



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Producción de cristales de oxalato de calcio en la cactácea columnar (Mytillocactus geometrizans): una interpretación adaptativa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

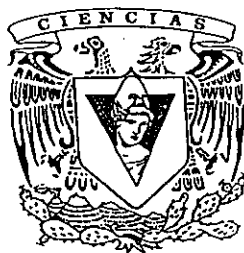
B I O L O G A

P R E S E N T A:

AURORA GAXIOLA ALCÁNTAR

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Exequiel Ezcurra Real de Azúa

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESTUDIOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Producción de cristales de oxalato de calcio en la cactácea
columnar (*Myrtillocactus geometrizans*): una interpretación
adaptativa

realizado por Aurora Gaxiola Alcántar

Con número de cuenta 9450295-6, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis
Propietario

Dr. Exequiel Ezcurra Real de Azúa

Propietario

Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Propietario

M. en C. Irene Pisanti Baruch

Suplente

Dra. Christina Désireé Siebe Grabach

Suplente

Biól. Carlos Martorell Delgado

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

*Éstos son en verdad los pensamientos de todos los
hombres en todos los lugares y épocas; no son
originales míos.*

Si son menos tuyos que míos, son nada o casi nada.

*Si no son el enigma y la solución del enigma, son
nada.*

Si no están cerca y lejos, son nada.

Éste es el pasto que crece donde hay tierra y hay agua.

Éste es el aire común que baña el planeta.

Leaves of Grass

Walt Whitman

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera manifestar el agradecimiento que siento por todas las personas que forman parte de la Universidad y que intervinieron de manera directa o indirecta en mi formación.

Exequiel, gracias por dejarte convencer y aceptar 10,000 leguas de viaje;
para ti, oxalatos agradecidos.

Muchas gracias, Marisa Mazari por ayudarme
a encontrar las herramientas necesarias.

Eduardo Morales, gracias por enseñarme a descubrir
el maravilloso mundo de las zonas áridas.

A mis sinodales, Exequiel Ezcurrea, Carlos Martorell,
Eduardo Morales, Irene Pisanti y Cristina Siebe,
gracias por trabajar conmigo
y participar en la consolidación de este proyecto.

A mis compañeros en el LACRA laboratorio, Eduardo, Carlos y Miguel,
gracias por enseñarme Tehuacán, gracias a Everardo Castillo
y a todas las personas de Zapotitlán Salinas y Santiago Chazumba.

A mis padres y a mis hermanos que comenzaron a descubrir el mundo
mucho antes que yo, gracias por compartirlo (Bárbara, Julieta, Laura y Poncho).
Gracias también a todas las "erres" y las "equis" de Mazatlán; tía Loren-Xóchitl.

Gracias muchas Guillermo, muchas...

Amiga Alejandra, por ser mi amiga, por estar
y por compartir esta tierra-morada.

A los amigos, qué más se les puede agradecer; Alejandra, Luis, Karina,
Sotres, Ek, Demon, Valeria, Mauricio, Daniela, Andrea, Chuky,
gracias y muchas gracias, la biología nunca hubiera sido la misma,
gracias Eduardo.

Quisiera agradecer de manera especial la ayuda de las personas
de los diferentes laboratorios que me albergaron a lo largo de las diferentes etapas
de mi tesis. Del Laboratorio de Química de Suelos (Departamento de Edafología en el
Instituto de Geología-UNAM) a la doctora Cristina Siebe y al maestro Raúl López; del
Laboratorio de Química Analítica (Posgrado de Química, de la Facultad de Química-
UNAM), al ingeniero químico Francisco Rojo. Agradezco también la ayuda de la bióloga
Estela Salazar del laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico de la UNAM.

Por el apoyo económico,
muchas gracias a Fundación UNAM y a PROBETEL.

INDICE

ANTECEDENTES 5

El oxalato de calcio 5

Las cactáceas, plantas sin hojas 8

The cost of not shedding leaves: calcium oxalate accumulation in *Myrtillocactus geometrizans*, a columnar cactus 10

SUMMARY 10

INTRODUCTION 12

Background studies 14

Objectives 14

MATERIALS AND METHODS 15

Study Area 15

Myrtillocactus geometrizans C. 16

Study species 16

Sampling procedure 17

RESULTS 20

DISCUSSION 23

OTRAS CONSIDERACIONES 26

El posible origen 27

Exaptación 28

FUTUROS TRABAJOS 30

BIBLIOGRAFÍA 33

ANEXO I: Metodología 37

Calcio vegetal 37

Calcio no asociado a oxalato (fácilmente soluble, fs) 37

Calcio asociado a oxalato 38

Calcio edáfico 39

Pretratamiento 39

Calcio intercambiable 39

Calcio intemperizable 40

ANEXO II. ÁREA DE TRABAJO Y SITIOS DE MUESTREO 42

ANEXO III: TABLA DE RESULTADOS 43

ANEXO IV: FOTOGRAFÍAS 44

ANTECEDENTES

En el Valle de Tehuacán es posible observar largas estelas de cristales blancos sobre la superficie del suelo, estas estelas son el rastro de cactáceas columnares que cayeron al suelo. La cactácea derrumbada se desintegra y reincorpora al ecosistema casi en su totalidad; sin embargo, los procesos de degradación por medio de los cuales los tejidos vegetales se descomponen no afectan a los cristales de oxalato de calcio en la misma escala de tiempo y el rastro éstos que dejan permanece por mucho tiempo.

A partir de estas observaciones surgió la idea de evaluar qué tanto oxalato de calcio podría llegar a tener una cactácea columnar. Para responder esta pregunta, se realizaron análisis en *Neobouxbamia tetetzo*, endémica del Valle de Tehuacán, que pueden llegar a medir entre 12 y 15 metros de altura y vivir entre 300 y 500 años (Nobel, 1995). El resultado fue sorprendente: aproximadamente 50% de la masa en pie de los tetechos se presentó en forma de oxalato de calcio. Estos análisis preliminares fueron los que generaron la pregunta principal de este trabajo: ¿Por qué es tan abundante el oxalato de calcio en las cactáceas?

El oxalato de calcio

El oxalato es la sal del ácido oxálico. Este compuesto es un producto del metabolismo vegetal y consiste en un ácido dicarboxílico (dos carbonos), producido a lo largo de diferentes vías bioquímicas (Scott, 1993). Los precursores inmediatos del ácido oxálico son el glioxilato, producido principalmente en glioxisomas y transformado por la enzima glioxilato oxidasa en ácido oxálico (Lehninger, 1990; Gielt, 1992; Ilarsan *et al.* 1997), y el ácido L-ascórbico, que al ser descompuesto en dos moléculas produce ácido oxálico y ácido L-terónico (Franceschi y Loewus, 1995). La oxidación del ácido oxálico produce oxalato que, al asociarse al ion calcio, forma un compuesto sumamente insoluble, el oxalato de calcio. La síntesis del oxalato de calcio en las plantas involucra calcio -que se obtiene del medio ambiente por medio de las raíces- y oxalato producido durante el metabolismo vegetal.

La producción de esta sal no es exclusiva de las cactáceas; se ha reportado la presencia de cristales en hongos, algas, animales y diversos grupos de plantas (Ruiz y Mansfield, 1994). En relación con las últimas, los resultados de los experimentos y trabajos consultados apunta a que la mayor acumulación de cristales se encuentra en las hojas (Borchert, 1990; De Silva *et al.*, 1996; Al-Rais, 1971; Rengel, 1992; Ruiz y Mansfield, 1994 y Larcher, 1995).

La producción de cristales de oxalato de calcio se ha reportado para hongos (Arnott, 1995), angiospermas, gimnospermas (Horner y Wagner, 1995) y mamíferos (Khan, 1995), sin que su función haya sido definida. Algunos trabajos proponen la tesis de que la inmovilización de Ca^{2+} en cristales de oxalato evita que las altas concentraciones de este ion interfieran con los mecanismos de comunicación celular relacionados con la apertura y contracción de los estomas (Ruiz y Mansfield, 1994). Asimismo, la presencia de estos cristales ha sido referida como un mecanismo de regulación del balance iónico (Franceschi y Loews, 1995). Finalmente, se ha reportado que la acumulación de cristales de oxalato en los tejidos de algunas plantas puede proveerlas de protección química y mecánica (Al-Rais, 1971; Morton, 1977; Kerner *et al.* 1973).

De estas hipótesis, la más aceptada es la que relaciona al oxalato con características defensivas, sobre todo contra la herbivoría (Dixon *et al.*, 1994 y Ruiz y Mansfield, 1994). Sin embargo, en el caso de las cactáceas no parece haber evidencias que apoyen esta idea. Si bien los procesos de herbivoría a los que los cactus pudieran estar sometidos no son totalmente conocidos, no parecen ser tan devastadores como para que se haya seleccionado una defensa tan costosa en términos metabólicos.

Las formas de estos cristales son características y distintivas para cada grupo vegetal y se localizan en casi cualquier tejido, aunque, como ya se mencionó, son las hojas los principales centros de acumulación. El oxalato se produce de manera natural a través de distintos procesos fisiológicos celulares y la formación de oxalato de calcio representa necesariamente la presencia de iones Ca^{2+} disponibles.

Es importante recalcar que el calcio es un elemento que forma parte de muchos procesos dentro de la fisiología vegetal (Hepler y Wayne, 1985). Interviene por ejemplo, en la regulación del comportamiento de los estomas; en la producción y activación de fitohormonas, y en la regulación molecular vía segundos mensajeros (Ruiz y Mansfield, 1994), entre otros procesos. Por el papel que juega en la estructura de la pared celular, el calcio es considerado como un elemento de vital importancia y, debido a la intervención dentro del metabolismo celular a través de varios mecanismos ON-OFF, los niveles del ion Ca^{2+} en citosol se mantienen muy estables a través de una ATPasa que expulsa calcio fuera del citoplasma hacia los espacios extracelulares (Hepler y Wayne, 1985; De Silva *et al.*, 1994; Scott, 1993).

En su mayor parte, el calcio se asimila a través de fuerzas electrostáticas (enlaces coordinados) y no a través de complejos moleculares en donde el ion es neutralizado y pierde su carga. Lo anterior tiene como consecuencia que el exceso de calcio se encuentre disuelto en forma de ion Ca^{2+} , y se refleja en la interacción química entre el calcio y una amplia variedad de compuestos metabólicos en diversos organismos (Taiz y Zeiger, 1991).

El aumento en la concentración de calcio inhibe numerosos procesos bioquímicos: el estiramiento y crecimiento de la pared celular (Rengel, 1992; Ruiz y Mansfield, 1994); apertura y contracción de estomas (De Silva *et al.*, 1994); activación e interrupción de procesos genéticos (transducción) a través de vías de segundos mensajeros (Johannes *et al.*, 1991), y acoplamiento del complejo calcio-calmodulina (Harper *et al.*, 1991), entre otros.

Considerando todo lo anterior, es de esperarse que exista una cantidad requerida de calcio enlazada a diferentes estructuras y/o moléculas (De Silva, 1996).

Las plantas absorben el calcio del sustrato en el que se encuentran. Por lo tanto, es muy probable que las plantas que viven en suelos calcáreos absorban cantidades considerables del ion Ca^{2+} (Ayyad, 1981). Consecuentemente, se esperaría encontrar en las plantas que se encuentran expuestas a sustratos ricos en calcio mecanismos que ayuden a evitar el

daño fisiológico que puede producirse debido a los desajustes iónicos ocasionados por las altas concentraciones del ion (Ruiz y Mansfield, 1994; Scott, 1993; Khan, *et al.*, 1976).

Las cactáceas, plantas sin hojas

Las hojas de las plantas son las principales estructuras encargadas de dos procesos vitales: la *fotosíntesis* y la *respiración*. Los tejidos foliares son los principales centros de producción de metabolitos de la mayoría de las plantas. A través del sistema vascular se distribuyen los productos del metabolismo desde las hojas hacia el resto de la planta (Taiz y Zeiger, 1991; Nobel, 1994). Estas funciones se realizan mientras la hoja es joven; conforme ésta senece los nutrientes se trasducen hacia el tallo hasta que la hoja se seca completamente y se desprende, por lo que se podría decir que las plantas con hojas no desperdician casi nada de la energía. Al mismo tiempo, los excedentes metabólicos que carecen de utilidad -o no tienen una función inmediata-, los iones de metales pesados y demás compuestos prescindibles, no se trasducen y se eliminan cuando la hoja cae. A través de este mecanismo, las plantas reutilizan gran cantidad de la materia y energía que representa una hoja y, al mismo tiempo, se deshacen de los productos de desecho del metabolismo, lo que se denomina *basura metabólica* (Larcher, 1995; Nobel, 1994).

Las cactáceas son plantas que presentan ciertas características morfológicas y fisiológicas como respuesta adaptativa a la escasez de agua y nutrientes. Una de estas características distintivas es la pérdida de hojas fotosintéticas, (en su lugar se observan espinas). Por otro lado, el tallo engrosado y verde concentra la actividad fotosintética (Flores, 1973) y disminuye la superficie de contacto entre el interior de la planta y el medio externo. Esto representa para las cactáceas una disminución en la pérdida de agua ya que se evita la generación de un gradiente de humedad que desecaría a la planta (Nobel, 1994). Sin embargo, la pérdida de hojas implica la carencia de uno de los mecanismos a través de los cuales la mayoría de las plantas se deshace de su basura metabólica.

Las características morfológicas que han significado una ventaja adaptativa, y que han permitido el establecimiento de las cactáceas en ambientes de altas temperaturas y escasez de agua, representan por otro lado una limitante muy importante: la reducción de la superficie fotosintética (Gibson y Nobel, 1986). La restringida capacidad de

intercambio gaseoso convierte a cada átomo de carbono en un tesoro metabólico invaluable (Kluge y Ting, 1978).

Las cactáceas, al ser plantas sin hojas, carecen de un mecanismo que actúe como tiradero metabólico. Presentan modificaciones morfológicas y fisiológicas que les han permitido desarrollarse en ambientes extremadamente áridos, y al mismo tiempo han hecho de los procesos metabólicos ciclos eficientes, lo que conlleva el uso cuidadoso de todas las moléculas disponibles.

En el Valle de Tehuacán, las cactáceas están expuestas a altos niveles de calcio edáfico, lo que puede intervenir negativamente en los procesos fisiológicos si éste se absorbe en exceso.

De aquí surge la hipótesis de este trabajo: las cactáceas inmovilizan el exceso de calcio que absorben del suelo como oxalato de calcio; al carecer los cactus de hojas, éste se acumula como basura metabólica que no puede ser eliminada.

**The cost of not shedding leaves: calcium oxalate accumulation in
Myrtillocactus geometrizans, a columnar cactus**

SUMMARY

1. We evaluated the hypothesis that calcium oxalate crystals in cacti —known as druses— are the result of an adaptive mechanism that allows sequestering excess calcium in the calcium-rich environments of many arid lands.
2. In 26 contrasting sites within the arid Tehuacán Valley, Mexico, we sampled plant tissue in adult individuals of *Myrtillocactus geometrizans*, a columnar cactus of widespread distribution in central Mexico, and also took soil samples around each plant. We analyzed the soil samples for exchangeable and releasable calcium, and analyzed the plant tissues for calcium oxalate and non-oxalate forms of calcium.
3. We found that calcium concentration in the arid soils of Tehuacán was generally high, but varied considerably according to the parent material and the presence of caliche. The exchangeable calcium in the soil (an estimate of the calcium fraction that is immediately available) was correlated with releasable calcium (an estimate of long-term calcium supply).
4. A significant positive correlation was found between soil calcium content and calcium oxalate crystals in the cactus. The production of calcium oxalate druses was higher in cacti growing in soils with higher calcium contents; the amount of calcium in the plant immobilized as oxalate was on average 4 times higher than the amount of calcium in other forms, and calcium immobilized as oxalate in the plant increased with increasing soil calcium contents almost twice as fast as non-oxalate calcium.
5. A significant correlation was also found between calcium oxalate and the size of the plant. That is, calcium oxalate accumulates in the body of the plant as it grows, and larger (older) plants have higher contents of calcium oxalate than smaller

(younger) ones. Old plants may have ca. 45% of their dry mass in the form of calcium oxalate.

6. Although many broad-leafed plants produce small amounts of calcium oxalate with no clear adaptive interpretation, our study suggests that in columnar cacti calcium oxalate may have a fundamental function. Due to the absence of external detachable structures, such as leaves that can be shed together with accumulated calcium, oxalate helps to sequester excess calcium produced in calcium-rich soils. Thus, the adaptive role of calcium oxalate crystals in cacti, derived from an originally non-adaptive trait in many plants, may be considered an evolutionary "exaptation".

INTRODUCTION

Plants that live in arid environments often deal with elevated concentrations of soil calcium as a consequence of the high calcium contents that are common in dryland soils (Larcher, 1995). Although desert rainfall is often capable of leaching the most soluble ions that are produced by soil weathering, the less-soluble calcium ions may accumulate a few centimeters under the surface of the desert soil, forming a characteristic soil layer of calcium concretions called *caliche* (Black, 1965). On top of this, in some desert soils the parent material is composed of limestone or other calcium-rich minerals. In these cases, the poor leaching capacity of the scant desert rains may produce large accumulations of mineral calcium near the soil surface.

Calcium is absorbed into plants through the roots with no barrier other than the pericycle. In leaf cells it is electrogenically transported through an ATP pump system (Rengel, 1992). The ATP pump is a selective barrier that works at the cellular level in plant leaves (Lehninger 1992), but its selective capacity is limited at the root level (Larcher 1995). During rainy seasons, giant columnar cacti absorb large amounts of water in a very short time (the saguaro cactus *Carnegiea gigantea*, for example, can absorb water totaling ca. 10% of their standing mass, representing as much as 50 liters in large adult plants, in only four days after receiving adequate rainfall, and in approximately 20 days it can store water representing as much as 50% of their initial standing mass, i.e., some 250 liters in large plants; see Nobel 1988). The speed at which this process occurs probably makes calcium exclusion at the root level more difficult than for most plants (Scott 1993). Thus, together with soil water, large amounts of soil calcium may be incorporated into the xylem flux of cacti growing in calcium-rich substrates.

At a cellular level, calcium ions have an important role in many physiological processes (De Silva *et al.* 1994), and they have been recognized as an important nutrient. Although calcium is essential for growth and development, high concentrations can interfere with cell physiology (De Silva *et al.* 1996). It has been postulated that the production of insoluble calcium oxalate may function as a means of calcium sequestration (Borchert 1985) contributing to the homeostatic regulation of this ion when

it is absorbed in excess from the soil. Calcium oxalate crystals occur in most plant species in the leaves (Ilarslan 1997), and are eliminated when the leaf senesces, dies and falls (Taiz and Zeiger 1991). Cacti, however, have evolutionarily modified their leaves into thorns, spines and trichomes, and therefore lack detachable external structures through which metabolic waste can be disposed. Previous work have shown that columnar cacti (*Neobuxbaumia tetetzo*) can accumulate large amounts of calcium oxalate crystals, representing as much as half of their total body dry mass (Hinke and Ezcurra 1990).

Recent studies have discussed the possible function of calcium oxalate crystals as physical and chemical protection against herbivory. These crystals are produced in specific patterns of crystal morphology, size and shape. According to these characteristics, crystals are described as raphides (needles), crystal sand, styloids, prisms, and druses (Ilarsan 1997, Cavaletto 1998). Needle-like crystals, or raphides, have irritant and allergenic properties (Oaks and Butcher 1962), they penetrate tender tissues of the digestive system causing injurious effects in some herbivores. Several reports of damages caused by the ingestion of plants belonging to the families Agavaceae and Araceae support the idea that raphides have an anti-herbivore protective function (Kerner *et al.* 1973).

The most common calcium oxalate crystals in cacti are clustered incrustations of crystals called druses (Al-Rais *et al.* 1971), which are more or less spheroidal, not acicular, in shape and have not been reported as irritant or allergenic (Fig. 1). Indeed, many herbivores such as rabbits, jackrabbits, bighorn sheep, and goats readily consume the soft parenchyma of cacti when the protective spines are removed. Consequently, it seems unlikely that calcium oxalate



Figure 1. Microscope photograph of two druses of *Myrtillocactus geometrizans*. Note the rounded shape of the crystals.

production in cacti could be related to any kind of protective function. Some other authors (e.g., Gibson and Nobel 1986) have discussed the possibility that calcium oxalate may function as a means of storing metabolic carbon. However, as the energy needed to hydrolyze the oxalate molecule is very high, this hypothesis seems unlikely. Metabolically, starch storage is a more efficient mechanism.

Background studies

Hinke and Ezcurra (1990) studied the accumulation of calcium oxalate in the giant columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo*. For this study, they developed an analytical pathway to determine both, non-oxalic calcium and calcium oxalate in cactus tissue. They found that on average 52% of the dry mass of adult individuals of *Neobuxbaumia tetetzo* is formed by calcium oxalate. That means that some 30% of the carbon atoms forming the aboveground plant tissue are trapped in the form of insoluble calcium oxalate.

Objectives

The leading hypothesis of our paper is that calcium oxalate crystals are the result of an adaptive mechanism for sequestering excess calcium in the calcium-rich environments of many arid lands. This hypothesis is consistent with the results reported by other authors (e.g., Borchert 1985) showing that calcium sequestration can be a major function of calcium oxalate. A second objective of our study was to evaluate the real magnitude of the process of calcium sequestration, and the cost in carbon for the plant. We worked with *Myrtillocactus geometrizans*, a columnar cactus of widespread distribution in southern and central Mexico.

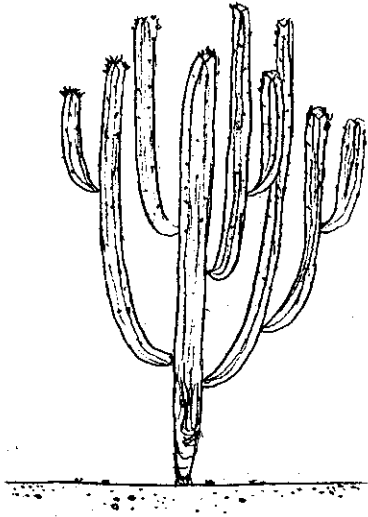
Based on our hypothesis, we make four predictions that are logically derived from it and can be used to test it. Firstly, we predict that exchangeable calcium in the soil (i.e., an estimate of the calcium fraction that is immediately available for the plant) will be higher at sites that have calcium-rich substrates. Secondly, the production of calcium oxalate crystals will be higher in desert cacti that grow in soils with higher calcium contents. Thirdly, the amount of calcium in the plant immobilized as oxalate will be higher than the amount of calcium in other forms (mostly formed by cytoplasmic calcium plus calcium

combined to the cell walls). Finally, due to the absence of external detachable structures in columnar cacti (such as leaves that can be shed), calcium oxalate will accumulate in the body of the plant as the individual ages, and in consequence older plants will have higher contents of calcium oxalate than younger ones.

MATERIALS AND METHODS

Study Area

The study was conducted in the Tehuacán Valley in the State of Puebla, Mexico, between 17°48' and 18°58' lat. N, and between 97°03' and 97°43' long. W. The climate is arid to semiarid with a marked rainy season in summer (June-September). The mean annual rainfall in the valley ranges between 300 mm and 600 mm, the mean annual temperature is around 21°C in the lowlands, and the annual evaporative demand is around 1800-2000 mm (García 1981, Peters 1993). The aridity of this site is due to the rain-shadow cast by the Eastern Sierra Madre (locally known as Sierra de Zongolica) on the predominantly easterly atmospheric circulation. Soils have originated in igneous, calcareous sedimentary and metamorphic rocks, derived from evaporites and sedimentary limestones of the Lower and Middle Cretacic. Soil units (following the FAO-UNESCO soil classification system) include calcareous lithosols, calcareous xerosols, feozem and rendzinas. Although most of them are calcic, they may vary considerably in their total calcium content, and hence in calcium availability and supply for the plants. The main vegetation type is a xerophytic scrub (Rzedowski 1978) in which giant columnar cacti are dominant elements (Zavala-Hurtado 1982).



Myrtillocactus geometrizans C.

Study species

Myrtillocactus geometrizans Console is a columnar cactus belonging to the tribe Pachycereeae within the Cactaceae. It is endemic to Mexico and shows a widespread distribution over the central drylands (Aguascalientes, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz and Zacatecas; see Fig. 2 and Dávila and Medina 1995), and is very common in the Tehuacán Valley. Although the young individuals normally support only a few stems, in later stages the plants branch profusely and develop a distinctive candelabriform growth-form, sometimes showing as many as 30 or more individual branches. Its widespread distribution over different soils, ranging from limestone substrates to non-calcareous soils, makes it an ideal species to evaluate through field observations how the individual plants deal with increasing amounts of calcium.

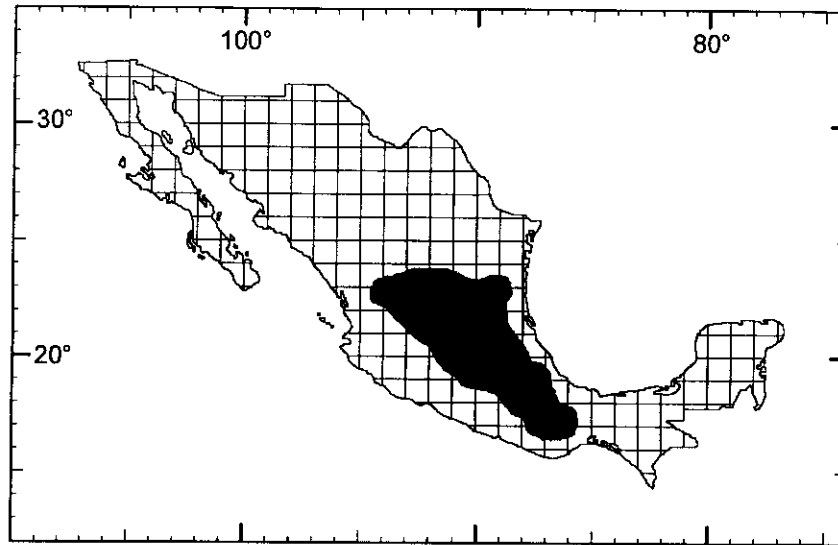


Figure 2. Geographic distribution of *Myrtillocactus geometrizans* in Mexico.

Sampling procedure

We identified 29 different locations based on the soil types and their preliminary calcium content. To evaluate this, we made a quick field evaluation of calcium content by qualitatively observing the soil reaction to 0.1N HCl. We also used soil color and soil type as an indicator of the main mineral components. Under these criteria localities were chosen all over Tehuacán Valley.

Plant sampling

At each selected site, we randomly chose a single adult (i.e., higher than 2 m) individual of *M. geometrizans*, irrespective of its size and age. Then, with a plant borer we took two radial samples in each of two randomly-selected branches of each plant, totaling four samples per plant. We only used large, well-developed branches. In each branch, one sample was taken at a distance of 1 m from the branch's apex, and the other

at 2 m. The core sampler was driven radially towards the center of the stem, and each sample included the different tissues that are found in a transversal cut of the stem: epidermis, cortex, vascular ribs, and pith. The cores were oven-dried in the laboratory at 40°C until constant weight.

Soil sampling

We took ten soil samples at regular angular intervals around the sampled plant at an approximate radial distance of 1m from the stem. Each sample consisted of a core 10 cm deep and 5 cm in diameter. The ten cores were then air-dried and homogenized. We then subdivided the homogenized soil sample into two replicates, and performed chemical analyses on the two sub-samples independently. The results were then averaged to smooth-out variation in the laboratory procedure.

Chemical analyses

Non-oxalate calcium

We ground 50 g of oven-dried tissue, and then digested 1 g of the powdered sample in 20 ml of 0.1N HCl for 10 minutes to hydrolyze the calcium in non-oxalate structures such as cell wall and membranes (Hinke and Ezcurra 1995). The sample was then centrifuged for 30 minutes at 13,000 rpm and 4°C. Calcium was then determined on the solution by EDTA titration (AOAC 1994).

Calcium oxalate

The centrifuge precipitate from the former treatment was digested in 25 ml of 2.0N HCl for 30 minutes at 400°C. After re-precipitating the solid materials, we took 5 ml of the resulting solution and determined oxalic acid by titration with potassium permanganate (KMnO₄, similar results can be obtained by determining calcium in the digested sample; see AOAC 1995 and Hinke and Ezcurra 1990).

Soil calcium

We used two measurements of soil calcium; one was oriented at estimating the short-term availability of calcium in the soil (exchangeable calcium), and the other was aimed at estimating the long-term capacity of the soil for supplying calcium through weathering of the soil particles (releasable calcium). For the determination of exchangeable calcium we extracted ions from the air-dried soil samples with 1 N ammonium acetate as described in Schlichting, Blume and Stahr (1995). Calcium in the extract was determined by spectrophotometry at 540 nm wavelength. To evaluate the amount of calcium that can potentially be released by long-term weathering (i.e., releasable calcium), we digested the air-dried soil samples in concentrated HCl (30%) for an hour, as described in Schlichting, Blume and Stahr (1995). Calcium in the extract was determined by spectrophotometry at 540 nm wavelength.

Data analysis

All of the analyses were done with simple linear regression models. As in all cases both the independent and the dependent variables are subject to experimental error, we used major axis regression instead of traditional least squares regression. Additionally, because measurements of plant calcium at 1 m from the apex did not differ significantly from those taken at 2 m, we lumped all four values into a single mean for each plant. We re-sampled in the field four plants from a single laboratory batch that showed outlying data points with significantly large negative residuals ($P < 0.001$). As these four data points increased almost twofold in the new analysis, other three outliers belonging to the suspect batch of chemical analyses that could not be re-sampled in the field for lack of accessibility were eliminated from the statistical analysis. Thus, our final data set consisted of 26 plants.

RESULTS

Results from soil calcium analyses showed a significant linear relationship between exchangeable soil calcium and releasable soil calcium ($r = 0.75$, $P = 0.00001$; Fig. 3).

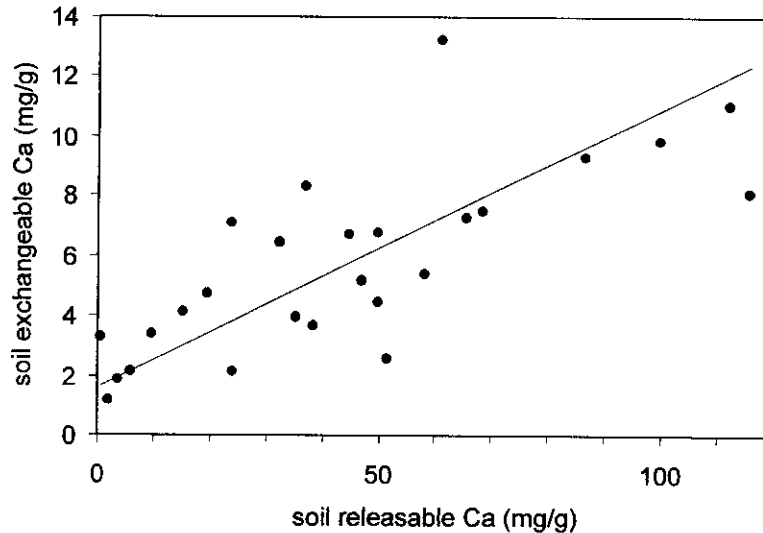


Figure 3. Exchangeable soil calcium as a function of releasable soil calcium. Values are means of two replicates. Each dot represents a different sampling location.

The regression line shows that short-term exchangeable calcium content increases in soils as the long-term releasable calcium increases.

A significant relationship was found between soil releasable calcium and calcium derived from oxalate in *M. geometrizans* ($r = 0.58$, $P = 0.001$; Fig. 4). Additionally, a significant linear association was also found between releasable soil calcium and calcium in the plant not derived from oxalate ($r = 0.85$, $P < 0.00001$; Fig. 4). On average, non-oxalate calcium represents around 19% of the total calcium in the plant, while the remaining 81% is in the form of calcium oxalate. The slope of the oxalate linear function was almost twice as high than the slope for non-oxalate calcium (0.005 vs 0.003 $r = 0.55$,

$P < 0.0001$), indicating that as soil releasable calcium increases, calcium oxalate increases more rapidly than other, less-immobilized forms of calcium in the plant. The regressions of the dependent variables (calcium stored as calcium oxalate and non-oxalate forms of calcium in the plant) against soil exchangeable calcium was also significant ($r = 0.43$, $P = 0.03$ and $r = 0.75$, $P = 0.00001$, respectively) but in both cases the fit was poorer.

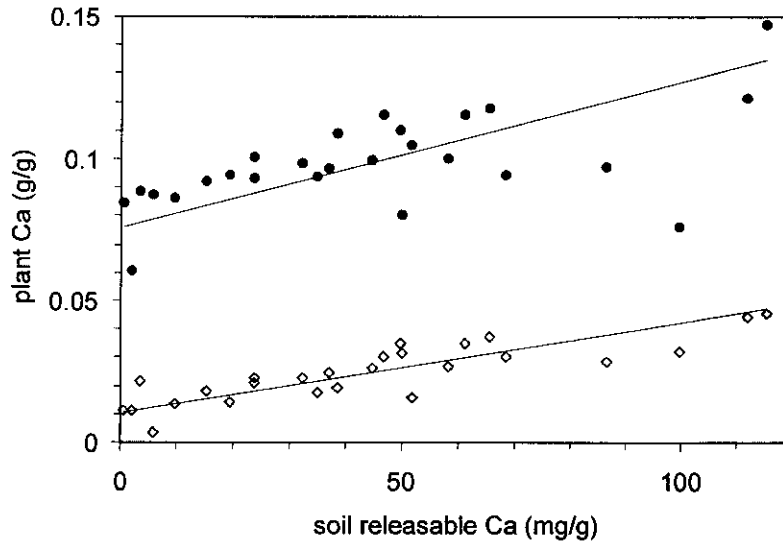


Figure 4. Calcium derived from oxalate (closed circles) and non-oxalate calcium (open diamonds) in *M. geometrizans* as a function of releasable soil calcium content. Calcium oxalate increases as a function of soil calcium content at a higher rate ($y_{(ox)} = 0.0005x + 0.076$) than non-oxalate calcium ($y_{(Ca)} = 0.0003x + 0.010$). In the oxalate-derived data set, the points lying under the line correspond to smaller plants (see Fig.5).

Finally, a significant linear relationship was also found between the number of branches (an indicator of plant age) and calcium oxalate accumulation in the plant tissue ($r = 0.73$, $P = 0.00005$; see Fig.5). In larger, older plants calcium oxalate forms ca. 45% of the aboveground dry mass. **Figure 4.** Calcium derived from oxalate (closed circles) and non-oxalate calcium (open diamonds) in *M. geometrizans* as a function of releasable soil calcium content. Calcium oxalate increases as a function of soil calcium content at a higher rate

($y_{(ox)} = 0.0005x + 0.076$) than non-oxalate calcium ($y_{(Ca)} = 0.0003x + 0.010$). In the oxalate-derived data set, the points lying under the line correspond to smaller plants (see Fig.5).

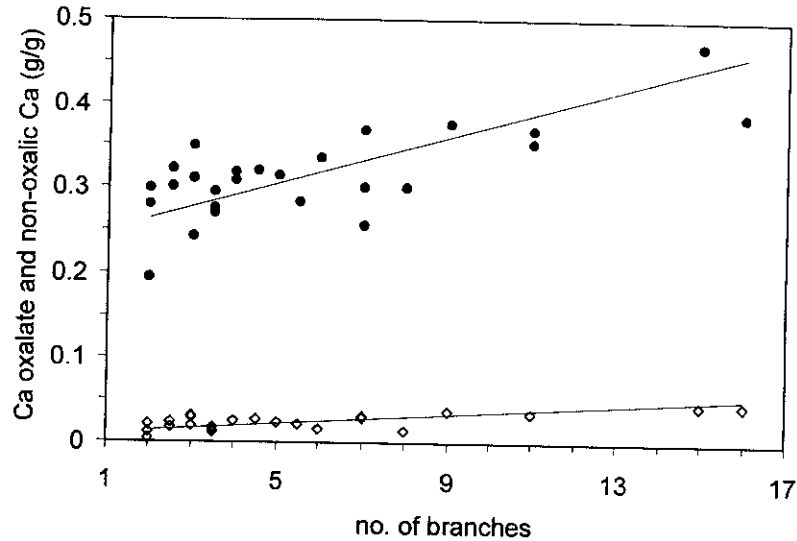


Figure 5. Concentration of calcium oxalate (closed circles) in *M. geometrizans* as a function of the number of branches (a measure of plant age). For comparison, the concentrations of non-oxalate calcium forms are also given as a function of size (open diamonds). Larger and older plants may have almost 50% of their dry mass in the form of calcium oxalate. Note that in this figure the values for calcium oxalate are given for the whole molecular weight of the product (i.e., Ca + oxalate), while in the previous figure only the concentrations of calcium derived from oxalate were given.

DISCUSSION

Columnar cacti subject to elevated soil calcium concentrations must deal with high amounts of calcium in their cells as compared to plants living in soils with lower calcium contents. These plants seem to be able to maintain low levels of reactive calcium ions by immobilizing them through oxalate chelation. More than 80% of the calcium in *Myrtillocactus geometrizans* is sequestered in the form of calcium oxalate, a product that demands metabolic energy for its production.

As the plants age, and possibly due to the absence of mechanisms to excrete calcium compounds, oxalate druses concentrate inside this cactus. The accumulation can be so great that older plants may show almost 50% of their biomass in the form of calcium oxalate, and around 16% of this dry mass is formed by pure calcium. It can be also calculated that in these high-oxalate individuals some 32% of the plant's carbon is in the form of calcium oxalate.

Because cacti do not shed leaves, the standing-crop biomass of the plant is approximately equal to the aboveground net primary production. Thus, it can be concluded that almost a third of the net primary production of older plants growing in calcium-rich soils may be devoted to the immobilization of calcium.

The formation of druses seems also to be related to plant size and/or longevity. In a previous study it was reported that adult individuals of the giant columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* show in this same region amounts of calcium oxalate surpassing 50% of the plant biomass (mean = 51.5%; s.dev. = 1%; see Hinke and Ezcurra 19??). In contrast, none of the *Myrtillocactus* plants evaluated surpassed the 50% barrier; a fact that is possibly related to the smaller size and more dynamic growth of *Myrtillocactus* compared to the giant, slow-growing *Neobuxbaumia*.

It is interesting to observe that in our data set total releasable calcium in the soil (a measure of long-term supply) was consistently a better predictor of the calcium status in the plant than soil exchangeable calcium (a measure of short-term availability). This may

be because calcium accumulation in the plant is the result of a long-term process that is better reflected in a chemical estimate of the total amount of calcium that is releasable through weathering than in a short-term estimate of readily-absorbable calcium. Alternatively, the result may also be due to the fact that the soil chemical extracts used to estimate exchangeable calcium do not necessarily reflect the real status of calcium that is truly available to the plant (see Gibson *et al.* 1985 for a review of this problem).

Calcium oxalate crystals are common in many different biological groups, such as fungi, ferns, gymnosperms and angiosperms (Ilarslan *et al.* 1997). However, the occurrence of significant amounts of oxalate during the life-cycles of many plants is still not clearly understood (Ilarslan *et al.* 1997). It is known that calcium oxalate is produced from environmentally-provided soil calcium and metabolically-formed oxalic acid (De Silva 1996). Several studied pathways have shown that glycollate and L-ascorbic acid are precursors of oxalic acid (Ruiz and Mansfield 1994; Ilarslan *et al.* 1997).

In contrast to the calcium oxalate crystals frequently formed in mammals, oxalate crystals do not seem to constitute any pathological condition in plants. Although crystal function has not been clearly elucidated, it seems that natural selection has favored needle-like crystals (raphides) in some plants as a defense against herbivory (Oaks and Butcher 1962). Druses in cacti are not needle-like and do not seem to provide a significant protection against herbivory (Ruiz and Mansfield, 1994; De Silva, 1996).

The production of oxalate may not have a clear function in many living organisms. It is possibly the result of the reaction between metabolic oxalate and calcium ions that produces an organic salt that is insoluble under normal metabolic conditions. Nevertheless, oxalate production may have developed through evolutionary processes some adaptive benefits. Quite clearly, raphides as those found in *Agave* species or in many Araceae are formidable defenses against herbivores, mostly as a result of their needle-like shape and their piercing capacity. Our study suggests that calcium oxalate has a fundamental function in columnar cacti, i.e., that of sequestering excess calcium from the calcium-rich soil water of arid lands. If calcium were not chelated by oxalate, reactive calcium ions could form as much as 20% of the plant's biomass, reaching concentration

levels that would be lethal for the cactus. When an originally non-adaptive character is molded by natural selection to perform an advantageous function, the character is defined as an "exaptation" (Gould 1980). This seems to be the case with calcium oxalate in columnar cacti.

OTRAS CONSIDERACIONES

El análisis estadístico del artículo permitió establecer la relación entre la producción de cristales de oxalato de calcio y la disponibilidad de calcio presente en el suelo. Los valores de oxalato correspondientes a plantas que viven en suelos ricos en calcio (valores de calcio intemperizable) son mayores a aquellos pertenecientes a plantas que viven en suelos con menores cantidades de calcio. Esto implica que los individuos aumentan o disminuyen la producción de oxalato dependiendo de la disponibilidad de calcio en el suelo y, por lo tanto, de la presencia de concentraciones potencialmente nocivas en el tejido vegetal.

A partir de estas observaciones —y dada la obvia ventaja que representa para el individuo la producción de oxalato de calcio— se puede decir que el aumento o disminución de oxalato de calcio es un proceso de aclimatación. Es decir, la producción de oxalato no es obligada, ni constante. Por el contrario, ésta varía en proporción a las concentraciones de calcio en el suelo; por lo que un aspecto interesante es dilucidar si este compuesto está ausente en algunos individuos de la misma especie, así como las implicaciones de ello.

Los análisis revelaron que las concentraciones de oxalato de calcio se relacionan con la edad de los individuos de manera más clara y representativa que con el calcio edáfico intercambiable. Esto implica que individuos viejos tienen más oxalato de calcio que los jóvenes que viven en suelos con valores similares de calcio. Lo anterior es una fuerte evidencia que apoya el argumento de que las altas concentraciones de oxalato de calcio en los tejidos de las cactáceas son consecuencia de la imposibilidad de eliminarlo al carecer éstas de hojas.

Es muy importante tener claro que el calcio intemperizable es absorbido por la planta una vez que ocupa los sitios de intercambio del suelo. Lo anterior nos permite entender el por qué los valores de oxalato de calcio, que implican una acumulación cuya escala de tiempo es mucho mayor que la que se asocia con la absorción de calcio intercambiable del suelo, se relacionan entre ellas.

Otro aspecto importante que fue parcialmente abordado se refiere a las formas cristalinas del oxalato. La forma y estructura de estas asociaciones químicas parece ser específica para cada grupo vegetal (Cavaletto, 1998). Existen estructuras afiladas, llamadas ráfidas que pueden ser una sola aguja afilada o tener dos, tres y hasta cuatro puntas afiladas (Cavaletto, 1998). Existen también conglomerados piramidales planos, triangulares, esféricos con bordes afilados, y esféricos con bordes redondeados (Al-Rais, 1971).

La mayoría de los trabajos que asocian a dichos cristales con defensa contra la herbivoría, hablan de ráfidas (Oaks y Butcher, 1962; Kerner *et al.* 1973), es decir pequeños alfileres que producen daño físico en el tejido blando de los potenciales herbívoros.

Como parte del trabajo realizado para describir la concentración de cristales en el tejido vegetal, se hicieron análisis cualitativos de los cristales con microscopía electrónica. La comparación permitió observar las diferencias en las concentraciones de cristales en las muestras de parénquima de garambullos tomadas en suelos con valores de calcio contrastantes (Véase Anexo IV). En las fotografías (Véase la figura 1 del artículo), se puede observar que la estructura principal de las drusas del garambullo es la de un cristal esférico; asimismo, se encontraron asociaciones cristalinas conspicuas formadas por cristales de puntas redondeadas.

Estos resultados concuerdan perfectamente con la hipótesis central de este trabajo ya que las estructuras encontradas no parecen del tipo que dañarían el tejido de un herbívoro; de hecho estas estructuras apoyan sustantivamente la función de los cristales de oxalato de calcio como mecanismo por medio del cual las cactáceas previenen el posible daño fisiológico ocasionado por el excedente de calcio procedente de los suelos ricos en calcio en los que viven.

El posible origen

La producción de oxalato de calcio se presenta en diferentes grupos biológicos, no para todos ellos existe una función aparente, y en algunos grupos se manifiesta de forma

patológica. Esto nos hace pensar que la producción de oxalato de calcio ha estado presente en la historia de los grupos biológicos sin que se evidencien ventajas adaptativas. Es incierto si la producción de oxalato de calcio en la historia biológica es o ha representado una ventaja adaptativa, no obstante se ha mantenido constante en la evolución de los grupos biológicos y es muy difícil definir por qué se encuentra presente. La indefinición de la función de oxalato de calcio nos lleva a pensar en un proceso evolutivo que se ha manifestado a partir de la selección de un proceso metabólico presente en la historia biológica sin que se le pueda atribuir función alguna; mismo que, en un momento determinado, se manifiesta como un rasgo que aumenta la posibilidad de sobrevivir en el medio. Es decir, la producción de oxalato de calcio es una exaptación en las cactáceas, que se manifiesta en la inmovilización de calcio, lo que les permite sobrevivir en ambientes ricos en calcio.

Exaptación

Una **exaptación** es un **rasgo** que evolucionó hacia un propósito distinto del que originalmente tenía. Por ejemplo, las plumas pudieron haber evolucionado como un agente termoregulador, pero también son una exaptación al vuelo. El uso original de la mano es la locomoción arbórea, pero esta función fue co-optada como una herramienta indispensable una vez que el bipedalismo evolucionó (Gould y Vrba, 1982; Dennett, 1994).

Una exaptación es un rasgo que existe aun cuando no tenga una función y esa característica sobrevivirá solo si no reduce drásticamente la **aptitud** de los organismos que la heredan. Asimismo, una exaptación puede referirse a una característica que se establece en la población con una función determinada y sin sufrir modificación alguna, adquiere otra distinta (Dennett, 1994).

La importancia de concebir la producción del oxalato de calcio como una exaptación no radica en las ventajas actuales que ésta representa para los individuos de garambullo. Por el contrario, aun cuando en el origen se haya seleccionado por representar ventajas ante el acecho de los herbívoros, actualmente esa no es su función, al menos, no en las

cactáceas. En las cactáceas se manifiesta como una exaptación a la inmovilización del excedente de calcio que podría ser dañino para la fisiología normal de las plantas.

Si, por el otro lado, concluimos que la producción de oxalato de calcio no parece tener función alguna en la mayoría de los organismos en los que se manifiesta, entonces, adquirió un función posterior en las cactáceas, es decir una función exaptativa que probablemente haya favorecido la expansión de este grupo de plantas tan característico por sus limitaciones morfológicas, en regiones áridas en donde dominan los suelos ricos en calcio.

FUTUROS TRABAJOS

A partir de la pregunta principal formulada en este trabajo se tienen más herramientas que describen la producción de oxalato de calcio como un mecanismo de inmovilización del ion calcio. En las cactáceas, como en otras plantas que viven en zonas áridas con suelos ricos en calcio, evitar la presencia de altas concentraciones de calcio parece ser una herramienta fundamental de sobrevivencia.

Una de las principales premisas para la presencia de grandes cantidades de oxalato de calcio en las cactáceas es la falta de un mecanismo de excreción. Evaluar esta hipótesis requeriría del conocimiento acerca de los posibles mecanismos radiculares que una planta con hojas pudiera tener y evitar desde la raíz la absorción de grandes cantidades de calcio. Aun cuando estos mecanismos no sean del todo conocidos, la pregunta persiste, ¿Las plantas con hojas que viven en suelos de zonas áridas ricos en calcio edáfico producen oxalato de calcio?, ¿lo producen como un mecanismo análogo a aquél que se observa en cactáceas?, ¿el oxalato de calcio se elimina, y si se elimina, es a través de las hojas?

Sería muy interesante evaluar si estas plantas están produciendo oxalato de calcio y si éste está siendo eliminado a través de las hojas. Asimismo, se podría comparar la presencia de oxalato de calcio en las hojas de plantas que viven en suelos ricos en calcio y en suelos con menores cantidades de calcio.

Otro aspecto que demanda atención se relaciona con el posible costo fisiológico que implica la producción de oxalato de calcio. Como se puede ver en los resultados de este trabajo, las cactáceas jóvenes presentan mucha menor concentración de oxalato de calcio que cactáceas viejas, aún cuando viven en suelos igualmente ricos en calcio. Esto se debe a que las cactáceas acumulan estos cristales en sus tejidos. Las premisas anatómicas y las condiciones de aridez que sobreviven las cactáceas nos han permitido formular varias hipótesis acerca del posible costo fisiológico que representa designar dos átomos de carbono a la producción de una sal anteriormente inútil. Sin embargo, las posibles consecuencias ecológicas aún se desconocen.

La producción de oxalato de calcio aumenta con relación a las concentraciones de calcio edáfico, es decir, a menor cantidad de calcio en el suelo, menor será la inversión de carbono destinada a la inmovilización de calcio. Por lo tanto, ese carbono podría estar siendo utilizado en otros procesos metabólicos. Para poder dilucidar esto, se ha pensado en el cálculo de la tasa fotosintética para una especie con individuos que vivan en suelos con diferentes concentraciones de calcio. La tasa metabólica es constante para la especie, por lo tanto, es posible saber la cantidad de carbono que todos los individuos asimilan y que utilizan en el metabolismo.

Lo interesante de conocer la tasa metabólica es poder evaluar el costo ecológico que podría representar la producción de oxalato de calcio. Es claro que si éste no se produce, las plantas mueren. Sin embargo, la medición de la tasa de crecimiento en tallo y raíces, así como la cuantificación de la inversión de carbono en funciones reproductivas, tales como tamaño y número de flores, volumen de néctar, producción de semillas, y una valoración nutricional de néctar, polen y semillas, nos permitiría evaluar cuánto carbono se destina a las diferentes actividades. Una planta que tenga flores más grandes, néctar más concentrado, semillas con más nutrientes, probablemente tendrá más posibilidades de establecerse. El seguimiento de estos parámetros a lo largo del tiempo nos permitiría evaluar si estos fenómenos son representativos para la especie.

Una de las limitantes más importantes para la realización de los experimentos anteriores es la dificultad de generarlos en viveros bajo condiciones controladas. Se requiere monitorear organismos de la misma especie bajo distintas concentraciones de calcio edáfico y evaluar la tasa fotosintética, la tasa de crecimiento, la asimilación de calcio y, finalmente, la producción de cristales de oxalato de calcio.

El resultado de la comparación entre estos individuos podría reflejar la disminución en las capacidades reproductivas del garambullo. El análisis de estos resultados podría mostrar la competencia intraespecífica que podría presentarse entre individuos que tienen que invertir mayor cantidad de carbono y que por lo tanto podrían tener una descendencia quizá "débil" en comparación con aquella proveniente de individuos cuya inversión a la producción de oxalato de calcio es menor, entonces, disminuye la aptitud en comparación

con otras plantas que viven en suelos con menor cantidad de calcio. Es decir, la disminución de la disponibilidad de carbono debido al secuestro de calcio asociado a oxalato, quizá se reflejaría en dos aspectos importantes: reproducción sexual y/o crecimiento. Quizá no, quizá la selección ha favorecido el establecimiento de una especie plástica de amplia distribución.

Finalmente, se quisiera abordar el aspecto filogenético de la producción de oxalato de calcio. Se ha citado la presencia de cristales de oxalato de calcio en los diferentes grupos biológicos y en varios grupos de plantas. Si la producción de oxalato de calcio en las cactáceas se ha mantenido como un mecanismo que les permite evitar los daños que generaría el exceso de calcio, entonces sería interesante rastrear el momento en el que este mecanismo apareció, o bien, se mantuvo. Es posible que las cactáceas epífitas no produzcan oxalato o bien, produzcan pequeñas cantidades e incluso existe la posibilidad de que la estructura cristalina que se encontrara fuera aquella que se asocia a las funciones defensivas, las ráfidas, debido a que las plantas epífitas presentan menos protecciones anatómicas a la aridez y/o herbivoría.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, H.N. (1989). *Tratado de Edafología de México* (Vols. I and II). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Al-Rais, A.H., A. Myers and L. Watson. (1971). The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Ann. Bot.* 35, 1213-18 pp.
- Arnott, H.J. (1995). Calcium oxalate in fungi. In S.R. Khan (ed.), *Calcium oxalate in biological systems*. Nueva York. CRC Press. ch.5, 73-111pp.
- Arreola N, H.J.(1997). Formas de vida y características morfológicas En Suculentas mexicanas: Cactáceas. CONABIO, México 26-35 pp.
- Ayyad, M.A. (1981). Soil-vegetation interactions. In: Goodall, D.W., Perry, R.A. (Eds), *Aridland ecosystems; Structure, Functioning and Management*. Cambridge: CUP 9-31pp
- Black, C.A., Evans, D.D., Ensminger, L.E. (1965). *Methods of Soil Analysis Agronomy*, 9. Madison, Wisconsin, EUA: American Society of Agronomy Publisher, 565 pp.
- Borchert, R. (1985). Calcium-induced patterns of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. and *Albizia julibrissin* Durazz. *Planta* 165 :301-310 pp.
- Borchert, R. (1990). Ca^{2+} as developmental signal in the formation of Ca-oxalate crystal spacing patterns during leaf development in *Carya ovata*. *Planta* 182 :339-347 pp.
- Cavaletto, J., B.E. Goodwin, W. McDowell y M. A. Webb. (1998). Intravacuolar membranes sequestering crystalline calcium oxalate in grape. *Experimental Biology Online*. ISSN 1430-3418.

De Silva, D.L.R., A.M. Hetherington and T.A. Mansfield. (1996). Where does all calcium go? Evidence of an important regulatory role for trichomes in two calcicoles. *Plant, Cell and Environment* 19:880-886 pp.

De Silva, D.L.R., L.P. Ruíz, C. J. Atkinson and T.A. Mansfield. (1994). Physiological disturbances caused by high rhizospheric calcium in the calcifuge *Lupinus luteus*. *Journal of Experimental Botany* 45(274):585-590 pp.

Fitter, A.H., R.K. M. Hay. (1987). *Environmental physiology of plants*. 2nd. Ed. Academic Press, London. 423 pp.

Flores V., E.M. (1973). Algo sobre morfología y anatomía de cactáceas. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. 167 pp

Franceschi, V. R., Loews, F. A. (1995) Oxalate biosynthesis and function in higher plants and fungi. In S.R. Khan (ed), *Calcium oxalate in biological systems*. CRC Press. Nueva York. ch.6: 112-147 pp

Gibson, A.C., P.S. Nobel. (1986). *The Cactus. Primer*. Harvard Univ. Press. London. 286 pp.

Gibson, D.J., I.A. Colquhoun and P. Greig-Smith. (1985). A new method for measuring nutrient supply rates in soils using ion-exchange resins. In: A.H. Fitter (ed.) *Ecological Interactions in Soil. Plants, microbes and animals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 73-79 pp.

Gietl, C. (1992). Malate dehydrogenase isozymes; cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1100 : 217-234 pp.

Gould, S. J. (1988). On replacing the idea of progress with an operational notion of directionality. In: M.H. Nitecki (ed.), *Evolutionary Progress*. The University of Chicago Press, Chicago. 319-338 pp.

Gould, S.J., E. S. Vrba. (1982). Exaptation – a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8 (1982):4-15 pp.

Hinke, S.N., E., Ezcurra. (1990). ¿Cuál es el precio metabólico de no tirar hojas? Evaluación del oxalato de calcio en *Neobuxbaumia tetetzo*. *Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D.F.

Horner, H.T. and B.L. Wagner. (1995) Calcium oxalate formation in higher plants *In* S.R. Khan (ed), *Calcium oxalate in biological systems*. CRC Press. Nueva York. ch.4, 59-72 pp

Ilarslan, H., R.G. Palmer, J. Imsande, H. T. Horner. (1997). Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84(8):1042-1046 pp.

Kerner, J., J. Mitchell y H.I. Maibach. (1973). (1973) Irritant contact dermatitis from *Agave americana* L. Incorrect use of sap as “hair restorer”. *Archives of Dermatology* 108: 102-103 pp.

Khan, M.I., Khan, M.A y Khizar, T. (1976). Plant-growth regulators from species differing in salt tolerance as affected by soil salinity. *Plant and Soil*, 45:267-271pp.

Khan, S.R. (1995) (ed), *Calcium oxalate in biological systems*, CRC Press, New York EUA. 400 pp.

Kluge, M. y I.P. Ting. (1978). Crassulacean Acid Metabolism. Analysis of an ecological Adaptation. Springer-Verlag Berlin, New York. 209 pp.

Larcher W. (1995). *Physiological Plant Ecology, ecophysiology and stress physiology of functional plants*. 3rd ed. Springer Verlag, Berlin 208 pp.

Lehninger, A.L. (1990). *Biochemistry*. 4ta. Ed. Worth Publishing, Nueva York, EUA 411 pp.

Nobel, P.S. (1988). *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, Cambridge. 270 pp.

Nobel, P.S. (1995). Remarkable agaves and cacti. Oxford University Press Inc. New York. 166 pp.

Oak, A.J., J.O. Butcher. (1962). Poisonous and injurious plants of the U.S. Virgin Islands. Misc. Publ. 882. Washington, DC: US Department of Agriculture.

Rengel, Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment* 15:625-632 pp.

Ruiz, L.P., and T.A. Mansfield. (1994). A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytologist* 127, 473-481 pp.

Scott, B.D. (1993). Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiology*.103:7-13 pp.

Schlichting, E., H. P. Blume, K. Stahr. (1995). *Bodenkundliches Praktikum*. 2nd ed. Pareys Studentexte 81, Blackwell Wissenschafts-Verlag. Wien.

Taiz, L., E. Zeiger. (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc. EEUU. 565 pp.

ANEXO 1: Metodología

Calcio vegetal

Calcio no asociado a oxalato (fácilmente soluble, fs)

Si la producción de cristales de oxalato de calcio evita que la cantidad de calcio iónico Ca^{2+} se incremente hasta alcanzar niveles tóxicos, entonces los valores de calcio fácilmente soluble (generalmente asociado a la pared celular en forma de pectatos o disuelto en forma de ion en citoplasma) serán casi constantes, independientemente del tipo de suelo en el que se encuentre viviendo la planta. Es decir, que aun cuando los valores de calcio en el suelo varíen mucho, la cantidad de calcio no asociado a oxalato será casi constante.

En este proceso se utilizaron muestras de garambullo, *Myrtillocactus geometrizans*, previamente deshidratadas y molidas. Las muestras fueron sometidas a dos procesos químicos diferentes para evaluar las asociaciones químicas en las que el calcio se encuentra presente en el tejido vegetal; calcio fácilmente soluble y calcio inmovilizado en forma de oxalato de calcio.

Utilizando esta diferencia de solubilidades, las muestras de tejido vegetal fueron tratadas con diferentes concentraciones de ácido clorhídrico (HCl). El calcio fácilmente soluble fue solubilizado en una concentración 0.01N de HCl. La solución se separó del resto del tejido vegetal y de los visibles cristales de oxalato de calcio. El tejido vegetal y los cristales de oxalato de calcio fueron sometidos a una solución ácida de HCl 2N y calor (400°C), de esta manera, el oxalato de calcio se disoció en ácido oxálico y Ca^{2+} .

Procedimiento:

La cantidad de calcio presente en el tejido colectado, se calculó con el método de extracción de la AOAC (American Organization of Analytical Chemistry, 1994) modificado por Exequiel Ezcurra, Francisco Rojo y Aurora Gaxiola. El método consiste en digerir muestras de tejido vegetal en un medio ácido a fin de disociar los compuestos químicos cuyos enlaces con el calcio no son muy fuertes o estables. Esto genera una solución con varios iones disueltos por lo que es necesario utilizar un método de

titulación específico para el calcio en el que se utiliza EDTA como titulador y murexida como colorante. Antes de poder titular, es necesario separar los cristales de oxalato, así como el resto de la materia vegetal, por lo que se centrifugan las muestras a 13 000rpm a 4°C, durante 30 minutos.

Del sobrenadante se toman 5ml a los que se les agrega 1ml de Buffer de ácido L-ascórbico (Rojo 1999 c.p.). El punto de vire del murexida requiere de un pH mayor a 9 por lo que es necesario agregar una gota de sosa (NaOH) 12N (Rojo 1999 c.p.).

Calcio asociado a oxalato

Los cristales de oxalato requieren de bajos valores de pH y de altas temperaturas para poderse disociar. El tejido vegetal que quedaba en el tapón después de centrifugar las muestras era digerido en 25ml de HCl 2N durante 30 minutos a una temperatura promedio de 400°C. Transcurrido el tiempo, se obtiene una solución en donde se encuentran el ácido oxálico y el Ca^{2+} .

La AOAC describe el método de cuantificación del ácido oxálico, en el que se utiliza permanganato de potasio (KMnO_4) como titulador.

Se toman 5ml de muestra y se le agrega 1ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 20% para bajar el pH y evitar la posible asociación entre el ácido oxálico y el Ca^{2+} . Las muestras se titulan a más de 60°C y se utiliza KMnO_4 .02M.

Calcio edáfico

Pretratamiento

Las muestras de suelo se esparcieron en superficies individuales para secarlas al aire. Posteriormente, se tamizaron y molieron para obtener muestras homogéneas. Todos los análisis químicos se hicieron tomando porciones definidas de estas muestras pretratadas.

Calcio intercambiable

Las plantas obtienen, a través de las raíces, una gran cantidad de minerales y compuestos orgánicos provenientes del suelo. Entre éstos se encuentra el calcio, que se absorbe del suelo en forma de catión Ca^{2+} . El Ca^{2+} puede encontrarse adsorbido en la superficie de algunos compuestos minerales -e incluso de algunos orgánicos- o disuelto en la solución del suelo (Black, *et al.*, 1965). La solubilidad de los compuestos minerales varía: pueden ser muy solubles como el yeso; medianamente solubles como la calcita, o minerales primarios y secundarios de poca solubilidad.

En la solución del suelo, así como en los cristales minerales existen sitios con carga a los que se asocian iones que pueden ser desplazados reversiblemente por otros iones (Black, *et al.*, 1965). El Ca^{2+} que está presente en estos sitios de intercambio y que es sustituido por otros iones se denomina calcio intercambiable.

Las plantas absorben el Ca^{2+} que por procesos de intercambio iónico se encuentra disponible en la solución del suelo. Las asociaciones minerales en las que se encuentra presente Ca^{2+} determinan si éste podrá asimilarse en un periodo de tiempo relativamente corto o si requiere de procesos complejos de intemperización cuya escala de tiempo es más amplia.

Por lo tanto, el Ca^{2+} intercambiable es aquel que podrá ser absorbido por las plantas en un periodo de tiempo corto. El calcio que se encuentra asociado a compuestos minerales poco solubles requiere de procesos físicos y químicos de intemperización hasta disociarse en la forma del ión Ca^{2+} y ocupar los sitios de intercambio del suelo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las cactáceas son plantas longevas y de lento crecimiento por lo que se pensó que el valor de Ca^{2+} intercambiable posiblemente representaría el calcio que las plantas han absorbido en los últimos años de su vida. Considerando que la hipótesis central de este trabajo se encuentra referida al exceso de calcio al que las plantas de suelos calcáreos se encuentran expuestas, entonces la medición de calcio intercambiable no representaría todo el calcio que potencialmente las cactáceas han absorbido. A partir de esto, se decidió hacer el análisis de calcio intemperizable y así obtener una referencia de las posibles cantidades de calcio que han sido absorbidas durante su vida y que probablemente se manifiestan en las concentraciones de oxalato de calcio presente en el tejido vegetal.

Partiendo del principio que refiere la presencia de sitios de intercambio que se ocupan reversiblemente por iones, para calcular la cantidad de calcio intercambiable del suelo, es necesario intercambiar todos los cationes adsorbidos a los sitios de intercambio. El amonio ocupará los sitios de intercambio del suelo liberando al calcio y a otros iones. El procedimiento se repite varias veces hasta intercambiar todos los iones por NH_4 . El calcio en solución se cuantifica posteriormente en el espectrofotómetro de absorción de masas.

Procedimiento:

Se pesan 4g de suelo seco al aire y tamizado ($> 2\text{mm}$) en tubos de centrifuga de 50ml. Se le agregan 33ml de acetato de amonio 1N a pH 7.0 y se agita durante 5min. Después se centrifuga a 2 500 rpm durante 5 min (o hasta que el sobrenadante quede transparente). Se decanta el sobrenadante cuidadosamente en un matraz aforado de 100ml. El procedimiento de extracción se repite 2 veces más, y los extractos se decantan en el mismo matraz aforado de 100ml. Se afora el matraz con solución de acetato de amonio 1N.

Se prepara una curva de calibración. Una vez hecha la curva patrón, se leen las demás muestras en el espectrofotómetro y se realizan los cálculos necesarios.

Calcio intemperizable

Los lentos procesos de intemperización que ocurren en la naturaleza se sustituyen en el laboratorio por fuertes reacciones químicas. Utilizando ácidos concentrados y altas

temperaturas se disuelven los compuestos y se libera el calcio presente en ellos. De esta manera queda una solución en la que se cuantifica la cantidad de calcio que potencialmente puede ser liberada a la solución del suelo en periodos largos de tiempo.

Procedimiento:

Se pesan 10g de muestra, seca al aire y tamizada (<2mm), en las cápsulas de porcelana. Se colocan en la mufla –previamente calentada a 500°C- y se dejan durante una hora. Después de enfriarlas se agregan, debajo de la campana, 50ml de HCl 30% (en caso de que las muestras contengan carbonatos se le adicionará 1ml de ácido más por cada 5% de carbonato). Se tapan con un vidrio de reloj y se ponen a hervir durante 1 hora en la plancha de calentamiento (thermoline). Se retiran de la plancha y se dejan enfriar. Después se filtra la muestra a un matraz aforado de 100ml a través de un embudo, lavando varias veces con agua destilada y se afora. Se pipetea 10ml del filtrado y se pasan a una cápsula de porcelana. Ahí se le agregan 2 ml de ácido nítrico 0.5N (calentando un poco para que se disuelva bien) y se traspasa a un matraz aforado de 50ml, se afora con ácido nítrico 0.5N. Las determinaciones de calcio se hacen con un espectrofotómetro de absorción atómica a una longitud de onda de 540 nanómetros.

ANEXO II. ÁREA DE TRABAJO Y SITIOS DE MUESTREO



En el mapa se observa la región del Valle de Tehuacán. La distribución del área de muestreo se define por la ubicación de los sitios a los que se les asignó una letra o un número. En cada punto se tomaron muestras de suelo y de tejido vegetal. Definidos *a priori* considerando el color del suelo y la reacción con la solución de ácido clorhídrico. Asimismo, los individuos fueron escogidos al azar entre aquellos que tuvieran al menos una rama de más de 2 metros de altura.

ANEXO III: TABLA DE RESULTADOS

Tabla 1. Valores de calcio interperizable (**Caintem**), calcio intercambiable (**Cainterc**), calcio fácilmente soluble (**Cafs**) y calcio asociado a oxalato (**Caoxal**) determinados en muestras de suelos del Valle de Tehuacán, Puebla, y tejido vegetal de *Myrtillocactus geometizans*. El número de ramas principales (**ramas**) de cada individuo se utilizó como referente de la edad, para la cual se establecieron dos categorías: **1** para las plantas jóvenes y **2** para las viejas (**edad**).

Muestra	Calcio en el suelo		Calcio en tejido vegetal		Edad (ramas)	Edad (edad)
	Caintem (mg/g)	Cainterc (mg/g)	Cafs (µg/g)	Caoxal (µg/g)		
A	32.277	6.433	0.0225	0.3142	5	2
B	0.469	3.319	0.0108	0.27	3.5	1
C	15.258	4.097	0.0183	0.2945	3.5	1
D	19.366	4.734	0.0141	0.3011	8	2
F	99.765	9.842	0.0318	0.2431	3	1
H	51.643	2.587	0.0157	0.3357	6	2
li	115.61	8.074	0.0454	0.4698	15	2
1	86.385	9.274	0.0284	0.3104	3	1
2	46.831	5.17	0.03	0.3682	7	2
3	65.728	7.254	0.0374	0.3764	9	2
J	58.099	5.36	0.027	0.3203	4.5	1
K	3.638	1.888	0.0215	0.2837	5.5	2
L	9.742	3.403	0.0133	0.2749	3.5	1
M	68.545	7.443	0.0302	0.3007	7	2
N	23.709	7.064	0.0225	0.3224	2.5	1
4	49.883	6.749	0.0316	0.2562	7	2
O	5.986	2.14	0.0036	0.2795	2	1
P	2.113	1.148	0.0111	0.1942	2	1
Q	61.033	13.251	0.0349	0.3682	11	2
R	111.972	11.042	0.0441	0.3862	16	2
S	49.765	4.459	0.0349	0.3518	11	2
T	23.944	2.14	0.0208	0.2978	2	1
V	38.498	3.655	0.0191	0.3485	3	1
X	36.972	8.264	0.0247	0.3084	4	1
Y	35.094	3.971	0.0172	0.2996	2.5	1
Z	44.601	6.686	0.0261	0.3188	4	1

ANEXO IV: FOTOGRAFÍAS

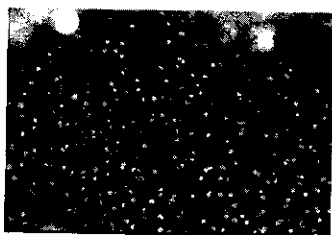


Foto A: *M. geometrizans*, transección de tallo. Clorénquima con cristales de oxalato en forma de pequeñas drusas. x100 polarización. Suelo gris con una concentración de calcio intemperizable de 46.831 mg /g suelo y 7 ramas (Muestra colectada en el Jardín Botánico Helia Bravo de Zapotitlán, Valle de Tehuacán, Puebla).

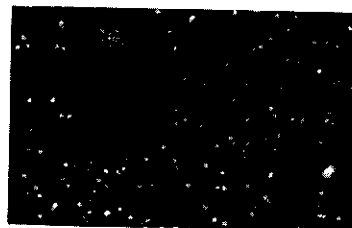


Foto B: *M. geometrizans* transección de tallo. Clorénquima con cristales de oxalato en forma de pequeñas drusas. x100 polarización. Suelo rojo con una concentración de calcio intemperizable de 3.6383 mg/g suelo y 5 ramas (muestra colectada en San Sebastián Frontera, Valle de Tehuacán, Oaxaca).

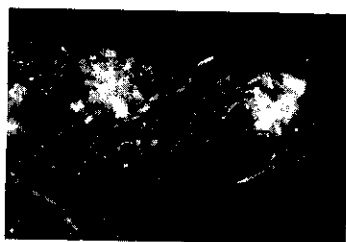


Foto C: Drusas mayores de oxalato de calcio en clorénquima de *M. geometrizans*. x100, luz polarizada.