de JIM7 en respuesta al aluminio. Escala 20 μ m.

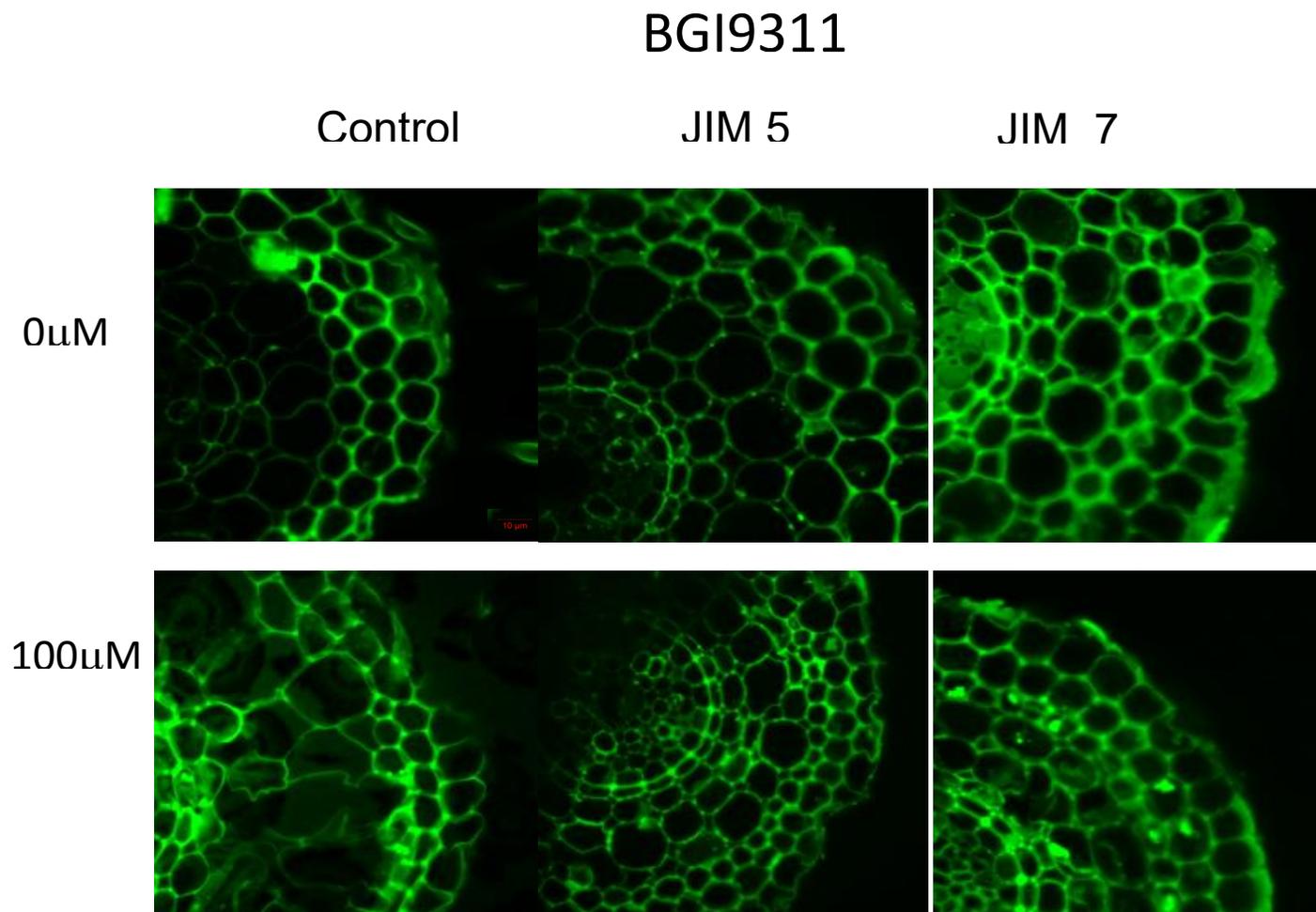


Figura 13. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo susceptible BGI en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Disminución de JIM7 en el córtex en 100 μ M en comparación con 0 μ M, y aumento de JIM5 en el córtex en 100 μ M. Escala 10 μ m

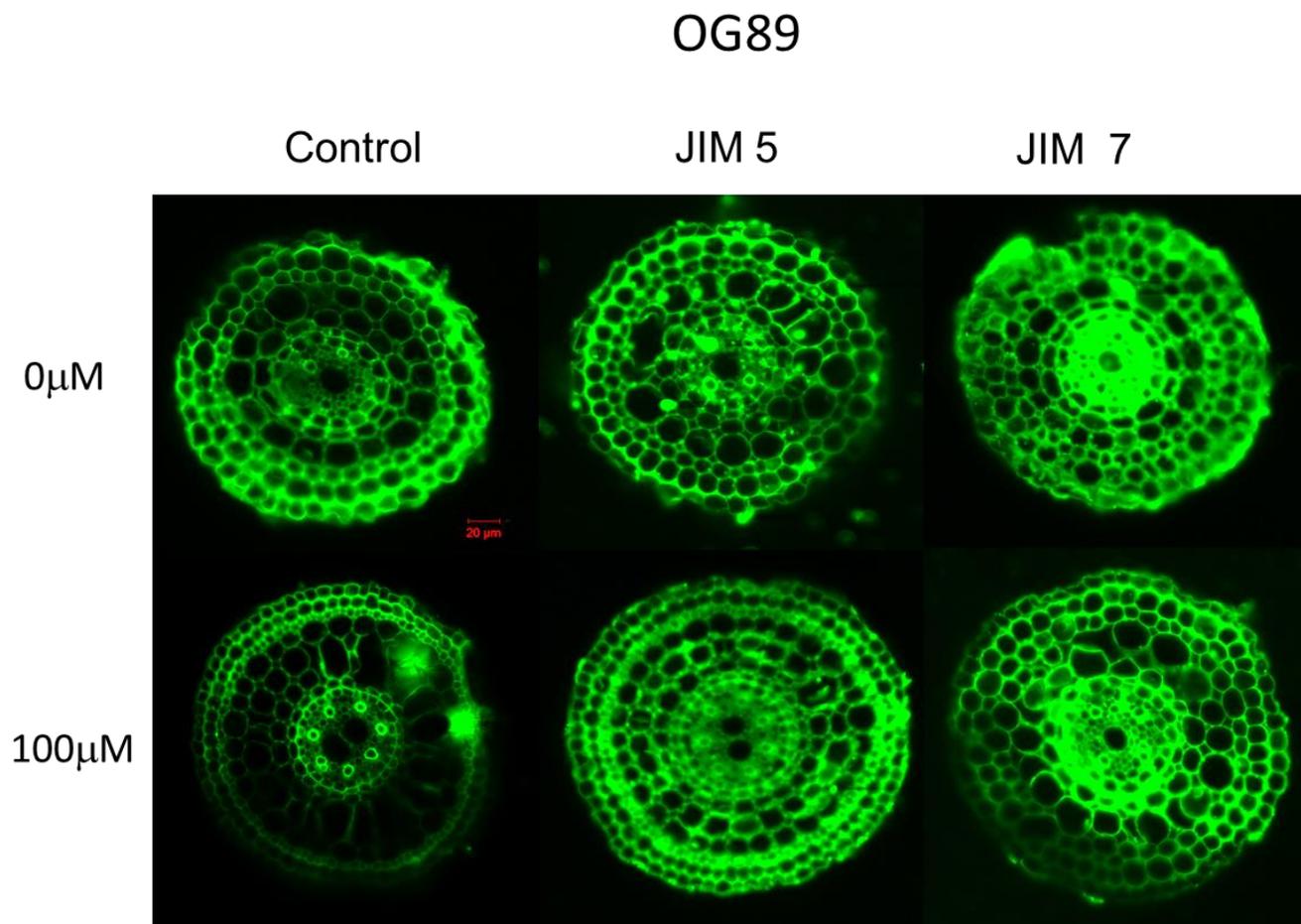


Figura 14. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo tolerante OG89 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Aumento tanto de pectinas no metiladas (JIM5) y metiladas (JIM7) en presencia de aluminio (100 μ M). Escala 20 μ m.

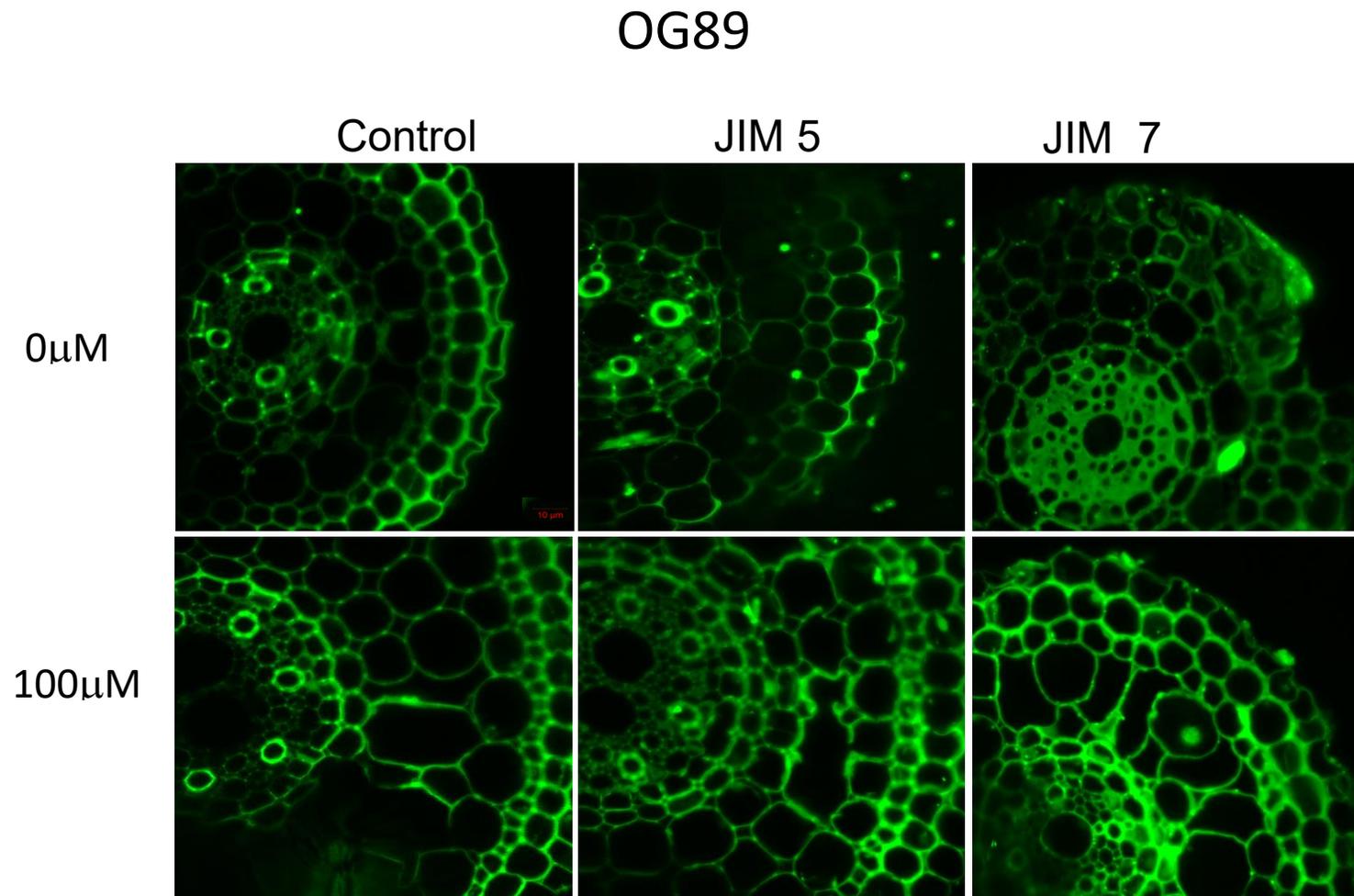


Figura 15. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo tolerante OG89 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Aumento evidente tanto de pectinas no metiladas (JIM5) y metiladas (JIM7) en presencia de aluminio (100 μ M). Escala 10 μ m.

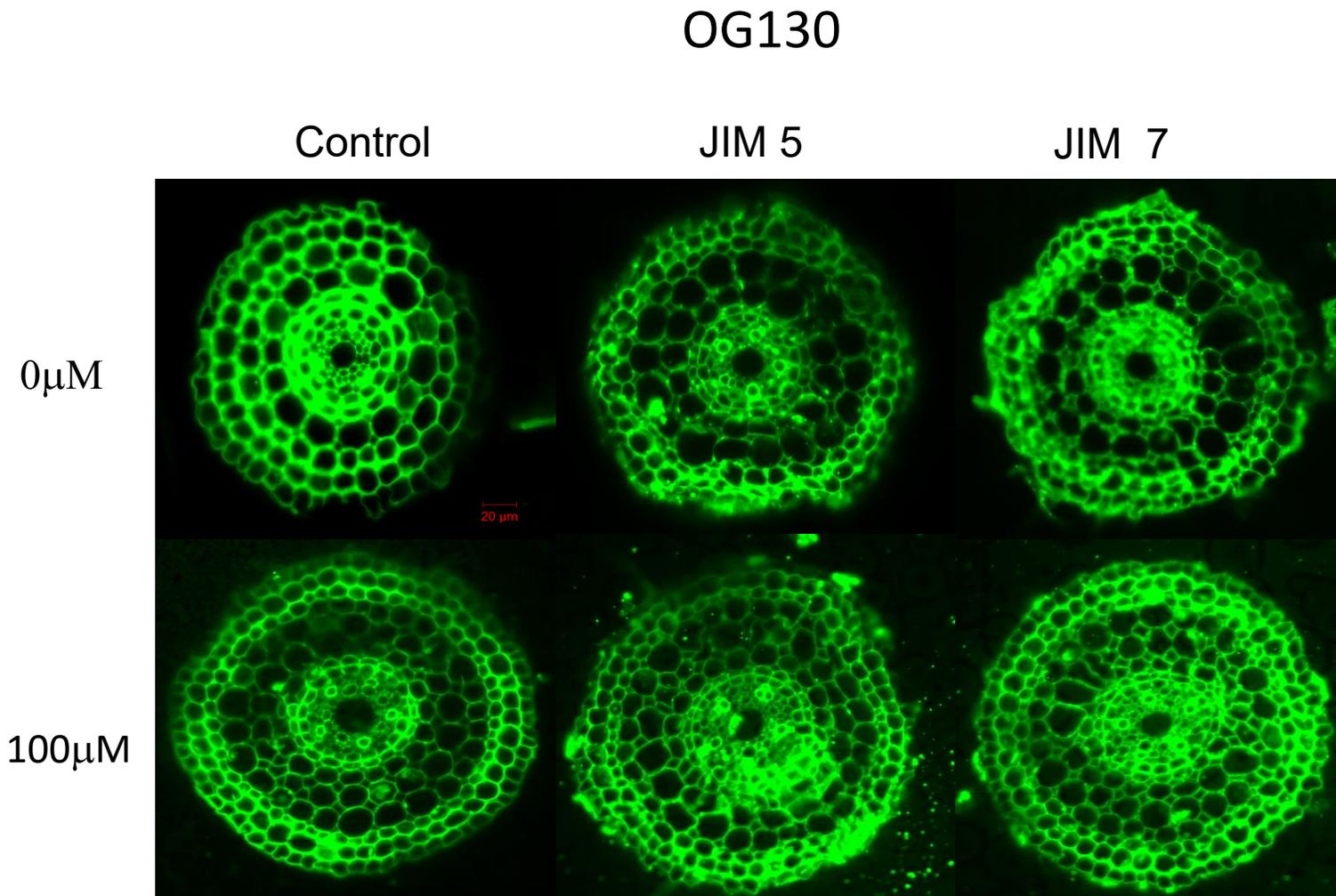


Figura 16. Patrones de ligación de JIM5 y JIM7 en el genotipo susceptible OG130 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Aumento de pectinas bajas (JIM5) y altas en metilación JIM7, en 100uM en comparación con 0 μ M. Escala 20 μ m.

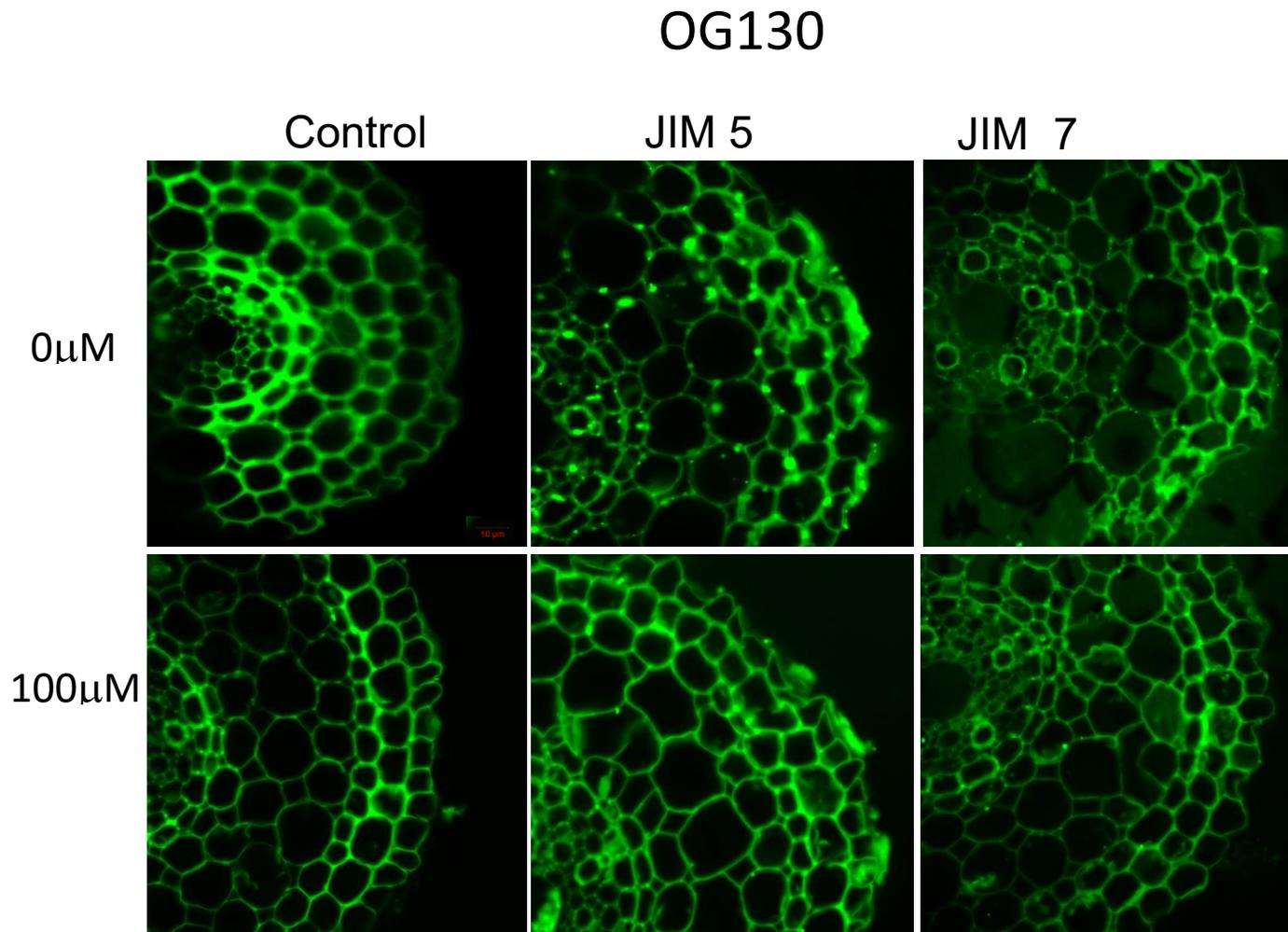


Figura 17. Detalle (100X) de la ligación de JIM 5 y JIM7 en el genotipo susceptible OG130 en concentraciones 0 y 100 μ M de aluminio. Aumento de intensidad de fluorescencia de ambos anticuerpos en las dos concentraciones. Escala 10 μ m.

2.6 DISCUSIÓN

2.6.1 Respuesta al estrés por aluminio en los genotipos Azucena, BGI, OG89 y OG130.

El principal síntoma de estrés por aluminio en plantas es la inhibición del crecimiento de las raíces (Souza et al., 2016). Por lo cual, la evaluación de este parámetro (LSR) mediante curvas de respuesta, permitió evidenciar la tolerancia diferencial existente entre los genotipos de las especies *O. sativa* y *O. glumaepatula* utilizadas en este proyecto y por tanto evaluar si estas diferencias están relacionadas con una ligación diferencial del aluminio a la pared celular y a la metilación diferencial de las pectinas.

Los comportamientos susceptibles y tolerantes entre los genotipos de *O. sativa* y *O. glumaepatula* descritos en este estudio, coinciden con la previa caracterización realizada de estos genotipos en los estudios de Posso et al., 2013 y Tello, 2015.

El tiempo de retardo en la respuesta de tolerancia al aluminio en OG89, coincide con lo observado en el estudio realizado por Tello, 2015, en el cual el genotipo OG89 también mostró un tiempo de retardo de 5 días antes de recuperar el crecimiento. Adicionalmente este comportamiento se ha reportado en *Brachiaria decumbens*, una especie perteneciente a la familia Poaceae, que es tolerante al estrés por aluminio (Arroyave et al., 2011). El estudio desarrollado por Arroyave et al., 2011 demostró mediante una curva dosis-respuesta que la tasa de elongación en *B. decumbens* es inhibida por el aluminio durante las primeras 20 horas de exposición al aluminio, sin embargo después de este lapso de tiempo la tasa de elongación se recupera.

El retardo en la respuesta de tolerancia en algunas plantas se ha relacionado con el periodo de síntesis de ácidos orgánicos y la exudación de los mismos (Ma et al., 2002). Sin embargo, esta explicación no podría sugerirse para el retardo observado en OG89, puesto que en arroz se ha demostrado que este mecanismo no está implicado en la tolerancia al aluminio (Cai et al., 2011) (Yang et al., 2008)). En un estudio realizado por Ma et al., 2002 se evaluó la exudación de ácidos orgánicos en respuesta al aluminio en Koshihikari y Kalasath, dos genotipos de arroz con tolerancia y susceptibilidad al aluminio, respectivamente. Se encontró que la exposición al aluminio no indujo la exudación de ácidos orgánicos como el ácido málico y el oxálico, pero se detectó citrato en los exudados. A pesar de ello, la cantidad de citrato exudada fue muy baja en ambos genotipos y no se observaron diferencias significativas entre los mismos.

La construcción de las curvas de respuesta realizada por Posso y colaboradores, no sólo logró confirmar la tolerancia diferencial al aluminio entre los genotipos, sino que se comprobó que la concentración de 100 μ M es suficiente para alterar los patrones de crecimiento, y poner en evidencia la capacidad de hacer frente a este tipo de estrés por parte de los genotipos tolerantes. Además se pudo establecer que 5 días de exposición a los tratamientos es el tiempo óptimo para evaluar los posibles mecanismos implicados en las respuestas de tolerancia de los genotipos de las dos especies de arroz.

La confirmación de la tolerancia de los genotipos se complementó con un ensayo de tinción con hematoxilina, que permitió evaluar de manera cualitativa la presencia de aluminio en los tejidos. Una mayor tinción de color azul, indica mayor ligación de aluminio a los tejidos (Radmer et al., 2012) y esto a su vez se asocia a la susceptibilidad de los genotipos, pues una mayor ligación de aluminio indicaría que estos no poseen mecanismos para excluir el aluminio de sus tejidos (Cancado et al., 1999). En este estudio se encontró que las raíces de los genotipos expuestos al tratamiento de aluminio mostraron tinción en las capas externas del tejido radicular, lo que indica que hay una ligación de este elemento a la epidermis. Aun así, la tinción más intensa estuvo presente en los genotipos susceptibles BGI y OG130, en comparación con los tolerantes, lo cual coincide con las tolerancias diferenciales observadas en la curva de respuesta.

En los genotipos susceptibles, la tinción fue más intensa en el ápice y en la zona distal de transición la cual está implicada en el crecimiento de las raíces (Horst et al., 2010). Esto coincide con el estudio realizado por Miftahudin et al., 2007 en dos genotipos de arroz, IR64 y Krowal, susceptible y tolerante, respectivamente; en este estudio las raíces expuestas a concentraciones fitotóxicas de aluminio mostraron tinciones con hematoxilina diferenciales entre los genotipos, viéndose una mayor intensidad de la tinción en IR64 que en Krowal, en la zona de un milímetro anterior al ápice.

Al interior de las raíces de los genotipos tolerantes OG89 y Azucena, se observó que la ligación del aluminio se restringió a la zona del haz vascular y del esclerénquima (Figura 6). A diferencia de los tolerantes, los genotipos BGI y OG130 presentaron una tinción más generalizada a través de las distintas capas celulares. No obstante, BGI mostró ser más susceptible que OG130 pues la intensidad de la tinción con hematoxilina en las diferentes capas es mayor, lo que sugiere que BGI presenta una mayor cantidad de componentes celulares, a los que se puede ligar el aluminio. Según Ma et al., 2004, el sitio de mayor ligación del aluminio es la pared celular, específicamente las pectinas cargadas negativamente que conforman la matriz péctica (Horst et al., 2010). En estudios realizados por Yang et al., 2008 y Eticha et al., 2005, en genotipos susceptibles y tolerantes de arroz y maíz, respectivamente, se encontró un mayor contenido de pectinas en los genotipos susceptibles, lo que representaría una mayor cantidad de componentes estructurales a los cuales puede ligarse el aluminio, y en consecuencia estos

genotipos mostrarían una mayor ligación de aluminio en sus tejidos. Esto sugiere que la alta ligación de aluminio observada en BGI puede estar relacionada con un mayor contenido de pectinas.

Según Hossain et al., 2006 y Panda et al., 2009 el aluminio se une fuertemente a la pared celular de las células de la epidermis y del córtex en las raíces. En los genotipos OG89 y Azucena (Figura 6), se observa ausencia de tinción en el córtex, lo que sugiere que en esta zona debe haber una composición diferencial de la pared celular que inhibe la unión del aluminio y que por tanto le confiere una mayor tolerancia a estos genotipos frente a este metal.

La inhibición del crecimiento debido a la toxicidad por el aluminio, está relacionada con alteraciones en los parámetros de extensibilidad y viscosidad de la pared celular (Ma et al., 2004), los cuales podrían verse reflejados en cambios del tamaño celular y diámetro radicular. Por tanto, cambios en estas características podrían ser indicadores tanto de la tolerancia diferencial observada en los genotipos como del tipo de mecanismo implicado.

En cuanto al tamaño celular hubo aumento significativo de este parámetro en los genotipos tolerantes (Azucena y OG89), mientras que los genotipos susceptibles (BGI y OG130) presentaron una disminución significativa del mismo. Se podría esperar que el patrón observado en el tamaño celular tuviese una relación directamente proporcional con el diámetro radical; sin embargo, un aumento significativo del diámetro en respuesta al aluminio, se observó para los genotipos de *O.sativa* (BGI y Azucena), mientras que para los genotipos de *O.glumaepatula* (OG89 y OG130) hubo un aumento del diámetro, pero este no fue una respuesta frente al estrés por aluminio.

El aumento del tamaño celular y del diámetro radicular en Azucena, puede estar relacionado con un proceso de vacuolización como mecanismo complementario de tolerancia al aluminio que ocurre principalmente en las células corticales de la raíz (Zelinová et al., 2011). Se ha reportado que la tolerancia al aluminio en arroz, está relacionada con la composición diferencial de la pared celular y que la vacuolización puede ser una manera complementaria de reducir la cantidad de aluminio presente en la pared celular que puede alterar la dinámica de esta estructura y por tanto afectar el crecimiento. De modo que el aluminio presente en la pared es transportado al citoplasma y de ahí es transportado hacia y secuestrado en vacuolas (Kochian, Pi, & Liu, 2015). En *O.sativa* se ha visto que el mecanismo de secuestro de aluminio en vacuolas se debe a la acción conjunta de las proteínas “Natural resistance-associated macrophage protein Al transporter 1” (OsNrat1), y “vacuolar ABC transporter *O.sativa* Al-sensitive 1” (OsALS1), la primera se encarga del transporte del aluminio al citoplasma y la segunda del secuestro en las vacuolas (Kochian et al., 2015).

En BGI hubo un aumento significativo del diámetro, pero una disminución significativa del tamaño celular en respuesta al aluminio. Esto puede explicarse por la formación de aerénquima que se observó en algunos de los cortes, y que se relaciona con el efecto tóxico inducido por el aluminio en este genotipo (Anexo 3). El aerénquima es un tejido parenquimatoso que se forma generalmente en respuesta a la inundación para promover un mayor intercambio de oxígeno en los tejidos. Sin embargo, su formación es mediada por especies reactivas de oxígeno y etileno (Steffens et al., 2011), cuya producción aumenta en presencia de aluminio. El aluminio, es capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno o ROS(por sus siglas en inglés) debido a la alteración de los balances iónicos de los componentes celulares (Ribeiro et al., 2012). De igual manera, el aluminio induce la formación de etileno que se ve implicado en la expansión de los tejidos radicales (Zelinová et al., 2011). La formación del aerénquima empieza cuando las células del córtex sufren muerte celular programada, luego los componentes celulares de las células muertas son degradados y reabsorbidos de manera que se forma un espacio de gas en la zona del córtex, que podría explicar el aumento del diámetro observado en BGI. Este proceso requiere de la presencia de peróxido de hidrogeno, que actúa como una señal para que se active la muerte celular mediada por etileno (Steffens et al., 2011).

El proceso de formación de aerénquima empieza en la célula más grande y se expande radialmente a las células vecinas (Steffens et al., 2011). Este proceso se restringe a la zona media del córtex, de modo que las células más internas del córtex permanecen intactas (Yamauchi et al., 2014). Sin embargo, estas células son las más pequeñas en el córtex, lo que puede explicar la disminución del tamaño celular en respuesta al aluminio.

Los genotipos de *O.gluaepatula*, OG89 y OG130, presentaron un aumento significativo del diámetro radical, pero este no fue inducido por la exposición al aluminio, pues se observó tanto en el tratamiento control como en el tratamiento de aluminio. Por otro lado, el tamaño celular en las raíces de OG89 aumentó en respuesta al aluminio, a diferencia de OG130 cuyo tamaño celular disminuyó. Al igual que en Azucena, el aumento del tamaño celular en OG89 podría estar relacionado con un aumento del número de vacuolas o del volumen vacuolar en las células del córtex, pero es probable que este aumento no sea tan alto en OG89 como para inducir diferencias significativas a nivel de todo el diámetro. Esta diferencia entre los genotipos tolerantes, podría estar relacionado con el nivel de tolerancia exhibido por Azucena y OG89 (Azucena es más tolerante). Por otro lado, en OG130, también se observó presencia de aerénquima, pero en menor proporción en comparación con BGI.

Es importante aclarar que aunque en Azucena y OG89, también se observó aerénquima en tejidos expuestos al aluminio, las células intactas del córtex presentaron un mayor tamaño que las del control, lo cual permite proponer que adicionalmente hubo un proceso de vacuolización.

Estos resultados sugieren que el aluminio, efectivamente induce múltiples alteraciones morfológicas y estructurales en las células de las raíces y que los genotipos de arroz, dependiendo de su grado de tolerancia, presentan respuestas diferenciales ante el estrés inducido por el aluminio.

2.6.2 Metilación de las pectinas

Como se ha mencionado anteriormente, la pared celular es la principal estructura a la cual se liga el aluminio (Horst et al., 2010). Se ha comprobado que en monocotiledóneas cerca del 80 al 90% del aluminio se acumula en la pared celular, desencadenando una serie de alteraciones dentro de las cuales la inhibición del crecimiento de la raíz es la más notoria (Wang et al., 2015). La unión del aluminio a la pared celular, se da de manera específica a las pectinas que presentan grupos carboxilos cargados negativamente, como resultado de la acción de la pectin-metilesterasa. El contenido de pectinas y el grado de metilación de las mismas ha sido propuesto por Yang et al., 2008 y Eticha et al., 2005 como un posible mecanismo de tolerancia en genotipos de arroz y maíz. Por lo anterior en este proyecto se evaluó el grado de metilación de pectinas en genotipos de *O.sativa* y *O.glumaepatula*.

Para la evaluación del grado de metilación de pectinas, se trataron las muestras con anticuerpos monoclonales JIM7 y JIM5 específicos para el grado de metilación alto y bajo, respectivamente.

En Azucena, no se observaron cambios en el grado de metilación de pectinas inducidos por aluminio. Sin embargo, bajo ambas concentraciones de aluminio se observó una mayor emisión de fluorescencia de JIM7 en comparación con JIM5, especialmente en el córtex, lo cual sugiere que Azucena contiene, de manera constitutiva, una mayor cantidad de pectinas metiladas en esta región. Por otro lado, en el genotipo susceptible BGI se observó una disminución de la emisión de fluorescencia de JIM7 en el tratamiento de 100 μM en comparación con 0 μM , lo que indica que hay una disminución en el grado de metilación de pectinas inducido por aluminio, que concuerda con una mayor presencia de JIM5 en el tratamiento de 100 μM . Estas observaciones fueron comprobadas al calcular los índices de fluorescencia relativa de JIM7/JIM5 obtenidos para Azucena y BGI, según los cuales Azucena exhibió un ligero incremento, no significativo, de pectinas metiladas en 100 μM Al^{3+} , mientras que para BGI se observó que la susceptibilidad al aluminio está acompañada con una disminución significativa de este índice.

Los resultados obtenidos para Azucena y BGI coinciden con lo observado en el estudio realizado por Yang et al., 2008, al comparar dos genotipos de *O.sativa* con tolerancia diferencial al aluminio Zhefu802 (susceptible) y Nipponbare (tolerante). Los investigadores detectaron una mayor cantidad de pectinas no

metiladas en Zhefu802 en respuesta al aluminio y una mayor presencia de pectinas metiladas en Nipponbare tanto en condiciones control como en aluminio. Esto sugiere que los genotipos tolerantes exhiben de manera constitutiva, una mayor proporción de pectinas metiladas, en comparación con los susceptibles. Adicionalmente en este estudio, las variaciones en el grado de metilación de las pectinas también se detectaron principalmente en la región del córtex.

La mayor proporción de pectinas metiladas en la región del córtex observada en Azucena, no solo coincide con el estudio realizado por Yang en arroz, sino con el estudio de Eticha et al., 2005 realizado en dos cultivares de maíz con tolerancia diferencial.

El grado de metil esterificación diferencial observado en las raíces de Azucena, coincide con lo observado en los cortes tratados con hematoxilina, en este ensayo la región del córtex no presentó una tinción pronunciada con hematoxilina, lo cual podría relacionarse con el alto grado de metilación de pectinas presente en esta zona que impide la unión de aluminio a la pared celular. La hipótesis de que Azucena podría secuestrar aluminio en las vacuolas, dado que se observó un aumento el volumen celular, no contradice los resultados obtenidos en la evaluación inmunohistoquímica con JIM7/JIM5. En este genotipo hay pectinas no metiladas a las cuales el aluminio puede unirse y por tanto luego ser secuestrado por los transportadores reportados para *O.sativa*. En soporte a esta idea, se observó un leve aumento de JIM5 para Azucena en 100 μM en la región del haz vascular.

En Azucena, la observación de los cortes tratados con JIM7 con el objetivo 100X, mostró un patrón de ligación diferencial entre la concentración 0 μM y 100 μM , correspondiente a los espacios intersticiales. Resultados similares han sido reportados en otros estudios. En la investigación realizada por Eticha et al., 2005, un genotipo tolerante de maíz (ATP-Y), mostró una mayor proporción de pectinas metiladas en los espacios intercelulares. Una alta metilación de pectinas en esta zona puede darse para evitar la unión de aluminio en los espacios intersticiales, lo cual podría generar efectos dañinos sobre las pectinas de esa zona, las cuales desempeñan un papel importante en la unión intercelular indispensable para una adecuada comunicación entre células (Iwai et al., 2002)

En BGI, el cambio drástico en la composición de las pectinas en respuesta al aluminio, puede estar ligado a la acción de la Pectin-Metilesterasa (PME), la cual es una enzima que se encarga de modificar la estructura de las pectinas que se encuentran en la pared celular (Pelloux et al., 2007). Esta enzima, cataliza desmetilaciones específicas de las pectinas, quitando los grupos metanol y los protones, de manera que deja expuestos los grupos carboxilo cargados negativamente, a los cuales el catión Al^{3+} se une con mayor afinidad (Eticha et al., 2005). En el estudio realizado por Yang et al., 2008 se evaluó, mediante ensayos colorimétricos, la actividad de la pectin-metilesterasa, y se encontró que en

ausencia de aluminio, la actividad de esta enzima es mayor en el genotipo susceptible que en el tolerante; no obstante, la acción de esta enzima aumenta en presencia de aluminio en los dos genotipos, aunque su actividad es mucho mayor en el genotipo susceptible. En otros estudios como el de Yang et al., 2011 en maíz, y Li et al., 2016 en *Pisum sativum*, se encontró que la acción de esta enzima aumenta en presencia de aluminio y que su actividad siempre es mayor en el genotipo susceptible en comparación con el tolerante.

La mayor emisión de fluorescencia de JIM5 en el tratamiento con aluminio para BGI, coincide con el patrón de tinción con hematoxilina. De manera que el bajo grado de metilación de las pectinas en las distintas capas celulares, podría ser responsable de la alta ligación de aluminio observada, especialmente en el haz vascular. En el estudio de Yang et al., 2008, también se evidenció un aumento de JIM5 en el haz vascular del genotipo susceptible, inducido por la exposición al aluminio.

En el genotipo tolerante de *O.glumaepatula* OG89 se observó un aumento tanto de JIM7 como de JIM5 en el córtex para la concentración de aluminio de 100 μ M. El índice relativo de intensidad de la fluorescencia JIM7/JIM5. mostró valores ligeramente superiores a 1, tanto en el control como en el tratamiento de aluminio, lo cual indica una mayor proporción de pectina metiladas. Aunque no se observó un cambio significativo en este índice en respuesta al aluminio, el grado de metilación fue ligeramente superior en las plantas expuestas al metal. Esto coincide al igual que en Azucena, con el patrón de tinción con hematoxilina.

Por otro lado, en el genotipo susceptible de *O.glumaepatula*, se observó un grado de metilación diferencial en comparación con BGI. En OG130 también observó un aumento de la fluorescencia de ambos anticuerpos, pero hubo una mayor emisión de JIM7. Estas observaciones fueron soportadas por el índice de intensidad de fluorescencia JIM7/JIM5, el cual mostró valores mayores bajo el tratamiento de 100 μ M Al^{3+} y por el patrón de tinción con hematoxilina que mostró una menor ligación de aluminio en OG130 en relación con lo observado para BGI. En conjunto estos resultados indican que OG130 es más tolerante al estrés inducido por el aluminio que BGI, lo cual podría deberse a la capacidad de limitar la ligación de aluminio a las paredes celulares.

La alta metilación de pectinas en OG130 durante los 5 días de exposición al aluminio, puede ser el resultado de un proceso de hormesis. Este proceso se ha considerado como la respuesta adaptativa que presenta un organismo a una dosis baja de un agente químico o ambiental, que en altas dosis puede ser dañino (Lopez-diazguerrero et al., 2013). El proceso de hormesis generalmente se da en respuesta al estrés oxidativo causado por diversos factores incluyendo los metales pesados (Lopez-diazguerrero et al., 2013), como lo hace el aluminio. De manera que la metilación de pectinas en este genotipo se puede dar en un principio como respuesta ante la exposición al aluminio no como un mecanismo de tolerancia,

sino como una respuesta de hormesis, para evitar la unión del mismo y reducir el estrés oxidativo que este genera. Sin embargo, como la exposición al aluminio es continua, este logra alcanzar el umbral de toxicidad en este genotipo, generando efectos fitotóxicos como la inhibición del crecimiento que se observa en la curva de respuesta (Figura 5D).

Adicionalmente este comportamiento en OG130, es coherente con lo encontrado por Tello, 2015. En donde OG130, a una concentración de aluminio 172,2 μM cercana a 100uM, no presentó inhibición del crecimiento durante los primeros 5 días de exposición al tratamiento, sugiriendo la expresión de algún tipo de respuesta hormética sólo durante este periodo de tiempo, ya que posterior a este lapso la inhibición del crecimiento fue evidente. De modo que el aumento de JIM7 observado en este genotipo puede estar relacionado más a una respuesta hormética, que a un mecanismo de tolerancia en este genotipo, pues la inhibición del crecimiento se hace evidente en la curva de respuesta.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que la tolerancia diferencial al aluminio exhibida por los genotipos estudiados podría estar asociada a diferencias en el grado de metilación de las pectinas de la pared celular. Lo cual podría explicar la ligación diferencial de aluminio observada al realizar la tinción con hematoxilina.

Sin embargo, para confirmar si efectivamente este es un mecanismo de tolerancia importante en arroz, resulta necesario desarrollar otra investigación en donde se analice la composición de la pared celular en cada uno de los genotipos, para determinar el contenido de pectinas, y se cuantifique la actividad de la enzima pectin-metilesterasa. Adicionalmente, también podrían realizarse ensayos de inhibición de la pectin-metilesterasa para evaluar cómo afecta esto a la tolerancia diferencial al aluminio entre los distintos genotipos. Finalmente, se deben hacer experimentos con el fin de validar si existen cambios de este mecanismo a través del tiempo y establecer la concentración umbral de aluminio para la funcionalidad de este mecanismo.

2.7 CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones de este estudio, en relación a los objetivos propuestos:

- Confirmar la tolerancia diferencial y de crecimiento en las especies *Oryza sativa* y *Oryza glumaepatula*:
 - Se evidenció que el aluminio induce alteraciones diferenciales en las células de las raíces en cuanto al tamaño y el diámetro celular, para cada genotipo en estudio.
 - La concentración de 100 μ M de aluminio es suficiente para generar respuestas diferenciales en los diferentes genotipos.
 - Se determinó que la exposición al aluminio durante 5 días, es un tiempo óptimo para evaluar los posibles mecanismos implicados en las respuestas de tolerancias de los genotipos de las dos especies de arroz.
 - Se evidenció una mayor ligación de aluminio en los genotipos susceptibles en comparación con los tolerantes, según la intensidad de la tinción con hematoxilina.
 - Se evidenció baja ligación de aluminio en el córtex de los genotipos tolerantes, según los patrones de tinción con hematoxilina.
 - La tinción con hematoxilina en los genotipos susceptibles fue más generalizada en todas las capas celulares, indicando una mayor ligación de aluminio en estos genotipos.
- Optimizar un protocolo de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (JIM 5 y JIM 7) para la identificación del grado de metilación de pectinas:
 - Se optimizó un protocolo de inmunofluorescencia con anticuerpos específicos en el cual se definen las condiciones, pasos y reactivos requeridos para la ligación de los anticuerpos en el tejido radicular.
- Evaluar el grado de metilación de pectinas en las paredes de las células radicales de los genotipos susceptibles (OG89 y BGI9311) y tolerantes (OG130 y Azucena) al aluminio, mediante ensayos de inmunofluorescencia:

- Los genotipos tolerantes OG89 y Azucena presentaron un mayor grado de la metilación de pectinas tanto en el tratamiento control como en $100\mu\text{M Al}^{3+}$.
 - El genotipo susceptible BGI presento una disminución en el contenido de pectinas metiladas en respuesta al aluminio.
 - El genotipo susceptible OG130 presentó un aumento de pectinas metiladas en respuesta al aluminio.
- Identificar si las diferencias en tolerancia a concentraciones fitotóxicas de aluminio se relacionan con el grado de metilación de pectinas en la pared celular de las células de la raíz:
 - La alta metilación de pectinas observada en ambos genotipos tolerantes, tanto en condiciones control como de estrés, sugieren que la metilación de pectinas es de carácter constitutivo en estos genotipos.
 - Se determinó que la tolerancia diferencial al aluminio exhibida por los genotipos estudiados podría estar asociada a diferencias en el grado de metilación de las pectinas de la pared celular, lo cual podría explicar la ligación diferencial de aluminio observada en la tinción con hematoxilina.

2.8 RECOMENDACIONES

- Analizar la composición de la pared celular en cada uno de los genotipos, con el fin de determinar el contenido de pectinas y su contribución en la tolerancia diferencial observada entre genotipos.
- Cuantificar la actividad de la enzima pectin-metilesterasa en cada uno de los genotipos y establecer una relación con la tolerancia diferencial observada entre genotipos.
- Realizar ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la pectin-metilesterasa y evaluar su efecto en la tolerancia diferencial entre los diferentes genotipos.
- Determinar cambios de la metilación de pectinas a través del tiempo con el fin de establecer si este mecanismo es constitutivo o inducido por aluminio en los diferentes genotipos.
- Evaluar hasta que concentración de aluminio se puede presenciar la activación de este mecanismo de tolerancia en los diferentes genotipos.
- Implementar un protocolo para bloquear la autofluorescencia del tejido radical y observar con mayor claridad los patrones de tinción de los anticuerpos.

3 REFERENCIAS

- Alvarez, I., Sam, O., Reynaldo, I., Testillano, P., Risueño, C., & Arias, M. (2012). Morphological and cellular changes in rice roots (*Oryza sativa* L .) caused by Al stress. *Botanical Studies*, 53, 67–73.
- Arroyave, C., Barceló, J., Poschenrieder, C., & Tolrà, R. (2011). Aluminium-induced changes in root epidermal cell patterning , a distinctive feature of hyperresistance to Al in *Brachiaria decumbens*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(11), 1477–1483. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.011>
- Avwioro, G. (2011). HISTOCHEMICAL USES OF HAEMATOXYLIN - A REVIEW. *JPCS*, 1, 24–34.
- Cai, M., Zhang, S., Xing, C., Wang, F., Wang, N., & Zhu, L. (2011). Plant Science Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. *Plant Science*, 180(5), 702–708. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.01.017>
- Cancado, G. M. ., Loguercio, L. ., & Martins, P. . (1999). Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L .), 99, 747–754.
- Carreño, A., & Chaparro-giraldo, A. (2013). Tolerancia al aluminio en especies vegetales : mecanismos y genes. *Universitas Scientiarum*, 18(3), 283–310. <http://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-3.taev>
- Casierra-posada, F. (2007). Estrés por aluminio en plantas : reacciones en el suelo , síntomas en vegetales y posibilidades de corrección . Una revisión Stress for aluminum in plants : reactions in the soil , symptoms in plants and amelioration possibilities . A review. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS*, 1(2), 246–257.
- Chang, S. H. U., Gao-ling, S. H. I., Lai-qing, L. O. U., Jun-xia, D. E. N. G., Jian-lin, W. A. N., & Qing-sheng, C. A. I. (2015). Different Aluminum Tolerance among Indica , Japonica and Hybrid Rice Varieties. *Science Direct*, 22(3), 123–131. <http://doi.org/10.1016/j.rsci.2015.05.016>
- Clarck, R., & Kochian, L. (2006). Rootreader2D. Cornell University and the Cornell Research Foundation, Inc.
- Cordain, L. (1999). Cereal Grains : Humanity ' s Double-Edged Sword. *World Rev Nutr Diet*, 84, 19–73.

- Costa, G., & Plazanet, I. (2016). Plant Cell Wall , a Challenge for Its Characterisation. *Advances in Biological Chemistry*, 6, 70–105.
- Coudert, Y., Perin, C., Courtois, B., Khong, N. G., & Gantet, P. (2010). Genetic control of root development in rice , the model cereal. *Trends in Plant Science*, 15(4), 219–226. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.01.008>
- Eticha, D., Stass, A., & Horst, W. J. (2005). Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex : significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell and Environment*, 28, 1410–1420.
- Famoso, A. N., Clark, R. T., Shaff, J. E., Craft, E., Mccouch, S. R., & Kochian, L. V. (2010). Development of a Novel Aluminum Tolerance Phenotyping Platform Used for Comparisons of Cereal Aluminum Tolerance and Investigations into Rice. *Plant Physiology*, 153(August), 1678–1691. <http://doi.org/10.1104/pp.110.156794>
- Fang, S., Clark, R. T., Zheng, Y., Iyer-pascuzzi, A. S., Weitz, J. S., & Kochian, L. V. (2013). Genotypic recognition and spatial responses by rice roots. *PNAS*, 110(7), 2670–2675. <http://doi.org/10.1073/pnas.1222821110>
- FAO. (2004). *INTERNATIONAL YEAR OF RICE*.
- FEDEARROZ. (2010). *Colombia unida frente a un gran desastre*.
- Gall, H. Le, Philippe, F., Domon, J., Gillet, F., Pelloux, J., & Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4, 112–166. <http://doi.org/10.3390/plants4010112>
- Horst, W. J., Wang, Y., & Eticha, D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants : a review. *Annals of Botany*, 106, 185–197. <http://doi.org/10.1093/aob/mcq053>
- Hosmer, K., & Mohnen, D. (2009). The structure , function , and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Hossain, A. K. M. Z., Koyama, H., & Ñ, T. H. (2006). Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *Journal of Plant Physiology*, 163, 39–47. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.02.008>
- Iwai, H., Masaoka, N., Ishii, T., & Satoh, S. (2002). A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *PNAS*, 99(25), 16319–16324.

- Jones, D. L., Blancaflor, E. B., Kochian, L. V, & Gilroy, S. (2006). Spatial coordination of aluminium uptake , production of reactive oxygen species , callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1309–1318. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01509.x>
- Kochian, L. V, Pi, M. A., & Liu, J. (2015). *Plant Adaptation to Acid Soils: The Molecular Basis for Crop Aluminum Resistance*. <http://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114822>
- Li, W., Li, Y., Qu, M., Xiao, H., Feng, Y., Liu, J., ... Yu, M. (2016). Cell Wall Pectin and its Methyl-esterification in Transition Zone Determine Al Resistance in Cultivars of Pea (*Pisum sativum*). *Frontiers in Plant Science*, 7(39), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00039>
- Lionetti, V., Bellincampi, D., & Cervone, F. (2012). Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Plant Physiology*, 169(16), 1623–30. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.006>
- Lopez-diazguerrero, N. E., Gonzáles, V., Hernández, R., Alarcón, A., Lopez, A. L., & Königsberg, M. (2013). Hormesis: What doesn ' t kill you makes you stronger. *Gaceta Médica de México*.
- Ma, J. F., Shen, R., Nagao, S., & Tanimoto, E. (2004). Aluminum Targets Elongating Cells by Reducing Cell Wall Extensibility in Wheat Roots. *Plant Cell Physiol*, 45(5), 583–589.
- Ma, J. F., Shen, R., Zhao, Z., Wissuwa, M., Takeuchi, Y., & Yano, M. (2002). Response of Rice to Al Stress and Identification of Quantitative Trait Loci for Al Tolerance. *Plant Cell Physiol*, 43(6), 652–659.
- Marcus, S. E., Vale, R. P., Knox, J. P., Shewry, P. R., & Tosi, P. (2015). Comparative in situ analyses of cell wall matrix polysaccharide dynamics in developing rice and wheat grain. *Planta*, 241, 669–685. <http://doi.org/10.1007/s00425-014-2201-4>
- Miftahudin, Nurlaela, & Juliarni. (2007). Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices of Two Rice Varieties under Aluminum Stress. *HAYATI Journal of Biosciences*, 14(3), 110–114.
- Minitab Inc. (n.d.). Minitab. Retrieved from <https://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>
- Mossor-pietraszewska, T. (2001). Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 673–686.

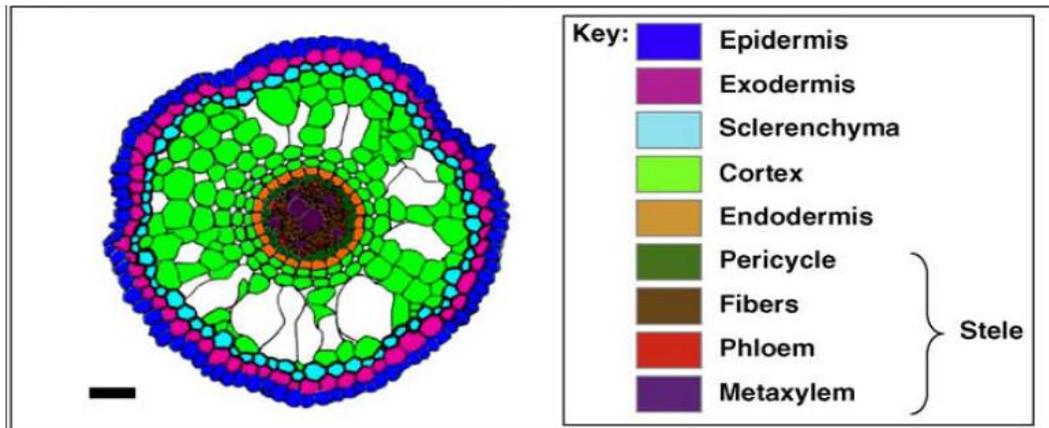
- Nikon Corporation. (2014). Nis elements Basic Research.
- Panda, S. K., Baluska, F., & Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7), 592–597.
- Pandey, S. (2010). Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2), 88–94.
- Pelloux, J., Rustéruc, C., & Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *TRENDS in Plant Science*, 12(6), 268–277. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.001>
- Posso, D. (2013). Protocolo de tinción con hematoxilina.
- Posso, D., Llano, J., Londoño, A., Lentini, Z., & Ghneim, T. (2013). Caracterización de la Tolerancia al Aluminio en Genotipos de la Especie Silvestre de Arroz *Oryza glumaepatula* Steud. In *I Workshop sobre Tolerância a Estresses Abióticos em Plantas Forrageiras* (pp. 68–75).
- Radmer, L., Tesfaye, M., Somers, D. A., Temple, S. J., Vance, C. P., & Samac, D. A. (2012). Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L .), 121–134. <http://doi.org/10.1007/s11104-011-0937-1>
- Ribeiro, C., Cambraia, J., Henrique, P., Peixoto, P., Meira, É., & Júnior, F. (2012). Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars, 24(2), 107–116.
- Robinson, J. P., Bs, J. S., & Kumar, G. L. (2009). Immunofluorescence. In *IHC Staining Methods* (5th ed., pp. 61–65).
- Samac, D. A., & Tesfaye, M. (2003). Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 75, 189–207.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). HISTORICAL commentary NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Semwogerere, D., & Weeks, E. R. (2005). Confocal Microscopy. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (pp. 1–10). <http://doi.org/10.1081/E-EBBE-120024153>
- Sivaguru, M., Liu, J., & Kochian, L. V. (2013). Targeted expression of SbMATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *The Plant Journal*, 76, 297–307. <http://doi.org/10.1111/tpj.12290>

- Souza, L. T. De, Cambraia, J., & Ribeiro, C. (2016). Effects of aluminum on the elongation and external morphology of root tips in two maize genotypes. *Bragantia, Campinas*, 75(1), 19–25.
- Spring, K. R. (2003). Fluorescence Microscopy. In *Encyclopedia of Optical Engineering* (pp. 548–555). <http://doi.org/10.1081/E-EOE>
- Steffens, B., Geske, T., & Sauter, M. (2011). Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. *New Phytologist*, 190, 369–378.
- Tello, D. (2015). *Estalecimiento del umbral de toxicidad de aluminio en genotipos de las especies de arroz Oryza sativa y Oryza glumaepatula*. Icesi.
- University of Georgia. (2016). The University of Georgia, Complex Carbohydrate Research Center.
- Vaughan, D. a., Kadowaki, K., Kaga, A., & Tomooka, N. (2005). On the Phylogeny and Biogeography of the Genus *Oryza*. *Breeding Science*, 55(2), 113–122. <http://doi.org/10.1270/jsbbs.55.113>
- Villamizar, J. (2012). (VERBENACEAE) SOMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO Phenotypic Plasticity in Plants of *Lippia dulcis* (Verbenaceae). *ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA*, 17(2), 363–378.
- Wang, W., Zhao, X. Q., Chen, R. F., Dong, X. Y., Lan, P., Ma, J. F., & Shen, R. F. (2015). Altered cell wall properties are responsible for ammonium-reduced aluminium accumulation in rice roots, 1382–1390. <http://doi.org/10.1111/pce.12490>
- Willats, W. G. T., Limberg, G., Buchholt, H. C., Alebeek, G. Van, Benen, J., Visser, J., ... Knox, J. P. (2000). Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides , polysaccharides , and enzymatic. *Carbohydrate Research*, 327, 309–320.
- Willats, W., & Knox, P. (2003). Molecules in context: probes for cell wall analysis. In J. Rose (Ed.), *The Plant Cell Wall* (pp. 92–99). Blackwell Publishing.
- Yamauchi, T., Shimamura, S., Nakazono, M., & Mochizuki, T. (2014). Aerenchyma formation in crop species: A review. *Field Crops Research*, 152(October 2013), 8–16. <http://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.12.008>
- Yang, J. L., Li, Y. Y., Zhang, Y. J., Zhang, S. S., Wu, Y. R., Wu, P., & Zheng, S. J. (2008). Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex 1. *Plant Physiology*, 146, 602–611. <http://doi.org/10.1104/pp.107.111989>

- Yang, J. L., Zhu, X. F., Peng, Y. X., Zheng, C., Li, G. X., Liu, Y., ... Zheng, S. J. (2011). Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 155(4), 1885–92. <http://doi.org/10.1104/pp.111.172221>
- Yang, J. L., Zhu, X. F., Zheng, C., Zhang, Y. J., & Zheng, S. J. (2011). Genotypic differences in Al resistance and the role of cell-wall pectin in Al exclusion from the root apex in *Fagopyrum tataricum*. *Annals of Botany*, 107(Zheng 2001), 371–378. <http://doi.org/10.1093/aob/mcq254>
- Ye, Y., Qiaolan, W., Mingjian, G., Zaihua, G., & Zhuqing, Z. (2011). Al-induced root cell wall chemical components differences of wheat (*Triticum aestivum* L .) differing in Al tolerance. *African Journal of Biotechnology*, 10(35), 6762–6772. <http://doi.org/10.5897/AJB10.2090>
- Zelinová, V., Halu, L., Huttová, J., Illé, P., Mistrík, I., & Valentovi, K. (2011). Short-term aluminium-induced changes in barley root tips. *Protoplasma*, 248, 523–530. <http://doi.org/10.1007/s00709-010-0199-4>
- Zheng, S. J., Yang, J. L., He, Y. F., Yu, X. H., Zhang, L., You, J. F., ... Matsumoto, H. (2005). Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance. *Plant Physiology*, 138, 297–303. <http://doi.org/10.1104/pp.105.059667.1>
- Zibae, A. (2013). Rice: Importance and Future. *J Rice Res*, 1(2), 2013. <http://doi.org/10.4172/jrr.1000e102>
- Zorrilla, G., Martínez, C., Berrío, L., Corredor, E., Carmona, L., & Pulver, E. (2013). Chapter 10: Improving Rice Production Systems in Latin America and the Caribbean. In *Eco-efficiency: From Vision to Reality* (pp. 162–170).

4 ANEXOS

Anexo 1. Representación esquemática de la organización de las capas celulares en un corte transversal en raíz. Las capas celulares están separadas por colores, y a la derecha se indican los nombres de las mismas (Coudert et al., 2010).



Anexo 2. Protocolo de inmunofluorescencia modificado.

PROTOCOLO PARA INMUNOFLUORESCENCIA

1. Someter las plántulas (aproximadamente de 5 días) a cultivos hidropónicos: control y tratamiento (100 μ l) $AlCl_3$.
2. Realizar cortes de 1 a 3mm en la zona anterior al ápice de las raíces.
3. Poner los cortes directamente en 30 μ l de solución de fijación* contenida en pozos de una Placa de ELISA, durante 24 horas a 4°C.
4. Lavar las muestras con 30 μ l de Buffer fosfato salino (PBS) 10X pH 7.4.
5. Trasladar los cortes de los pozos a portaobjetos con ayuda de una micropipeta de 200 μ l.
6. Retirar el exceso de PBS con una micropipeta de 2.5 μ l. Procure que los cortes no se deshidraten.

7. bloquear con 30 μ l de albumina sérica bovina 0.2% en PBS (10X pH 7.4) durante 30 minutos.
8. Retirar el exceso.
9. Incubar las muestras con 30 μ l de los anticuerpos monoclonales JIM5 y JIM7, diluidos 1:10 en PBS (10X pH 7.4) con albumina sérica bovina al 0.2% en PBS por 2 horas a temperatura ambiente y en completa oscuridad.
10. Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno, con 30 μ l PBS (10X pH 7.4). Retirar el exceso después de cada lavado.
11. Incubar las muestras a 37°C con 30 μ l de anticuerpo secundario (anti-rat IgG conjugado con fluoresceína de isotiocianato) diluido 1:50 en albumina sérica bovina 0,2% en PBS (10X pH 7.4).
12. Lavar las muestras tres veces con PBS (10X pH 7.4) durante 5 minutos y retirar el exceso.
13. Adicionar 20 μ l de una solución 50:50 PBS/ Solución fijadora en los portaobjetos y poner los cubreobjetos.
14. Sellar los cubreobjetos con una capa doble de esmalte transparente.
15. Observar en el microscopio confocal LSM 700

Nota: Las muestras control se procesan de igual manera pero no se incuban con los anticuerpos primarios JIM5 y JIM7.

***Solución de fijación:** Paraformaldehído 4% en 50mM PIPES, MgSO₄ 5mM y EDTA 5mM, pH 6.9.

Anexo 3. Presencia de aerénquima en corte transversal de una raíz de BGI tratada con aluminio 100 μ M.

