

Trabajo final del 8° verano de la ciencia UAQ 2009.

CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO EN CACTACEAS Y SU RELACIÓN CON LOS ESTOMAS

Reinoso Pérez, M. T.; Bárcenas Luna, R. T.
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Se hizo un estudio histológico de nodos tanto adulto y joven de la cactácea *Grusonia vilis* para determinar la presencia y posición de cristales de oxalato de calcio dentro de los tejidos. De acuerdo con los resultados obtenidos se confirmó la presencia de los cristales a lo largo de los nodos y se comparó la ubicación de los mismos en nodos de diferentes tamaños. Conforme el tejido se aleja del nodo, los cristales se encuentran de preferencia cerca de la epidermis mientras que cerca del nodo, la ubicación de los cristales es en todo el tejido incluyendo la hipodermis. La diferencia entre nodos de distintos tamaños reside en la cantidad de cristales, los nodos adultos cuentan con mayor cantidad de cristales que los jóvenes. El presente trabajo será el punto de partida para una mayor investigación que pretende determinar la posible relación entre los cristales de calcio con la fisiología de los estomas.

INTRODUCCIÓN

La epidermis de una planta tiene poros que permiten el intercambio de gases entre el ambiente externo e interno. Estos poros o estomas están rodeados por un par de células llamadas guarda y éstas a su vez por otras células conocidas como células subsidiarias. El estoma junto con estas células se conoce como complejo o aparato estomático. La fuerza que hace que los estomas se abran es consecuencia de la entrada de agua por ósmosis a las células guarda y el incremento de presión hidrostática. El resultado es la deformación de las células que incrementan el tamaño del poro entre ellas. El cierre estomático se da por la pérdida de agua y presión, lo que relaja a las células guarda (Hopkins y Hüner, 2004).

Durante varios años se han propuesto diferentes mecanismos explicando los cambios de concentración osmótica en las células guarda que permiten la apertura y el cierre de los estomas. A finales de 1960 se hizo evidente que los niveles de K^+ en las células guarda de estomas abiertos eran altos, mientras que su nivel era bajo en estomas cerrados. A partir de esto se postuló que el potencial osmótico de las células guarda está determinado por los niveles de K^+ (Hopkins y Hüner, 2004). La entrada y salida de K^+ se hace a través de canales ya que la membrana de estas células es impermeable al K^+ . Schroeder y Keller (1992) identificaron al menos dos tipos de canales iónicos en las células guarda, unos que permiten la entrada y otros la salida de K^+ . Estos canales se abren como resultado del cambio en el potencial de la membrana y a su vez, el cambio en los niveles de K^+ conduce la entrada o salida de agua por ósmosis.

El cierre estomático no ha recibido la misma atención o interés como la apertura pero se asumía que es resultado de eventos contrarios a los que conducen la apertura. Pero debido a que el cierre ocurre muy rápido se pensó que éste es producto de eventos metabólicos específicos (Hopkins y Hüner, 2004).

Los primeros estudios de Iljin (1957) sugirieron que los iones Ca^{++} podrían interferir con la apertura de estomas. Años después se postuló que el cierre estomático puede estar mediado por la activación simultánea de canales de Ca^{++} y canales iónicos. Éstos pueden proveer un mecanismo de control para la regulación del cierre estomático ya que causan la salida de K^+ (Schroeder y Keller, 1992). De Silva y col. (1985) observaron la inhibición de la apertura de estomas al poner en contacto las células guarda con soluciones de diferentes concentraciones de Ca^{++} .

Se ha demostrado que el Ca^{++} regula directa o indirectamente la actividad de los canales de K^+ (de entrada y de salida) tanto si aumenta adentro como afuera de las células. Un aumento en la concentración externa de Ca^{++} induce el cierre de estomas porque inhibe los canales de entrada de K^+ y abre canales iónicos de salida, la disminución de solutos dentro de la célula provocan la salida de agua de las mismas. El aumento

de Ca^{++} citoplasmático lleva a la misma respuesta de cierre de estomas, en este caso, el Ca^{++} estimula la activación de canales de salida de K^+ (Schroeder *et. al.*, 1987).

Las altas concentraciones de Ca^{++} en el sustrato son capaces de producir un incremento en las concentraciones de Ca^{++} libre dentro de la planta, lo que aparentemente es suficiente para inducir el cierre estomático. Los niveles de Ca^{++} en xilema son superiores a las que se alcanzan en las células guarda, el estoma se cierra prácticamente cuando las concentraciones de Ca^{++} en la epidermis iguala a las del xilema (Ruiz *et al.*, 1993).

Debido a la importancia de Ca^{++} en las plantas, se puede esperar una disminución en las concentraciones de Ca^{++} libre, sin embargo, cuando las plantas están expuestas por largos periodos a grandes concentraciones de Ca^{++} las necesidades celulares serán excedidas. Debido a esto, es necesario otro mecanismo de regulación que evite que las altas concentraciones de Ca^{++} lleguen a áreas más sensibles como los estomas. Se ha propuesto que el mecanismo involucrado en esta regulación iónica es la producción de cristales de oxalato de calcio (Ruiz y Mansfield, 1994).

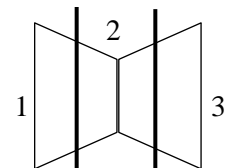
Los cristales de oxalato de calcio se encuentran en la mayoría de las plantas y en casi cualquier tejido aunque su forma y distribución presenta una gran variación (Franceschi y Horner, 1980). Considerando la conservación de tipo de cristal y su localización en varias especies se ha especulado que la formación de oxalatos de calcio está bajo control genético. Se han identificado varios tipos de mutantes que expresan diferentes fenotipos de cristales, sin embargo, los genes específicos que han sido alterados no son conocidos hasta el momento (Franceschi y Nakata, 2005). Las dudas sobre el control genético de la producción de cristales continúan ya que en algunas plantas se presenta un solo tipo de cristal y hay otras que presentan dos o más tipos diferentes incluso dentro de un mismo tejido (Gibson, 1973).

Los cristales se producen en células especializadas llamadas idioblastos, las que difieren en forma y tamaño con respecto a las células adyacentes (Franceschi y Nakata, 2005). La precipitación de los cristales toma lugar dentro de la vacuola de la célula por lo que son intracelulares, aunque hay reportes de pueden ser extracelulares (Fink, 1991).

La probable participación de cristales de oxalato de calcio en la regulación del balance iónico ha sido sugerido (Franceschi y Horner, 1980). Es probable que estas precipitaciones sean capaces de proteger a las células guarda para evitar que éstas entren en contacto con altas concentraciones de calcio que está siendo transportado por el xilema, lo que puede ser esencial para el funcionamiento normal de los estomas. Se ha observado que los cristales, cuando la planta está en contacto con elevadas concentraciones de calcio, son mayores en las células subsidiarias; lo que indica que éstas están recibiendo y transportando altas cantidades de calcio libre pero no se encontraron cristales en las células guarda (Ruiz y Mansfield, 1994).

EXPERIMENTAL

Se usaron nodos de *Grusonia vilis* uno joven y uno adulto. Se pasaron por un tren de alcoholes de 70°, 80°, 90°, 96°, isopropanol, isopropanol:histochoice (50:50), e histochoice cada uno 24 horas. Después se colocaron en un segundo cambio de histochoice durante otras 24 hrs. Una vez que se cumplió con este tiempo, se colocaron los nodos en un frasco de vidrio con una porción de histochoice y una cantidad similar de paraplasto y se dejó en incubadora durante 24 horas. Finalmente se cambiaron los nodos a un frasco solo con paraplasto y se dejó en la incubadora durante 5 días para después incluirlos en paraplasto fundido nuevo y dejarlo secar. Una vez secos, se hicieron cortes transversales con microtomo con un grosor de 20 μm . los cortes se montaron en portaobjetos y permout para después observarlos al microscopio. Nota: los cortes se hicieron según el siguiente esquema: 1 y 3 extremos del nodo, 2 centro del nodo



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los cortes de ambos nodos, el adulto y el joven presentaron cristales de forma de drusa aunque el nodo joven presenta una cantidad menor de cristales.

En la parte de los extremos del nodo adulto, los cristales se encuentran preferentemente cerca de la epidermis mientras que los cortes más cercanos al centro del nodo presentan los cristales con una distribución no particular a un área ya que se ven los cristales a lo largo de todo el corte (pequeños círculos en un tono de color café), (Fig 1).

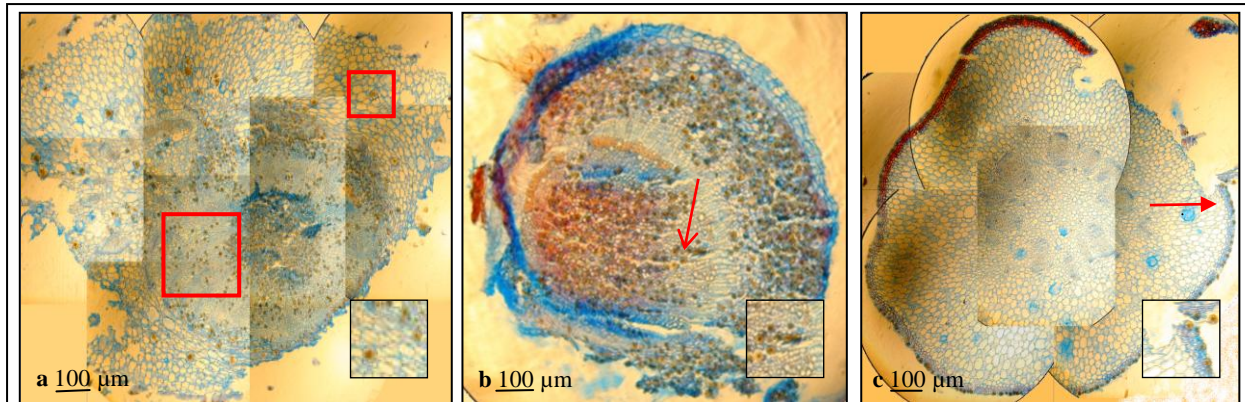


Figura 1. Secuencia de cortes de nodo adulto visto con objetivo 10x. Se marca con color rojo la posición de los cristales. 1a muestra corte cercano al centro, 1b centro del nodo y 1c corte de un extremo del nodo. Se presenta acercamiento de cristales.

En cuanto al nodo joven, es claro que tiene menos cristales que el nodo adulto. Se puede observar que en el corte de centro del nodo hay más cristales en el centro del tejido a diferencia del mismo sitio pero en los cortes de los extremos del nodo. En este caso los cristales en la epidermis se presentan a lo largo de todo el nodo y no solo en los cortes de los extremos, además en uno de los extremos es claro que los cristales no se presentan en el centro del corte (Fig. 2)

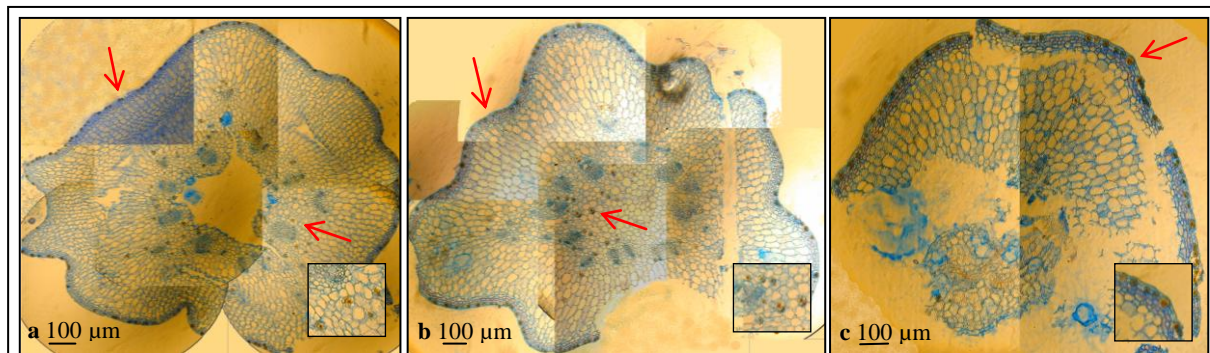


Figura 2. Secuencia de cortes de nodo joven visto con objetivo 10x. Se marca con color rojo la posición de los cristales. 2a muestra corte de un extremo, 2b centro del nodo y 2c corte del otro extremo del nodo. Se presenta acercamiento de cristales

CONCLUSIONES

El tipo de cristal presente en esta especie es en forma de drusa. La poca presencia de cristales en un nodo joven se debe a su misma edad ya que es un tejido nuevo que esta aprovechando todos los nutrientes presentes en su ambiente. Conforme va pasando el tiempo se puede inferir, que por ser un nodo, el tejido presente tiene una gran actividad metabólica y es en el centro por donde se transportan fluidos con altas cantidades de calcio por lo que en ese sitio se van depositando los cristales. Mientras el tejido se va observando hacia los extremos, los cristales se observan con mayor preferencia en la epidermis lo que

puede estar formando parte de una protección a los complejos estomáticos que se encuentran en la epidermis, al formarse los cristales puede evitarse el contacto de una gran cantidad de calcio con las células guarda. Esta primera evidencia de formación de cristales cerca de la epidermis, será la base de un trabajo más extenso que permita explicar una posible relación entre la formación de cristales de calcio y la importante fisiología de los complejos estomáticos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Iljin W.S. (1957) Drought resistance in plants and physiological processes. Annual Review of Plant Physiology. 8:257-274.
- Gibson A.C. (1973) Comparative anatomy of secondary xylem in cactoideae (Cactaceae). Biotropica 5:2965
- Franceschi V.R. y H.T. Jr. Horner (1980) Calcium oxalate crystal in plants. Botanical review 46 (4): 361-427
- De Silva D.L.R, A.M. Hetherington y T.A. Mansfield (1985) Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. New phytol. 100:473-482.
- Schroder J.I., K. Raschke y E. Neher (1987) Voltage dependence of K⁺ channels in guard-cell protoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 4108-4112.
- Fink S. (1991) The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway Spruce. New Phytol. 199: 33-40.
- Schroeder J.I. y Keller (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulating. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 5025-5029.
- Ruiz L.P., C.J. Atkinson, T.A. Mansfield (1993) Calcium in the xylem and its influence in the behavior of stomata. Philosophical transactions of the Royal Society of London B 341: 6774.
- Ruiz L.P. y T.A. Mansfield (1994) A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomata guard cells. New Phytol. 127: 473-481.
- Hopkins W.G. y N.P.A Hüner. Introduction to plant physiology. Editorial Wiley. 3° ed. E.U.A, 2004
- Franceschi B.R. y P.A. Nakata (2005) Calcium oxalate in plants: Formation and function. Annu. Rev. Plant. Biol. 56: 41-71.