



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**MICROSCOPIA COMPARADA DE CRISTALES DE
OXALATO DE CALCIO EN ANGIOSPERMAS
CULTIVADAS**

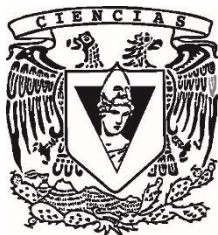
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO CALVA BORJA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. AURORA ZLOTNIK ESPINOSA

Cd. Universitaria, CD.MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Calva

Borja

Maria del Rocio

(55) 65712368

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307018982

2. Datos del tutor

Dra.

Aurora

Zlotnik

Espinosa

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Teresa Margarita

Terrazas

Salgado

4. Datos del sinodal 3

Dra.

Alicia Enriqueta

Brechú

Franco

5. Datos del sinodal 4

Dra.

Silvia

Espinosa

Matías

6. Datos del sinodal 2

Mtra.

Ana Isabel

Bieler

Antolín

7. Datos del trabajo escrito

Microscopía comparada de cristales de oxalato de calcio en angiospermas cultivadas

109 p

2018

Agradecimientos

A la Dra. Aurora Zlotnik Espinosa, por su dedicación, tiempo y esfuerzo, sin los cuales la realización de esta tesis no habría sido posible, además por todas las gentilezas que ha tenido conmigo, por sus charlas y consejos, por aceptarme de nuevo y por confiar en mí para la realización de esta tesis. Un agradecimiento enorme.

A mis sinodales, la Mtra. Ana Isabel Bieler, la Dra. Silvia Espinosa Matías, la Dra. Alicia Brechú Franco y la Dra. Teresa Terrazas Salgado, por sus valiosas observaciones y comentarios para mejorar este trabajo. De manera especial a la Dra. Silvia Espinosa y la Mtra. Ana Bieler, por la enseñanza y el apoyo en la realización de la labor técnica de la microscopía electrónica de barrido y microscopía fotónica respectivamente.

A mis padres de quienes he recibido tanto, gracias por sus virtudes y defectos heredados. Por tu amor incondicional papá, que aún en mis momentos terribles me has sabido dar, por tu entrega que secretamente me ha alentado y por estar siempre a mi lado. Gracias mamá por intentarlo todos los días, por tu mano y por enseñarme a hablar en coreano. Gracias a ambos por apoyarme aún cuando no han entendido por o para qué.

A mis hermanos, por quererme aún en mi peor versión. A ti Marce, porque siempre has estado tras bambalinas en muchos de mis logros académicos y personales. A ti Arturo por aceptarme de nuevo en tu vida. A ti Claus por soportar e inspirar las locuras, por ser cómplice y no aprender de mí. A Daniel y Emanuel, que sé me han sostenido en momentos de incertidumbre.

A mis abuelos que siempre me han querido como suya, por estar siempre para mí y por alentarme en todo.

A Cariño y a Faty, gracias por estar aún en la distancia absurda, por reír, llorar e insistir, por guardar los secretos, por hablar con la verdad, por la lealtad, por esta inquebrantable amistad.

A las Niñas y a las Ficheras, gracias por los estupendos momentos compartidos en la etapa más bella de mi vida (y en la que me enamoró la biología), siempre son y serán de un buen motivo de alegría y disfrute.

A Jimi, por soportarme con paciencia y por la invaluable amistad que hemos construido a pesar de todo pronóstico y sentido común.

A César, Pichón, Paco y Meli, por recorrer el camino juntos, siempre hicieron la universidad más llevadera, cada uno a su singular manera, los disfruté mucho.

A Fili, porque en muchos sentidos y a pesar de todo, este trabajo no sería sin haber estado tú.

A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y a la labor de aquellos docentes que siempre me mostraron lo maravilloso de la biología.

A ti, por la historia.

Con cariño a mi familia

“Nuestra imaginación no es nada comparada
con la impresionante realidad de la naturaleza”

Neil deGrasse Tyson

Índice

Resumen.....	1
Introducción	3
Biom mineralización: concepto e importancia	3
Cristales de oxalato de calcio en plantas	4
Distribución.....	4
Morfología	5
Síntesis del cristal en los idioblastos	6
Oxalato y calcio disponibles para la formación del cristal.....	8
Función de los cristales de oxalato de calcio en las plantas	9
Impacto de cristales de oxalato de calcio y el oxalato vegetales en la salud humana	11
Microscopía.....	11
Justificación	15
Objetivos	15
Método.....	16
Elección de especies	16
Preparación de laminillas semipermanentes.....	18
Aplicación de distintos sistemas de iluminación en microscopía fotónica (MF).....	19
Aplicación de microscopía electrónica de barrido (MEB).....	19
Resultados	20
Microscopía fotónica de campo claro	23
Microscopía fotónica de contraste de fases	26
Microscopía fotónica de luz polarizada	29
Microscopía de contraste diferencial de interferencia (CDI).....	32
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	32
Discusión	44
Microscopía fotónica de campo claro	44
Microscopía fotónica de contraste de fases	46
Microscopía de luz polarizada.....	47
Microscopía fotónica de contraste diferencial de interferencia (CDI)	50
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	51
Muestras analizadas al MEB	53
Conclusiones.....	55

Literatura Citada	56
Anexos.....	64
Anexo I.....	64
Anexo II.....	73

Resumen

La biomineralización es la producción de minerales que sintetizan los organismos biológicos; en las plantas los cristales de oxalato de calcio son los biominerales más abundantes, pueden formarse en cualquiera de sus tejidos, con morfologías, distribución y naturaleza específicas en los taxones a nivel de familia y género. Fueron de las primeras estructuras vegetales vistas bajo el microscopio y desde entonces las microscopías, fotónica y electrónica, han sido muy empleadas para observar y estudiar estos cristales. El conocimiento de la morfología, formación y ubicación de los cristales de oxalato de calcio en plantas es esencial para comprender la función que tienen en éstas y la microscopía tiene un papel importante al momento de estudiarlos. No existe un estudio que indique ventajas/desventajas de técnicas microscópicas para la observación y estudio de cristales de oxalato de calcio en angiospermas. La presente investigación se realizó para establecer lineamientos metodológicos para el estudio de los cristales de oxalato de calcio en las angiospermas cultivadas teniendo como objetivo fundamental sugerir cual microscopía es más adecuada para su observación. Se hicieron laminillas semipermanentes de cortes transversales de lámina foliar, pecíolo y raíz, de 12 especies de angiospermas cultivadas con representación de las 5 morfologías básicas de estos cristales. Se analizaron bajo microscopía fotónica en los sistemas de iluminación de campo claro, contraste de fases, luz polarizada y contraste diferencial de interferencia, para determinar los tipos de cristales presentes en los diferentes órganos de las plantas y su ubicación, así como las características de los cristales en cada iluminación; también se prepararon cortes para la observación de la morfología cristalina al microscopio electrónico de barrido. Se determinó la presencia de las 5 morfologías básicas de estos cristales, y sus características morfológicas, en los tres órganos en los sistemas de iluminación de luz polarizada, de campo claro y de contraste diferencial de interferencia; el sistema de contraste de fase no proporcionó información útil. En contraste, la microscopía electrónica de barrido proveyó de información fundamental sobre la textura y morfología de los cristales. Estas observaciones coincidieron con anteriores investigaciones que emplearon microscopía fotónica y electrónica de barrido para detección y descripción de la morfología de estos cristales en tejidos vegetales. Se concluyó que la microscopía a usar para la observación de cristales de oxalato de calcio en tejidos vegetales va a depender de los objetivos planteados

en cada investigación y de lo que se quiera observar en dichos cristales, es por ello que una microscopía comparada provee de información variada y complementaria para la descripción y estudio de estos cristales en angiospermas.

Introducción

Biom mineralización: concepto e importancia

La biom mineralización es la producción de minerales que sintetizan ciertos organismos biológicos. Estos biom minerales son únicos en su estructura, llevan a cabo diferentes funciones como la de sostén y protección y están presentes en los 5 reinos (Franceschi y Horner, 1980; Berman *et al.*, 1993; Webb, 1999; Nakata, 2003). En las plantas se han observado biom minerales de sílice, oxalato de calcio y magnesio, carbonato de calcio, tartrato de calcio, oxalatos ferrosos, entre otros (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Bauer *et al.*, 2011). Los cristales de oxalato de calcio o calcifitolitos (Zhang *et al.*, 2014) son los más comunes y abundantes en los tejidos vegetales (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Horner y Wagner, 1995; Webb, 1999; Franceschi, 2001; Bauer *et al.*, 2011), su presencia se ha reportado en al menos 215 familias de plantas en todos sus niveles de organización (Arnott, 1966; Horner y Wagner, 1995; Ilarslan *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2011), en las angiospermas en más del 75 % (Nakata, 2003). Los cristales de oxalato de calcio puede constituir desde 3% hasta el 85% del peso de algunos tejidos vegetales (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Zindler-Frank, 1991; Nakata, 2003) y el 90% de su contenido de calcio total en la planta dependiendo del grupo taxonómico (Nakata, 2003).

El calcio es indispensable para el desarrollo y crecimiento de las planta, forma parte de paredes celulares, da estabilidad a las membranas (Arnott y Pautard, 1970; Demarty *et al.*, 1984; Franceschi y Horner, 1980; Ilarslan *et al.*, 1999), es un agente de señalización celular (Sanders *et al.*, 2002) y confiere equilibrio osmótico entre otros papeles más (Kinzel, 1989). La mayoría de las plantas no restringen eficientemente la absorción de calcio por sus raíces, resultando en niveles de captación de calcio directamente proporcionales a los niveles disponibles en el medio ambiente (Kostman *et al.*, 2003, García-Fernández *et al.*, 2014) y no se conocen sistemas fisiológicos excretores en ellas para eliminar el exceso de calcio (Webb, 1999), por ello se ha sugerido que las plantas responden al exceso de calcio biom mineralizándolo y acumulándolo en forma de cristales de oxalato de calcio dentro de sus células (Franceschi y Horner, 1980; Zindler-Frank, 1991; Ilarslan *et al.*, 1999; Franceschi, 2001). El oxalato de calcio es una sal metabólicamente

inactiva y relativamente insoluble dentro de las plantas y poco se sabe de los factores que dirigen su síntesis, tamaño, cantidad, forma y función dentro de ellas (Kinzel, 1989; Webb, 1999).

Cristales de oxalato de calcio en plantas

Distribución

Los cristales de oxalato de calcio pueden formarse en cualquier órgano o tejido de las plantas; a nivel de órganos se les encuentra en raíces, rizomas (Schneider, 1901), tallos aéreos, hojas y flores incluyendo gineceo y androceo, frutos y semillas (Arnott, 1966; Horner y Wagner, 1980; Franceschi y Horner, 1980; Ilarslan *et al.*, 1999; Nakata, 2012; Gębura y Winiarczyk, 2016). A nivel de tejidos se les ubica en tejidos epidérmicos como en células acompañantes de los complejos estomáticos y tricomas (Franceschi y Horner, 1980; Brubaker y Horner, 1989; Zindler-Frank, 1991; Ruiz y Mansfield, 1994; Bárcenas-Argüello *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014), tejidos vasculares como en cortezas, floema y xilema secundario (Borchert, 1984; Wang *et al.*, 1994) y tejidos embrionales (Tillman-Sutela y Kauppi, 1999; Ilarslan *et al.*, 1999); incluso se ha documentado sincronización en su aparición, forma y tamaño a lo largo de la microsporogénesis (Horner y Wagner, 1992) y de la embriogénesis (Ilarslan *et al.*, 1999). Se forman comúnmente dentro de la célula pero también existen cristales extracelulares (Franceschi y Horner, 1980). Los cristales intracelulares se desarrollan dentro las vacuolas de células especializadas llamadas idioblastos que se diferencian del resto del tejido por ser células de mayor tamaño y diferente forma, con un contenido citosólico denso, con núcleo y nucleolos agrandados, ricas en organelos, vesículas, lípidos, proteínas y polisacáridos (Foster, 1956; Franceschi y Horner, 1980). Los idioblastos jóvenes son células muy activas, pues dentro de su vacuola se están sintetizando cristales de oxalato de calcio y cuando éstos maduran y están completamente formados, los idioblastos inhiben el flujo de calcio hacia su interior, pero siguen activos lo cual hace pensar que pueden utilizar este calcio cristalino en caso de déficit de calcio ambiental (Kostman *et al.*, 2003).

Morfología

Los cristales de oxalato de calcio tienen morfologías variadas, pero se han catalogado cinco formas básicas (Figura 1), (1) cristales prismáticos que son simples formas prismáticas regulares, (2) estiloideos como cristales aciculares individuales, (3) rafidios como conjuntos de cristales aciculares, (4) drusas como agregados esféricos de cristales individuales y (5) arenas que son pequeños cristales individuales agrupados (Franceschi y Horner, 1980; Webb, 1999).

Es importante indicar que, si bien esta tipología es la más usual y la que mayoritariamente se encuentra en los textos básicos de botánica, existen formas intermedias como las drusas o prismas incompletos (Monje y Baran, 2002; Lersten y Horner, 2008); de la misma manera, en trabajos especializados se mencionan otros tipos de formas: Lersten y Horner (2011) y Zhang *et al.* (2014) reportan la concreción como un cristal secundario, una formación esférica compacta y densa parecida a la drusa. Monje y Baran (2002) reportan agregados cristalinos rudimentarios similares a estrellas y Zhang *et al.* (2014) detallan que en la base de tricomas de *Camellia sinensis* se encuentra una calcificación en forma oval con un agujero al centro separada en cuatro partes por grietas rectas que asemejan una cruz. Estos cristales existen en las plantas con dos naturalezas químicas o estados de hidratación: monohidratado (whewellita, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) que está ampliamente distribuido y dihidratado (weddelita, $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) más estable y poco distribuido (Frey-Wyssling, 1981; Monje y Baran, 2002). En angiospermas se ha reportado que en un mismo idioblasto puede haber hasta dos tipos diferentes de cristales en varias combinaciones, rafidios y arenas, estiloideos y agregados esféricos y prismas o drusas incrustadas en arenas, a este idioblasto se le ha denominado Duplex (Lersten y Horner, 2011). Los tamaños de los cristales van desde $<10 \mu\text{m}$ (arenas en Cactaceae según Viñas y Jiménez, 2016) hasta los $400 \mu\text{m}$ (drusas en Cactaceae según Monje y Baran, 2002).

En plantas la morfología, distribución y naturaleza química de estos cristales son caracteres específicos de los taxones a nivel de familia y género, lo cual ha resultado de utilidad para relacionar filogenéticamente a las especies vegetales (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Horner y Wagner, 1992; Prychid y Rudall, 1999; Monje y Baran, 2002; Lersten y Horner, 2000; Cervantes-Martínez *et al.*, 2005); no sólo la

Taxonomía y la Sistemática han utilizado estos caracteres, recientemente la Antropología ha intentado ayudarse de estas estructuras para discernir dietas humanas a partir de restos vegetales (Zhang *et al.*, 2014).

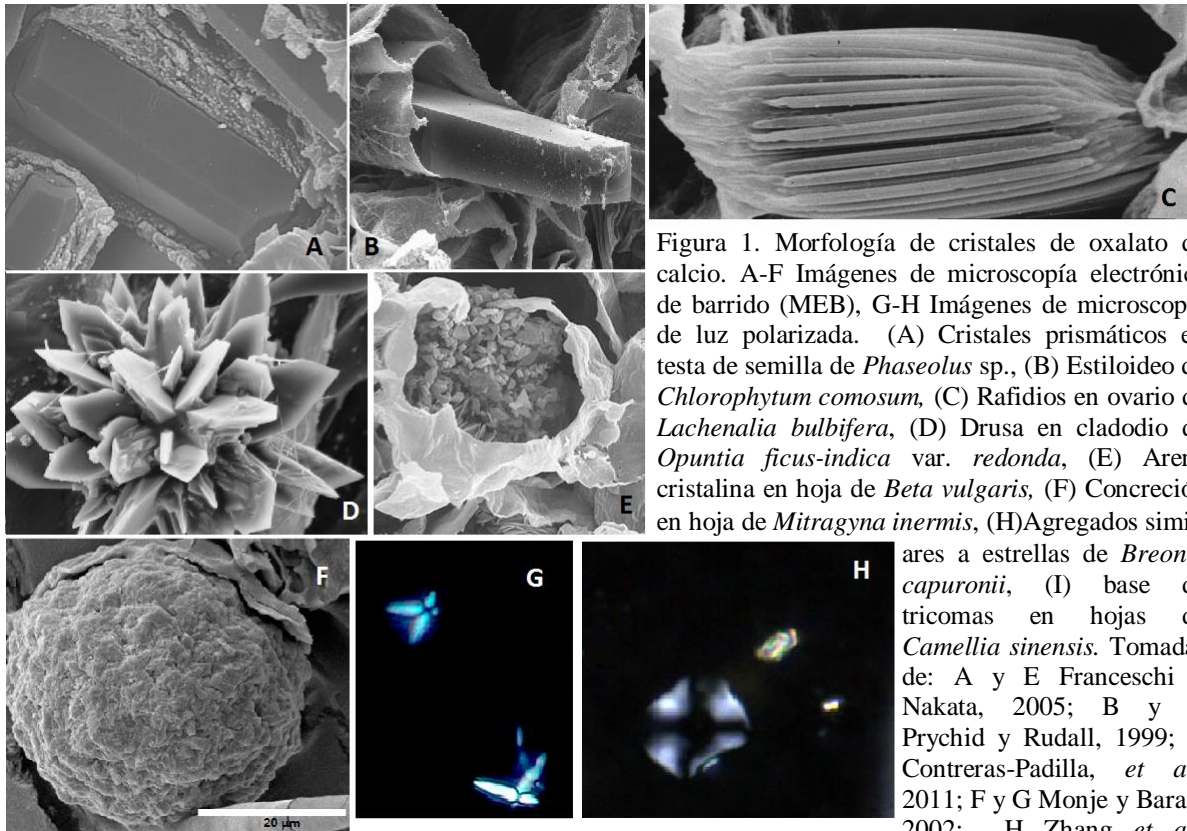


Figura 1. Morfología de cristales de oxalato de calcio. A-F Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB), G-H Imágenes de microscopía de luz polarizada. (A) Cristales prismáticos en testa de semilla de *Phaseolus* sp., (B) Estiloideo de *Chlorophytum comosum*, (C) Rafidios en ovario de *Lachenalia bulbifera*, (D) Drusa en cladodio de *Opuntia ficus-indica* var. *redonda*, (E) Arena cristalina en hoja de *Beta vulgaris*, (F) Concreción en hoja de *Mitragyna inermis*, (H) Agregados similares a estrellas de *Breonia capuronii*, (I) base de tricomas en hojas de *Camellia sinensis*. Tomadas de: A y E Franceschi y Nakata, 2005; B y C Prychid y Rudall, 1999; D Contreras-Padilla, *et al.*, 2011; F y G Monje y Baran, 2002; H Zhang *et al.*, 2014).

Síntesis del cristal en los idioblastos

La síntesis del cristal no se da como una precipitación al azar ocurrida al elevar los niveles de calcio u oxalato en la planta (Webb, 1999; Li *et al.*, 2003), está regulada genéticamente en los idioblastos (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Webb 1999; Horner y Wagner, 1995; Zindler-Frank *et al.*, 2001). Estudios realizados por Nakata y McConn (2000) han comprobado que la síntesis de cristales de oxalato de calcio está controlada genéticamente; estos autores identificaron siete mutantes defectuosos de oxalato de calcio (cod) en *Medicago truncatula* que exhiben alteraciones en la que morfología, distribución, cantidad y tamaño de los cristales y sugirieron que la síntesis de estos cristales involucra más de un sólo gen en esta planta. Los mismos autores trabajaron con líneas mutantes de

morfología cristalina defectuosa (cmd) en la misma planta, en las cuales revelaron que algunas mutaciones puntales podían alterar la forma y el tamaño del cristal (McConn y Nakata, 2002) reforzando lo dicho sobre el control genético de los cristales. Sin embargo, parámetros físicos y químicos como la temperatura, la concentración de iones, la presión, el pH, la radiación ultravioleta y alfa, también intervienen en la formación del cristal (Franceschi y Horner, 1980; Monje y Baran, 2002). Borchert (1985) sugirió que en las plantas superiores el exceso de calcio apoplástico induce a la diferenciación de los idioblastos, en contraste Frank (1972) observó que aún con calcio limitado los idioblastos se diferenciaban.

Los cristales intracelulares se forman comúnmente dentro de cámaras de membrana intravacuolar o cámaras de cristal que proliferan dentro la vacuola idioblástica (Arnott, 1966; Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Horner y Wagner, 1995), y que están asociadas a estructuras tubulares y fibrilares dentro de la vacuola, polisacáridos y lípidos (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi, 1984; Horner y Wagner, 1992, 1995; Webb *et al.*, 1995; Webb, 1999). Desde el inicio del desarrollo del idioblasto se sintetizan y acumulan cámaras de cristal en la vacuola, la estructura de esta cámara de cristal es una membrana simple o doble de fosfolípidos, cerrada y compleja con una mezcla de polisacáridos, proteínas y lípidos desconocidos, que separa el espacio de cristalización del resto de protoplasma vacuolar controlando el entorno en donde se iniciará la cristalización lo que proporciona un control en el número y la forma de los cristales (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Franceschi, 1984; Webb *et al.*, 1995; Webb, 1999). Además estas cámaras crecen a medida que los cristales también lo hacen y a veces las cámaras de membrana limitadas como las que forman los rafidios, parecen unirse entre sí formando un extenso sistema de membranas intravacuolares que orienta los cristales (Prychid y Rudall, 1999). Li *et al.* (2003) descubrieron que existe una proteína matriz específica sobre la superficie de los cristales de oxalato de calcio de la lechuguita de agua (*Pistia stratiotes*); esta proteína matriz tiene una fuerte especificidad por la unión al calcio y puede estar involucrada en la precipitación del oxalato de calcio dentro de la cámara de cristal. Katayama *et al.* (2007) trabajaron con hojas de *Morus alba* y encontraron que el xiloglucano, una hemicelulosa abundante en la pared vegetal, rodea a cristales maduros

formando una vaina a su alrededor; sugieren que esta vaina excluye al cristal del tonoplasto y que inhibe el crecimiento del cristal para evitar daños en el idioblasto.

Oxalato y calcio disponibles para la formación del cristal

Poco se conoce acerca de los mecanismos de formación del oxalato de calcio en plantas. Se piensa que la regulación del transporte de calcio y oxalato a través de la membrana vegetal, el citoplasma y el tonoplasto debe ser compleja e independiente (Webb, 1999), que involucra la operación coordinada de bombas de protones y canales iónicos (Horner y Wagner, 1992; Monje y Baran, 2002) y que la membrana vacuolar controla la entrada de iones hacia el espacio de cristalización (Webb, 1999). Algunos estudios han identificado una proteína ligante de calcio llamada calreticulina en los subdominios del retículo endoplásmico que podría regular el calcio libre en el citoplasma durante la producción del cristal (Franceschi *et al.*, 1993; Quitadamo *et al.*, 2000; Kostman *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2003). Volk *et al.* (2004) hallaron en la hoja de *Pistia stratiotes* abundantes canales de calcio tipo dihidropiridina (DHP) en los idioblastos del mesófilo, y consideran que estos canales están involucrados en procesos de transporte de calcio y en la formación de cristales. Webb (1999) sugiere que el transporte de calcio y oxalato tienen caminos separados hacia las cámaras de cristal o hacia la vacuola debido a que el oxalato de calcio es insoluble y por tanto no se espera encontrar calcio libre en presencia de oxalato en los idioblastos.

El transporte de calcio depende de la absorción a través de la raíz, del flujo de la transpiración y de la reabsorción de cristales de otras estructuras de la planta (Horner y Wagner, 1980; Franceschi, 1984); la cantidad de calcio transportado depende de la demanda de la planta y de la disponibilidad de éste en el medio ambiente (Molano-Flores, 2001). El oxalato por el contrario tiene origen endógeno y en algunas plantas su síntesis aumenta con el aporte de calcio (Franceschi y Horner, 1980; Zindler-Frank *et al.*, 2001); se han descrito varias vías de producción de oxalato, lo que sugiere que el oxalato no proviene de la misma fuente. Se proponen dos vías principales para plantas superiores, la primera, es la conversión de los productos fotorespiratorios glicolato y glioxilato que al ser oxidados por la glicolato oxidasa resultan en oxalato, y la segunda, el catabolismo del ácido L-ascórbico (sintetizado a partir de la D-glucosa) que produce oxalato y ácido tartárico

(Franceschi y Loewus, 1995; Nakata, 2003). Existen otras posibilidades de producción de oxalato como en el ciclo de Krebs en donde el isocitrato puede ser intervenido por la isocitrato liasa para dar glioxilato y ácido succínico donde el primero oxidado podría dar oxalato. También se ha reportado que el succinato, malato y aspartato que se convierten fácilmente en oxalacetato son buenos precursores de oxalato bajo la escisión enzimática del oxalacetato y podría ser un mecanismo socorrido para tejidos no verdes como los presentes en algunas raíces (Franceschi y Horner, 1980). Se piensa que la síntesis del oxalato se lleva a cabo en el citoplasma del idioblasto y posteriormente es transportado e incorporado a la vacuola para la formación del cristal (Lersten y Horner, 2000).

Función de los cristales de oxalato de calcio en las plantas

La función exacta de los cristales de oxalato de calcio es incierta, aunque se les han atribuido diversas funciones en la fisiología y ecología de las plantas. Se sugiere que el papel definitivo depende del tipo de órgano o tejido en el cual se encuentren depositados los cristales (Gębura y Winiarczyk, 2016).

Uno de los más mencionados establece que funcionan como sumideros de calcio para reducir el exceso de éste en el apoplasto y evitar el daño celular (Foster, 1956; Ilarslan *et al.*, 1997; Webb, 1999; Franceschi, 2001; Volk *et al.*, 2004). También se piensa que constituyen un reservorio interno de calcio que se reabsorbe en condiciones de deficiencia de calcio en el ambiente (Franceschi y Horner, 1980) o para la síntesis de proteínas en el desarrollo embrionario (Ilarslan *et al.*, 1997, 1999); para lo cual se considera que hay alguna modificación del pH en el medio y los cristales se solubilizan o que existe una degradación enzimática. Se sugiere que mantienen el balance iónico, que dan soporte y protegen a tejidos epidérmicos, subepidérmicos y vasculares, que regulan el transporte y reparto de calcio en las semillas, que ayudan en la dehiscencia de anteras y en el desarrollo de la microsporogénesis (Schneider, 1901; Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Horner y Wagner, 1980; Nakata, 2012; Gębura y Winiarczyk, 2016).

Un papel ecológico propone a los cristales como protección física contra herbívoros y esta función se ha descrito de varias formas, como que la morfología de los rafidios les

permite penetrar membranas mucosas orales de herbívoros, irritando o lesionando la boca y garganta de los animales así como del humano (Sakai y Hanson, 1974; Franceschi y Horner, 1980; Franceschi, 2001; Bradberry y Vale, 2015). Algunos autores han sugerido que la presencia de estos cristales en las hojas de las plantas disuaden a los herbívoros mediante el aumento de la producción de cristales (Molano-Flores, 2001) y mediante la abrasión física en las mandíbulas de algunos insectos masticadores (Korth *et al.*, 2006). Otros autores han sugerido que durante las antítesis y liberación del grano de polen de las anteras de algunas Commelinaceae los rafidios se adhieren a las caras superiores del grano de polen para disuadir a los herbívoros (Gębura y Winiarczyk, 2016).

En investigaciones sobre la fisiología de los cristales en la plantas tales como el de Ruiz y Mansfield (1994) se propone que en plantas con fotosíntesis CAM se producen cristales en las células epidérmicas de la lámina foliar próximas o subsidiarias a las células guarda de los estomas para mantener una baja concentración de calcio libre, pues estos iones están implicados en eventos transductores de señales que controlan la apertura estomática y por lo tanto regulan la pérdida de agua.

Por otro lado se ha sugerido que en algunas plantas acuáticas como *Typha angustifolia* los cristales promueven la formación de espacios de aire en las hojas jóvenes, ya que se ha observado que los idioblastos con rafidios se circunscriben en tejidos parenquimatosos que se descomponen para formar espacios aéreos (Prychid y Rudall, 1999).

La regulación de luz durante la fotosíntesis también ha sido propuesta por Kuo-Huang *et al.* (2007) quienes postulan que en las hojas de *Peperomia glabella* las drusas ubicadas en el parénquima fotosintético en empalizada distribuyen uniformemente la luz a los cloroplastos que rodean la vacuola y que también ayudan a reflejar el exceso de luz.

Se ha sugerido que el oxalato desempeñan un papel en la tolerancia a los metales pesados mediante dos mecanismos, uno interno en el que el oxalato secuestra el metal en forma no tóxica dentro de la planta y otro externo en el oxalato segregado desde las puntas

de la raíces puede unirse a los iones del metal en el suelo y reducir la biodisponibilidad de éstos, protegiendo a la planta contra su el efecto tóxico (Ma y Miyasaka, 1998; Ma, 2000; Olivares *et al.*, 2002).

Impacto de cristales de oxalato de calcio y el oxalato vegetales en la salud humana

Los alimentos vegetales son la principal fuente de calcio y oxalato de las dietas humanas (Franceschi y Nakata, 2005; Contreras-Padilla *et al.*, 2011; Guarrera y Savo, 2016), sin embargo los cristales de oxalato de calcio y el oxalato presentes en plantas comestibles pueden tener efectos nocivos para la salud humana si se consumen en exceso, ya que contribuyen con el aumento del oxalato urinario, provocando desde pequeñas intoxicaciones y lesiones de mucosas orales hasta daños y enfermedades renales agudas (Khan *et al.*, 2007; Banasik y Stedeford, 2014; Tütüncü *et al.*, 2014; Bradberry y Vale, 2015; Siener *et al.*, 2016). Por otro lado el oxalato también es considerado un antinutriente, pues hace que el calcio y a veces otros minerales no estén disponibles para la absorción nutricional (García-Fernández *et al.*, 2014). Lo anterior ha provocado esfuerzos para disminuir el contenido de oxalato en los alimentos vegetales, utilizando métodos que van desde la cocción y filtración de extractos de los alimentos (Guo *et al.*, 2015) y la adición de componentes de calcio en los suelos de cultivo (Bong *et al.*, 2017) hasta la manipulación genética de la producción de oxalato de calcio en los cultivos alimentarios (Franceschi y Nakata, 2005, Nakata y McConn, 2007).

Microscopía

Los cristales de oxalato de calcio fueron de las primeras estructuras vegetales vistas bajo el microscopio fotónico, observados por Leeuwenhoek en el siglo XVII (como lo citan Prychid y Rudall, 1999; Nakata, 2003), desde entonces han fascinado a muchos por su belleza morfológica y una variedad de microscopías como la microscopía fotónica de luz polarizada, microscopia electrónica de barrido y electrónica de transmisión, han sido utilizadas para estudiarlos (Prychid y Rudall, 1999; Lersten y Horner, 2011).

A lo largo de los años las mejoras en el microscopio han surgido gracias a descubrimientos relacionados con el comportamiento de la luz y los electrones y se han inventado aditamentos que mejoran la naturaleza de la luz e incrementan el contraste sin

afectar la resolución, permitiendo que detalles que pasan desapercibidos se traduzcan en cambios de intensidades luminosas. También se han creado microscopios que utilizan electrones para observar detalles ultraestructurales que revelan micro y nanocaracterísticas específicas de los objetos (Wayne, 2014).

A continuación se mencionan los sistemas de iluminación de microscopía fotónica y microscopía electrónica empleados en este estudio para la observación de cristales de oxalato de calcio y se presenta un comparativo sobre las características y aplicaciones de estas microscopías (Cuadro 1). La ficha técnica de cada microscopía puede consultarse en el Anexo I.

Tipo de microscopía	Sistema de iluminación (microscopía fotónica)	Características	Tipo de muestra	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Microscopía fotónica (MF)	Campo claro (Wayne, 2014; García-Escudero <i>et al.</i> , 2017)	El espécimen contrasta sobre un fondo claro y brillante	Procesada (Teñida)	Ofrece una máxima resolución y contraste del objeto	Requiere de material teñido	Para observar material procesado como células, tejidos y cromosomas teñidos
	Contraste de fases (Murphy y Davidson, 2013; Wayne, 2014)	Convierte las diferencias de fase entre las regiones de un espécimen en diferencias de amplitud	No procesada	Observación de especímenes vivos o transparentes que contrastan en su medio	Confusión de estructuras por presencia de halos de luz Limitado a especímenes delgados	Para observar especímenes transparentes en alta resolución Cuantificar índices de refracción y densidad de masa seca de células y concentraciones moleculares
	Luz polarizada (Wayne, 2014; Olympus, 2017)	Convierte un cambio en el ángulo de propagación de luz polarizada provocado por el espécimen en un cambio de amplitud y longitud de onda	Anisotrópica o birrefringente	Contrasta muestras birrefringentes y detecta la presencia de tinción óptica de muestras con patrones característicos	Solo contrasta muestras birrefringentes	Para identificar y comparar sustancias cristalinas o fibrosas de las células y tejidos, como citoesqueleto, colágeno y cristales. Permite el análisis cuantitativo de los patrones cristalinos de las muestras con actividad óptica

Continúa

Tipo de microscopía	Sistema de iluminación (microscopía fotónica)	Características	Tipo de muestra	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Microscopía fotónica (MF)	Contraste diferencial de interferencia (CDI) (Murphy y Davidson, 2013; Wayne, 2014)	Detecta variaciones de densidad óptica en especímenes y los convierte en diferencias de amplitud y longitud de onda, mostrando altas luces, sombras, y superficies con relieve	Sin procesar	Observación del detalle de la muestra sin pérdida de resolución, resaltando superficies con relieve Se obtiene contraste por medios ópticos sin la necesidad de tinciones Estudio de especímenes relativamente gruesos	La birrefringencia de las muestras anisotrópicas crea imágenes confusas en la observación	Para el estudio de células vivas no coloreadas Cualquier material que requiera la observación de detalle y resolución en su superficie
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	(Morris y Groves, 2013; Yoshimura, 2014; Egerton, 2016)	Escanea muestras con un haz de electrones produciendo señales que contiene información sobre la topología de la superficie de la muestra	Procesada	Logra imágenes con gran profundidad de campo y resolución, que van desde micrómetros hasta nanómetros	No se pueden observar muestras vivas	Observación de las características morfológicas externas de células, tejidos y cristales

Cuadro 1. Comparación de las características y aplicaciones de 4 sistemas de iluminación de microscopía fotónica (MF) y microscopía electrónica de barrido (MEB) empleados en este estudio.

Justificación

El conocimiento de la morfología, formación y ubicación de los cristales de oxalato de calcio en plantas es esencial para comprender su funcionalidad en ellas (Webb, 1999; Li *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2004), por ello es importante conocer y utilizar o incluso desarrollar las mejores herramientas para estudiarlos; es aquí donde la microscopía juega un papel importante, ya que el buen uso de ella y la interpretación adecuada de las imágenes que resultan de la misma, permiten conocimiento y la resolución o el surgimiento de incógnitas sobre la ocurrencia de cristales de oxalato de calcio en plantas (Franceschi y Horner, 1980).

Los estudios de cristales de oxalato de calcio en angiospermas hacen uso constante de la microscopía, en la mayoría de éstos se utilizan sólo la microscopía fotónica en campo claro, microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Franceschi y Horner, 1980; Frey-Wyssling, 1981; Horner y Wagner, 1995; Prychid y Rudall, 1999; Tillma-Sutela y Kaupii, 1999; Lersten y Horner, 2000, 2011; Li *et al.*, 2003; Demiray, 2007; Nakata, 2012; Raman *et al.*, 2014; Gębura y Winiarczyk, 2016) Sin embargo, no existe un sólo estudio que indique ventajas/desventajas de estas técnicas o cuales técnicas de microscopía son adecuadas para la observación y estudio de cristales de oxalato de calcio en angiospermas (y de hecho para el resto de los vegetales pues sólo para gimnospermas existen algunos estudios parciales sobre microscopia comparada de cristales, véase Fink, 1991).

Tomando en cuenta lo anterior, este estudio se realiza para establecer lineamientos metodológicos para el estudio de los cristales de oxalato de calcio en las angiospermas teniendo como objetivo fundamental sugerir cuáles son las microscopías más adecuadas para su observación.

Objetivos

Objetivo general

Observar la morfología con microscopía fotónica y microscopía electrónica de barrido de los 5 tipos básicos de cristales de oxalato de calcio en órganos vegetativos de 12 especies modelo de angiospermas cultivadas y establecer un comparativo que permita indicar cuáles son las mejores estrategias a nivel de microscopía para evidenciar las características de los cristales de oxalato de calcio.

Objetivos particulares

Observar al microscopio fotónico en 4 distintos sistemas de iluminación, laminillas semipermanentes de lámina foliar y pecíolo o de raíz en su caso, de 12 especies modelo de angiospermas.

Observar al microscopio electrónico de barrido, los mismos órganos seleccionados de las 12 especies modelo.

Hacer un análisis comparativo de las fotomicrografías obtenidas con las diferentes técnicas de microscopía aplicadas.

Método

Elección de especies

Se realizaron cortes transversales de lámina foliar, pecíolo o raíz en su caso, de 12 especies pertenecientes a familias con presencia y abundancia de al menos una de las cinco morfologías de cristal de oxalato de calcio reportada para facilitar su observación. Las especies elegidas fueron cultivadas ornamentales y alimentarias por su fácil obtención; en este sentido es que se habla de estas especies como “modelo”.

El material vegetal fue recolectado en la Facultad de Ciencias de la UNAM, Cd. Universitaria, perteneciente a la alcaldía de Coyoacán (Ciudad de México, México), ubicada en las coordenadas 19°19'26.8" N, 99°10'48.4" O y en la calle 1ª cerrada de Jesús del Monte, perteneciente a la alcaldía de Cuajimalpa (Ciudad de México, México), ubicada en las coordenadas 19°22'00.0" N, 99°17'37.9" O.

Las especies elegidas para este estudio fueron las siguientes.

Beta vulgaris L., Chenopodiaceae. Nombre común: betabel. Franceschi (1984) reporta arena cristalina en hojas.

Bougainvillea spectabilis Willd., Nyctaginaceae. Nombre común: buganvilia. Bittrich y Kuhn (1993) reportan rafidios en las hojas de algunos miembros de la familia Nyctaginaceae. Chew (2010) reporta rafidios en las hojas del género.

Brugmansia candida Pers., Solanaceae. Nombre común: floripondio. Lebsky y Poghosyan (2014) reportan arenas cristalinas en hojas de Solanáceas.

Citrus limon (L.) Burm., Rutaceae. Nombre común: limonero. Lebsky y Poghosyan (2014) reportan cristales prismáticos en el género *Citrus*.

Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl., Rosaceae. Nombre común: níspero. Souza *et al.* (2003) reportan drusas y cristales prismáticos en las hojas.

Lycopersicon esculentum P. Mill., Solanaceae. Nombre común: jitomate. Bouropoulos *et al.* (2001) reportan arenas cristalinas en hojas de Solanáceas. Bonner y Dickinson (1989) reportan drusas en anteras de la especie.

Paphiopedilum insigne (Wall. ex Lindl.) Pfitzer, Orchidaceae. Nombre común: zapatilla de Venus. Prychid y Rudall (1999) reportan rafidios, cristales prismáticos y drusas en la familia Orchidaceae.

Phalaenopsis Sogo Diana ‘Sophie’ (Sogo Lisa X Luchia Lip), Orchidaceae. Nombre común: orquídea mariposa. Prychid y Rudall (1999) reportan rafidios, cristales prismáticos y drusas en las hojas de familia Orchidaceae.

Phytolacca rugosa A. Braun & C. D. Bouché, Phytolaccaceae. Nombre común: masorquita. Carlquist (2000) reporta rafidios en tallos del género.

Punica granatum L., Punicaceae. Nombre común: granada. Lersten y Horner (2005) reportan drusas y cristales prismáticos en las hojas.

Schefflera actinophylla (Endl.) Harms., Araliaceae. Nombre común: árbol paraguas. Barceloux (2008) y Metcalfe (1989) reportan arenas cristalinas en las hojas y cristales prismáticos en tallos de la familia.

Tradescantia fluminensis Vell., Commelinaceae. Nombre común: hierba del pollo, velo de novia. Tomlinson (1966) reporta rafidios en casi todos miembros de la familia Commelinaceae con excepción del género *Cartonema*. Khan y Siddiqi (2014) reportan rafidios, cristales prismáticos y drusas en tallos de *Tradescantia pallida*.

Debido a que las hojas de las orquídeas elegidas eran cortamente pecioladas y suele ser difícil establecer el límite entre el pecíolo y la lámina, se optó por hacer cortes de la raíz de las mismas dado que la mayor parte de las especies de orquídeas han desarrollado raíces fotosintéticas como una estrategia de aumentar la superficie fotosintética y la captura de carbono (Chomicki *et al.*, 2015).

Para la preparación de laminillas semipermanentes se recolectaron hojas frescas completamente expandidas de las especies mencionadas y la raíz en el caso de *Paphiopedilum insigne* y *Phalaenopsis* Sogo Diana ‘Sophie’, en los sitios de estudio mencionados.

Preparación de laminillas semipermanentes

Se hicieron cortes transversales al centro de la lámina, del pecíolo y la raíz. Los cortes se hicieron a mano alzada con cuchillas de micrótopo desechable de perfil alto Leica 818, procurando obtener cortes lo más delgados posibles.

Los cortes se colocaron en un portaobjetos con una gota de hipoclorito de sodio comercial al 5% por 2 minutos o hasta aclarar el corte, después con papel absorbente se eliminó el exceso de hipoclorito de sodio e inmediatamente se colocó una gota de colorante azul de metileno 0.1% por 2 min. Posteriormente se eliminó con papel absorbente el excedente de colorante y se introdujo el corte en la jalea glicerinada derretida con ayuda de una aguja de disección, inmediatamente sobre esta preparación se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar. Después la preparación se selló con barniz de uñas transparente para evitar que perdiera humedad, se etiquetó con la especie y el tipo de corte.

Aplicación de distintos sistemas de iluminación en microscopía fotónica (MF)

Las lamillas semipermanentes se observaron en un fotomicroscopio marca Olympus modelo Provis AX-70 con objetivo 20x y se aplicaron los sistemas de iluminación de campo claro, contraste de fases, luz polarizada y contraste diferencial de interferencia (CDI), todos estos sistemas se aplicaron a un mismo campo de observación que contuviera cristales de oxalato de calcio en cada laminilla. Con estas observaciones se determinaron las morfologías de los cristales presentes en los diferentes órganos así como las características de los cristales en cada sistema de iluminación. Las fotomicrografías fueron capturadas digitalmente con el programa Q-Capture Pro 7.

Aplicación de microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la observación de cristales de oxalato de calcio al microscopio electrónico de barrido, se realizaron dos métodos de preparación del material recolectado.

El primero consistió en secar las hojas y raíces en una prensa botánica durante 1 mes. Posteriormente se procedió a hacer cortes transversales a mano alzada al centro de la lámina, del pecíolo y la raíz con cuchillas de micrótopo desechable de perfil alto Leica 818. Los cortes de las láminas de las 12 especies y del pecíolo envainado de *Trasdescantia fluminensis* se hicieron en forma de rectángulo con medidas de 0.8 mm x 3 mm aproximadamente. Los cortes de los pecíolos de las 12 especies y de las raíces en el caso de *Paphiopedilum insigne* y *Phalaenopsis* Sogo Diana 'Sophie' se hicieron de 0.5 a 1 mm de espesor. Los cortes se colocaron y orientaron en una cinta conductiva de carbón de doble cara sobre un portamuestras de aluminio. Posteriormente, se cubrieron con una fina capa de oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM5310-LV a 15kV.

El segundo método consistió en hacer cortes transversales a mano alzada en muestras frescas de los órganos bajo estudio; estos cortes se fijaron en etanol al 70% durante 72 horas y se deshidrataron en una serie gradual creciente de etanol, al 85% y 96% durante 30 min en cada uno y al 100% hasta el desecado del material 17 h después. Se desecaron a punto crítico de CO₂ en una desecadora CPD-030 Baltek. Posteriormente se colocaron y orientaron en una cinta conductiva de carbón de doble cara sobre un portamuestras de

aluminio, se cubrieron con una fina capa de oro en una ionizadora Denton Vacuum Desk II y se observaron en un microscopio electrónico de barrido JSM5310-LV a 15kV.

Las fotomicrografías digitales para ambos métodos se obtuvieron utilizando el programa Jeol Orion 5310.

Resultados

La presencia de cristales de oxalato de calcio intracelulares ocurrió en todos los órganos analizados de todas las especies, en *Eriobotrya japonica* también se hallaron cristales extracelulares. Los idioblastos de todas las especies presentaron sólo un cristal por idioblasto a excepción de *Tradescantia fluminensis* que presentó idioblastos dúplex con dos cristales diferentes por idioblasto. El cuadro 2 muestra el tipo de cristal hallado en cada órgano de cada especie en microscopía fotónica (MF) y electrónica de barrido (MEB).

Inicialmente para cada especie se hizo una comparación de las diferentes técnicas de microscopía, lo que sirvió de base para describir la morfología de los cristales de oxalato de calcio tanto en la lámina foliar como en el pecíolo o en la raíz, en su caso. Dichas láminas y su descripción se pueden consultar en el Anexo II.

A continuación se muestra la descripción y la lámina que ejemplifica dicha comparación:

Schefflera actinophylla

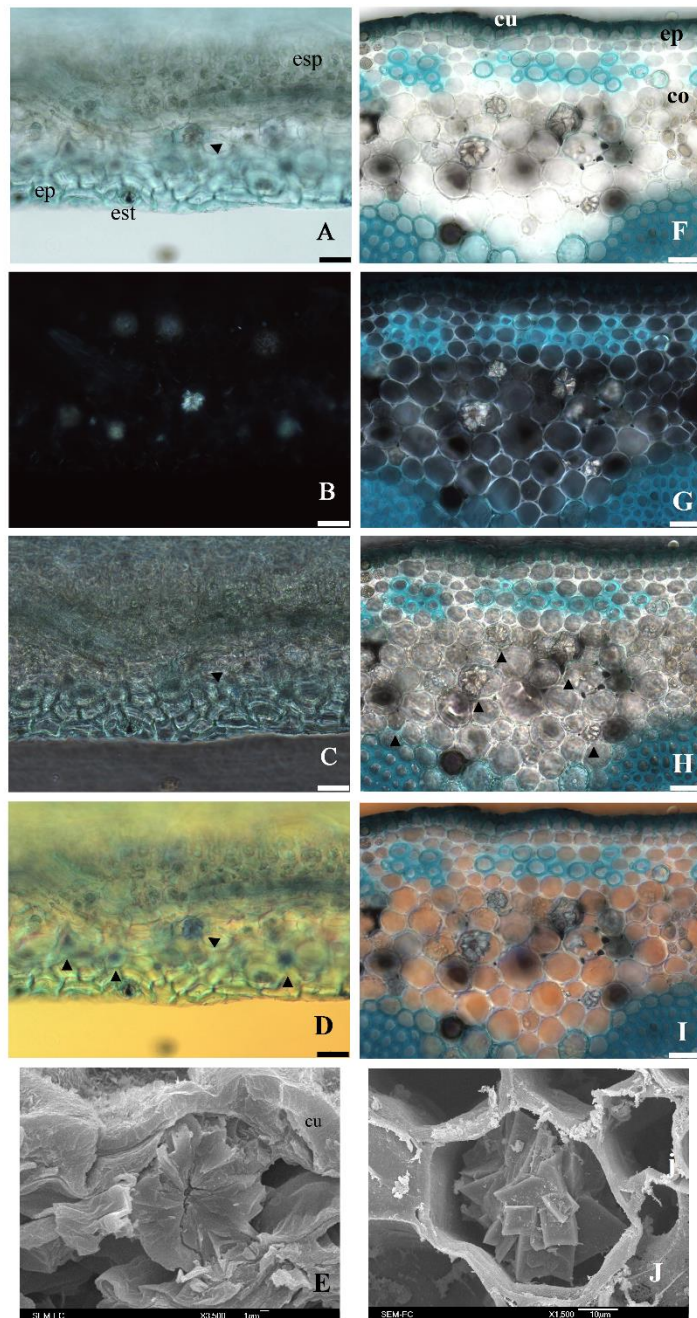
En la lámina foliar y el pecíolo (Figura 2) con microscopía fotónica (MF) de campo claro se observaron drusas de diferentes tamaños, éstas se apreciaron como cristales agregados con núcleo opaco y protuberancias radiales puntiagudas transparentes (Figura 2-A, F); estos cristales se encontraron en idioblastos distribuidos en el mesófilo de la lámina foliar y en el parénquima del córtex del pecíolo. Con luz polarizada la birrefringencia de las drusas se hizo muy evidente, lo cual permitió que éstas resaltaran en ambos tejidos (Figura 2-B, G). La observación de las drusas en contraste de fases fue difícil pues sólo se distinguieron drusas grandes, las pequeñas se perdieron en el contraste de ambos tejidos (Figura 2-C, H). En microscopía de contraste diferencial de interferencia las drusas en la lámina foliar se

Especie	Tejido vegetal	Morfología del cristal										
		Prisma		Estiloideo		Rafidios		Drusa		Arena		
		MF	MEB	MF	MEB	MF	MEB	MF	MEB	MF	MEB	
<i>Beta vulgaris</i>	Lámina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Pecíolo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bougainvillea spectabilis</i>	Lámina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Pecíolo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Brugmansia candida</i>	Lámina	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Pecíolo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Citrus limon</i>	Lámina	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pecíolo	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eriobotrya japonica</i>	Lámina	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Pecíolo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Lycopersicum esculatum</i>	Lámina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Pecíolo	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>Paphyopedilum insigne</i>	Lámina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Pecíolo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'</i>	Lámina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Pecíolo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Phytolacca rugosa</i>	Lámina	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Pecíolo	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	Lámina	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Pecíolo	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Schefflera actinophylla</i>	Lámina	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Raíz	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Tradescatia fluminensis</i>	Lámina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	Raíz	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Cuadro 2 .Morfología de cristales de oxalato de calcio observados en lámina foliar y pecíolo o raíz en MF y MEB, + presencia, - ausencia, + cristales extracelulares.

observaron en tono azul, con relieve de las protuberancias y el núcleo opaco (Figura 2-D), en el pecíolo las drusas se observaron con las mismas características pero ligeramente marrones (Figura 2-I). Con MEB en el mesófilo de la lámina foliar se observaron drusas fracturadas con una apariencia de prismas conglomerados en forma de estrella y bordes angulosos debajo de lo que corresponde a la epidermis (Figura 2-E); en el pecíolo se observaron drusas completas de diferentes tamaños dentro de idioblastos, como agregados relativamente esféricos formados por cristales prismáticos de bordes angulosos (Figura 2-J).

Figura 2. Secciones transversales de la lámina foliar (A-E) y pecíolo (F-J) de *Schefflera actinophylla*, MF (A-D, F-I), MEB (E, J). (A-D) Drusas distribuidas en el mesófilo de la lámina. (F-I) Drusas distribuidas en el parénquima del córtex del pecíolo. (A, F) Campo claro. (B, G) Drusas birrefringentes en luz polarizada. (C, H) contraste de fases. (D, I) Drusas en contraste diferencial de interferencia. (E) Drusa relativamente esférica, fracturada, debajo de epidermis. (J) Drusa dentro de idioblasto en el córtex del pecíolo, formada por cristales prismáticos de bordes rectos. Cabezas de flecha indican cristales. (**ep**-epidermis, **esp**-parénquima esponjoso **est**-estoma, **co**-córtex, **cu**-cutícula,). Escala A-D, F-I 40µm; E 1µm; J 20 µm.



Con fundamento en los resultados obtenidos para cada especie, se procedió a hacer el análisis comparativo de la morfología de los cristales hallados con cada una de las técnicas de microscopía.

Microscopía fotónica de campo claro

En microscopía fotónica de campo claro para los cristales de oxalato de calcio en los tejidos de lámina foliar (Figura 3), pecíolo y raíz (Figura 4), se pudo identificar preliminarmente la morfología, tamaño y localización de los cristales (Figuras 3-A- I, K-P; 4) si se encontraban dentro del idioblasto o eran extracelulares (Figura 3-E; 4-B, G). Todos los cristales contrastaron en el tejido teñido, aunque en los tejidos poco teñidos los cristales fueron difíciles de ver (Figura 4-E, M). Los cristales agrupados como arenas, rafidios y cristales grandes como primaticos, drusas y estiloideos, contrastaban en el tejido, independientemente del grosor de éste (Figuras 3-B-I, L-P; 4-A-I, K, N-Q); por otro lado la observación de arenas aisladas y rafidios, drusas y cristales prismáticos pequeños (<10 μm), era difícil (Figuras 3-A, J, K; 4-J, L, M). Con el manejo del tornillo micrométrico en el microscopio se pudieron diferenciar cristales aciculares individuales en los rafidios (Figuras 3-L-N; 4-M-Q) y sus lados en sección transversal (Figura 3-P). Este sistema de iluminación también permitió observar el núcleo de las drusas (Figuras 3-A-F, 4- A-D, G, H), la disposición de los rafidios dentro del idioblasto (Figura 3-K-N; 4-N, P, Q) y la presencia de idioblastos dúplex en *Tradescantia fluminensis* (Figura 3-A, K).

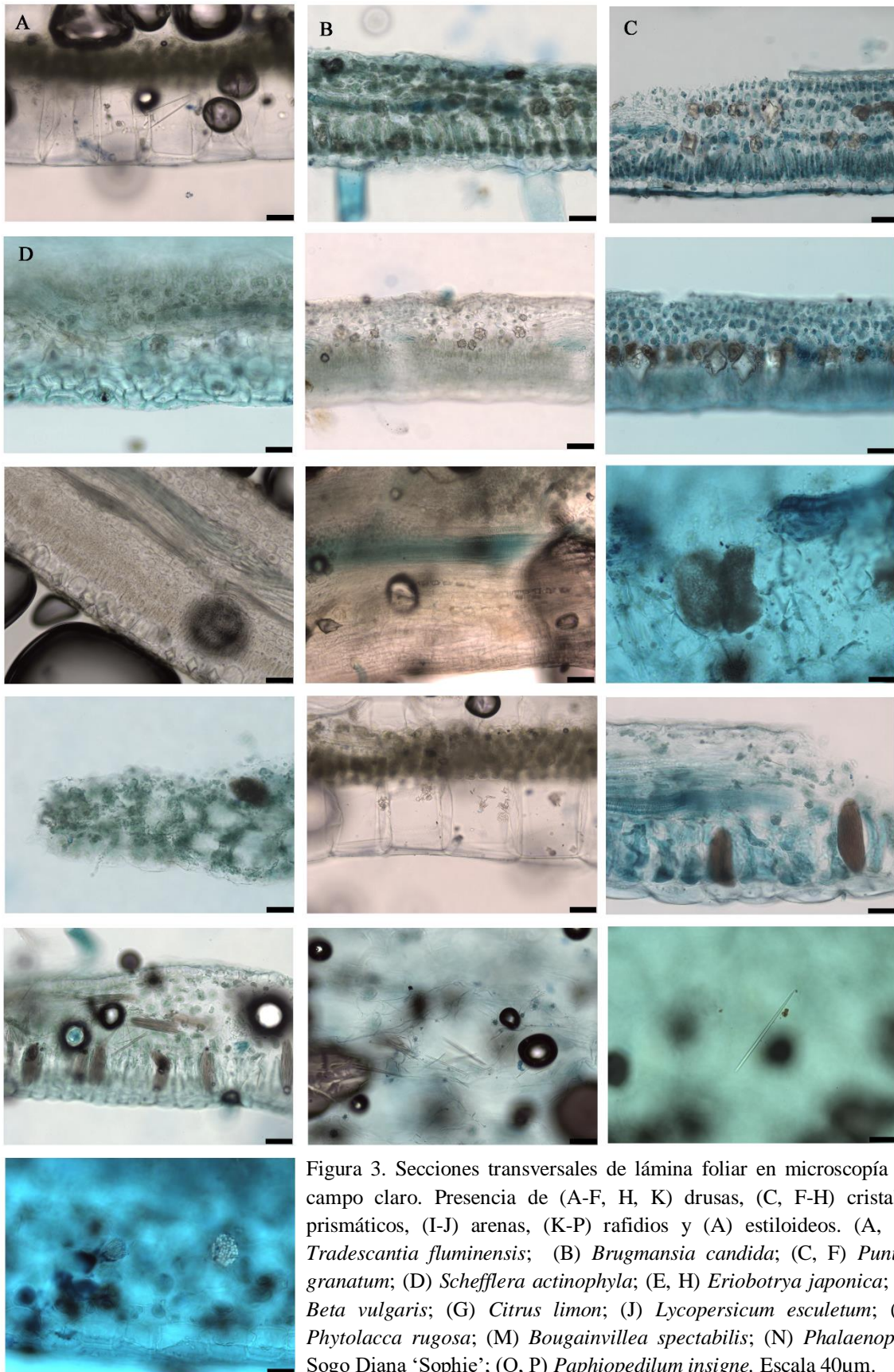


Figura 3. Secciones transversales de lámina foliar en microscopía de campo claro. Presencia de (A-F, H, K) drusas, (C, F-H) cristales prismáticos, (I-J) arenas, (K-P) rafidios y (A) estiloideos. (A, K) *Tradescantia fluminensis*; (B) *Brugmansia candida*; (C, F) *Punica granatum*; (D) *Schefflera actinophylla*; (E, H) *Eriobotrya japonica*; (I) *Beta vulgaris*; (G) *Citrus limon*; (J) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (N) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (O, P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

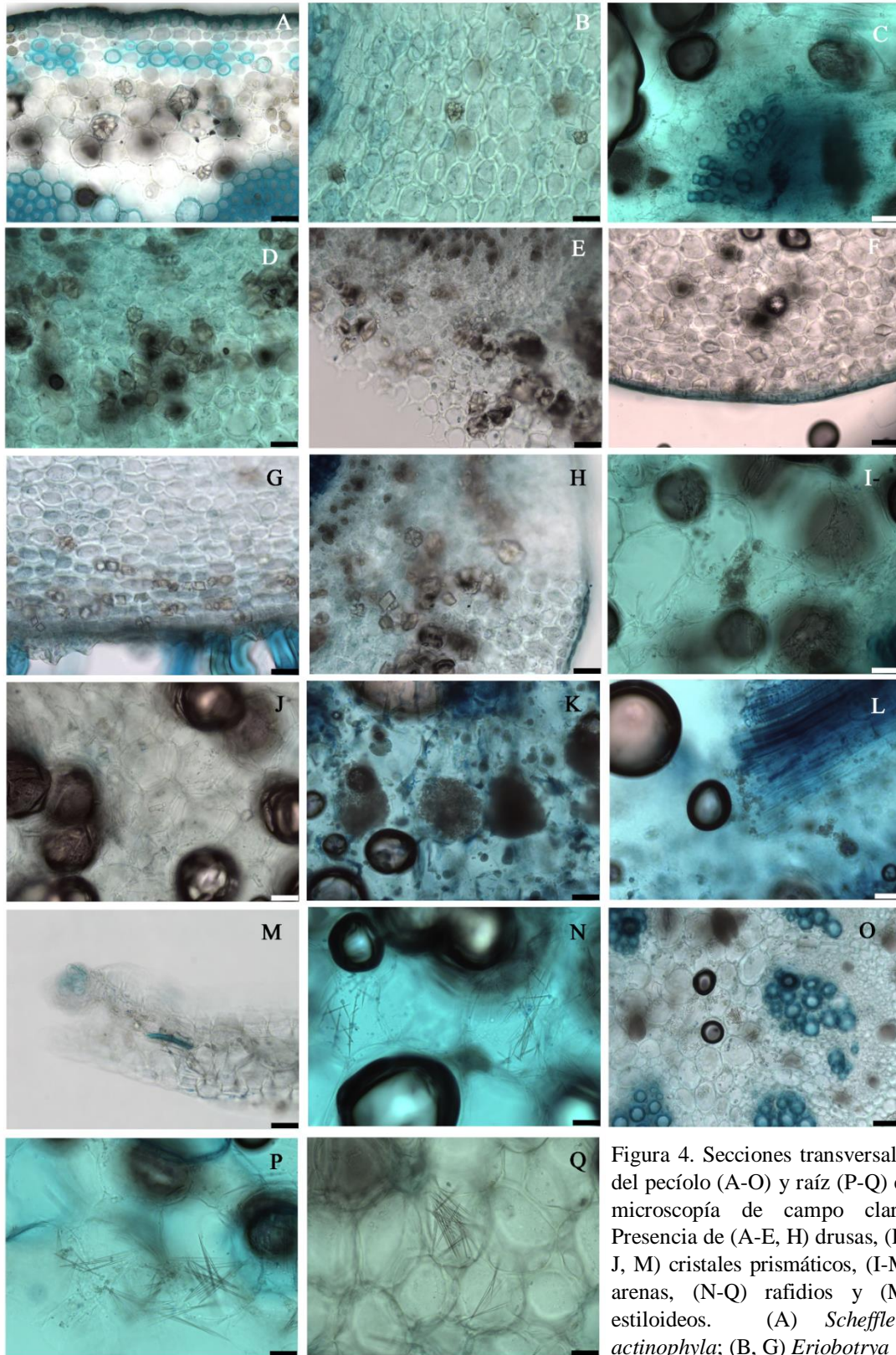
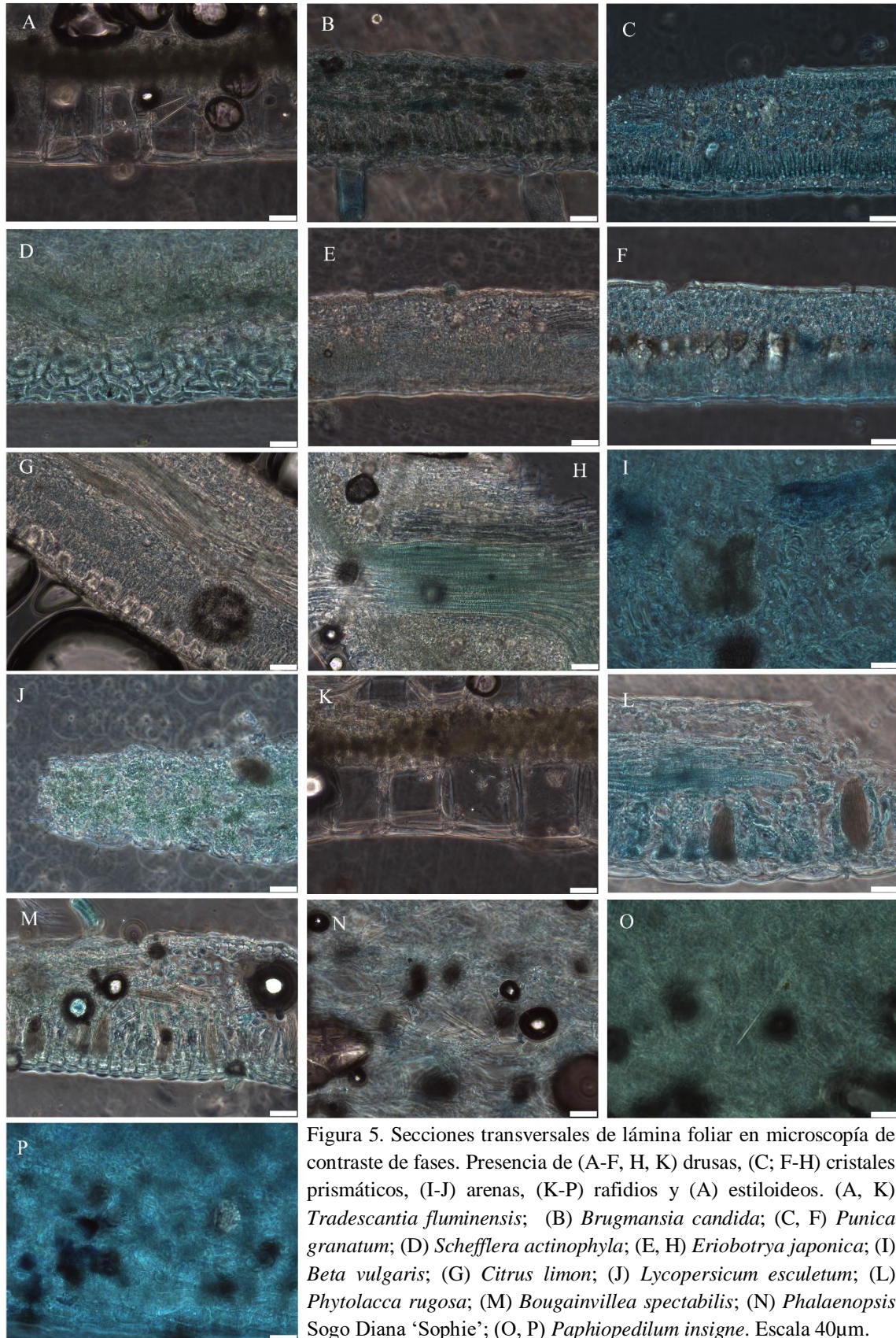


Figura 4. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de campo claro. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (N-Q) rafidios y (M) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya*

japónica; (C, I) *Lycopersicon esculentum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M) *Tradescantia fluminensis*; (N) *Phytolacca rugosa*; (O) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis* Sogo Diana 'Sophie'; (P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

Microscopía fotónica de contraste de fases

En microscopía fotónica de contraste de fases en los tres tejidos, la morfología de los cristales y los idioblastos se diferenciaban sólo si el corte era delgado, limpio, y con escasa tinción (Figuras 5-A, K, L, M; 6-A, B, D, E, H, O, Q). Los cristales aislados y pequeños dentro del tejido teñido fueron difícilmente visibles (Figuras 5-J; 6-C, I, J, L-O), en cambio los cristales individuales agrupados de arenas, rafidios y grandes, como cristales prismáticos, estiloideos y drusas, contrastaban lo suficiente para identificar su morfología (Figuras 5-C, F,G, I, K, M, O, P; 6- A, B, D-H, K, P, Q) sin embargo observar detalles como los bordes de los prismas en drusas y de cristales prismáticos, se dificultaba (Figuras 5- B-H, K; 6- D, F, G) al igual que la forma de cristales individuales en las arenas (Figuras 5-I, J; 6- I-M) y extremos y longitudes de los rafidios (Figura 5-L-O, 6-M-Q). Por el contrario los núcleos de las drusas sí eran visibles (Figura 5 A-F, H; 6-A-D; G,H). La tinción del tejido ocasionaba un alto contraste y opacaba el cristal ocultándolo (Figura 5-B-D; 6-L, N, P), En los cortes gruesos, los cristales eran difícilmente visibles (Figuras 5-B, D, H; 6-F, G). Los halos de luz en algunos cristales interferían con la observación de su morfología (Figuras 5-G, K; 6-F, I) y los artefactos como burbujas de aire en la preparación o sustancias internas de las células dificultaban su observación ya que los ocultaban (Figura 6-I-K, N).



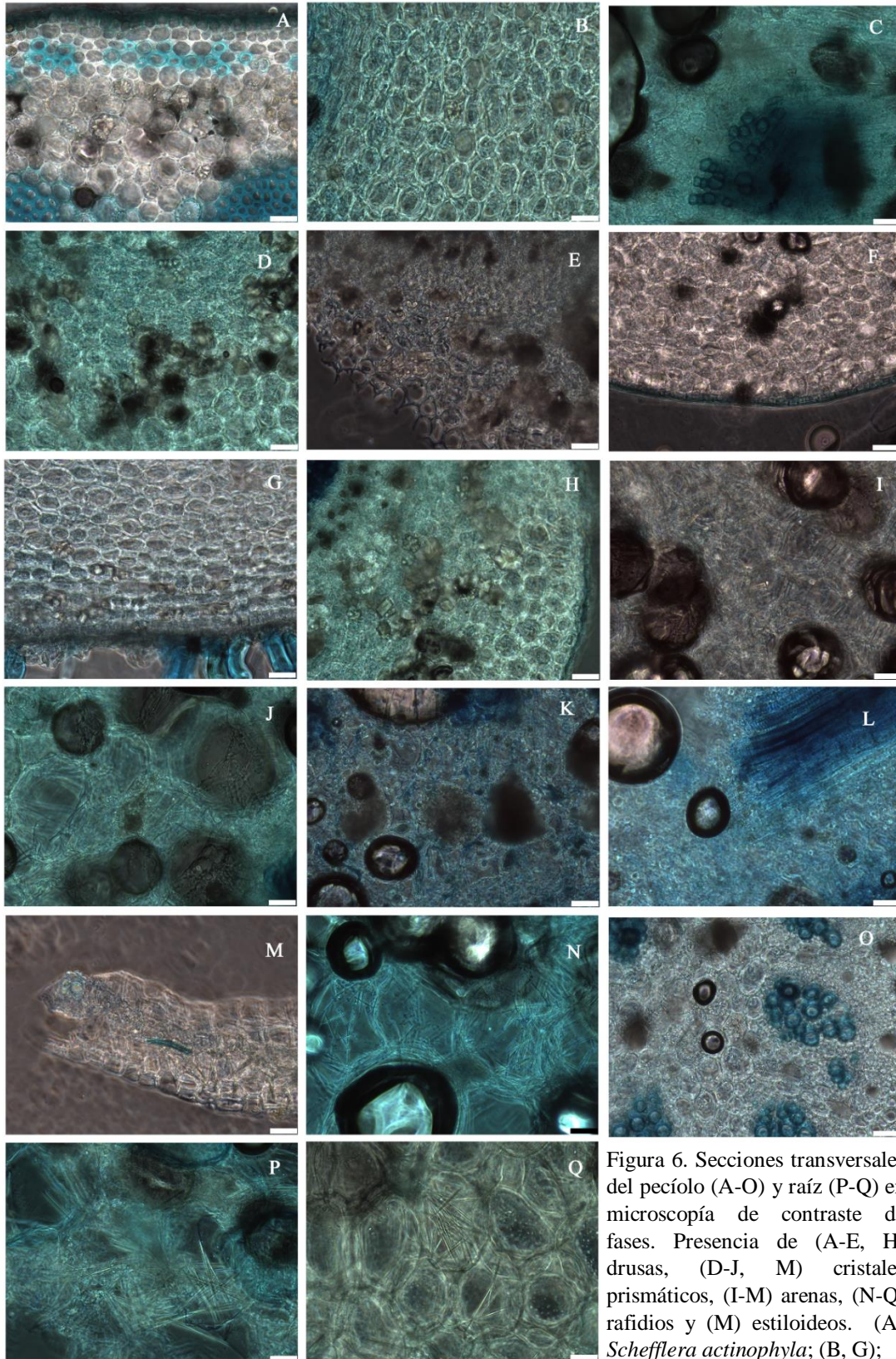
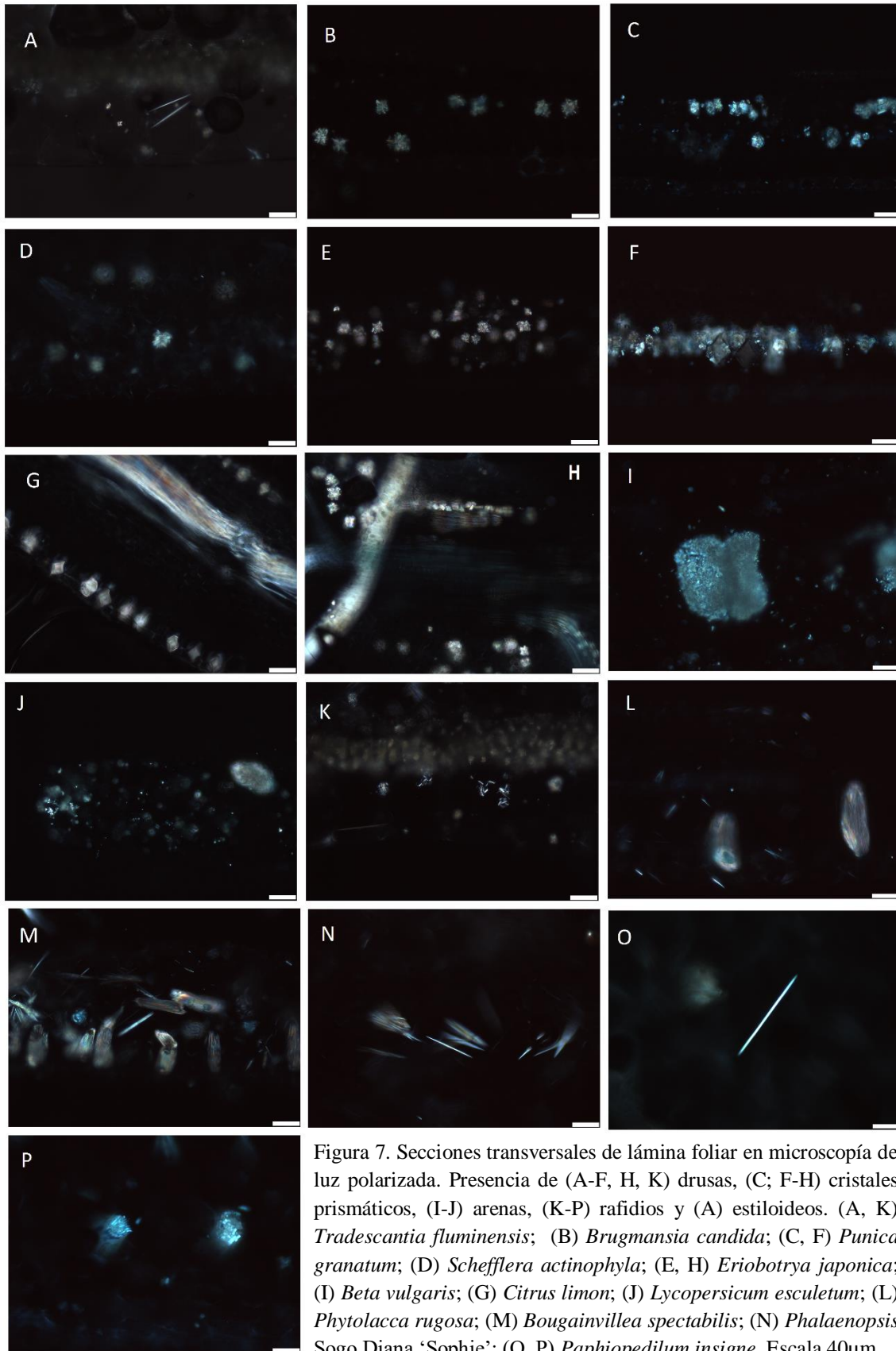


Figura 6. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de contraste de fases. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (N-Q) rafidios y (M) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G); *Eriobotrya japonica*; (C, I) *Lycopersicon esculentum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M) *Tradescantia fluminensis*; (N) *Phytolacca rugosa*; (O) *Bougainvillea spectabilis*; (P) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (Q) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

Microscopía de luz polarizada

En microscopía de luz polarizada se evidenció la presencia de cristales de oxalato de calcio y su morfología con mayor claridad, estos cristales brillaban en un fondo negro debido a que todos mostraron birrefringencia (Figuras 7; 8). Gracias a la birrefringencia se pudo observar la forma de los bordes de las protuberancias de las drusas (puntiagudas o redondeadas; Figuras 7-A-F, H; 8-A-E, G, H); en los cristales prismáticos se pudieron observar sus caras y su orientación (Figuras 7-F-H; 8-D-I, N) y en algunas especies, patrones de distribución de los cristales prismáticos en la epidermis y paralelos a los haces vasculares del tejido en la lámina foliar (Figuras, 7-G, H). La birrefringencia de los cristales aciculares individuales de rafidios y estiloideos permitió observar su longitud, características de sus extremos (puntiagudos o redondeados), orientación dentro del idioblasto (Figuras 7-A, L-O; 8-N-R) y lados en sección transversal (Figura 7-P). La birrefringencia de las arenas permitió visualizar detalles de su forma (Figura 7-I, J; 8-I, J, L). Los artefactos de la preparación como burbujas de aire y sustancias internas de las células, no intervinieron al identificar la presencia de cristales de oxalato de calcio y su morfología. Además, en algunas especies se pudo observar birrefringente la pared del idioblasto en el parénquima del córtex del pecíolo (Figuras 8-A, D, G, I, J, O, P, R) permitiendo saber si se trataba de cristales intra o extracelulares.



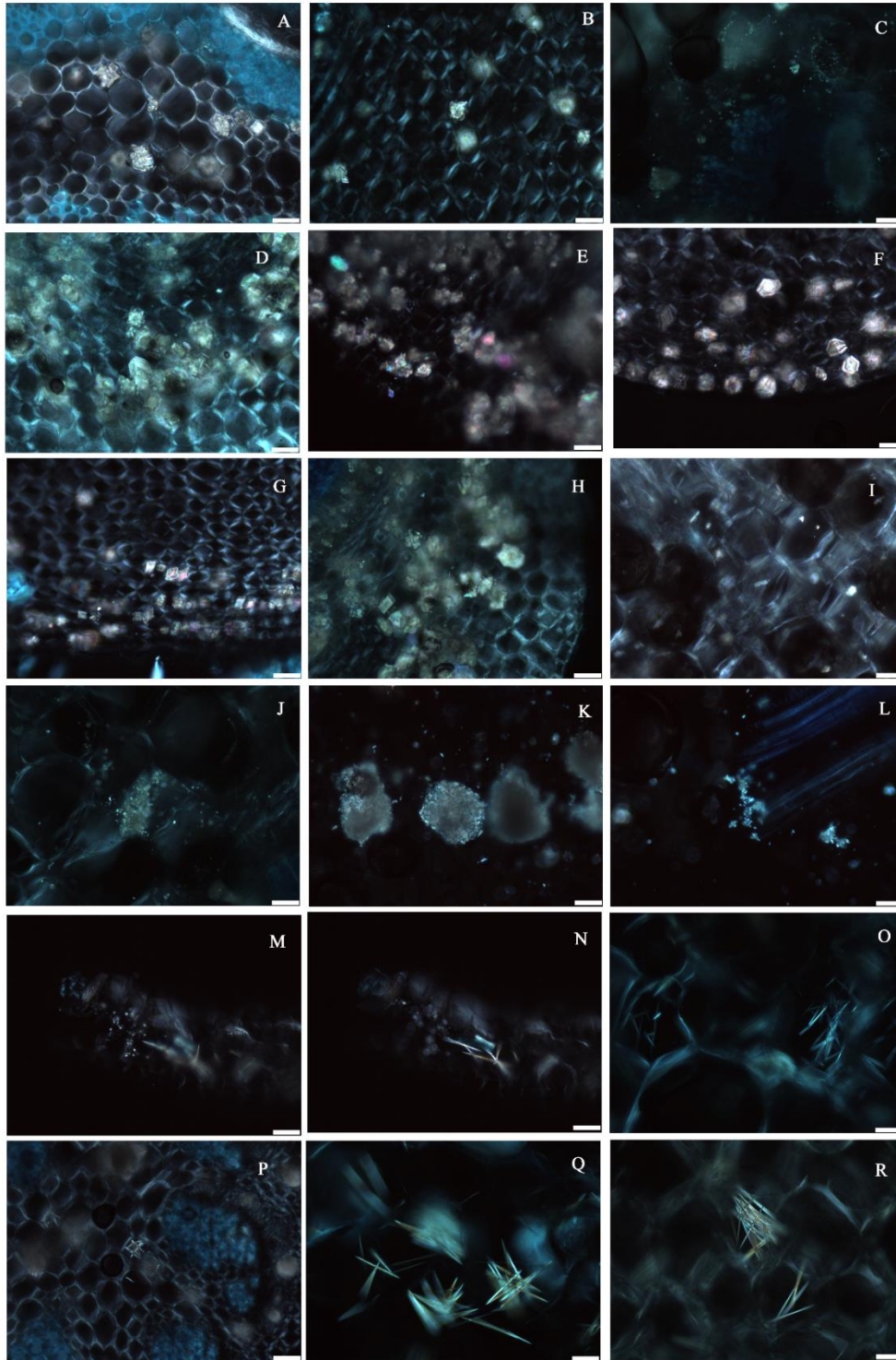


Figura 8. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de luz polarizada. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (M-R) rafidios y (N) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya japónica*; (C, I) *Lycopersicum esculentum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M-N) *Tradescantia fluminensis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (P) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (R) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

Microscopía de contraste diferencial de interferencia (CDI)

En microscopía fotónica de contraste diferencial de interferencia, la morfología, tamaño, localización y relieve de los cristales de oxalato de calcio en los tejidos de la lámina, pecíolo y raíz fueron claramente visibles, gracias al contraste que tienen los cristales con el fondo y con el resto del tejido (Figuras 9-16). Todos los cristales se tornaron de diferentes colores en diferentes fondos de interferencia (azules, grises, marrones, lilas y verdes) esto hizo que contrastaran no sólo con el fondo sino con el tejido teñido a su alrededor y con sus propios idioblastos (Figuras 9, 11, 13, 15-A-C, G, K-N, P; 10, 12, 14, 16-A, E, F, H-K, O-R). Todos estos cristales fueron altamente contrastantes independientemente de si el corte era delgado (Figuras 9, 11, 13, 15-A, C, E, K-N; 10, 12, 14, 16, B-E, H, J, M-R) o grueso (Figuras 9, 11, 13, 15-D, F, G, H, P; 10, 12, 14, 16-F, G), de si los cristales estaban en conjunto (Figuras 9, 11, 13, 15-F, I-M; 10, 12, 14, 16-I, K, P) o separados (Figuras 9, 11, 13, 15-J; 10, 12, 14, 16-J, L-N), o si eran grandes o pequeños. Los cristales individuales en conjuntos de arenas y rafidios en la lámina foliar, no cambiaron de color y se observaron semejantes a como se observaron en campo claro o contraste de fases (Figuras 9, 11, 13, 15-I, L, M, P). Todos los cristales mostraron relieve debido a las altas luces y sombras que se observaban en los cristales, gracias a ello se pudieron observar las protuberancias y bordes de las drusas (Figuras 9, 11, 13, 15-A-F; 10, 12, 14, 16- A-E, G, H) los bordes y orientación de los cristales prismáticos (Figuras 9, 11, 13, 15-C, F-H; 10, 12, 14, 16- F-H, J), los bordes de los cristales individuales de las arenas (Figuras 9, 11, 13, 15-J; 10, 12, 14, 16-I, J, L) y para los cristales aciculares de los rafidios y estiloideos se detallaban los límites en su longitud y características de sus extremos (puntiagudos o redondeados, Figuras 9, 11, 13, 15-A, K-O; 10, 12, 14, 16-N-R). En los fondos de interferencia morado y dorado de los tres tejidos observados (Figuras 13-16), algunos rafidios y estiloideos (13, 15-A, K-N; 14, 16-N, Q, R), drusas (13, 15-A; 14, 16-E, H), y cristales prismáticos (13, 15-G; 14, 16-F) mostraron una ligera birrefringencia, sin embargo esta birrefringencia no resultó ser un obstáculo para la observación de la morfología de los cristales. Por otro lado cuando el tejido teñido se asemejaba al color del cristal la observación se dificultaba (Figuras 9-B; 10, 12, 14, 16-C; 11-B, J).

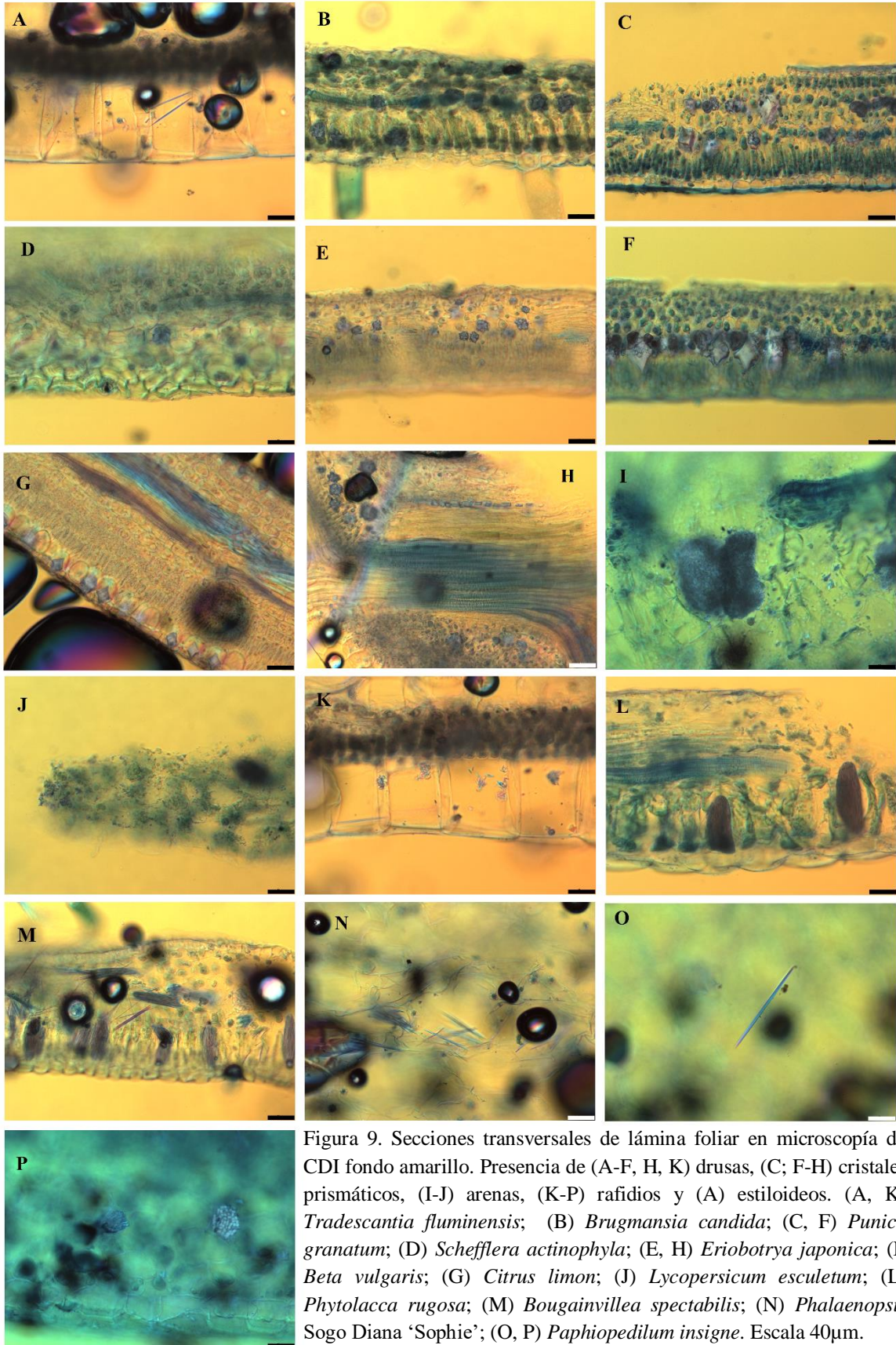


Figura 9. Secciones transversales de lámina foliar en microscopía de CDI fondo amarillo. Presencia de (A-F, H, K) drusas, (C; F-H) cristales prismáticos, (I-J) arenas, (K-P) rafidios y (A) estiloideos. (A, K) *Tradescantia fluminensis*; (B) *Brugmansia candida*; (C, F) *Punica granatum*; (D) *Schefflera actinophylla*; (E, H) *Eriobotrya japonica*; (I) *Beta vulgaris*; (G) *Citrus limon*; (J) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (N) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (O, P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

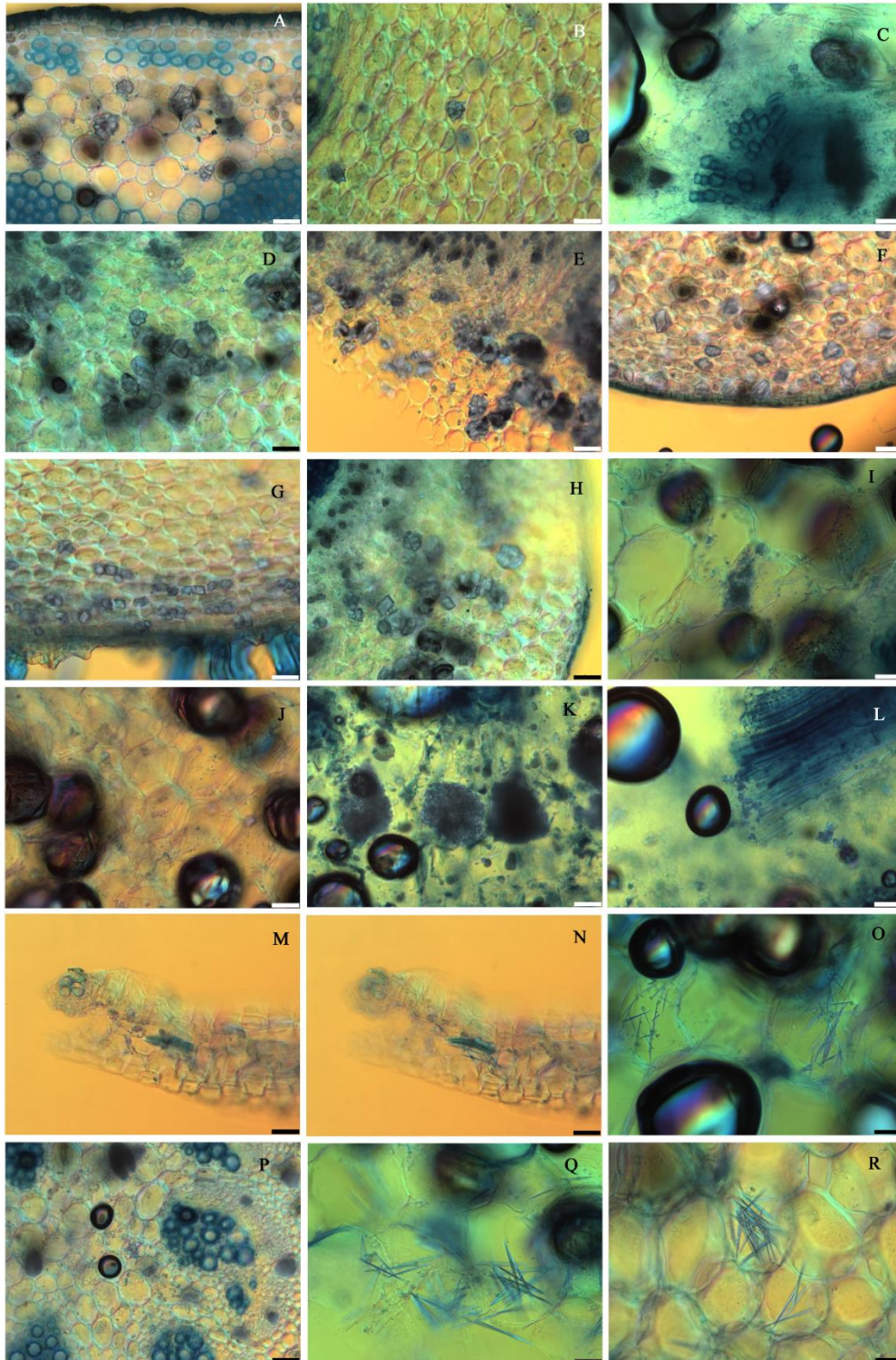


Figura 10. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de CDI fondo amarillo. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (M-R) rafidios y (N) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya japónica*; (C, I) *Lycopersicum esculentum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M-N) *Tradescantia fluminensis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (P) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis* Sogo Diana ‘Sophie’; (R) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

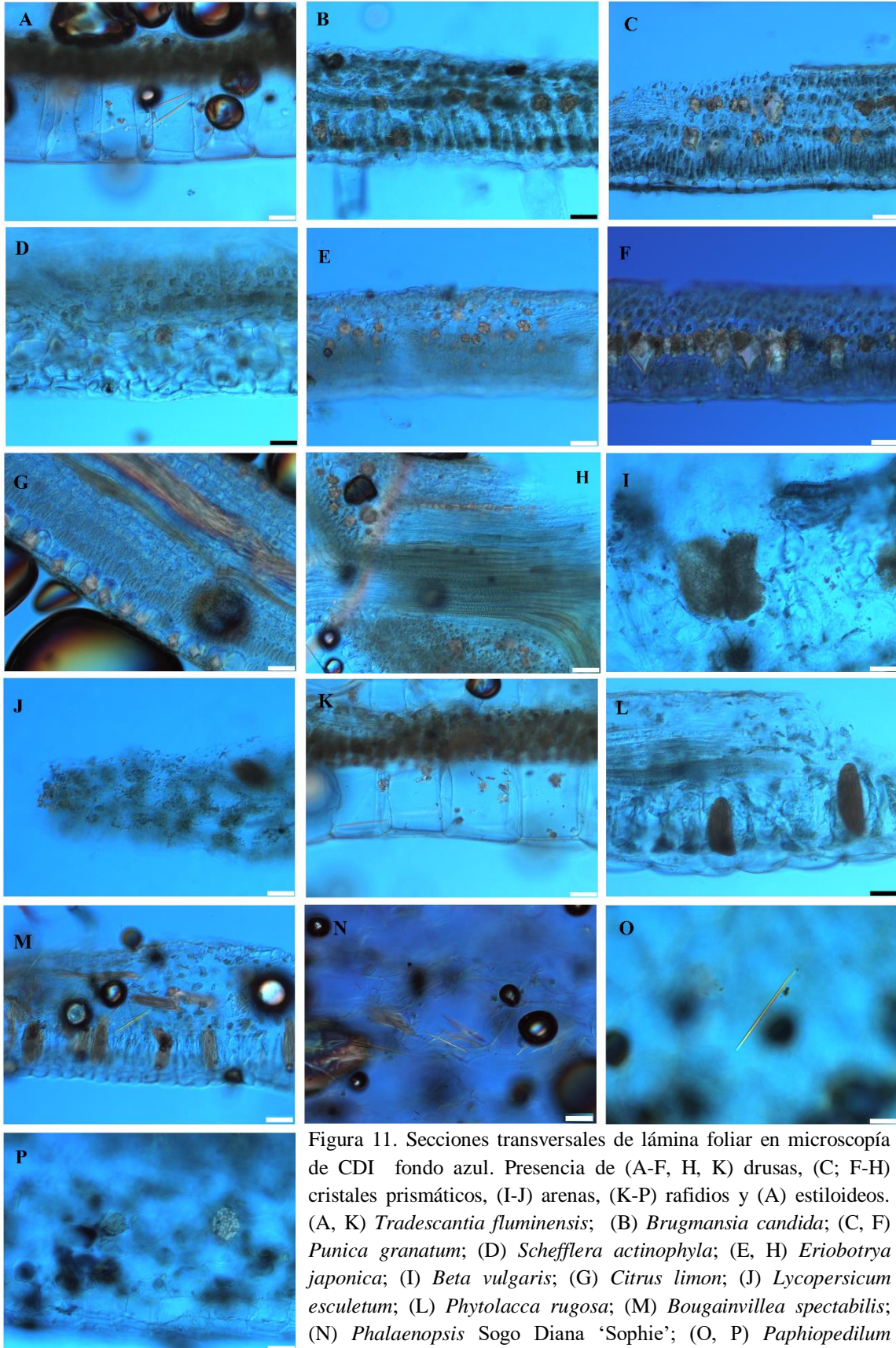


Figura 11. Secciones transversales de lámina foliar en microscopía de CDI fondo azul. Presencia de (A-F, H, K) drusas, (C; F-H) cristales prismáticos, (I-J) arenas, (K-P) rafidios y (A) estiloideos. (A, K) *Tradescantia fluminensis*; (B) *Brugmansia candida*; (C, F) *Punica granatum*; (D) *Schefflera actinophylla*; (E, H) *Eriobotrya japonica*; (I) *Beta vulgaris*; (G) *Citrus limon*; (J) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (N) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (O, P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

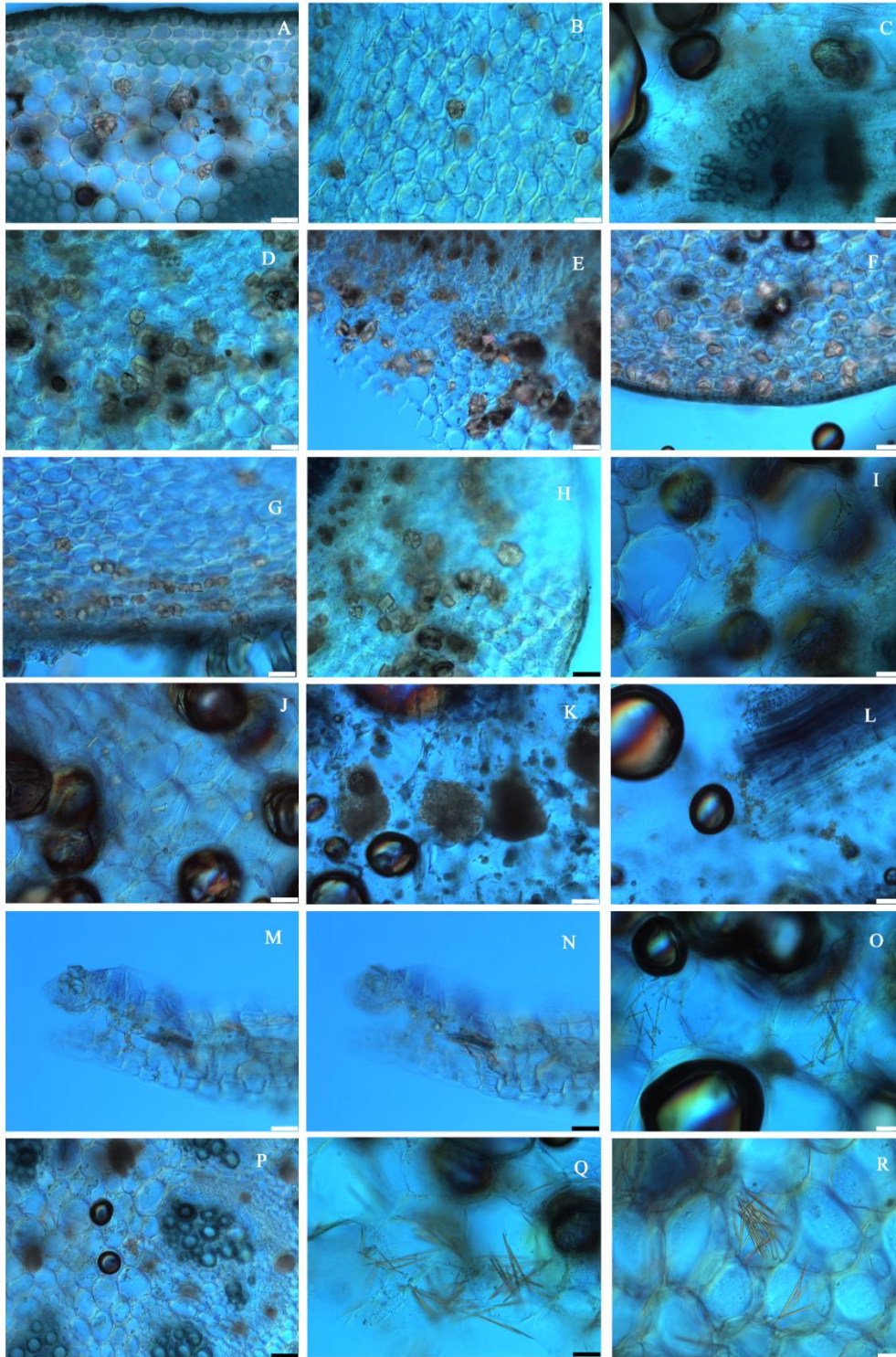


Figura 12. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de CDI fondo azul. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (M-R) rafidios y (N) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya japónica*; (C, I) *Lycopersicum esculentum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M-N) *Tradescantia fluminensis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (P) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (R) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

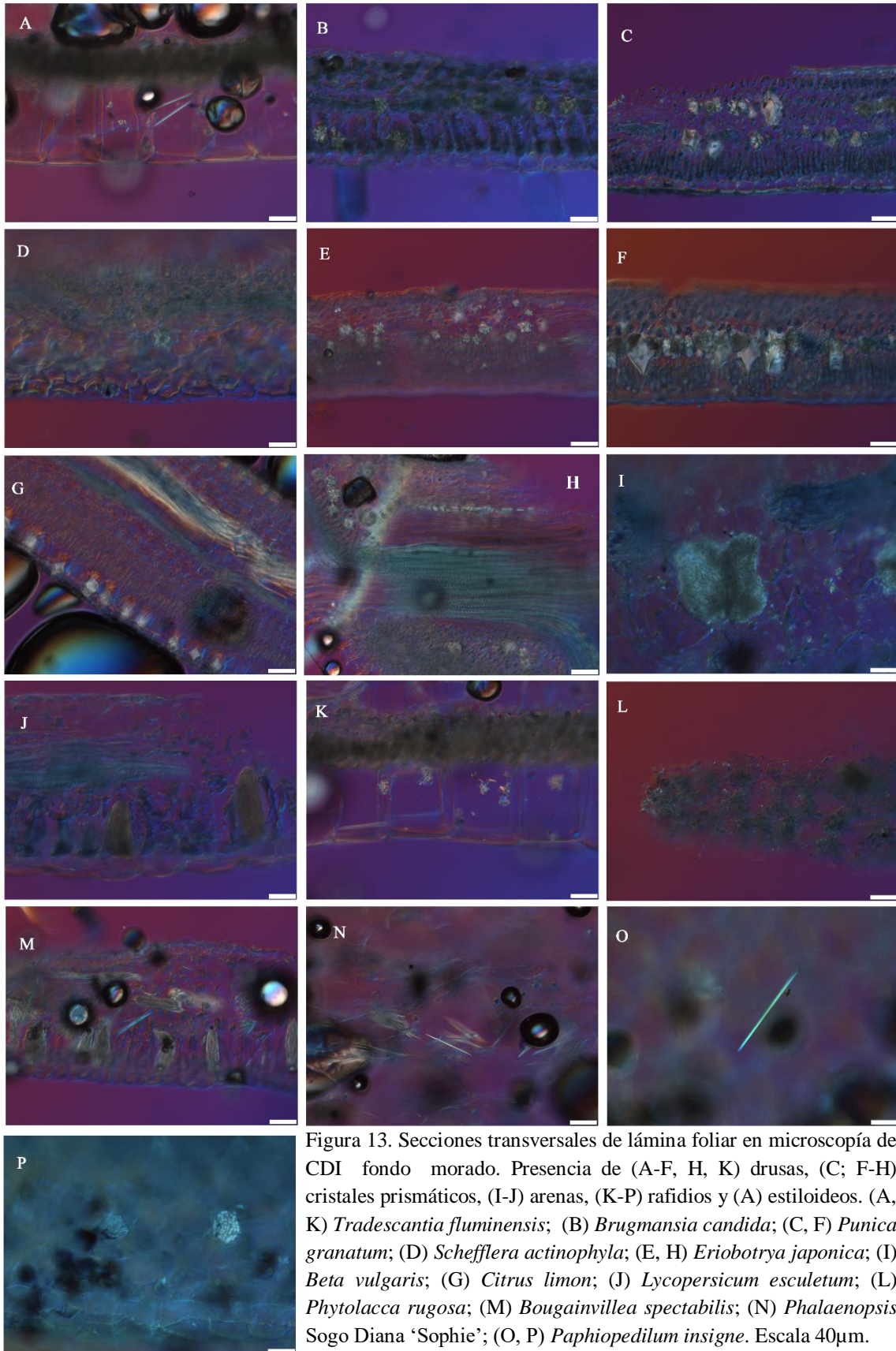


Figura 13. Secciones transversales de lámina foliar en microscopía de CDI fondo morado. Presencia de (A-F, H, K) drusas, (C; F-H) cristales prismáticos, (I-J) arenas, (K-P) rafidios y (A) estiloideos. (A, K) *Tradescantia fluminensis*; (B) *Brugmansia candida*; (C, F) *Punica granatum*; (D) *Schefflera actinophylla*; (E, H) *Eriobotrya japonica*; (I) *Beta vulgaris*; (G) *Citrus limon*; (J) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (N) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (O, P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

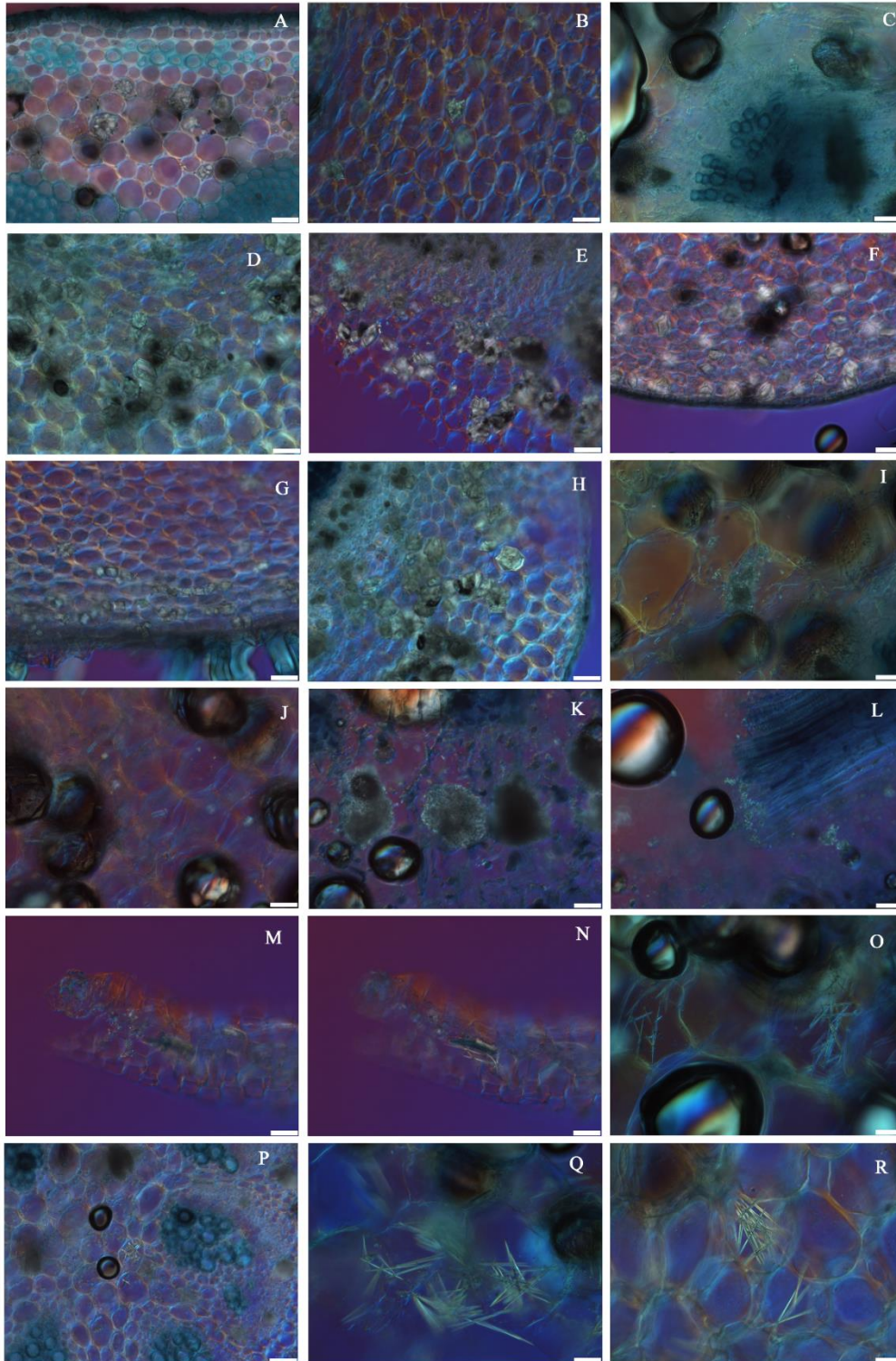


Figura 14. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en microscopía de CDI fondo morado. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (M-R) rafidios y (N) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya japónica*; (C, I) *Lycopersicum esculatum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M-N) *Tradescantia fluminensis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (P) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (R) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

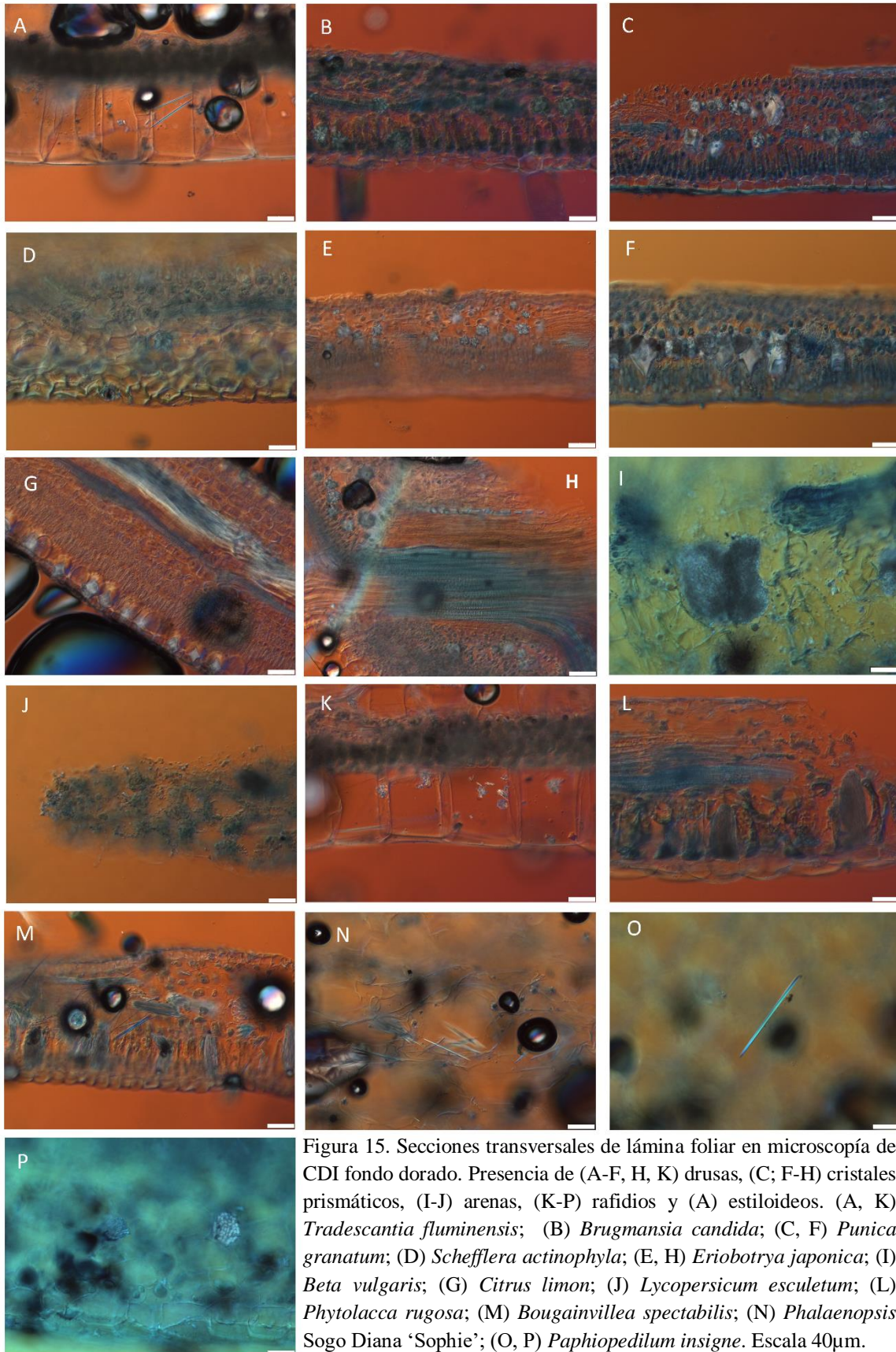


Figura 15. Secciones transversales de lámina foliar en microscopía de CDI fondo dorado. Presencia de (A-F, H, K) drusas, (C; F-H) cristales prismáticos, (I-J) arenas, (K-P) rafidios y (A) estiloideos. (A, K) *Tradescantia fluminensis*; (B) *Brugmansia candida*; (C, F) *Punica granatum*; (D) *Schefflera actinophylla*; (E, H) *Eriobotrya japonica*; (I) *Beta vulgaris*; (G) *Citrus limon*; (J) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (N) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (O, P) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

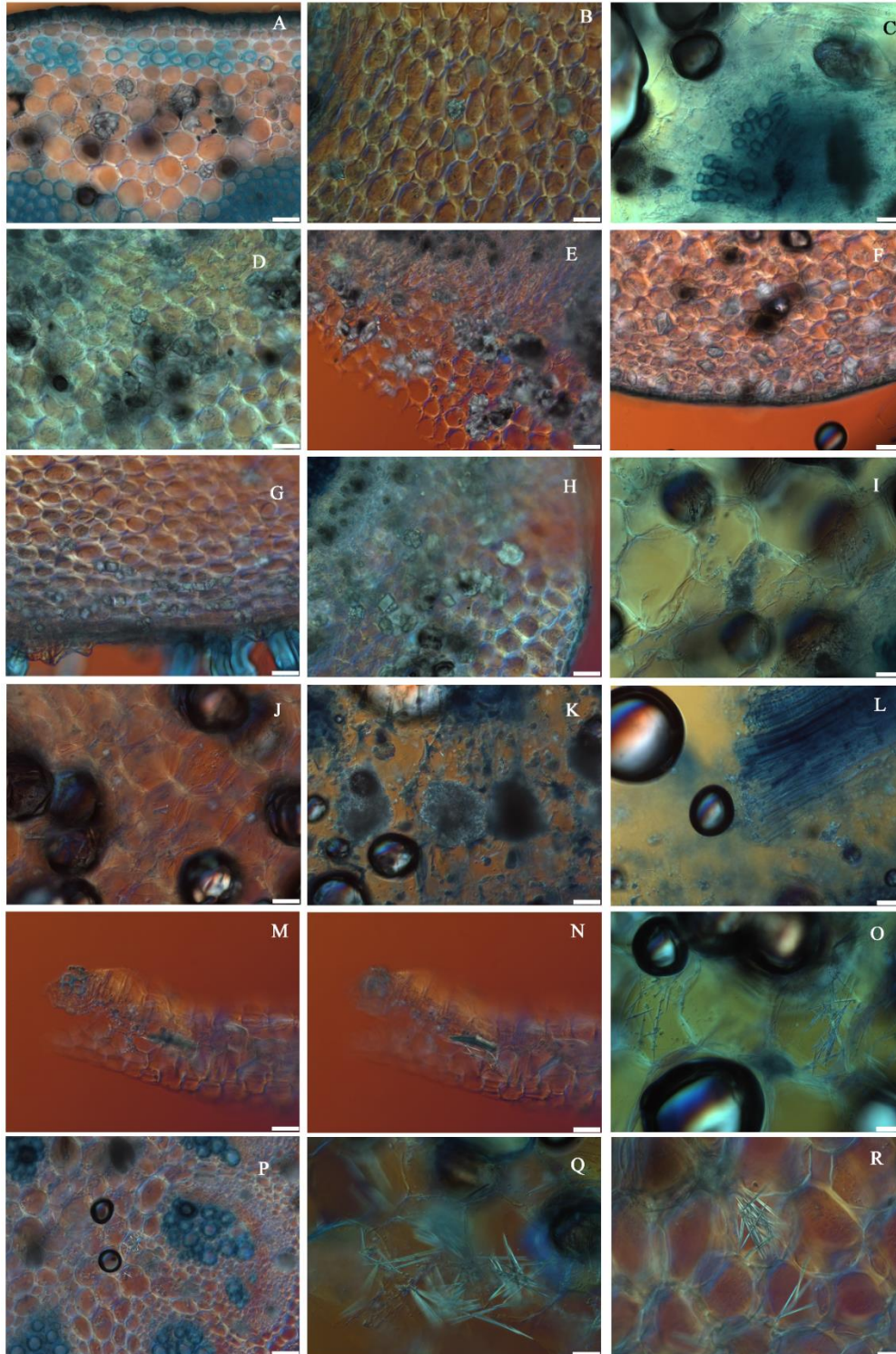


Figura 16. Secciones transversales del pecíolo (A-O) y raíz (P-Q) en CDI fondo dorado. Presencia de (A-E, H) drusas, (D-J, M) cristales prismáticos, (I-M) arenas, (M-R) rafidios y (N) estiloideos. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, G) *Eriobotrya japónica*; (C, I) *Lycopersicum esculatum*; (D, E, H) *Punica granatum*; (G) *Citrus limón*; (J) *Brugmansia candida*; (K, L) *Beta vulgaris*; (M-N) *Tradescantia fluminensis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (P) *Bougainvillea spectabilis*; (Q) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (R) *Paphiopedilum insigne*. Escala 40µm.

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En MEB para los tres órganos ya mencionados se pudo observar la morfología, textura y dimensión de los diferentes cristales hallados (Figuras 17, 18). Se hallaron drusas con dos tipos de morfologías diferentes, la primera como agregados esféricos de cristales prismáticos individuales de bordes angulosos con crecimiento perpendicular hacia el núcleo de la drusa (Figuras 17-A, C-E, 18-A-E) y la segunda se trataba de agregados relativamente esféricos con prolongaciones radiales (Figuras 17-B). En los cristales prismáticos se pudieron ver sus formas poligonales, la forma y superficie de sus caras, sus tamaños, bordes y textura (Figuras 17-E-I; 18-F-H). En las arenas se pudo apreciar la forma, tamaño y textura de cada cristal individual (Figuras 17-J-K; 18-I-K). En los rafidios se pudo observar su textura, la longitud de sus cristales aciculares individuales (Figuras 17-N-Q; 18-N-P), sus extremos (redondeados o puntiagudos, Figuras 17-L-M, O-Q; 18-L-P), sus lados (Figura 18-L) y su disposición dentro del idioblasto (Figuras 17-L, M, P, Q; 18-P). En los estiloideos se pudo apreciar su longitud y la características de sus extremos (redondeados o puntiagudos; Figura 17-N).

En caso de las muestras fijadas y desecadas de material fresco (Figuras 17-A, E-G, I, N-Q; 18-A-F, H, L, O, P) se pudieron observar los idioblastos y la disposición del cristal dentro de éste, la morfología y textura del cristal y su localización en el tejido. En la observación de las muestras secadas con prensa botánica se pudo ver la morfología del cristal, su textura, pocas veces el cristal completo (Figuras 17-B-D, H, J-M; 18-G, I-K, N, M) y algunos idioblastos (Figuras 17-L-M; 18-J).

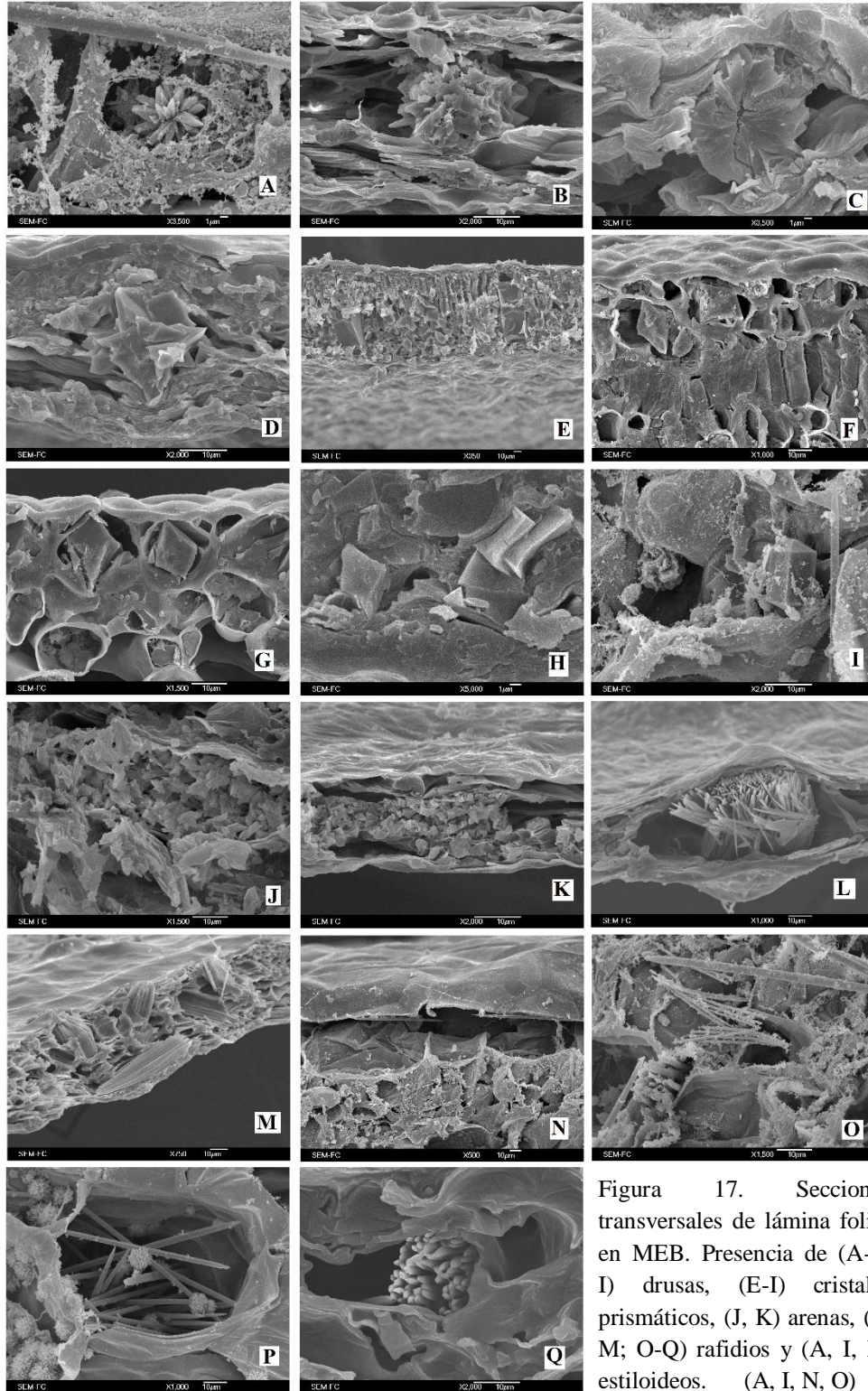


Figura 17. Secciones transversales de lámina foliar en MEB. Presencia de (A-E, I, D) drusas, (E-I) cristales prismáticos, (J, K) arenas, (L, M; O-Q) rafidios y (A, I, N, O) estiloideos. (A, I, N, O)

Tradescantia fluminensis; (B) *Brugmansia candida*; (C) *Schefflera actinophylla*; (D, H) *Eriobotrya japonica*; (E) *Punica granatum*; (F, G) *Citrus limon*; (J) *Beta vulgaris*; (K) *Lycopersicon esculentum*; (L) *Phytolacca rugosa*; (M) *Bougainvillea spectabilis*; (P) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (Q) *Paphiopedilum insigne*.

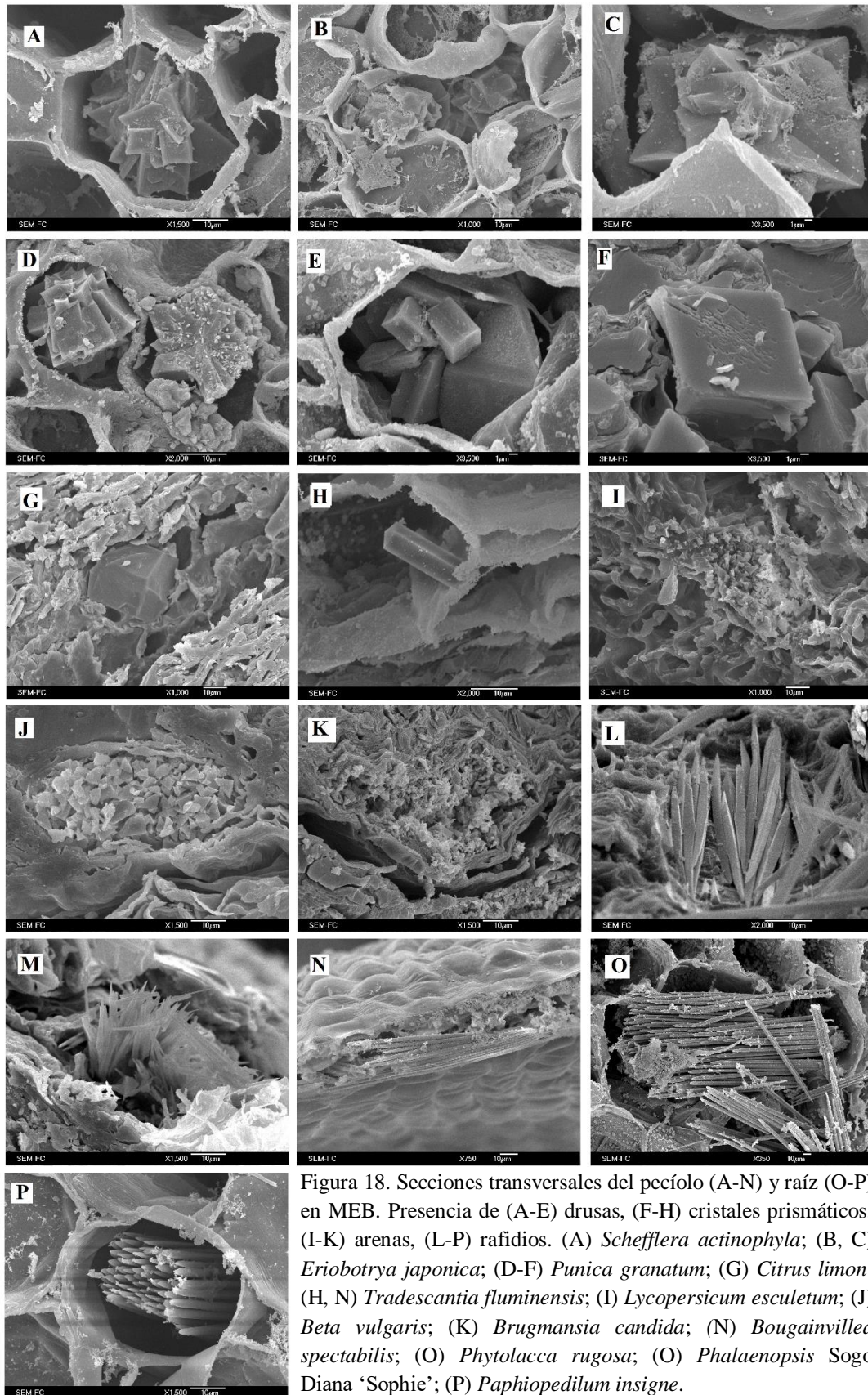


Figura 18. Secciones transversales del pecíolo (A-N) y raíz (O-P) en MEB. Presencia de (A-E) drusas, (F-H) cristales prismáticos, (I-K) arenas, (L-P) rafidios. (A) *Schefflera actinophylla*; (B, C) *Eriobotrya japonica*; (D-F) *Punica granatum*; (G) *Citrus limon*; (H, N) *Tradescantia fluminensis*; (I) *Lycopersicum esculentum*; (J) *Beta vulgaris*; (K) *Brugmansia candida*; (N) *Bougainvillea spectabilis*; (O) *Phytolacca rugosa*; (O) *Phalaenopsis Sogo Diana 'Sophie'*; (P) *Paphiopedilum insigne*.

Discusión

La biomineralización más distribuida en las plantas son los cristales de oxalato de calcio (Arnott y Pautard, 1970; Franceschi y Horner, 1980; Horner y Wagner, 1992, 1995; Webb, 1999; Franceschi, 2001; Nakata, 2003; Bauer *et al.*, 2011), su identificación en tejidos se puede realizar mediante diversos procedimientos, como histoquímicos, de microscopía fotónica y electrónica, tomográficos (Matsushima *et al.*, 2012), de espectroscopía infrarroja y difracción de rayos X (Franceschi y Horner, 1980; Taniguchi y Harada, 1987). En muchas investigaciones se ha utilizado la microscopía de luz polarizada y la microscopía electrónica de barrido para hacer una observación preliminar de los cristales de oxalato de calcio y definir su morfología (Franceschi y Horner, 1980, Raman *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio muestran que los cristales de oxalato de calcio en tejidos vegetales pueden ser visibles bajo las microscopías aquí empleadas, pero no todas éstas son útiles para la buena observación, identificación y caracterización de la morfología cristales de oxalato de calcio.

Microscopía fotónica de campo claro

La microscopía fotónica de campo claro es usada para la observación de objetos, células y tejidos que al absorber naturalmente la luz visible contrastan con un fondo claro, transmitiendo la amplitud de las ondas de luz y su intensidad (Wayne, 2014). Los cristales de oxalato de calcio han sido observados bajo este sistema de iluminación en múltiples estudios para identificar su morfología de manera preliminar y su distribución en los distintos órganos y tejidos vegetales. Monje y Baran (2002) observaron e identificaron la morfología general de drusas y su abundancia en cactus; Gębura y Winiarczyk (2016) identificaron la morfología general de rafidios, (cristales prismáticos) prismas y drusas, su tamaño, abundancia y su distribución, en los tejidos de órganos vegetativos y reproductivos de *Tinantia anómala* (Commelinaceae); Kuo-Huang *et al.* (2007) observaron la morfología y tamaño de drusas y ubicación de estas dentro de los idioblastos en el mesófilo de hojas de *Peperomia glabella* para definir sus papel; Coté (2009) observó e identificó la morfología de drusas y rafidios en órganos vegetativos y reproductivos de *Dieffenbachia seguine* (Araceae) para definir su rol; con este sistema de iluminación observó la ubicación y

densidad de los cristales en el tejido, midió el diámetro de las drusas, longitud y grosor de rafidios y sus cristales aciculares. Ilarslan *et al.* (1999) observaron morfología y distribución de cristales en semillas y óvulos de *Glycine max* (Leguminosae). Franceschi y Horner (1980) observaron la morfología y describieron la forma de la arena cristalina como depósitos de cristales pequeños tetragonales y la ubicación de los idioblastos en la hojas de *Beta vulgaris*. El empleo de este sistema de iluminación en este estudio, permitió la observación e identificación de la morfología, tamaño y ubicación de las cinco morfológicas básicas de cristales en todos los órganos de las especies analizadas, coincidiendo con las observaciones de los estudios antes mencionados en los que señalan que el sistema de iluminación de campo claro permite realizar una observación de la morfología general y ubicación de los cristales de oxalato de calcio en diversos órganos de las plantas.

Respecto a la observación de cristales intracelulares y extracelulares en este sistema de iluminación, Kuo-Huang *et al.* (2007) y Gębura y Winiarczyk (2016) reportan que se puede observar esta condición de los cristales en órganos vegetativos y reproductivos de las angiospermas y Fink (1991) reporta lo mismo en hojas de gimnospermas. En estudio de igual manera se pudo observar si se trataban de cristales intra o extracelulares en todos los órganos de las especies analizadas.

Los cristales agrupados como arenas, rafidios y cristales grandes como prismáticos, drusas y estiloideos, fueron fácilmente observados en el tejido debido a su tamaño y morfología característica. Prychid y Rudall (1999) mencionan que la morfología de rafidios, drusas y estiloideos en algunas monocotiledóneas se puede observar con claridad en este sistema de iluminación debido a su morfología. Por otro lado la observación de arenas aisladas y rafidio, drusas y prismáticos pequeños $<10\ \mu\text{m}$, fue difícil en este estudio, Tillman-Sutela y Kauppi, (1999) mencionan que los cristales prismáticos de $<10\ \mu\text{m}$ de tamaño en *Picea abies*, son difíciles de ver en campo claro debidos a su tamaño, hecho que en este estudio se confirma.

En la lámina foliar de *Paphiopedilum insigne* se observaron claramente 4 lados en los cristales aciculares individuales de los rafidios en sección trasversal, Raman *et al.* (2014) reportan que con este sistema de iluminación la observación en los cristales aciculares de 6

a 8 lados de sección transversal de rafidios en *Dioscorea polystachya* parecían circulares debido a la limitación de la resolución del microscopio fotónico, en este estudio se piensa que el número de lados que presentan los rafidios también influye en la claridad de la observación, ya que el número de lados de los cristales aciculares observados en *Paphiopedilum insigne* era menor a 6 y se pudieron observar claramente en este sistema de iluminación del microscopio fotónico. Este sistema de iluminación también permitió observar claramente el núcleo de las drusas en tono opaco, como lo reportan Prychid y Rudall (1999) y Monje y Baran (2002). Y la disposición de los rafidios dentro del idioblasto como lo menciona Côté (2009) de rafidios en órganos vegetativos de *Dieffenbachia seguine* (Araceae).

Con este sistema de iluminación también se pudo identificar la presencia de idioblastos dúplex en la epidermis de la lámina foliar de *Tradescantia fluminensis*, no se halló ningún estudio que reporte la observación de idioblastos dúplex por medio del uso de este sistema de iluminación.

Según los resultados de este estudio junto con de las observaciones de investigaciones antes referidas, se sugiere que la observación de cristales de oxalato de calcio en campo claro se realice como primer acercamiento a su morfología básica en plantas, en la cual se puede observar también el tamaño del cristal, ubicación en los tejidos y su condición intracelular o extracelular.

Microscopía fotónica de contraste de fases

El microscopio de contraste de fases es capaz de convertir las diferencias de fase entre las regiones de un espécimen en diferencias de amplitud, lo que hace visibles a los especímenes transparentes (Wayne, 2014, Murphy y Davidson, 2013). Los cristales de oxalato de calcio han sido observados bajo este sistema de iluminación en escasos estudios. Li *et al.* (2003) reportan el uso de este sistema de iluminación solamente para identificar la morfología básica y longitud de rafidios e idioblastos de 30 μm en hojas de *Pistia stratiotes*. Sandoval-Zapotitla *et al.* (2010) mencionan que emplearon éste sistema de iluminación para observar cristales de oxalato de calcio de manera preliminar, sólo para

detectar la presencia de drusas, rafidios y cristales primaticos en las hojas de especies de la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae). Las observaciones de cristales que se realizaron en este estudio con el uso de microscopía fotónica de contraste de fases fueron difíciles, ya que el procesamiento de la muestra ocasionó limitaciones en la observación. La morfología de los cristales y los idioblastos se diferenciaban sólo si el corte era delgado, limpio, y con escasa tinción. Los cristales pequeños y los detalles de los bordes y extremos de los cristales fueron difícilmente visibles y los halos de luz en algunos cristales interferían con la observación de su morfología. Por el contrario para las drusas los núcleos sí eran visibles y esa característica las diferenciaba del resto del tejido. Estas observaciones concuerdan con la mención que hacen los autores Li *et al.* (1999) y Sandoval-Zapotitla *et al.* (2010), sobre el empleo de contraste de fase solamente para la identificación de la morfología de los cristales de oxalato de calcio en plantas.

Por lo anterior no se recomienda usar el sistema de iluminación de contraste de fases para la observación de cristales de oxalato de calcio; sin embargo, si se recurre a usar el sistema de iluminación para la observación de estos cristales se sugiere que el corte que se observe sea muy delgado, sin tinción alguna y sin artefactos que puedan entorpecer la observación de los cristales.

Microscopía de luz polarizada

La microscopía fotónica de luz polarizada están diseñada para generar contraste y proporcionar una imagen brillante, clara y nítida de un objeto anisotrópico que muestran birrefringencia contra un fondo negro en alta resolución y gran aumento (Olympus, 2017; Wayne, 2014). Este sistema de iluminación ha sido utilizado para identificar la morfología de los cristales de oxalato de calcio y establecer patrones de distribución en el tejido debido a su birrefringencia. Ilarslan *et al.* (1999) identificaron la morfología general de rafidios, su ubicación, abundancia, aparición y desaparición a lo largo del desarrollo de tejidos de óvulos y semillas de *Glycine max* (Leguminosae) por medio de la birrefringencia de los cristales. Volk, *et al.* (2004), identificaron la morfología de rafidios en hojas de *Pistia stratiotes*, los cuales caracterizaron por ser brillantes por birrefringencia y de gran tamaño (60 μm), así describen su distribución en el tejido de la hoja y abundancia. Côté (2009)

observa la morfología general y patrones de distribución en tejidos de órganos vegetativos y reproductivos de *Dieffenbachia seguine* (Araceae). Gębura y Winiarczyk (2016) observan la presencia de cristales y su morfología de cristales prismáticos, rafidios y estiloideos en la microsporogénesis de *Tinantina anomala* (Commelinaceae). Kuo-Huang *et al.* (2007) mencionan que la birrefringencia de las drusas ayudó a visualizar la localización, distribución, densidad y tamaños en el mesófilo de la lámina foliar de *Peperomia glabella*. Prychid y Rudall (1999) reportan que la birrefringencia de los rafidios, drusas y estiloideos en algunas monocotiledóneas los hace fácilmente observables e identifican así su morfología y ubicación. Las observaciones de este estudio mostraron que en microscopía de luz polarizada, la birrefringencia de las cinco morfologías observadas de cristales ayudaba a detectar su presencia y distribución en los tejidos, su morfología, tamaño, detalles de sus bordes y extremos y disposición en los idioblastos, como los estudios anteriores lo mencionan.

En cuanto a los cristales aciculares individuales de rafidios y estiloideos, la birrefringencia permitió observar su longitud, características de sus extremos (puntiagudos o redondeados), disposición u orden dentro del idioblasto y lados en sección transversal coincidiendo con los reportes de Raman *et al.* (2014). Estos autores mencionan que la observación bajo luz polarizada de rafidios en sección transversal muestra con claridad el número de lados, la sección longitudinal muestra su longitud y sus extremos y en ambas secciones, su localización en el tejido. La birrefringencia de las arenas permitió visualizar detalles de su forma, tal como lo reporta Franceschi (1984) cuando describe la morfología de arenas birrefringentes y su distribución en el mesófilo de hoja de *Beta vulgaris*.

Debido a la característica de birrefringencia se pudieron identificar patrones de distribución de algunas especies, en *Citrus limon* se hallaron cristales prismáticos distribuidos sólo en la epidermis de la lámina foliar y en *Eriobotrya japónica* se hallaron cristales prismáticos paralelos a los haces vasculares del mesófilo de la lámina foliar. Esta característica sobre los patrones cristalinos que se han abordado en otros estudios, se considera una característica de importancia taxonómica y filogenética en las plantas. Borchert (1985) buscó patrones cristalinos en la ontogenia de la hoja sugiriendo que la birrefringencia es una característica clave de los cristales de oxalato que ayuda a identificar

morfología general, tamaño, aparición, crecimiento y distribución de cristales en las hojas de *Gleditsia triacanthos* y *Albizia julibrissin*. Berg (1994) examinó bajo luz polarizada la aparición y desaparición de cristales en ramas de *Casuarina cunninghamiana* y encontró patrones de distribución en células epidérmicas que supuso juega un papel de defensa contra herbívoros. Lersten y Horner (2000) utilizaron luz polarizada para describir patrones cristalinos alrededor de los haces vasculares del mesófilo de hojas de subgéneros de *Prunus* (Rosaceae), patrones que establecieron tomando en cuenta la distribución, densidad, morfología, proporción en número y tamaño de los cristales y sugirieron tienen importancia sistemática en las plantas. Cervantes–Martínez *et al.* (2005) establecieron patrones cristalinos en las hojas de especies de los géneros de *Glycine* y *Shutteria* (Fabaceae), según la localización y forma de cristales mediante el uso de microscopía de luz polarizada

En este sistema de iluminación la observación de idioblastos dúplex no fue posible, pues las paredes celulares de algunos tejidos no eran visibles, pero sí se observaron los cristales pertenecientes a estos idioblastos. Tal fue el caso de la lámina foliar de *Tradescantia fluminensis* donde se hallaron idioblastos dúplex, estos no fueron distinguidos en microscopía de luz polarizada pero sí en el resto de las iluminaciones de microscopía fotónica. Lersten y Horner (2011) mediante el uso de microscopía de luz polarizada, reportan la presencia de idioblastos dúplex en las hojas de varias especies de la tribu Naucleae (Rubiaceae). Ellos observaron solamente la combinación dúplex de cristales y concluyeron que se trataban de idioblastos dúplex, pues los cristales que observaron se encontraban incrustados uno en el otro (drusas incrustadas en arena cristalina) y no separados, como fue el caso en este estudio. Por esta razón no se observaron idioblastos dúplex bajo luz polarizada en *Tradescantia fluminensis*, a pesar de tenerlos presentes.

Si se pretende buscar o estudiar cristales de oxalato de calcio en una muestra, se recomienda la observación en la microscopía de luz polarizada, ya que en ésta los cristales brillan debido a su birrefringencia y su presencia, ubicación, distribución, abundancia, morfología, tamaño y disposición en el idioblasto son evidentes. Si el interés es observar los idioblastos que los contienen, la observación complementaria en campo claro puede realizar esta última labor.

Microscopía fotónica de contraste diferencial de interferencia (CDI)

El sistema de iluminación CDI traduce las diferencias de densidad de los especímenes en diferencias de intensidad; dando una imagen del espécimen con apariencia tridimensional o relieves que corresponden a las variaciones de la densidad óptica de la muestra, sin afectar la resolución de la imagen, así se pueden observar detalles que son invisibles en campo claro por medios ópticos, sin necesidad de tinciones (Wayne, 2014), además los efectos de halo son artefactos ausentes en CDI (Olympus, 2017). Existen pocos estudios que hayan observado cristales de oxalato de calcio en plantas bajo este sistema de iluminación. Prychid y Rudall, (1999) reconocen con el uso de CDI la morfología de drusas, rafidios y estiloideos y su localización en el tejido debido a su alto contraste sin necesidad de tinciones en monocotiledóneas. Fink (1991) usó CDI para detectar la presencia de cristales de oxalato de calcio en gimnospermas, y pudo identificar la morfología de cristales prismáticos y depósitos cristalinos, cristales intracelulares y extracelulares, brillo debido a la birrefringencia de estos cristales y un alto contraste de los cristales sobre un fondo más oscuro.

En este estudio la observación de cristales de oxalato de calcio en CDI, realizó el contraste de los cristales dentro de los tejidos, se identificó su morfología, las observaciones se vieron en colores llamativos y diferentes no sólo en el fondo y los cristales, sino también en el resto del tejido y se pudieron observar cristales intracelulares y extracelulares, como lo menciona Fink (1991). En esta microscopía no hubo halos de luz confusos alrededor de los cristales como los que se encontraron en contraste de fase y la visibilidad de los contornos y detalles mejoró en todos los cristales en comparación con las microscopías anteriores. Esto último debido a que este sistema de iluminación genera sombras y altas luces formadas por el sistema óptico que da una apariencia de volumen, mostrando el relieve de la superficie de la muestra (Wayne, 2014; Olympus, 2017), así fue entonces que se pudo observar el detalle de bordes y extremos en todos los cristales.

La literatura señala al sistema de iluminación CDI no apto para la observación de especímenes birrefringentes, debido a que su efecto sobre la luz polarizada crea imágenes confusas cuando los cristales brillan (Olympus, 2017). Sin embargo en las observaciones de

este estudio la birrefringencia en CDI de los cristales de oxalato de calcio no intervino con la observación de la morfología de los mismos.

Esta microscopía se usa en el estudio de células vivas no coloreadas, de tejidos teñidos o no teñidos y en el estudio de especímenes relativamente gruesos que no permiten el uso de contraste de fases (Wayne, 2014). Los resultados muestran que, en el sistema de iluminación CDI ni la tinción, ni el grosor de los cortes condicionaron en ningún modo la observación de morfología, contraste, detalle y relieve en los cristales de oxalato de calcio y que incluso, el ajuste del prisma de Wollaston del objetivo controló el contraste en la observación al lograr diferentes colores de interferencia del fondo y efectos de tinción óptica multicolor en los cristales (Figuras 9-16).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Un microscopio electrónico de barrido permite obtener imágenes de alta resolución con gran profundidad de campo de una muestra que se escanea con un haz de electrones enfocado (Yoshimura, 2014). Esta microscopía se emplea en las ciencias biológicas para estudiar la morfología externa (textura) de células, tejidos y cristales, su composición química, estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen a los organismos (Egerton, 2016) y ha sido muy utilizada para analizar la ultraestructura y morfología de los cristales de oxalato de calcio en plantas (Franceschi y Horner, 1980).

Las imágenes en MEB de cristales de oxalato de calcio obtenidas en este estudio permitieron observar el detalle de la morfología y la textura de los cristales, esta microscopía resultó ser de utilidad complementaria en la caracterización morfológica de los cristales y se pudieron confirmar ciertas características observadas en la microscopía fotónica, como su tamaño, su condición intracelular o extracelular y su disposición en el idioblasto, de hecho Lestern y Horner (2000) propone a la MEB como ideal para describir la morfología de estos cristales.

Las observaciones en este estudio mostraron que en los cristales prismáticos se pudieron ver sus formas poligonales, la forma y superficie de sus caras, sus tamaños, bordes y textura de la superficie; características que reportan Prychid y Rudall (1999), estos autores señalan caras curvas y rectas en los cristales aciculares y extremos

puntiagudos en los rafidios, su localización en los tejidos y orientación dentro del idioblasto en algunas monocotiledóneas. Tillma-Sutela y Kaupii (1999) detallan la morfología prismas con caras poliédricas y bordes angulosos en semillas de gimnospermas, describen cristales intra y extracelulares, tamaño y abundancia en los tejidos de semillas de *Picea abies*. Para los rafidios y estiloideos se pudo observar su textura, la longitud de sus cristales aciculares individuales, sus extremos, sus lados en sección transversal y su disposición dentro del idioblasto, características que Raman *et al.* (2014) también observan en los rafidios de *Dioscorea polystachya*, estos autores describen la morfológica del exterior e interior de cristales aciculares en dos nuevas variedades de rafidios, observan las dimensiones del cristal acicular, número de unidades en cada paquete, mucilago que los rodea, número de lados cada cristal individual, distancia entre ellos, diámetro de los haces, características de los extremos, longitud y localización en el tejido.

Existe una amplia variedad de drusas en las plantas, en este estudio se hallaron dos variedades de drusas, la primera como agregados esféricos de cristales prismáticos individuales de bordes angulosos con crecimiento perpendicular desde el núcleo de la drusa y la segunda eran agregados relativamente esféricos con prolongaciones radiales. Tillma-Sutela y Kaupii (1999) detallan la morfología de drusas como construcciones de agregados cristalinos en semillas de *Picea abies*. Contreras-Padilla *et al.* (2011) detallaron la morfología de las drusas como un conglomerado de cristales en los cladodios de *Opuntia ficus-indica* var. redonda. Kuo-Huang *et al.* (2007) describen a las drusas de la hoja de *Peperomia glabella* como conglomerados de múltiples facetas cristalinas que se irradian desde el núcleo y en otros estudios la variedad de descripciones sigue (Bárceñas-Argüello *et al.*, 2015). Es por ello que Monje y Baran (2002), sugieren que las morfologías variadas de las drusas pueden ser características específicas y útiles para discernir miembros de subgrupos taxonómicos al menos en la familia Cactaceae. En las arenas se pudo apreciar la forma, tamaño y textura de cada cristal individual, características que también Bouropoulos *et al.* (2001) reportan en los cristales individuales de las arenas de *Lycopersicon esculentum*, ellos describen por medio de observaciones al MEB una morfología pseudotetraédrica de 2-3 μm por lado de cada cristal,

Para la localización de todos los cristales observados en MEB la textura fue clave para localizarlos en el tejido, de hecho según Monje y Baran (2002) la textura del cristal puede revelar su forma de hidratación aun cuando los cristales son de la misma morfología. Es por ello que se debe prestar atención a esta característica en las observaciones al MEB.

Esta microscopía ha demostrado ser muy útil cuando se trata de caracterizar la morfología de un cristal (Tillma-Sutela y Kaupii, 1999; Monje y Baran, 2002; Raman *et al.*, 2014), sobre todo si ésta se pretende utilizar como carácter taxonómico en estudios sistemáticos y en la descripción e identificación de especies (Prychid y Rudall, 1999; Monje y Baran, 2002; Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2010; Raman *et al.*, 2014), ya que permite ver a detalle la morfología y textura de los cristales y las variaciones de una misma morfología del cristal, algo que la microscopía fotónica no puede hacer debido a su menor poder de resolución y a la bidimensionalidad de sus imágenes, sin embargo no en todos los estudios se requiere tanto nivel de detalle. Es por lo anterior que esta microscopía se propone para estudios morfológicos descriptivos de cristales de oxalato de calcio.

Muestras analizadas al MEB

Las muestras orgánicas que se analizan en el MEB necesitan una preparación para ser aptas en condiciones de alto vacío y para recibir el haz de electrones, deben ser de unos pocos milímetros de espesor y de hasta alrededor de un centímetro en longitud o diámetro. Se debe evitar que los tejidos liberen gas dentro del microscopio, para ello, los tejidos son sometidos a métodos de fijación y de secado en puntos críticos, liofilización o congelación que les confieren rigidez y permiten conservar sus condiciones originales, además necesitan el recubrimiento de un material conductor (Morris y Groves, 2013). En este estudio el uso y procesamiento de material fresco de las muestras analizadas permitió la observación de las condiciones originales en las que se encontraban los cristales de oxalato de calcio en los tejidos de los órganos analizados. Por el contrario el material herborizado permitió la observación de estos cristales en tejidos compactados, dificultando su localización y observación. Sin embargo, el uso de material herborizado representa una opción de análisis de cristales de oxalato de calcio, pues estos cristales tienen la ventaja de ser productos vegetales insolubles en agua, muy resistentes y por lo tanto, se pueden encontrar allí donde

otros residuos vegetales ya no son evidentes (Monje y Baran, 2002). En algunos estudios se ha hecho uso de material de herbario para la observación de cristales de oxalato de calcio al MF y MEB (Lersten y Horner, 2000; Cervantes–Martínez *et al.*, 2005). En estos estudios el material fue sometido a tratamientos de rehidratación y los resultados de observación resultaron óptimos. Por lo tanto, cuando por algún motivo no se puede conseguir material fresco, el material de herbario es una opción viable para la observación de cristales de oxalato de calcio en tejidos de plantas.

En la última década los métodos de observación de cristales de oxalato de calcio en las plantas se han ampliado y métodos no invasivos se han empleado para el estudio de estos cristales en las plantas; por ejemplo, Matsushima *et al.* (2012), utilizaron rayos X por contraste de fases (sXMT) para conocer la ocurrencia, cantidad y distribución de cristales de oxalato de calcio en pedúnculos de rosa, obteniendo imágenes tridimensionales sin realizar corte alguno en la planta. Eder (2010) evaluaron el potencial de la microscopía LC-Polscope en la observación de cristales de oxalato de calcio. En esta microscopía las estructuras biológicas pueden contrastarse en base a sus propiedades anisotrópicas e investigarse bajo sus condiciones ambientales nativas sin necesidad de agentes de etiquetado. Ellos utilizaron esta herramienta para seguir los cambios estructurales dinámicos de las estructuras, composición, índices de birrefringencia y orientación de cristales de oxalato de calcio en células vivas de tallos de *Dictyostelium discoideum* y concluyeron que con esta microscopía se pueden analizar la formación de sus estructuras in vivo. Estos métodos de observación de cristales han sido poco empleados, sin embargo tienen el potencial de proporcionar información complementaria al resto de las microscopias ya utilizadas

El conocimiento de las características morfológicas de los cristales de oxalato de calcio juega un papel importante en la Taxonomía, Sistemática y Anatomía Vegetal, Medicina, Agronomía y otras, es por ello que estudios como los ya mencionados y esta investigación resultan de ayuda para conocer y analizar características de los cristales dependiendo de los objetivos de cada área de investigación.

Conclusiones

La microscopía fotónica de luz polarizada, de contraste diferencial de interferencia (CDI) y de campo claro permitieron obtener una definición más clara de las estructuras de los 5 tipos de cristales de oxalato de calcio en los órganos en estudio. De igual manera la microscopía de contraste de fase es útil para la observación de estos cristales en cortes delgados.

La microscopía electrónica de barrido provee de información sobre las características morfológicas y textura de los cristales de oxalato de calcio.

El estudio comparativo con las diferentes técnicas de microscopía permitió establecer los requerimientos necesarios para lograr observaciones de buena calidad de los cristales de oxalato de calcio en material fresco y herborizado. En ello se sugiere el uso preferente de material fresco para que el procesamiento permita las mejores condiciones de observación.

La presencia y descripción clara de las características de los cristales de oxalato de calcio provee de información que sirve de base para la definición o resolución problemas en diferentes áreas de investigación.

La microscopía comparada proveyó de información variada y complementaria para la observación y descripción de la morfología de los cristales de oxalato de calcio en las plantas en estudio.

Literatura Citada

- Arnott, H.J. 1966. Studies of calcification in plants En: H. Fleisch, H.J.J Blackwood y M. Owen (eds.). Third European Symposium on Calcified Tissues. Springer-Verlag, Berlin. pp. 152-157.
- Arnott, H.J. y F.G.E. Pautard. 1970. Calcification in plants. En: H. Schraer (ed.) Biological Calcification: Cellular and Molecular Aspects. New York: Appleton Century-Crofts. pp. 375-446.
- Banasik, M. y T. Stedeford. 2014. Plants, Poisonous (Humans) En: P. Wexler Baselt (ed.) Encyclopedia of Toxicology. 3rd edition. Vol 3. Academic Press/Elsevier, London. pp. 970-978.
- Barceloux, D.G. 2008. Medical Toxicology of Natural Substances, Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. USA. pp. 768-772.
- Bárcenas-Argüello, M.L., M.C.C. Gutiérrez-Castorena y T. Terrazas. 2015. The polymorphic weddellite crystals in three species of *Cephalocereus* (Cactaceae). *Micron*, 77: 1-8.
- Bauer, P., R. Elbaum y I.M. Weiss. 2011. Calcium and silicon mineralization in land plants: Transport, structure and function. *Plant Science*, 180: 746-756.
- Berg, R.H. 1994. A calcium oxalate-secreting tissue in branchlets of the Casuarinaceae. *Protoplasma*, 183: 29-36.
- Berman, A., J. Hanson, L. Leiserowitz, T.F. Koetzle, S. Weiner y L. Addadi. 1993. Biological control of crystal texture: A widespread strategy for adapting crystal properties to function. *Science*, 259: 776-779.
- Bittrich, V. y U. Kuhn. 1993. Nyctaginaceae. En: K. Kubitzki (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. Vol II Flowering Plants Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. K. Kubitzki, G. Rohwer y V. Bittrich (eds. vol.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, Alemania. pp. 473-486.
- Bong, W-C., L. Vanhanen y G. Savage. 2017. Addition of calcium compounds to reduce soluble oxalate in a high oxalate food system. *Food Chemistry*, 221: 54-57.
- Bonner L.J. y H.G. Dickinson. 1989. Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* Mill. I. Structural aspects. *New Phytol.*, 113: 97-115.
- Borchert, R. 1984. Functional anatomy of the calcium excreting system of *Gleditsia triacanthos* L. *Bot Gaz.*, 145 (4): 474-482.

- Borchert, R. 1985. Calcium-induced patterns of calcium-oxalate crystals in isolated leaflets of *Gleditsia triacanthos* L. and *Albizia julibrissin* Durazz. *Planta*, 165: 301–31.
- Bouropoulos, N., S. Weiner y L. Addadi. 2001. Calcium Oxalate Crystals in Tomato and Tobacco Plants: Morphology and in Vitro Interactions of Crystal-Associated Macromolecules. *Chem. Eur. J.*, 7(9): 1881-1888.
- Bradberry, S. y A. Vale. 2015. *Plants. Botanical and Animal Poisons. Medicine (United Kingdom)*, 44 (2):113-115.
- Brubaker, C.L. y H.T. Horner. 1989. Development of epidermal crystals in leaflet of *Stylosanthes guianensis* (Leguminosae; Papilionoideae). *Can. J. Bot.*, 67: 1664–1670.
- Carlquist, S. 2000. Wood and stem anatomy of Phytolaccoid and Rivinoid Phytolaccaceae (Caryophyllales): ecology, systematics, nature of successive cambia. *Aliso*, 19(1):13-29.
- Cervantes-Martínez, T., H.T. Horner, R.G. Palmer, T. Hymowitz y A.H.D. Brown. 2005. Calcium oxalate crystals macropatterns in leaves of species from groups glycine and shuteria (Glycininae; Phaseoleae; Papilionoideae; Fabaceae). *Can. J. Bot.*, 83:1410-1421.
- Chew, S. 2010. Anatomical features of *Bougainvillea* (Nyctaginaceae). *Studies by Undergraduate Researchers at Guelph.*, 4(1): 72-78.
- Chomicki, G., L.P.R. Bidel, F. Ming, M. Coiro, X. Zhang, Y. Wang, Y. Baissac, C. Jay-Allemand y S.S. Renner. 2015. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist*, 205: 1330–1341.
- Contreras-Padilla, M., E. Pérez-Torrero, M.I. Hernández-Urbiola, G. Hernández-Quevedo, A. del Real, E.M. Rivera-Muñoz y M.E. Rodríguez-García. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24:38-43.
- Coté G.G. 2009. Diversity and distribution of idioblasts producing calcium oxalate crystals in *Dieffenbachia seguine* (Araceae). *American Journal of Botany*, 96(7): 1245–1254.
- Demarty, M., C. Morvan, y M. Thellier. 1984. Calcium and the cell wall. *Plant Cell Environ*, 7: 441–448.
- Demiray, H. 2007. Calcium oxalate crystals of some *Crataegus* (Rosaceae) species growing in Aegean region. *Biologia, Bratislava*, 62(1): 46-50.
- Eder, M., U. Lütz-Meindl y I.M. Weiss. 2010. Non-invasive LC-PolScope imaging of biominerals and cell wall anisotropy changes. *Protoplasma*, (2010) 246:49–64.

- Egerton, R.F. 2016. Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM, and AEM. 2nd edition. Springer International Publishing, AG, Switzerland. 196p.
- Fink, S. 1991. Comparative Microscopical Studies on the Patterns of Calcium Oxalate Distribution in the Needles of Various Conifer Species. *Bot. Act.*, 104: 306-315.
- Foster, A.S. 1956. Plant idioblasts: Remarkable examples of cell specialization. *Protoplasma*, 46: 184–193.
- Franceschi, V.R. 1984. Developmental Features of Calcium Oxalate Crystal Sand Deposition in *Beta vulgaris* L. Leaves. *Protoplasma*, 120: 216-223.
- Franceschi, V.R. 2001. Calcium oxalate in plants. *Trends in Plant Science*, 6 (7): 331.
- Franceschi, V.R. y H.T. Horner. 1980. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.*, 46: 361-427.
- Franceschi, V.R. y F.A. Loewus. 1995. Oxalate biosynthesis and function in plants and fungi. In *Calcium Oxalate in Biological Systems*, S.R. Khan, ed. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 113–130.
- Franceschi, V.R. y P.A. Nakata. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56: 41–71.
- Franceschi, V.R., X. Li, D. Zhang y T.W. Okita. 1993. Calsequestrinlike calciumbinding protein is expressed in calcium accumulating cells of *Pistia stratiotes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6986–6990.
- Frank, E. 1972. The Formation of Crystal Idioblasts in *Canavalia ensiformis* DC. at different Levels of Calcium Supply. *Z. Pflanzensphysiol*, 67: 350-358.
- Frey-Wyssling, A. 1981. Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. *Amer. J. Bot.*, 68: 130–141.
- García-Escudero, A., G. Navarro-Bustos, S. Umbría-Jiménez, R. González-Cámpora y H. Galera-Davidson. 2017. Planos conjugados y sistema de iluminación de Köhler en microscopía óptica. *Rev. Esp. Patol.*, 50(2):113-123.
- García-Fernández, A.J., S. Espín, P. Gómez-Ramírez y E. Martínez-López. 2014. Oxalates. En: P. Wexler Baselt (ed.) *Encyclopedia of Toxicology*. 3rd edition. Vol 3. Academic Press/Elsevier, London. pp. 730-735.
- Gębura, J. y K. Winiarczyk. 2016. A study on calcium oxalate crystals in *Tinantia anomala* (Commelinaceae) with special reference to ultrastructural changes during anther development. *J Plant Res*. Published online.

- Guarrera, P.M. y V. Savo. 2016. Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 185: 202-234.
- Guo, X., H. Meng, S. Zhu, Q. Tang, R. Pan y S. Yu. 2015. Developing precipitation modes for preventing the calcium-oxalate contamination of sugar beet pectins. *Food Chemistry*, 182: 64–71.
- Horner, H.T. y B.L. Wagner. 1980. The association of druse crystals with the developing stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. *Amer. J. Bot.*, 67: 1347-1360.
- Horner, H.T. y B.L. Wagner. 1992. Association of four different calcium crystals in the anther connective tissue and hypodermal stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) during microsporogenesis. *American Journal of Botany*, 79(5): 531-541.
- Horner, H.T. y B.L. Wagner. 1995. Calcium oxalate formation in higher plants. En: S.R. Khan (ed). *Calcium Oxalate in Biological Systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 53–72.
- Ilarslan, H., R.G. Palmer y H.T. Horner, 1999. Calcium Oxalate Crystals in Developing Soybean Seeds. *Scanning Microscopy*, 13 (2-3): 321-339.
- Ilarslan, H., R.G. Palmer, J. Imsande y H.T. Horner. 1997. Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 84(9): 1042–1046.
- Katayama, H., Y. Fujibayashi, S. Nagaoka y Y. Sugimura. 2007. Cell wall sheath surrounding calcium oxalate crystals in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 231: 245–248.
- Khan, S., P.A. Glenton y K.J. Byer. 2007. Dietary Oxalate and Calcium Oxalate Nephrolithiasis. *The Journal of Urology*, 178: 2191-2196.
- Khan, A.S. y R. Siddiqi. 2014. Environmental factors affect calcium oxalate crystals formation in *Tradescantia pallida* (Commelinaceae). *Pak. J. Bot.*, 46(2): 477-482.
- Kinzel, H. 1989. Calcium in the vacuoles and cell walls of plant tissue. *Flora*, 182, 99–125.
- Korth, K. L., S. J. Doege, S-H. Park, F.L. Goggin, Q. Wang, S.K. Gomez, G. Liu, L. Jia y A.P. Nakata. 2006. *Medicago truncatula* Mutants Demonstrate the Role of Plant Calcium Oxalate Crystals as an Effective Defense against Chewing Insects. *Plant Physiology*, 141: 188–195.
- Kostman, T.A., V.R. Franceschi y P.A. Nakata. 2003. Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Sci.*, 65: 205-212.

- Kuo-Huang, L-L., S.B.K. Maurice y V.R. Franceschi. 2007. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade-adapted *Peperomia glabella*. *Botanical Studies*, 48:155-164.
- Lebsky, V. y A. Poghosyan. 2014. Scanning electron microscopy detection of phytoplasmas and other phloem limiting pathogens associated with emerging diseases of plants. En: A. Méndez-Vilas (ed.). *Microscopy: advances in scientific research and education*. Vol 1. Formatex Research Center. Badajoz, España. pp. 78-83.
- Lersten, N.R. y H.T. Horner. 2005. Development of the calcium oxalate crystal macropattern in Pomegranate (*Punica granatum*, Punicaceae). *American Journal of Botany*, 92(12): 1935-1941.
- Lersten, N.R. y H.T. Horner. 2008. Crystal macropatterns in leaves of Fagaceae and Nothofagaceae: a comparative study. *Plant Syst. Evol.*, 271: 239-253.
- Lersten, N.R. y H.T. Horner. 2011. Unique calcium oxalate “duplex” and “concretion” idioblasts in leaves of tribe Naucleae (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 98(1):1-11.
- Lersten, N.R. y H.T. Horner. 2000. Calcium oxalate crystal types and trends in their distribution patterns in leaves of *Prunus* (Rosaceae: Prunoideae). *Plant Syst. Evol.*, 224:83-96.
- Li, X., D. Zhang, V.J. Lynch-Holm, T.W. Okita y V.R.Franceschi. 2003. Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells. *Plant Physiology*, 133: 549-559.
- Ma, J, F. 2000. Role of Organic Acids in Detoxification of Aluminum in Higher Plants. *Plant Cell Physiol*, 41(4): 383-390.
- Ma, J.F. y S.C. Miyasaka. 1998. Oxalate exudation by taro in response to Al. *Plant Physiology*, 118: 861-865.
- Matsushima, U, A. Hilger, W. Graf, S. Zabler, I. Manke, M. Dawson, G. Choinka, W.B. Herppich. 2012. Calcium oxalate crystal distribution in rose peduncles: Non-invasive analysis by synchrotron X-ray micro-tomography. *Postharvest Biology and Technology*, 72: 27–34.
- McConn, M.M. y P.A. Nakata. 2002. Calcium oxalate crystal morphology mutants from *Medicago truncatula*. *Planta*, 215: 380–386.
- Metcalf, C.R. 1989. Araliaceae. En: C. R. Metcalfe and L. Chalk (eds.) *Anatomy of the Dicotyledons*, Vol. II, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, UK. pp 725-735.

- Molano-Flores, B. 2001. Herbivory and Calcium Concentrations Afect Calcium Oxalate Crystal Formation in Leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany*, 88: 387-391.
- Monje, P.V. y E.J. Baran.2002. Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. *Plant Physiology*, 128: 707–713.
- Morris, V.J. y K. Groves. 2013. Food microstructures Microscopy, measurement and modelling. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Philadelphia, PA, USA, p 428.
- Murphy, D.B. y M.W. Davidson, 2013. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. 2nd ed. Wiley-Blackwell. New Jersey. EUA. p 538.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Science*, 164: 901-909.
- Nakata, P.A. 2012. Influence of calcium oxalate crystal accumulation on the calcium content of seeds from *Medicago truncatula*. *Plant Science*, 185-186: 246-249.
- Nakata, P.A., T.A. Kostman y V.R. Franceschi. 2003. Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 425-430.
- Nakata, P.A. y M.M. McConn. 2000. Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiology*, 124: 1097-1104.
- Nakata, P.A. y M.M. McConn. 2007. Calcium oxalate content affects the nutritional availability of calcium from *Medicago truncatula* leaves. *Plant Science*, 172: 958-961.
- Olivares, E., E. Peña, y G. Aguia. 2002. Metals and oxalate in *Tithonia diversifolia* (Asteraceae): concentrations in plants growing in contrasting soils, and Al induction of oxalate exudation by roots. *J. Plant Physiol.*, 159: 743-749.
- Olympus (2017). Olympus your vision, our future, Microscopy Resource Center, <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/>. Visita 09/12/17.
- Prychid, C.J. y P.J. Rudall. 1999. Calcium oxalate crystals in Monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany*, 84:725-739.
- Quitadamo, I.J. y T.E Kostman, M.E. Schelling y V.R. Franceschi. 2000. Magnetic bead purification as a rapid, and efficient method for enhanced specificity of antibodies for immunoblotting and immunolocalization in plant samples. *Plant Sci.*, 153: 7-14.
- Raman, V., H.T. Horner y I.A. Khan. 2014. New and unusual forms of calcium oxalate raphide crystals in the plant kingdom. *J. Plant Res.*, 127:721-730.

- Ruiz, L.P. y T.A. Mansfield. 1994. A postulated role for calcium oxalate in the regulation of calcium ions in the vicinity of stomatal guard cells. *New Phytol.*, 127: 473-481.
- Sakai, W.S. y M. Hanson. 1974. Mature raphid and raphididioblast structure in plants of the edible aroid genera *Colocasia*, *Alocasia*, and *Xanthomonas*. *Ann. Bot.*, 38: 739-748.
- Sanders, D., J. Pelloux, C. Brownlee y J.F. Harper. 2002. Calcium at the Crossroads of Signaling. American Society of Plant Biologists. *The Plant Cell*, 401–417.
- Sandoval-Zapotitla, E., T. Terrazas y J. L. Villaseñor. 2010. Diversidad de inclusiones minerales en la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 58 (2): 733-755.
- Schneider, A. 1901. The Probable Function of Calcium Oxalate Crystals in Plants. *Botanical Gazette*, 32(2):142-144.
- Siener, R., A. Seidler, S. Voss y A. Hesse. 2016. The oxalate content of fruit and vegetable juices, nectars and drinks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45: 108-112.
- Souza, W.M. de, C.A de M. Santos, M. de R. Duarte y D. Bardal. 2003. Morfo-anatomia das folhas da nespereira *Eriobotrya japonica* Lindl., Rosaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1): 41-49.
- Taniguchi T. y H. Harada. 1987. Characterization of calcium oxalate crystals in woody plants by X-ray microarea diffractometry. *Experientia*, 43: 1006-1008.
- Tillman-Sutela, E. y A. Kauppi. 1999. Calcium oxalate crystals in the mature seeds of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst. *Trees*, 13:131-137.
- Tomlinson, F.L.S. 1966. Anatomical data in the classification of Commelinaceae. *J.Linn. Soc. (Bot.)*, 59(380): 371-395.
- Tütüncü, S., N. Öztürk y F. Dane. 2014. Occurrence, types and distribution of calcium oxalate crystals in leaves and stems of some species of poisonous plants. *Botanical Studies*, 55:32.
- Vanhanen, L. y G. Savage. 2015. Comparison of oxalate contents and recovery from two green juices prepared using a masticating juicer or a high speed blender. *NFS Journal*, 1: 20-23.
- Viñas, M. y V.M. Jiménez. 2016. Occurrence and characterisation of calcium oxalate crystals in stems and fruits of *Hylocereus costaricensis* and *Selenicereus megalanthus* (Cactaceae: Hylocereeae). *Micron*, 89:21–27.
- Volk, G.M., L.J. Goss y V.R. Franceschi. 2004 Calcium Channels are Involved in Calcium Oxalate Crystal Formation in Specialized Cells of *Pistia stratiotes* L. *Annals of Botany*, 93: 741-753.

- Wang, Z-Y., K.S. Gould y K.J. Patterson. 1994. Structure and development of mucilage-crystal idioblasts in the roots of five *Actinidia* species. *Int. J. Plant Sci.*, 155: 342-349.
- Wayne, R. 2014. *Light and Video Microscopy*. Segundaedición. Academic PressElsevier. San Diego, CA, USA. p 325.
- Webb, M.A. 1999. Cell mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell*, 11: 751-761.
- Webb, A.W., J.M. Cavaletto, N.C. Carpita, L.E. López, y H.J. Arnott. 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant J.*, 7: 633-648.
- Yoshimura, N. 2014. *Historical Evolution Toward Achieving Ultrahigh Vacuum in JEOL Electron Microscopes*. Springer Tokyo, Japon. p 125.
- Zhang, J., H. Lu y L. Huang. 2014. Calciphytoliths (calcium oxalate crystals) analysis for the identification of decayed tea plants (*Camellia sinensis* L.). *Scientific Reports*, 4: 6703.
- Zindler-Frank, E. 1991. Calcium oxalate crystal formation and growth in two legume species as altered by strontium. *Bot. Acta*, 104, 229-232.
- Zindler-Frank, E., R. Hönow y A. Hesse. 2001. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. *J. Plant Physiol.*, 158:139-144.

Anexos

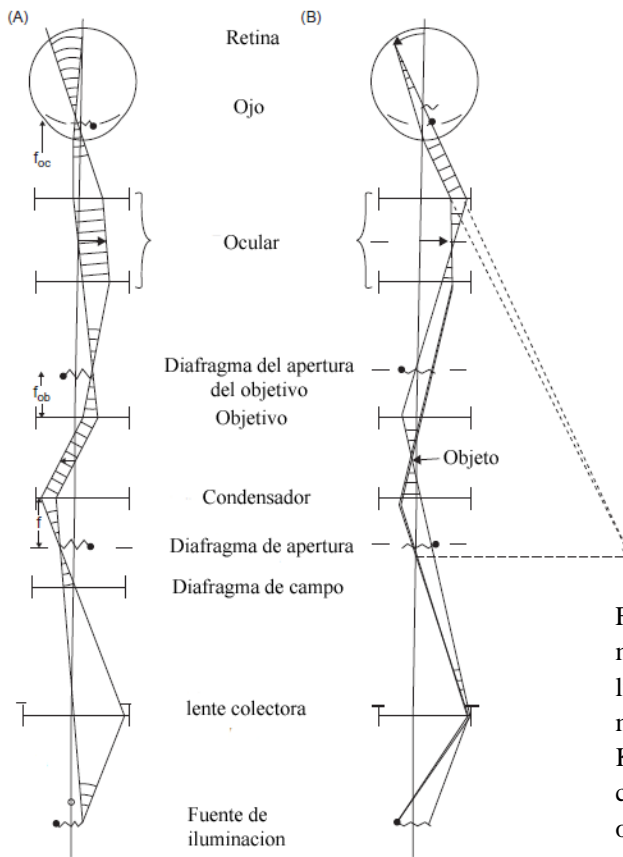
Anexo I. Microscopía: fichas técnicas

Microscopía fotónica (MF) y sistemas de iluminación

La iluminación de un objeto o espécimen visto al microscopio es fundamental para concebir su realidad ante nuestros ojos. August Köhler en 1893 estableció los parámetros que rigen la correcta iluminación en el microscopio fotónico, para obtener imágenes con el máximo contraste y resolución. La iluminación de Köhler (Figura 19) alinea correctamente los sistemas ópticos y de iluminación, logrando que el filamento de la lámpara sea proyectado por el condensador de la lámpara en el plano del iris debajo de la platina, que a su vez se proyecta sobre el plano de la muestra. Por tanto el cono luminoso que llega a la preparación es uniforme en todo su campo angular, está enfocado en su diámetro mínimo en el plano de la muestra, coaxial con el objetivo y el ocular y de una abertura numérica similar o ligeramente menor que la del objetivo (Wayne, 2014; García-Escudero *et al.*, 2017); es la forma más eficaz para la observación de una muestra en campo claro.

Microscopía de campo claro

El ojo humano tiene la capacidad de detectar diferencias de amplitud y/o longitud de onda, y vemos imágenes cuando los puntos que la componen varían en intensidad o color en comparación con el fondo. Como ya se mencionó la microscopía de campo claro, es el resultado de realizar los ajustes de la iluminación según Köhler y debe su nombre al tipo de imagen que proporciona, ya que el objeto resalta sobre un fondo blanco y brillante. Es el sistema óptico utilizado para observar material procesado y teñido, a fin de incrementar el contraste entre la muestra y el medio que le rodea, ya que si se examinan objetos sin color, la imagen resultante será poco contrastante, casi transparente.



La microscopía de campo claro ha sido instrumento para observar multitud de células y cromosomas, en ella se descubrió el movimiento Browniano con la observación incesante de las partículas vivas y en la medicina ha ayudado a diagnosticar enfermedades (Wayne, 2014).

Figura 19. Rutas de los haces luminosos en un microscopio compuesto (A). Rutas de los haces luminosos formadores de la imagen en un microscopio compuesto con Iluminación Köhler (B). f -plano focal frontal del condensador, f_{ob} -plano focal posterior al objetivo, f_{oc} -plano focal de la imagen (tomado

Microscopía de contraste de fases

La interacción de la luz con un objeto transparente e invisible, es visible con un microscopio de contraste de fases, éste fue inventado por Fritz Zernike en 1934. Los especímenes transparentes con variaciones en el índice de refracción (cómo cambia la velocidad de la luz al atravesar diferentes materiales), o mejor dicho con variaciones en la longitud del trayecto óptico, son capaces de diferenciar las ondas desfasadas, pero como no podemos detectar estas diferencias de fases a simple vista, el objeto permanece invisible. El microscopio de contraste de fases es capaz de convertir las diferencias de fase entre las regiones de un espécimen en diferencias de amplitud, lo que hace visibles los especímenes transparentes. En esta iluminación una región de un espécimen y el fondo, o dos regiones en un espécimen, tendrán una diferencia de trayectoria óptica si tienen índices refractivos o espesores diferentes (Wayne, 2014).

Cuando la luz pasa por un objeto homogéneo que tiene un índice de refracción diferente al de su alrededor, su velocidad se altera, y su llegada a un punto dado es avanzada o retardada, dependiendo si el índice de refracción del objeto es menor o mayor respectivamente al de su alrededor, la diferencia de fase se debe a que la onda que atraviesa el espécimen tienen una longitud de trayectoria óptica diferente a la onda que atraviesa su alrededor (Murphy y Davidson, 2013).

El microscopio de contraste de fases tiene un anillo en el condensador llamado anillo de fase y una placa de fase en el objetivo, que permite que se forme un cono hueco de luz que ilumina la muestra, entonces un cono hueco invertido de luz directa es capturado por la lente objetiva y se enfoca en un anillo que coincide con el área conjugada de la placa de fase en el plano focal posterior del objetivo, este sistema desfasa los haces luminosos que inciden y emergen del objeto para que cuando estos haces de luz se encuentren resulten en un cambio de la intensidad luminosa en el plano de la imagen (Figura 20) (Murphy y Davidson, 2013; Wayne, 2014).

La microscopía de contraste de fases, permite observar células vivas transparentes en alta resolución, se limita a especímenes delgados, en especímenes gruesos la áreas por abajo y por encima del plano del objeto proporciona cambios de fase no deseados, causan imágenes desenfocadas que se superponen y oscurecen la imagen enfocada. También se ha usado para la medición cuantitativa de índices de refracción y densidad de la masa seca de las células y concentraciones de macromoléculas (Wayne, 2014).

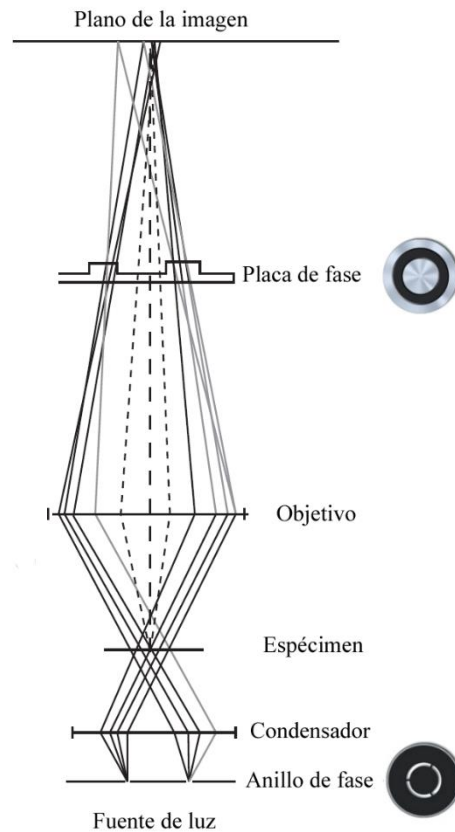


Figura 20. Diagrama esquemático del funcionamiento del Microscopio de contraste de fases (tomado de Wayne, 2014).

Microscopía de luz polarizada

La luz del sol y la artificial se transmiten en ondas de luz cuyo campo eléctrico vibra en todos los planos perpendiculares con respecto a la dirección en que se propaga. Cuando el campo eléctrico se restringe a un sólo plano por filtración, se dice que la luz está polarizada con respecto a la dirección de propagación y todas las ondas vibran en el mismo plano. El microscopio de luz polarizada convierte un cambio en el ángulo de propagación de la onda de luz polarizada provocado por cada punto del espécimen en un cambio de color y/o intensidad. Henry Fox Talbot diseñó el primer microscopio de polarización en 1834. Este microscopio está diseñado para el análisis cuantitativo de los patrones cristalinos de las muestras con actividad óptica, es decir, material con la capacidad de desviar el ángulo de la luz plano polarizada (materiales anisotrópicos) obteniendo una tinción óptica con patrones característicos (Olympus, 2017; Wayne, 2014).

Los componentes biológicos están constituidos por moléculas, en algunos están simétricamente distribuidas y orientadas en el espacio y en otros, esta distribución es aleatoria o asimétrica. Estas estructuras moleculares tienen propiedades ópticas diferentes y la luz que interactúa con ellas refracta en formas variadas. Se denominan isotrópicas a las estructuras cuyo arreglo molecular es simétrico, el cual les confiere un mismo índice de refracción, y, al interactuar con la luz el ángulo de refracción es constante y pasas través de la estructura a una misma velocidad sin polarizarse, lo que las hace invisibles en el microscopio de luz polarizada. Por el contrario si los enlaces de una sustancia son asimétricos se le denomina anisotrópica y sus ejes no equivalentes refractan en dos los haces de luz que inciden ella, cada uno de estos haces polarizados viaja con direcciones y velocidades diferentes, a este fenómeno se le llama de doble refracción o birrefringencia y les permite ser visibles en el microscopio de luz polarizada (Wayne, 2014).

El microscopio de luz polarizada tiene dos filtros polarizadores cruzados que modifican la luz. El primero llamado filtro polarizador está situado entre la fuente luminosa y el objeto, y el segundo filtro llamado analizador se encuentra entre el objetivo y el ocular. Las ondas de luz provenientes de la fuente de iluminación que pasan por el filtro polarizador oscilan en un mismo plano y esta luz polarizada incide en la muestra, cuando ésta es anisotrópica se presenta el fenómeno de la doble refracción o birrefringencia, entonces se producen dos

haces refractados distintos que vibran en planos diferentes y se propagan a diferentes velocidades en el interior de la muestra, éstos luego van hacia el filtro analizador que pasa solamente aquellos componentes de las ondas de luz que son paralelos a la dirección de polarización del analizador, esta luz polarizada es detectada por el ojo humano como un incremento en las intensidad luminosa o como un efecto de color de la muestra. (Figura 21; Olympus, 2017; Murphy y Davidson, 2013).

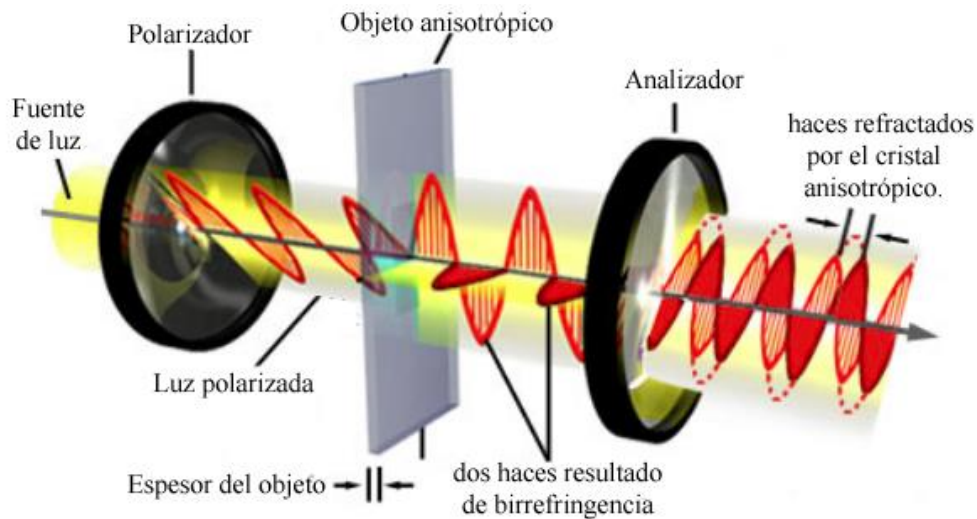


Figura 21. Diagrama esquemático del funcionamiento del Microscopio de luz polarizada (tomado de Olympus, 2017)

Este microscopio se aplica para identificar y comparar sustancias cristalinas o fibrosas de las células y tejidos, por ejemplo el citoesqueleto, colágeno y cristales; también se pueden identificar y estimar cuantitativamente los componentes minerales de una sustancia (Wayne, 2014).

Microscopía de contraste diferencial de interferencia (CDI)

En la década de 1950 Georges Nomarski modificó el prisma de Wollaston utilizado para detectar variaciones de densidad óptica en especímenes y convertirlos en diferencias de intensidad, a este tipo de microscopía se le llamó de contraste diferencial de interferencia (CDI). Este microscopio utiliza luz polarizada y posee dos prismas birrefringentes de Wollaston que fraccionan el haz de luz polarizada en dos, con trayectos e índices de

refracción diferentes, dando una imagen del espécimen con apariencia tridimensional o relieves que corresponden a las variaciones de la densidad óptica de la muestra, así se pueden observar detalles que son invisibles en campo claro por medios ópticos y no por medio de tinciones (Wayne, 2014).

En este microscopio la luz de la fuente pasa a través de un polarizador ubicado debajo del condensador, seguido de un prisma de Wollaston, este prisma está compuesto por dos cuñas de cuarzo cementadas; la luz polarizada entra en este prisma y divide el haz en dos rayos que emanan del prisma perpendiculares entre sí, estos dos rayos viajan juntos pero en direcciones ligeramente diferentes. Los rayos se interfieren en el plano focal del condensador, donde pasan paralelos y muy cercanos entre sí con una diferencia en su trayectoria. La distancia entre los rayos llamada cizalla es más pequeña que la capacidad de resolución del objetivo. Los haces divididos pasan a través del espécimen donde sus trayectorias de onda se alteran de acuerdo con el espesor y los índices de refracción del espécimen. Estas variaciones provocan alteraciones en la trayectoria de la onda de ambos haces. Cuando los haces paralelos entran en el objetivo, se enfocan por encima del plano focal trasero donde entran en un segundo prisma de Wollaston, que combina los dos haces a una distancia definida fuera del propio prisma, lo que elimina la cizalla y la diferencia de trayectoria original entre los dos haces (Figura 22; Olympus. 2017; Murphy y Davidson, 2013).

Como resultado de haber atravesado el espécimen, las trayectorias de los haces paralelos no tienen la misma longitud para las diferentes áreas del espécimen, estos haces de diferente longitud de trayectoria deben introducirse en el mismo plano y eje para que interfieran, esto se logra colocando un segundo polarizador (analizador) por encima del segundo prisma de Wollaston que combina los haces de luz, esta luz entonces va hacia el ocular donde puede ser observada como diferencias de amplitud y longitud de onda, resultando que un lado del espécimen o detalle de él aparezca brillante (o posiblemente de un color) mientras que el otro lado aparezca más oscuro (o de otro color). Este efecto de sombra confiere al espécimen una apariencia pseudo tridimensional (Murphy y Davidson, 2013; Wayne, 2014).

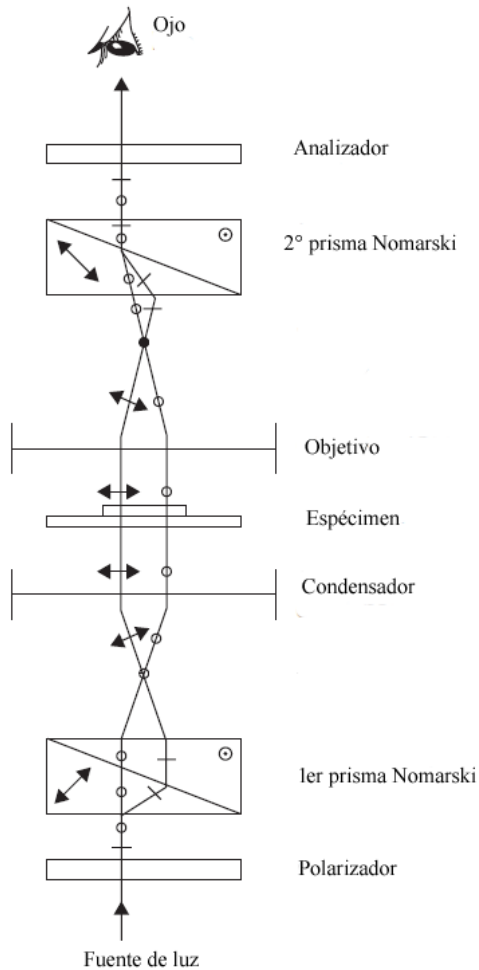


Figura 22. Diagrama esquemático del funcionamiento del microscopio de contraste diferencial de interferencia (CDI) (tomado de Wayne, 2014).

El segundo prisma también puede colocarse de forma que se pueda mover horizontalmente, esto permite variar las diferencias ópticas de trayectoria de los haces, así se puede alterar el brillo y el color del fondo y de la muestra. Debido al diseño del prisma y a las ubicaciones, el fondo será homogéneo para cualquier color que se haya seleccionado (Olympus, 2017).

Esta microscopía se usa en el estudio de células vivas no coloreadas y en el estudio de especímenes relativamente gruesos que no permiten el uso de contraste de fases (Wayne, 2014).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

El desarrollo de la microscopía electrónica de barrido tiene sus comienzos en la década de 1930,

con ella se han podido estudiar las características morfológicas de los materiales, con una gran profundidad de campo en escalas de longitud que van desde milímetros hasta nanómetros (Morris y Groves, 2013).

Un microscopio electrónico de barrido (MEB) permite obtener imágenes de una muestra escaneándola con un haz de electrones enfocado. Los electrones del haz interactúan con los electrones de la muestra, produciendo varias señales que pueden ser detectadas y que contienen información sobre la topografía y composición de la superficie de la muestra (Yoshimura, 2014). Típicamente un MEB (Figura 23) consiste en una fuente de electrones que generan un haz de electrones primarios; una columna con lentes electromagnéticas para enfocar y desmagnetizar el haz de electrones primarios; bobinas para escanear el haz de electrones a través de la superficie de la muestra; bombas de vacío para mantener el sistema

bajo alto vacío y uno o más detectores para recoger señales generadas por irradiación de electrones en alto vacío (Morris y Groves, 2013).

Los electrones del haz llamados electrones primarios que inciden en la muestra, suministran energía a los electrones atómicos que están presentes en ella, los cuales son liberados como electrones secundarios, éstos contienen información sobre la topografía de la muestra y son recogidos por un detector de electrones, después esta información es ampliada por lentes electromagnéticas que forman la imagen de la muestra (Yoshimura, 2014; Egerton 2016).

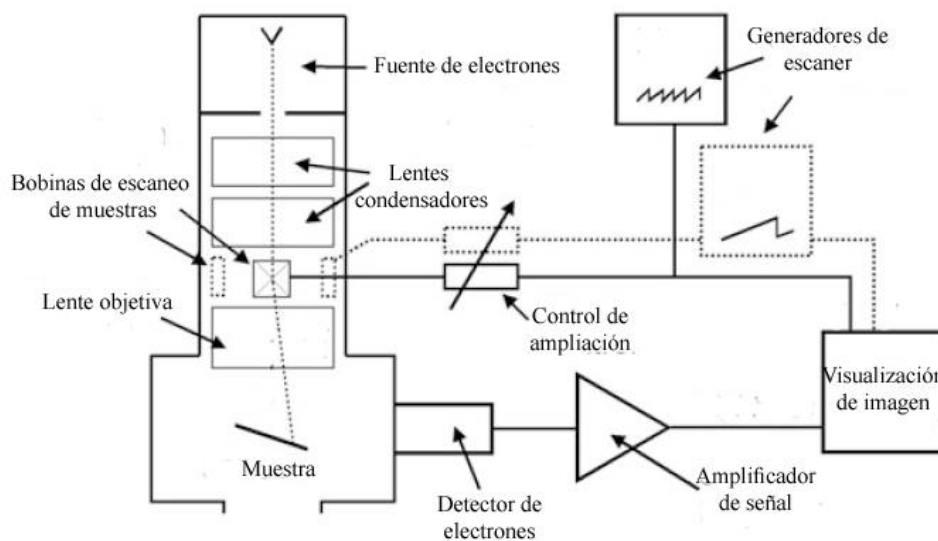


Figura 23. Diagrama esquemático de un microscopio electrónico de barrido (tomando de Egerton, 2016).

El MEB puede lograr una resolución de los especímenes en alto vacío, bajo vacío y en condiciones de humedad y proporciona una resolución de imagen de 1-10 nm; además las imágenes del MEB tienen una gran profundidad de campo y las características del espécimen que no están exactamente en el plano de enfoque siguen siendo nítidas y distinguibles (Yoshimura, 2014).

Las muestras orgánicas que se analizan en el MEB necesitan una preparación para ser aptas en condiciones de alto vacío y para recibir el haz de electrones. La preparación comúnmente indica que los tamaños de las muestras deben ser de unos pocos milímetros de espesor y de hasta alrededor de un centímetro en longitud o diámetro. Para la clase de

materiales que no son sólidos completos o que tienen tendencia a generar gas en el vacío, existen métodos para conferirles rigidez y evitar la salida de gas, estos métodos incluyen el secado en puntos críticos, el liofilizado y el uso de crioescalas para muestras hidratadas por congelación. Estas muestras necesitan el recubrimiento de un material conductor como el oro, no sólo para aumentar la conductividad sino también para protegerlos de los daños que pueden sufrir durante la excitación e ionización de los electrones, pues sus átomos pueden desplazarse, cambiando la estructura y apariencia visible de su superficie (Morris y Groves, 2013).

Esta microscopía se emplea para estudiar la morfología externa (textura) de células, tejidos y cristales, su composición química, estructura cristalina y la orientación de los materiales que los componen (Egerton, 2016).

Anexo II. Descripción de cristales de oxalato de calcio hallados en cada especie y comparación en las diferentes técnicas de microscopía.

Beta vulgaris

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 24) bajo MF se hallaron arenas agrupadas formando acumulaciones; los idioblastos que las contenían eran relativamente esféricos y se distribuían entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso del mesófilo. Las arenas cristalinas fueron claramente visibles en campo claro como acumulaciones de color marrón, contrastaban con el fondo y con el tejido teñido. Bajo luz polarizada, estas acumulaciones eran birrefringentes y se podía observar la forma de sus cristales individuales. La observación en contraste de fases de las acumulaciones de arenas contrastaban en tono marrón, mientras que las arenas aisladas se perdían en el tejido. En CDI las arenas se observaron en tono marrón-azulado con mayor contraste y birrefringencia en fondo amarillo, púrpura y dorado, en fondo azul esta misma contrastaban con poca birrefringencia y ocultaba los cristales aislados. En la observación al MEB no se distinguieron los idioblastos, sin embargo, se observaron acumulaciones de arenas cristalinas en el mesófilo de la lámina, sus cristales individuales tenían formas irregulares, tamaños variables y bordes puntiagudos.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 25) bajo MF se observaron depósitos de arenas en acumulaciones numerosas de pequeños cristales en el parénquima del córtex, los idioblastos que las contenían eran relativamente esféricos. Las arenas cristalinas fueron claramente visibles en todos los sistemas de iluminación; en campo claro se observaron contrastantes en tono marrón en un tejido teñido; eran birrefringentes en luz polarizada y se podía observar la forma de sus cristales individuales; fueron contrastantes en contraste de fases, aunque los cristales aislados se perdían; y se observaron ligeramente marrones y contrastantes en todas las observaciones de CDI, aunque los cristales aislados se perdían en el fondo amarillo y azul. La observación al MEB mostró agrupaciones de arenas cristalinas en un el tejido compactado del parénquima del córtex, no se distinguieron los idioblastos,

sin embargo se observaron cristales individuales con formas irregulares, tamaños variables y bordes puntiagudos.

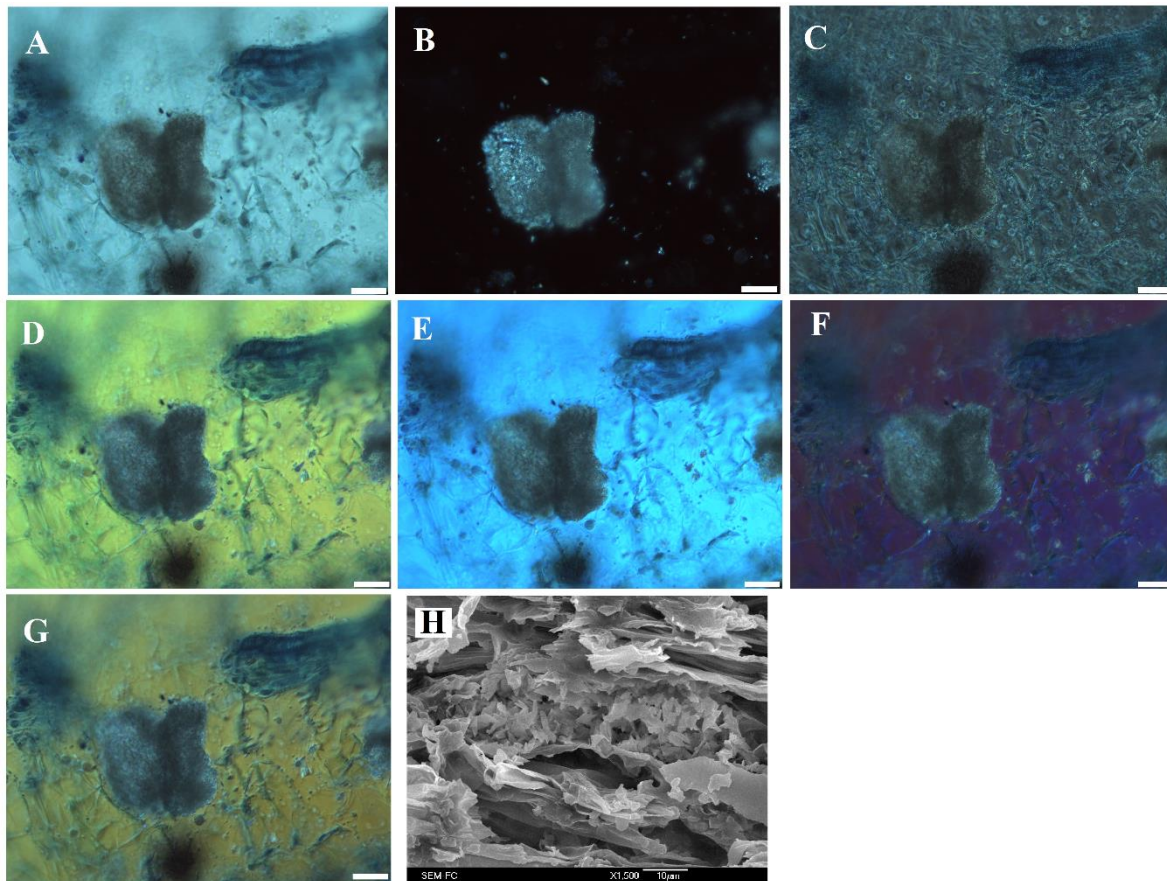


Figura 24. Secciones transversales de la lámina foliar de *Beta vulgaris*, MF (A-H), MEB (H). (A) Arenas distribuidas en el mesófilo de la lámina en campo claro; (B) Arenas birrefringentes en el mesófilo de la lámina en luz polarizada; (C) Arenas en contraste de fases; (D-G) Arenas en CDI en el mesófilo de la lámina, en tono marrón-azulado contrastantes con el fondo. MEB (H) Agrupaciones de arenas con cristales individuales de formas irregulares, tamaños variables y bordes puntiagudos dentro del mesófilo de la lámina. Escala A-G 40µm.

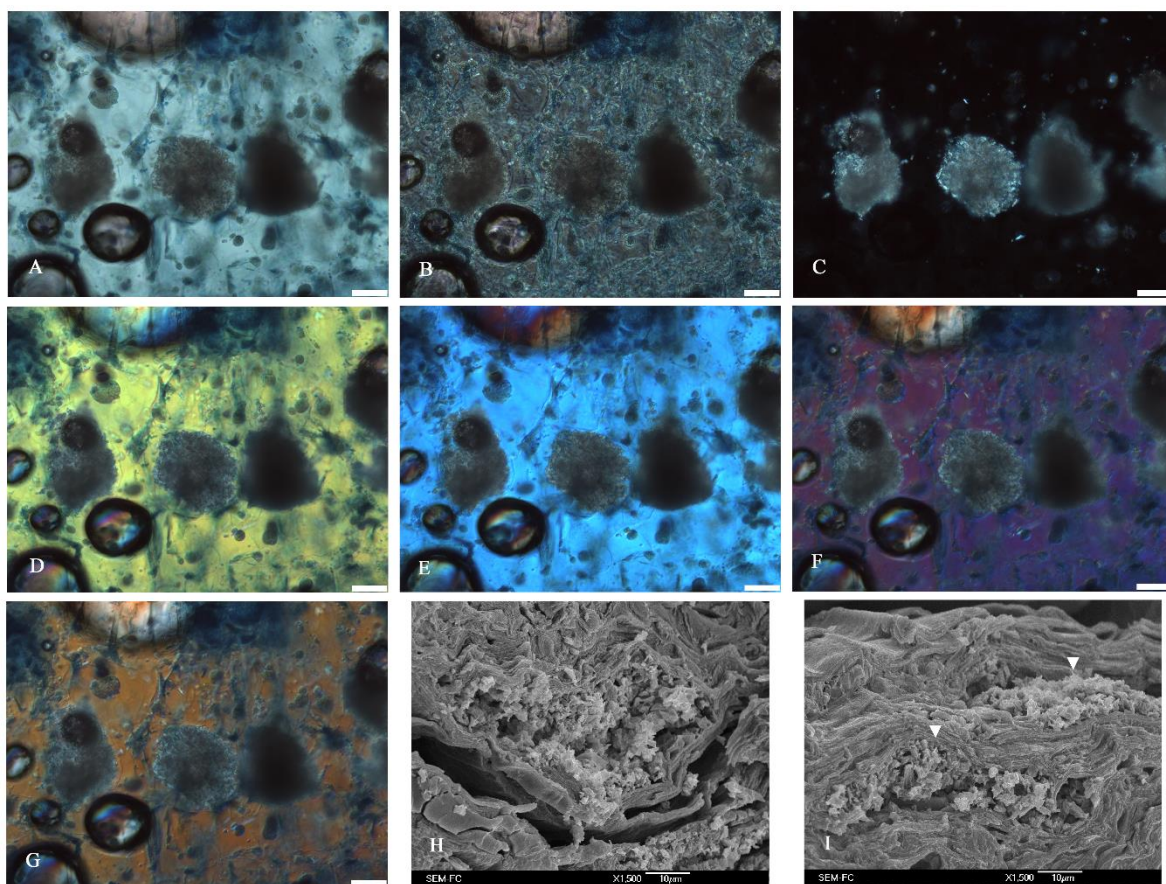


Figura 25. Secciones transversales del pecíolo de *Beta vulgaris*, con arenas distribuidas en el parénquima del córtex del pecíolo; MF (A-G), MEB (H-I). (A) Idioblastos con arenas contrastantes en campo claro; (B) Idioblastos con arenas en contraste de fases; (C) Arenas birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Idioblastos con arenas en CDI en tono marrón contrastantes con el fondo. MEB (H-I) Agrupaciones de arenas con cristales individuales de formas irregulares, tamaños variables; Cabezas de flechas indican cristales. Escala A-G 40µm.

Bougainvillea spectabilis

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 26) bajo MF se observaron abundantes idioblastos con rafidios, los idioblastos se hallaron en el parénquima en empalizada con orientación perpendicular a la epidermis y en el parénquima esponjoso con orientación paralela a la epidermis, los idioblastos eran grandes células alargadas con un haz de cristales aciculares en su interior. Los cristales aciculares que conformaban los rafidios eran finos, delgados y alargados con extremos puntiagudos y fueron fáciles de observar en MF debido a su gran tamaño, morfología y al corte delgado. En campo claro se observaron claramente densos paquetes

de cristales aciculares contrastantes con el fondo y con el tejido teñido. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes lo que permitió visualizar su morfología, longitud, ubicación, disposición en el idioblastos y en el tejido. Los rafidios contrastaron en la observación en contraste de fases. En CDI los rafidios se observaron en tono café y gris, con contraste en los fondos amarillo y azul, en los fondos púrpura y dorado contrastaban en menor grado, se apreciaban birrefringentes y con relieve de los cristales aciculares de los rafidios que permitió ver su longitud y extremos. En la observación MEB, se hallaron rafidios como paquetes de miles de cristales aciculares finos y alargados con extremos puntiagudos, dentro del idioblasto (Figura 26-H).

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 27) bajo MF se observaron rafidios como haces de cristales aciculares seccionados transversalmente, los idioblastos se hallaron en el parénquima del córtex; fueron fácilmente observados ya que el corte era delgado. En campo claro se observaron idioblastos esféricos con alta densidad de rafidios. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes y se pudieron observar los cristales aciculares de los rafidios. La observación de cristales en contraste de fases fue pobre, los rafidio en paquete no contrastaban con el tejido, sólo algunos de ellos solitarios. En CDI los rafidios se observaron en tono gris y marrón en todos los fondos de interferencia, con buen contraste, relieve de los cristales aciculares y ligera birrefringencia. En la observación al MEB se observaron rafidios como paquetes de cristales aciculares finos, de tres o cuatro lados en sección transversal y extremos puntiagudos, incrustados en un tejido compactado y rasgado en el que no se distinguían los idioblastos ni su localización en el tejido.

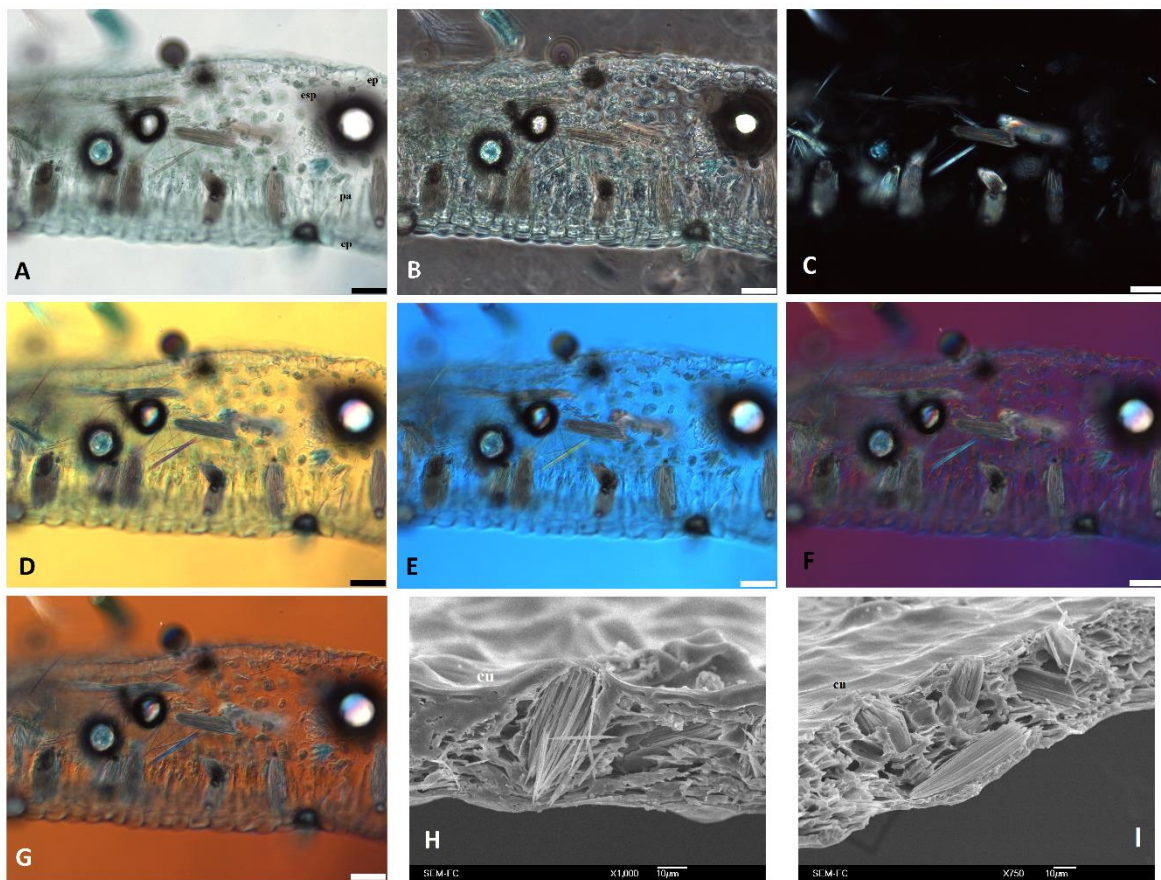


Figura 26. Secciones transversales de la lámina foliar de *Bougainvillea spectabilis*, presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima en empalizada y parénquima esponjoso del mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes bajo luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, en D, E con un tono marrón cuando se encuentran en haces, los cristales solitarios en tono púrpura (D) y verde (E), en F, G rafidios birrefringentes, en haces con un tono gris, y los cristales solitarios en tono azul; en todos los fondos contrastantes y con relieve. MEB (H-I) Rafidios como haces de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos dentro del idioblasto. (cu-cutícula). Escala A-G 40 μ m.

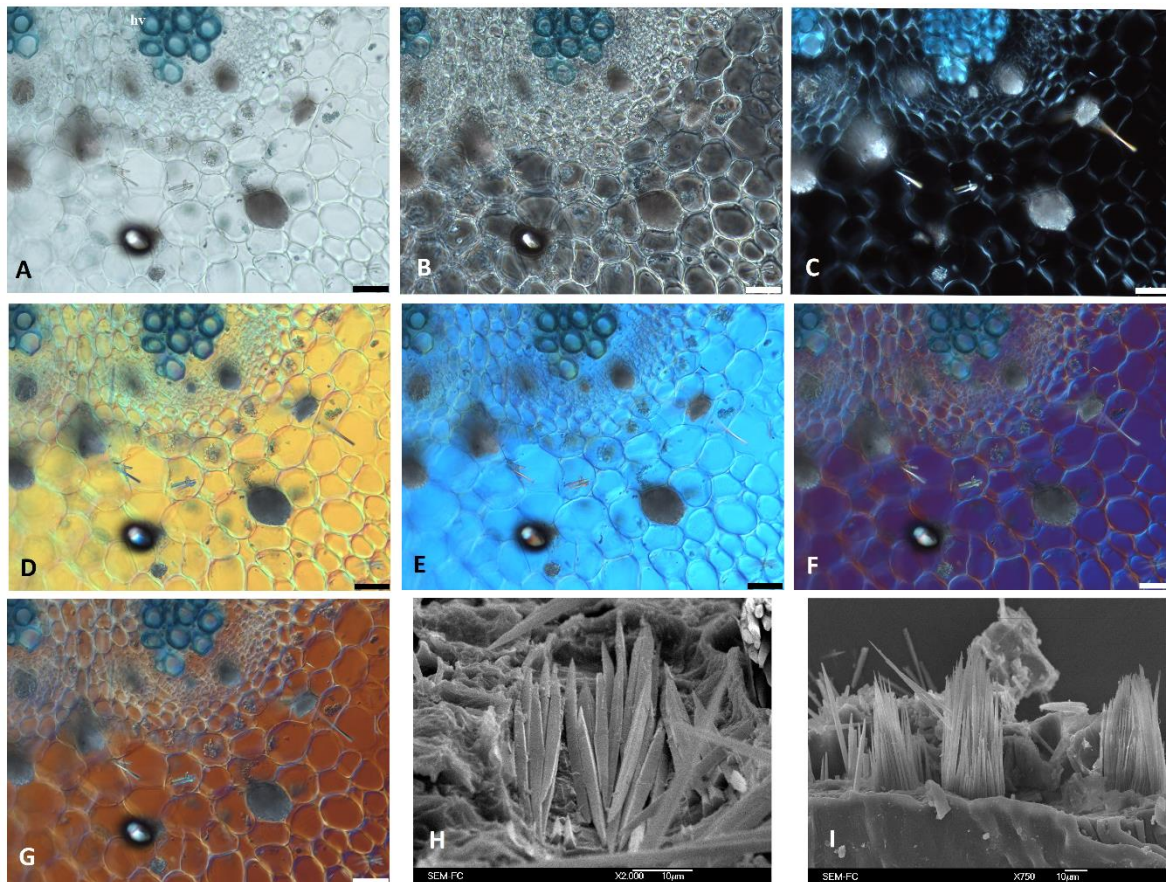


Figura 27. Secciones transversales del pecíolo de *Bougainvillea spectabilis* presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima del córtex. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios poco visibles en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, en todos los fondos presentan relieve en tono gris y marrón, contrastantes con el fondo y ligeramente birrefringentes. MEB (H-I) Rafidios separados (H) y en haces (I). Escala A-G 40µm.

Brugmansia candida

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 28) bajo MF se hallaron solamente drusas de tamaños similares con protuberancias puntiagudas distribuidas por todo el mesófilo. Las drusas fueron poco visibles en campo claro pues todo el tejido contrastaba y las ocultaba. Bajo luz polarizada, las drusas resaltaron birrefringentes en todo el mesófilo lo que permitió observar su morfología, tamaño y ubicación en el tejido. La observación en contraste de fases fue mala, el contraste del tejido ocultaba los cristales por completo. En CDI las drusas se observaron

en tono azul con contraste en fondo amarillo, púrpura y dorado, la observación de esta misma en fondo azul oscurecía el cristal tornándolo marrón que igualmente contrastaba; en todos los fondos presentaron una ligera birrefringencia y apariencia de volumen con respecto a las protuberancias que presentaban. La observación al MEB fue complicada, el tejido estaba compactado y se observaron drusas fracturadas de tamaños similares, con apariencia de esferas con protuberancias angulares que surgían el núcleo de la drusa, distribuidas en el mesófilo de la hoja, a algunas de ellas aún se les distinguía en el idioblasto (Figuras 28-I).

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 29) bajo MF se observaron en el parénquima del córtex idioblastos con poca arena cristalina de forma piramidal y dispersa, también se hallaron idioblastos con cristales prismáticos cilíndricos pequeños y aislados. Ambos tipos de cristales fueron claramente visibles en todos los campos de observación debido a que el corte era relativamente delgado. En campo claro ambos cristales contrastaron poco debido a la poca tinción del tejido pero se distinguía la morfología de cada cristal; Ambos cristales se observaron birrefringentes en luz polarizada y esto permitió, ubicarlos con facilidad en el tejido y distinguir su morfología. Ambos cristales tuvieron poco contrastante en la observación en de contraste de fases, eran pequeños y se perdieron en el tejido, además el aire encapsulado en la muestra también los ocultaba; en CDI fueron azules en los fondos, azul, púrpura y dorado, en fondo amarillo las arenas fueron azules y los prismas rosas; ambos cristales fueron contrastantes y ligeramente birrefringentes en todos los fondos de interferencia, aunque se perdieron en el fondo amarillo. La observación al MEB mostró sólo acumulaciones de arenas cristalinas con forma piramidal de diferente tamaño en el tejido compactado del parénquima del córtex. Los prismas cilíndricos observados en MF no se encontraron en MEB.

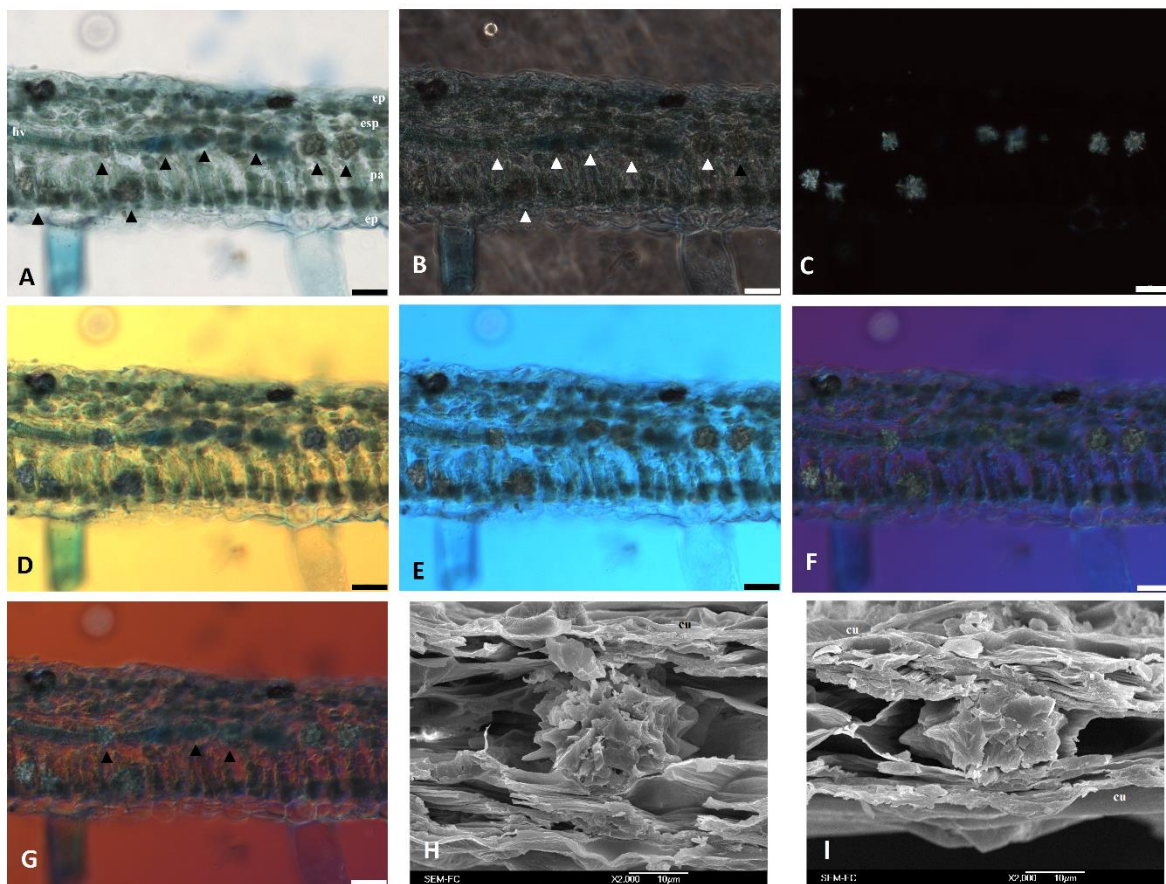


Figura 28. Secciones transversales de la lámina foliar de *Brugmansia candida*, con presencia de drusas en el mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Drusas en campo claro, (B) Drusa poco visibles en contraste de fases. (C) Drusas birrefringentes en luz polarizada. (D-G) Drusas en CDI en el mesófilo de la lámina, contrastantes, birrefringentes, con ligero relieve y un poco transparentes; (D, F, G) drusas con tono azul que contrastan con el fondo; (E) drusas en tono marrón que contrastan con el fondo, MEB (H-I). Drusa relativamente esférica de prolongaciones puntiagudas que parecen emerger del núcleo del cristal. Cabezas de fecha indican cristales. (cu-cutícula, ep-epidermis, esp-parénquima esponjoso, hv-haz vascular, pa-parénquima en empalizada). Escala A-G 40µm.

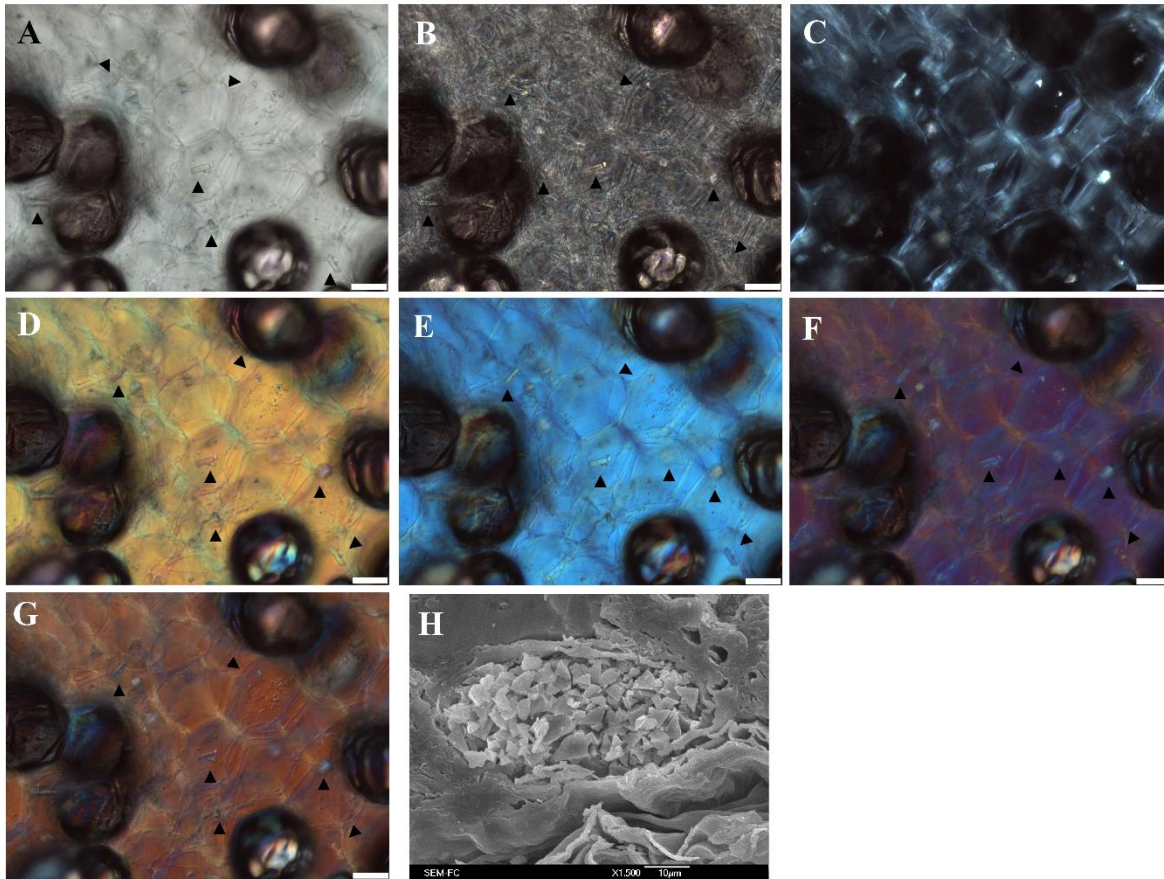


Figura 29. Sección transversal del pecíolo de *Brugmansia candida*, con presencia de arenas de forma triangular y pequeños prismas, MF (A-G), MEB (H). (A) Arenas y prismas poco contrastantes en campo claro; (B) Arenas y prismas poco visibles en contraste de fases; (C) Arenas y prismas birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Arenas y prismas en CDI, en E-G ambos cristales ligeramente azules, en D los prismas se tornaron rosas y las arenas ligeramente azules; en todos los fondos contrastan y son ligeramente birrefringentes. MEB, (H) Arenas piramidales dentro del idioblasto en el parénquima del córtex colapsado del pecíolo de la hoja. Cabezas de flecha indican cristales. Escala A-G 40 μ m.

Citrus limon

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 30) bajo MF se observaron solamente cristales prismáticos de tamaños similares en idioblastos epidérmicos en ambas caras de la lámina, cada idioblasto en la epidermis contenía un cristal. En campo claro se observó la morfología de los cristales prismáticos romboides. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes en ambas epidermis y se distinguía bien su morfología. En la observación en contraste de fase, los cristales se perdieron un poco en el tejido y presentaron halos de luz que interfería

con la distinción morfológica de los cristales. En CDI los prismas se observaron en tono gris, con contraste y relieve de sus bordes en los cuatro colores de interferencia. En la observación al MEB, se observaron cristales prismáticos en ambas epidermis de la lámina con formas poliédricas (Figura 30-I) y romboides (Figura 30-H) de tamaños similares, se observó un cristal por idioblasto y la forma y textura de las caras del cristal.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 31) bajo MF se observaron idioblastos con cristales prismáticos de tamaños similares distribuidos en mayor número en la epidermis y en menor número en el parénquima del córtex. La Morfología de los cristales fue claramente visible en todos los campos de observación. En campo claro los cristales se observaron con poco contraste porque el tejido estaba poco teñido, sin embargo se observó la morfología del cristal dentro de su idioblasto. Los cristales fueron birrefringentes en luz polarizada, se observó su morfología e incluso se distinguieron varias caras del cristal. En contraste de fases los cristales fueron poco contrastantes, difícilmente distinguibles del resto del tejido. En la observación en CDI fueron ligeramente grises, contrastantes y con apariencia de volumen en todas los fondos de interferencia, en este sistema de iluminación se distinguían los idioblastos, la disposición de los cristales en el idioblasto y el relieve de sus bordes angulares. La observación al MEB mostró prismas de tamaño similar incrustados en el tejido compactado de epidermis y parénquima del córtex.

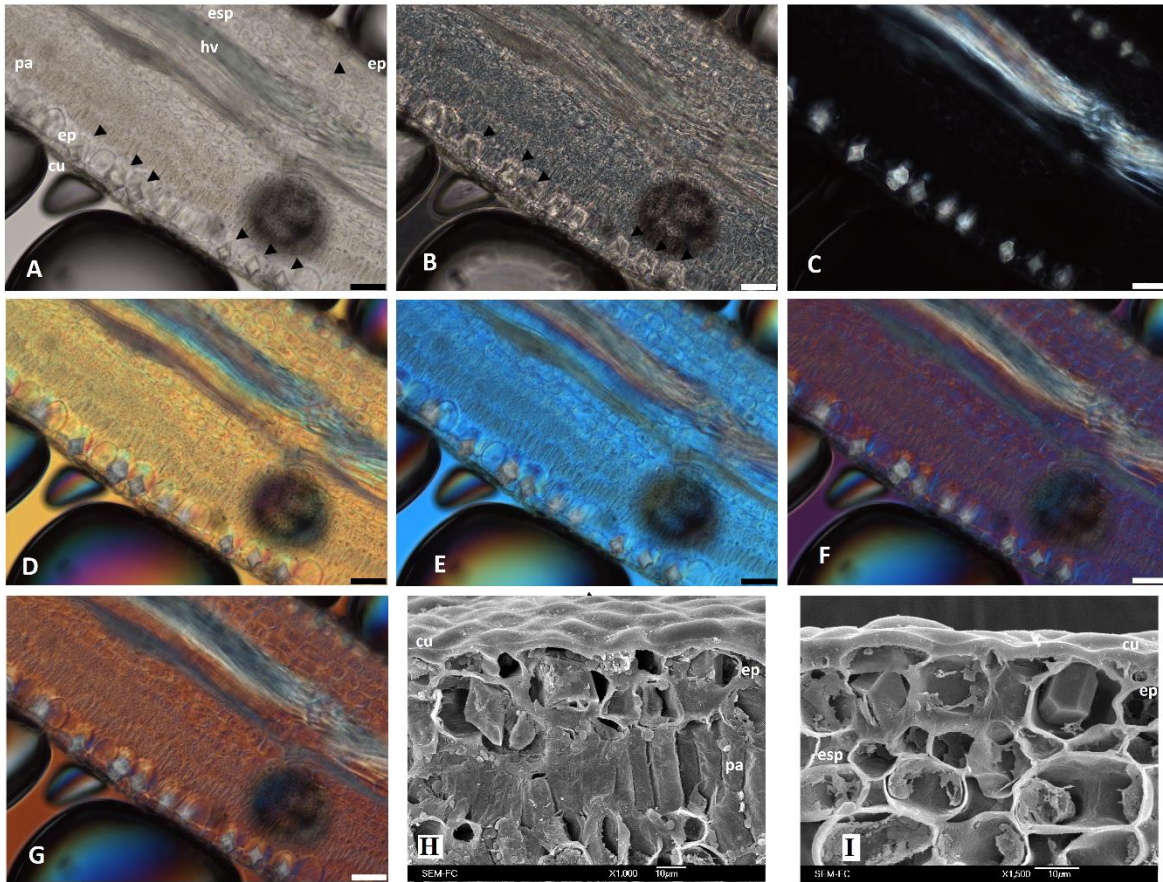


Figura 30. Secciones transversales de la lámina foliar de *Citrus limon*, presencia de idioblastos con cristales prismáticos en ambas caras de la lámina. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Cristales prismáticos romboides que se aprecian sólo en la cutícula adaxial en campo claro; (B) Cristales prismáticos en contraste de fases donde un halo de luz interviene con la visualización de su aspecto, se aprecian sólo en la cutícula adaxial; (C) Cristales prismáticos romboides birrefringentes en luz de campo claro que se aprecian en ambas cutículas; (D-G) Arenas en CDI en tono gris contrastantes con el fondo. MEB (H) Vista de la cara adaxial de la lámina, en la epidermis se hallan idioblastos con cristales prismáticos romboides; (I) Vista de la cara abaxial de la lámina, en la epidermis se hallan idioblastos con cristales prismáticos poliédricos. Cabezas de flecha indican cristales. (cu-cutícula, ep-epidermis, esp-parénquima esponjoso, hv-haz vascular, pa-parénquima en empalizada). Escala A-G 40 μ m.

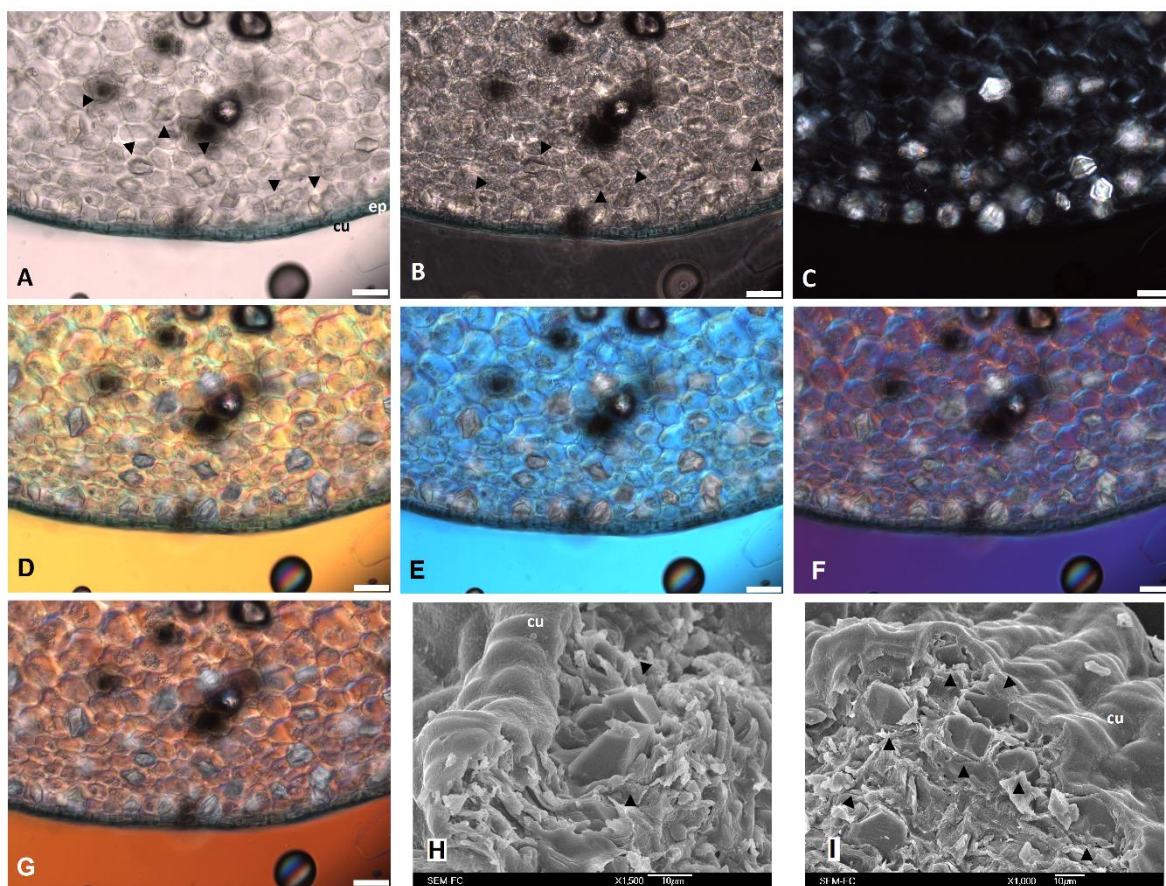


Figura 31. Secciones transversales del pecíolo de *Citrus limon*, presencia de idioblastos con cristales prismáticos en la epidermis y el córtex. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Cristales prismáticos romboides y poliédricos con poco contraste en campo claro; (B) Cristales prismáticos en contraste de fases con poco contraste; (C) Cristales prismáticos romboides y poliédricos con alta birrefringencia en luz polarizada, se aprecia sus orientación en el tejido; (D-G) Cristales prismáticos romboides y poliédricos en CDI, en tono gris y contrastantes con el fondo, se aprecia una apariencia de volumen en ellos y la orientación de los cristales dentro de los idioblastos. MEB, (H) cristales prismáticos de tamaño similar incrustados en la epidermis y (I) en el parénquima del córtex. Cabezas de flecha indican cristales. (cu-cutícula, ep-epidermis). Escala A-G 40µm.

Eriobotrya japonica

Lámina

En la lámina foliar (Figuras 32; 33) bajo MF se hallaron drusas extracelulares y cristales prismáticos intracelulares de tamaños similares, las drusas tenían protuberancias puntiagudas y estaban distribuidas en el parénquima esponjoso del mesófilo, los cristales prismáticos se observaron rectangulares y en idioblastos alineados paralelamente a los haces vasculares. Ambos cristales fueron claramente visibles en campo claro y se pudo

identificar su morfología, tamaño y ubicación en el tejido. Bajo luz polarizada, ambos cristales presentaron birrefringencia y se distinguió un patrón de distribución de los prismas paralelos a los haces vasculares. La observación de los cristales en contraste de fases fue difícil, algunas drusas de gran tamaño contrastaban, pero los cristales prismáticos de menor tamaño se perdieron en el tejido. CDI las drusas y los prismáticos se observaron en tono azul en fondo amarillo y dorado, en fondo azul y púrpura ambos cristales fueron ligeramente grises; tanto drusas como prismáticos mostraron birrefringencia en los fondos azul, púrpura y dorado; en todos los fondos de interferencia ambos cristales contrastaban y presentaban relieve que permitía ver sus bordes angulares. En la observación al MEB se observaron drusas fracturadas con apariencia de prismas aglomerados de bordes angulares, estos cristales se observaron en un tejido compactado que no permitió discernir si eran cristales extracelulares o intracelulares; se encontraron pocos cristales prismáticos de apariencia rectangular.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 34) bajo MF se observaron drusas extracelulares y cristales prismáticos intracelulares de tamaños similares, las drusas tenían protuberancias puntiagudas y se ubicaban en el parénquima del córtex, los cristales prismáticos se encontraban en abundancia debajo de la epidermis, ambos cristales fueron claramente visibles en todos los sistemas de observación. Ambos cristales fueron contrastantes en campo claro; birrefringentes en luz polarizada, donde se distinguían las caras de los cristales prismáticos y las protuberancias de las drusas; eran pobremente contrastantes en contraste de fases y se perdían en el tejido; en microscopia de CDI fueron ligeramente marrones y contrastantes en todos los fondos, donde se distinguían con mayor claridad y relieve las caras y bordes del prisma y las protuberancias de las drusas, el contraste de ambos cristales fue mejor en los fondos amarillo y azul. La observación al MEB mostró drusas extracelulares que aparentaban prismas aglomerados con bordes angulares y abundantes cristales primaticos intracelulares rectangulares y romboides de tamaño similar en el parénquima del córtex.

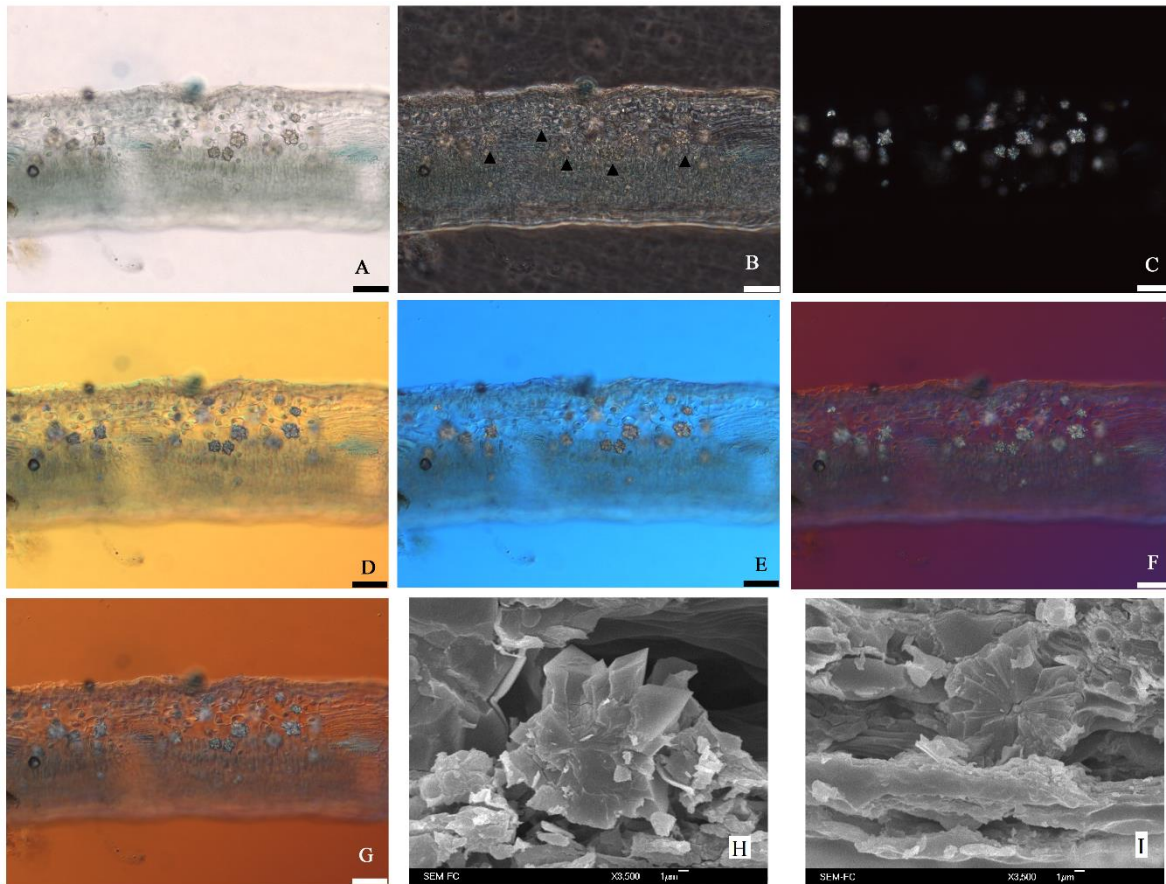


Figura 32. Secciones transversales de la lámina foliar de *Eriobotrya japonica* con presencia de drusas extracelulares en el parénquima del mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Drusas en campo claro; (B) drusas poco visibles en interferencia de fases, (C) drusas altamente birrefringentes en luz polarizada; (D-G) drusas en CDI, (D, G) drusas azules, (E, F) drusas grises. MEB, (H-I) drusa fragmentada relativamente esférica de prismas poligonales aglomerados. Escala A-G 40 μ m.

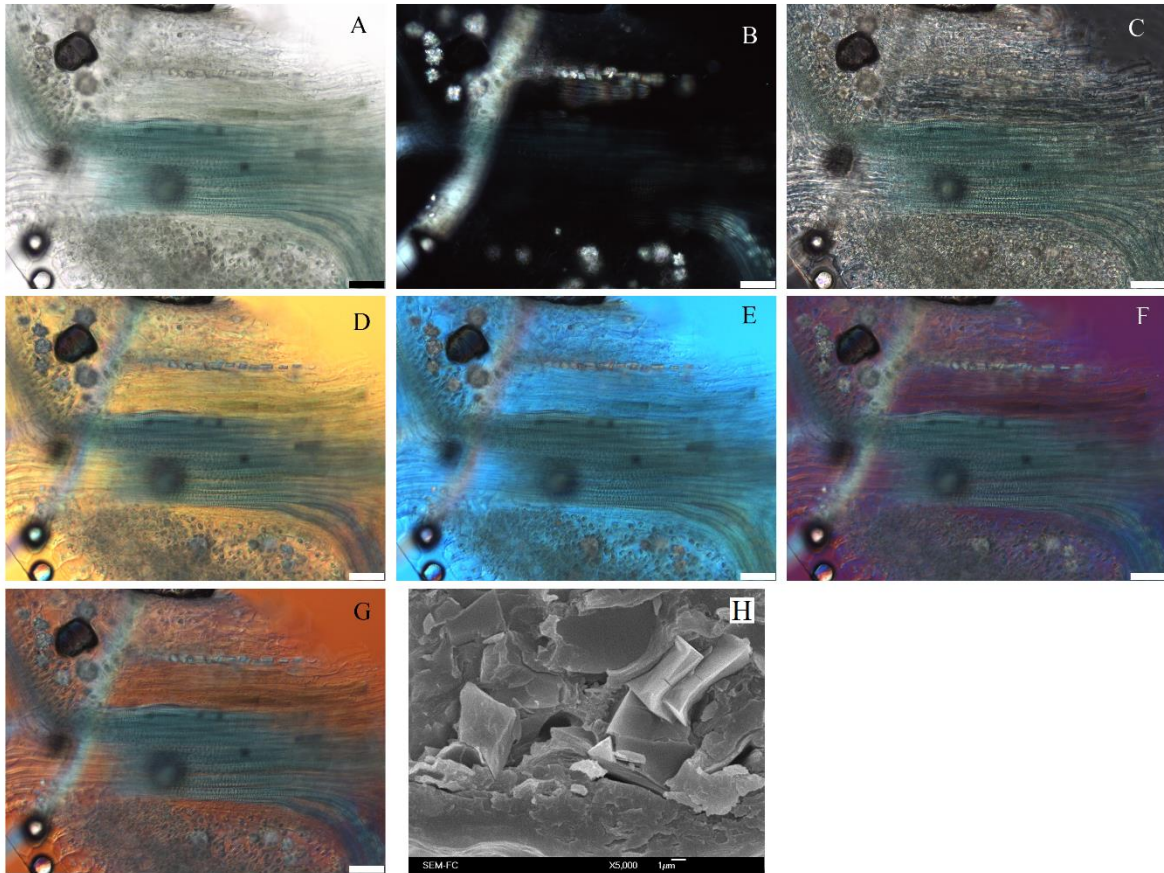


Figura 33. Secciones transversales de la lámina foliar de *Eriobotrya japonica* con presencia de drusas extracelulares e idioblastos con cristales prismáticos en el parénquima del mesófilo. MF (A-G), MEB (H). (A) Drusas y prismáticos en campo; (B) drusas y prismáticos birrefringentes en luz polarizada; (C) drusas y prismáticos en contraste de fases; (D-G) drusas y prismáticos en CDI, ambos cristales en tonos ligeramente azules (D, G) y grises (E, F). MEB (H) cristales prismáticos rectangulares a la derecha de una drusa fragmentada. Escala A-G 40μm.

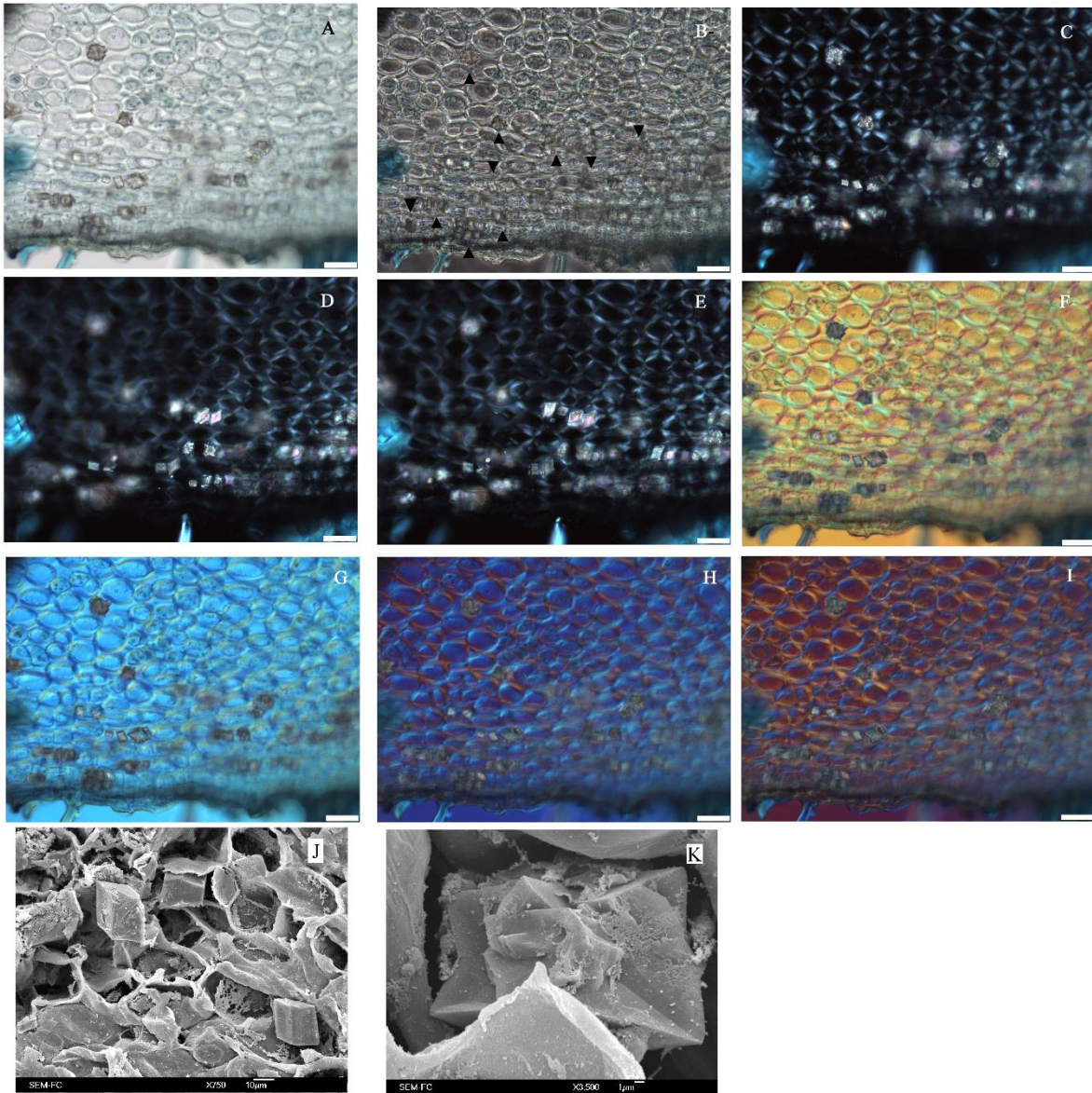


Figura 34. Secciones transversales del pecíolo de *Eriobotrya japonica* con presencia de drusas extracelulares en idioblastos con cristales prismáticos en el parénquima del córtex. MF (A-I), MEB (J-O). (A) Drusas y prismáticos en campo claro; (B) drusas y prismáticos poco visibles en contraste de fases, (C-E) drusas y prismáticos birrefringentes en luz polarizada; (F-I) drusas y prismáticos en CDI, (H-I) ambos cristales muestran ligera birrefringencia. MEB, (J) cristales prismáticos cúbicos; (K) drusas extracelulares con apariencia de prismas aglomerados. Escala A-I 40 μ m.

Lycopersicum esculentum

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 35) bajo MF se hallaron idioblastos con arenas cristalinas en el mesófilo de la hoja; estos fueron visibles en campo claro como cúmulos marrones contrastantes con el fondo. Bajo luz polarizada, las arenas fueron birrefringentes y se

distinguió la forma triangular de los cristales individuales. La observación en contraste de fases provocó confusión al observar los cristales individuales de las arenas pues se formaban halos de luz no sólo en los cristales aislados, sino también en otras partículas de la preparación. En microscopía CDI los cúmulos de arenas se observaron marrones en todos los fondos y los cristales individuales se observaron en tono azul con mayor contraste y apariencia de volumen en fondo amarillo, púrpura y dorado, la observación de estos mismos en fondo azul llegó a ser del mismo tono y contrastaba poco, sin embargo los cristales eran birrefringentes en todos los fondos y se distinguían la forma de los cristales individuales. La observación al MEB fue complicada, el tejido estaba compactado, sin embargo, se observaron agrupaciones de arenas cristalinas con forma piramidal de diferente tamaño dentro del idioblasto.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 36) bajo MF se observó poca arena de forma piramidal, pocas drusas y cristales prismáticos en el parénquima del córtex, los cristales fueron claramente visibles en todos los campos de observación debido a que el corte era delgado, aunque algunas burbujas de aire en la preparación entorpecían su observación. En campo claro las drusas y los cristales prismáticos se observaban claramente y las arenas se perdían o eran ocultadas por aire encapsulado de la muestra, se identificaban como cristales intracelulares; todos los cristales fueron birrefringentes en luz polarizada y así resaltaba su morfología. Todos los cristales fueron poco contrastantes en el sistema contraste de fases debido a su tamaño y a los artefactos en la preparación. Las tres morfologías de cristales fueron ligeramente azules, contrastantes y con ligero relieve en las observaciones en CDI en fondo amarillo, púrpura y dorado, en fondo azul los cristales se tornaron ligeramente marrones aunque contrastaban de igual manera y sólo se mostró birrefringencia en el fondo morado y dorado. La observación al MEB sólo mostró cúmulos de arenas cristalinas de forma piramidal de diferente tamaño en un el tejido compactado de parénquima del córtex.

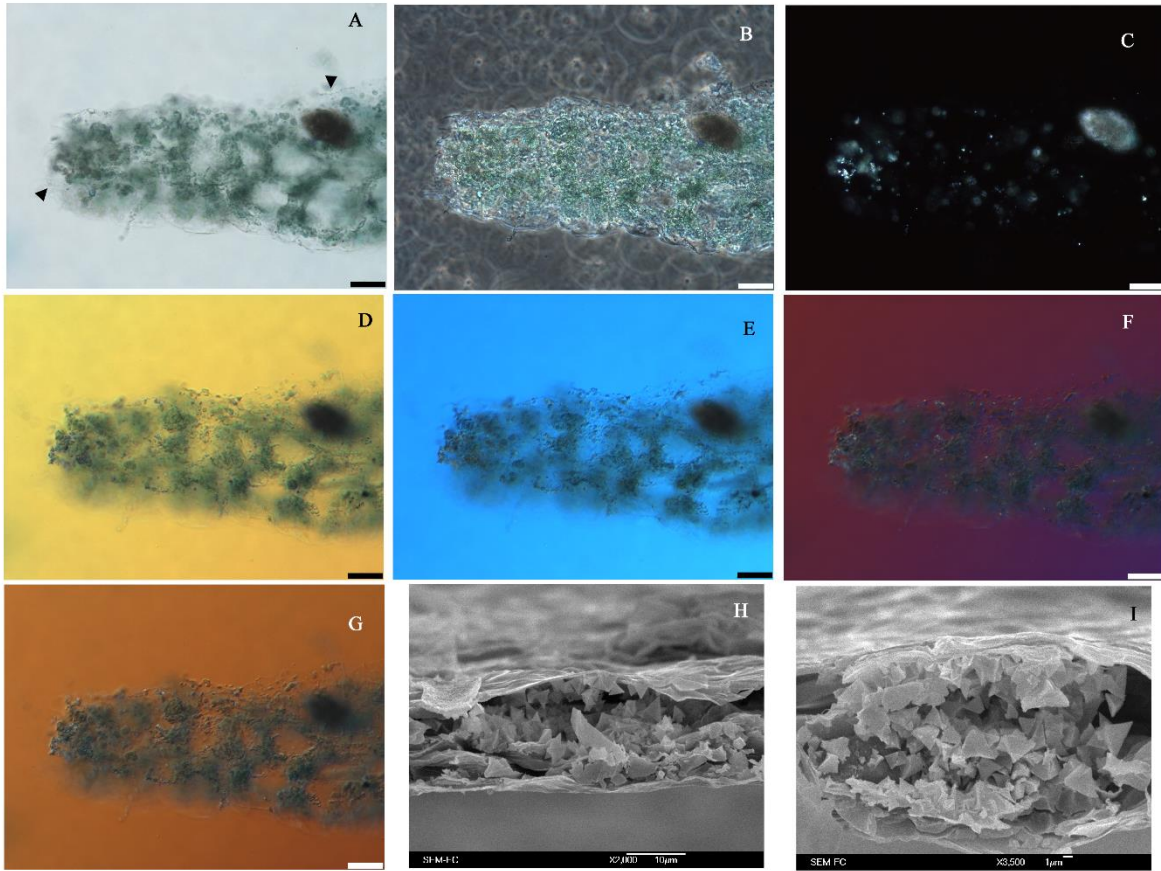


Figura 35. Sección transversal de la lámina foliar de *Lycopersicum esculentum*, idioblastos con arenas cristalinas en el mesófilo de la hoja. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Arena cristalina poco contrastante en campo claro; (B) Arena cristalina en contraste de fases; (C) Arena cristalina birrefringente en luz polarizada, (D-G) Arena cristalina en CDI, en todos los fondos contrasta y es birrefringente. MEB, (H-I) Arenas piramidales dentro del idioblasto en el parénquima del mesófilo de la hoja. Cabezas de flecha indican cristales. Escala A-G 40 μ m.

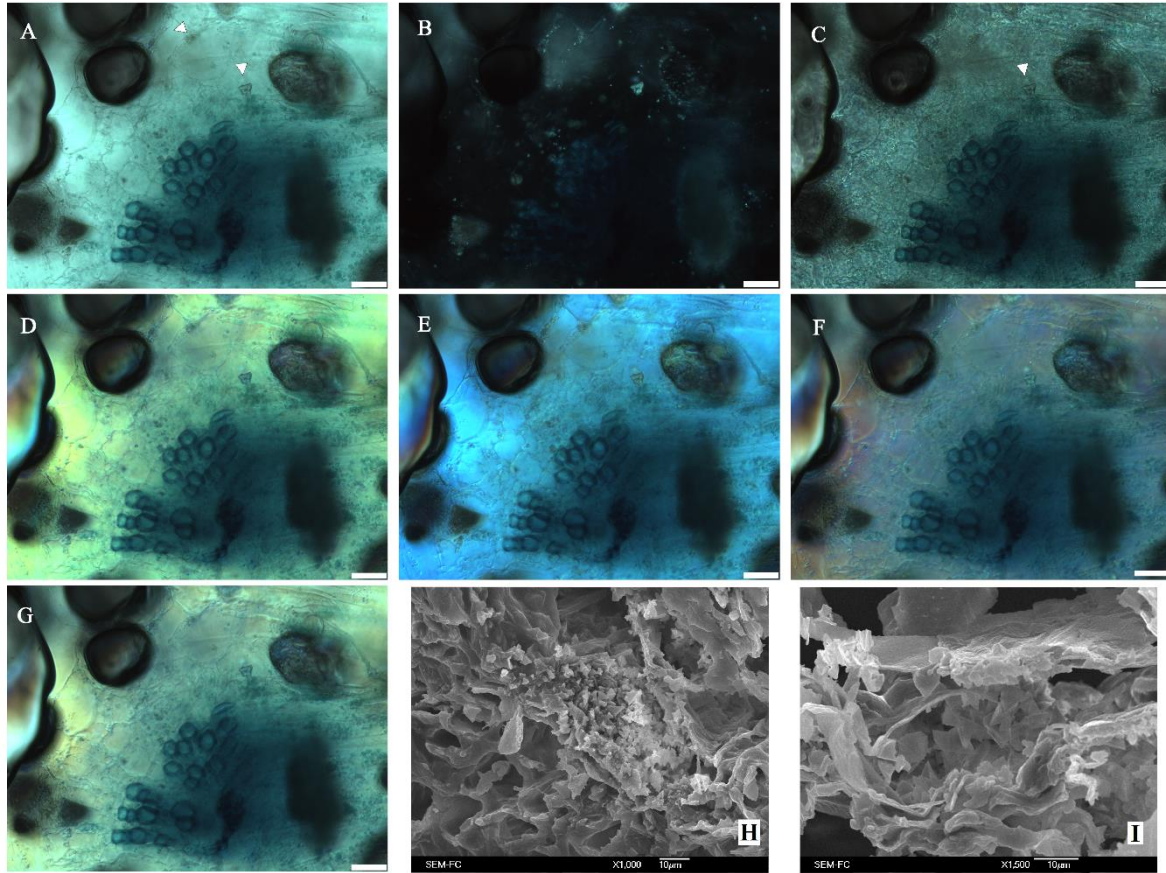


Figura 36. Sección transversal del peciolo de *Lycopersicum esculentum*, presencia de drusa, cristal prismático y arenas cristalinas en el parénquima del córtex. MF (A-G), MEB (H-I). (A) drusa, cristal prismático y arenas cristalinas en campo claro; (B) drusa, cristal prismático y arenas cristalinas birrefringentes en luz polarizada; (C) drusa, cristal prismático y arenas cristalinas en contraste de fases, (E-H) drusa, cristal prismático y arenas cristalinas en CDI. MEB, (H-I) Arenas piramidales en el parénquima del córtex del peciolo. Cabezas de flecha indican cristales. Escala A-G 40µm.

Paphiopedilum insigne

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 37) bajo MF se observaron idioblastos con rafidios en el parénquima del mesófilo, los rafidios se encontraron en sección trasversal y parecían cristales cuadrados que permitía observar las caras de los cristales aciculares individuales. En campo claro se observaron claramente cuatro caras de los cristales individuales de los rafidios dispuestos en haces. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes y resaltaba la forma y tamaño de los cristales aciculares Su observación en

contraste de fases permitió observar la forma de los cristales aciculares y ubicados en el mesófilo. En CDI los rafidios se observaron ligeramente grises, con contraste y ligera birrefringencia en todos los fondos de interferencia. En la observación al MEB, se observaron rafidios como paquetes de decenas de cristales aciculares con extremos poco redondeados, de más de cuatro caras en sección transversal, dentro del idioblastos distribuidos en el mesófilo de la hoja.

Raíz

En la raíz (Figura 38) bajo MF se observaron idioblastos con rafidios desordenados y no en haces, los idioblastos se hallaron en el parénquima del córtex, los cristales aciculares que conformaban los rafidios tenían extremos puntiagudos. En campo claro la morfología, tamaño y ubicación de los cristales y su disposición en el idioblasto se observaban claramente. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes y se observaron las mismas características de su morfología que se observaron en campo claro. En la observación en contraste de fases contrastaban lo suficiente para ubicarlos. En microscopía CDI los rafidios se observaron en tono azul en fondo amarillo y dorado, y, en tono gris en los fondos azul y púrpura, presentaron contraste y apariencia de volumen, ligeramente birrefringentes en los fondos amarillo y azul, relieve del acomodo de los cristales aciculares y ligera birrefringencia en los fondos púrpura y dorado. En la observación al MEB, se observaron idioblastos con rafidios como paquetes de centenas de cristales aciculares con extremos poco redondeados, con lados definidos en sección transversal, distribuidos en el parénquima del córtex.

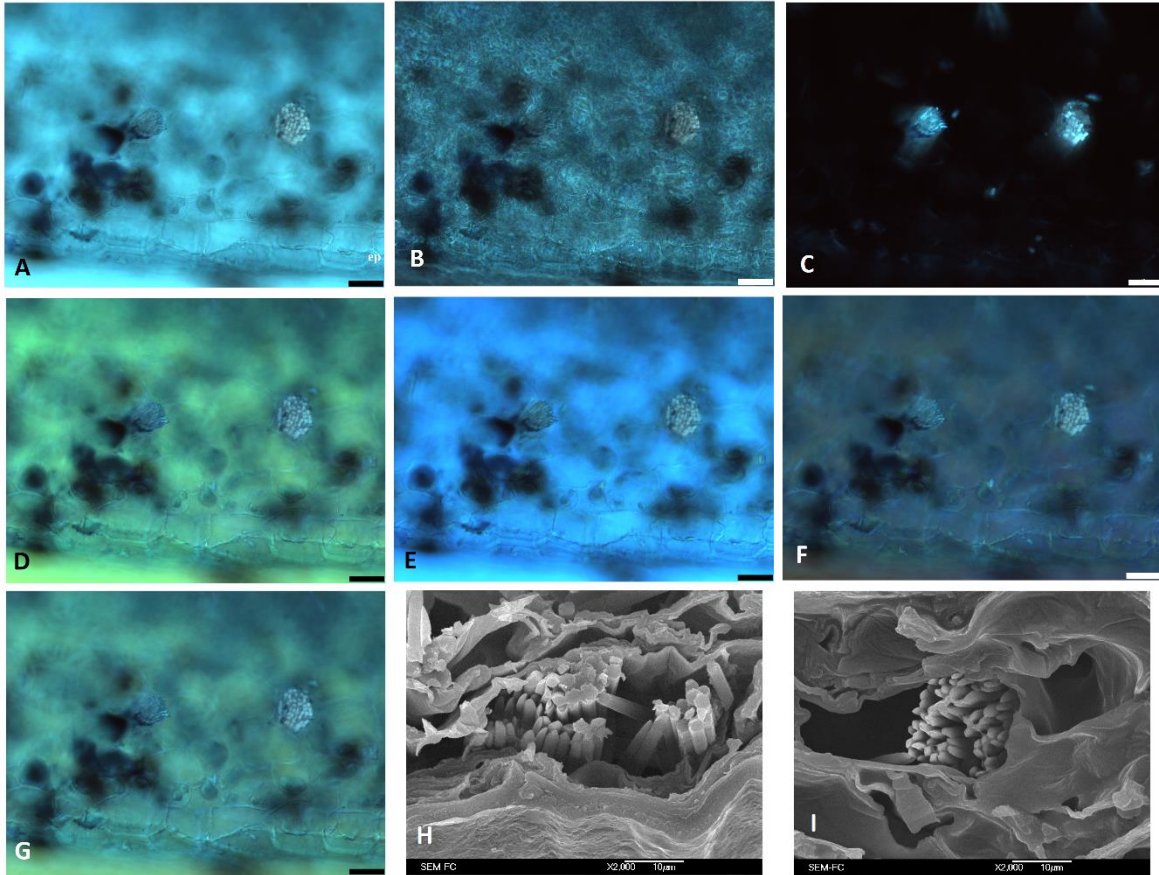


Figura 37. Secciones transversales de la lámina foliar de *Paphiopedilum insigne*, con presencia de idioblastos con rafidios seccionados transversalmente en el parénquima del mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, en tono gris en todos los fondos en los cuales contrastan y muestran ligera birrefringencia. MEB, (H-I) Rafidios como haces de decenas de cristales aciculares con extremos poco redondeados (I), circulares en sección transversal (H). Escala A-G 40 μ m.

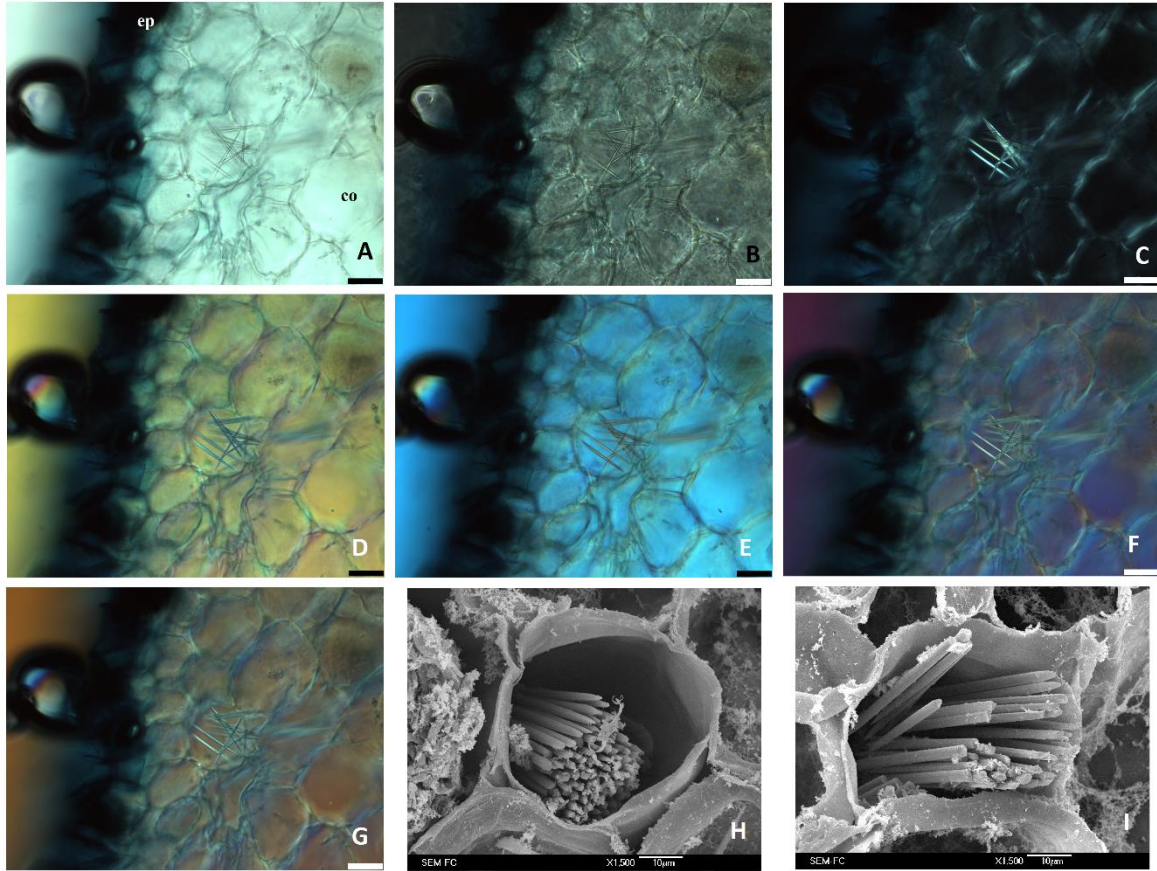


Figura 38. Secciones transversales de raíz de *Paphiopedilum insigne* con presencia de idioblastos con rafidios desordenados en el parénquima del córtex. MF (A-G), SEM (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, contrastan, se observa relieve de cristales individuales y muestran ligera birrefringencia; en D cristales en tono azul, en E-G cristales en tono gris. SEM, (H-I) idioblastos con haces de rafidios de extremos ligeramente redondeados. (ep-epidermis, co-córtex). Escala A-G 40µm.

Phalaenopsis Sogo Diana ‘Sophie’

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 39) bajo MF se observaron pocos idioblastos con rafidios desordenados, los idioblastos se hallaron distribuidos en el mesófilo de la hoja, los cristales aciculares que conformaban los rafidios tenían extremos puntiagudos. La morfología de los rafidios en campo claro se observaron claramente, al igual que su tamaño y disposición en el idioblasto. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes en todo el mesófilo de la hoja y su morfología, tamaño, ubicación y disposiciones en el idioblasto era más evidente. La observación de los rafidios en contraste de fases fue pobre, contrastaba de

igual manera con el tejido y los cristales se perdían. En CDI los rafidios se observaron en tono azul en los fondos amarillo y dorado, grises en fondos azul y púrpura y con contraste, birrefringencia y relieve de sus longitudes y extremos en todos los fondos de interferencia. En la observación al MEB se observaron rafidios como paquetes de decenas de cristales aciculares con extremos puntiagudos, circulares en sección trasversal, con extremos puntiagudos dentro del idioblasto, distribuidos en el mesófilo de la hoja.

Raíz

En la raíz (Figura 40) bajo MF se observaron idioblastos con rafidios desordenados y no en haces, los idioblastos se hallaron en el parénquima del córtex, los cristales aciculares que conformaban los rafidios tenían extremos puntiagudos. Estos cristales en campo claro se observaron claramente desordenados y no en haces. Bajo luz polarizada, los cristales fueron birrefringentes y se distinguía claramente su morfología, tamaño, extremos y disposición en el idioblasto. La observación de cristales en contraste de fases fue mala, contrastaba de igual manera con el tejido y se perdían. En CDI los rafidios se observaron azules en fondo amarillo y dorado, gris en los fondos azul y púrpura, con contraste y apariencia de volumen en todos los fondos, ligeramente birrefringentes en los fondos amarillo y azul, y, altamente birrefringentes en los fondos púrpura y dorado. En la observación al MEB, se observaron rafidios como paquetes de cristales aciculares con extremos puntiagudos, circulares en sección trasversal, dispuestos en haces y distribuidos en el córtex de la raíz.

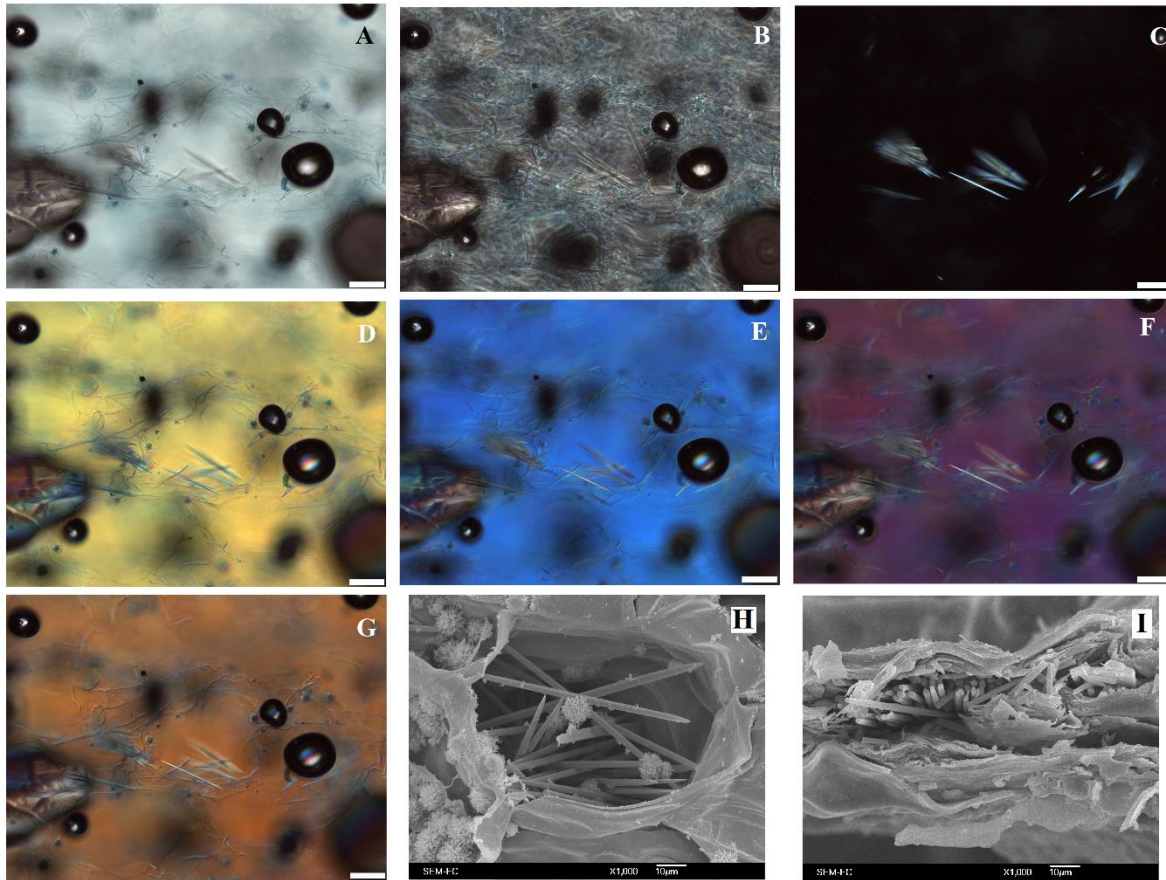


Figura 39. Secciones transversales de la lámina foliar de *Phalaenopsis* Sogo Diana ‘Sophie’, presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima del mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI contrastan y aparentan volumen, en D, G cristales en color azul, en E, F en un tono gris, (D, E) cristales con ligera birrefringencia, (F, G) cristales con alta birrefringencia. MEB, (H) rafidios desordenados con extremos puntiagudos dentro del idioblasto. (I) Rafidios fragmentados en sección trasversal. Escala A-G 40µm.

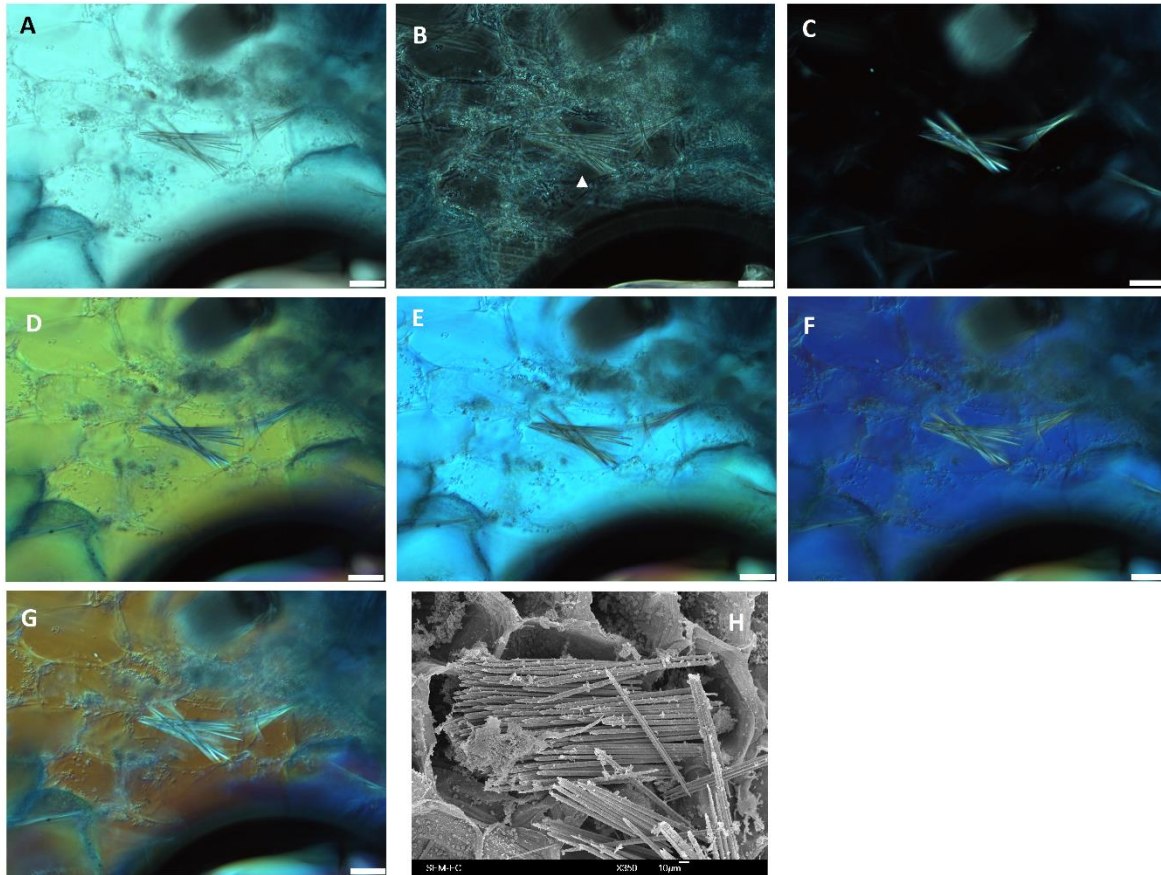


Figura 40. Secciones transversales de raíz de *Phalaenopsis* Sogo Diana 'Sophie', con presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima del córtex. MF (A-G), MEB (H). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, contrastan, muestran relieve los cristales individuales y muestran birrefringencia, en D y G los cristales son ligeramente azules. MEB, (H) rafidios con extremos puntiagudos. Escala A-G 40μm.

Phytolacca rugosa

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figuras 41; 42), bajo MF se observaron idioblastos con rafidios en el parénquima en empalizada y en el parénquima esponjoso del mesófilo, la orientación de los manojos de rafidios en ambos tejidos era diferente, en el parénquima en empalizada se encontraban perpendiculares a la epidermis (Figura 41) y en el parénquima esponjoso estaban paralelos a la epidermis (Figura 42); los idioblastos eran grandes células alargadas con un haz de cristales aciculares, los cristales aciculares de los rafidios eran delgados con extremos puntiagudos; fueron fáciles de visualizar en todos los sistemas de MF debido a su

gran tamaño, morfología y a que el corte era delgado. En campo claro se observaron densos paquetes de cristales aciculares que contrastaban con el fondo y con el tejido teñido. Bajo luz polarizada, los rafidios fueron altamente birrefringentes en todo el mesófilo de la hoja, destacando los extremos. La observación en contraste de fases permitía distinguir los cristales del resto del tejido del mesófilo sin halos de luz ni sobras. En CDI los rafidios se observaron ligeramente birrefringentes en tono pardo, contrastantes en los fondos amarillo y azul, en los fondos púrpura y dorado contrastaban en menor grado, pero en todos los fondos de interferencia se observó relieve en los cristales aciculares que conformaba los rafidios. En la observación al MEB se observaron rafidios como haces de miles de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos, algunos se hallaron dentro del idioblasto y con una membrana fina a su alrededor (Figura 42-H), otros en un tejido compactado que no permitió localizarlos en el mesófilo.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 43) se observaron bajo MF idioblastos con rafidios desordenados en su interior y no en haces, los idioblastos se hallaron en el parénquima del córtex, los cristales aciculares que conformaban los rafidios eran delgados con extremos puntiagudos. En campo claro se observaron idioblastos y rafidios contrastantes en el tejido. Bajo luz polarizada, los cristales fueron altamente birrefringentes lo que permitió ver la longitud, extremos y disposición de estos en el idioblasto. La observación de cristales en contraste de fases fue difícil, los cristales contrastaban ligeramente y presentaban un halo de luz. En CDI los rafidios se observaron con buen contraste y apariencia de volumen en todos los colores de interferencia, en tono ligeramente azul en los fondos amarillo, púrpura y dorado, y en un tono ligeramente verde en el fondo azul. En la observación al MEB se hallaron rafidios como paquetes de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos, incrustados en un tejido demasiado compactado en el que no se distinguieron idioblastos.

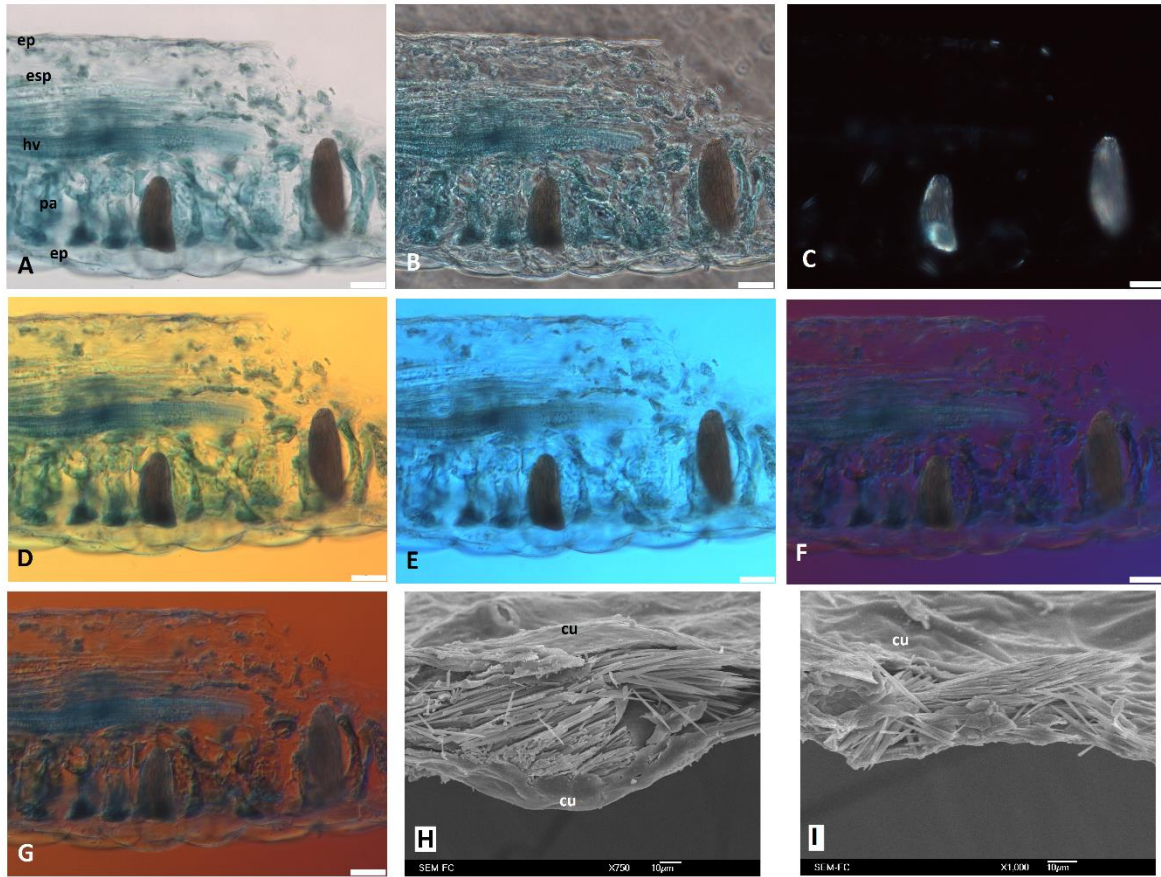


Figura 41. Secciones transversales de la lámina foliar de *Phytolacca rugosa*, presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima en empalizada del mesófilo. MF (A-G), MEB (H-I). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases. (C) Rafidios con birrefringencia sobresaliente en sus extremos en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI en tono marrón, contrastantes, con relieve los cristales aciculares y ligera birrefringencia en todos los fondos. MEB (H-I); Rafidios como paquetes de miles de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos. (cu-cutícula, ep-epidemis, esp-parénquima esponjoso, hv-haz vascular, pa-parénquima en empalizada). Escala A-G 40 μ m.

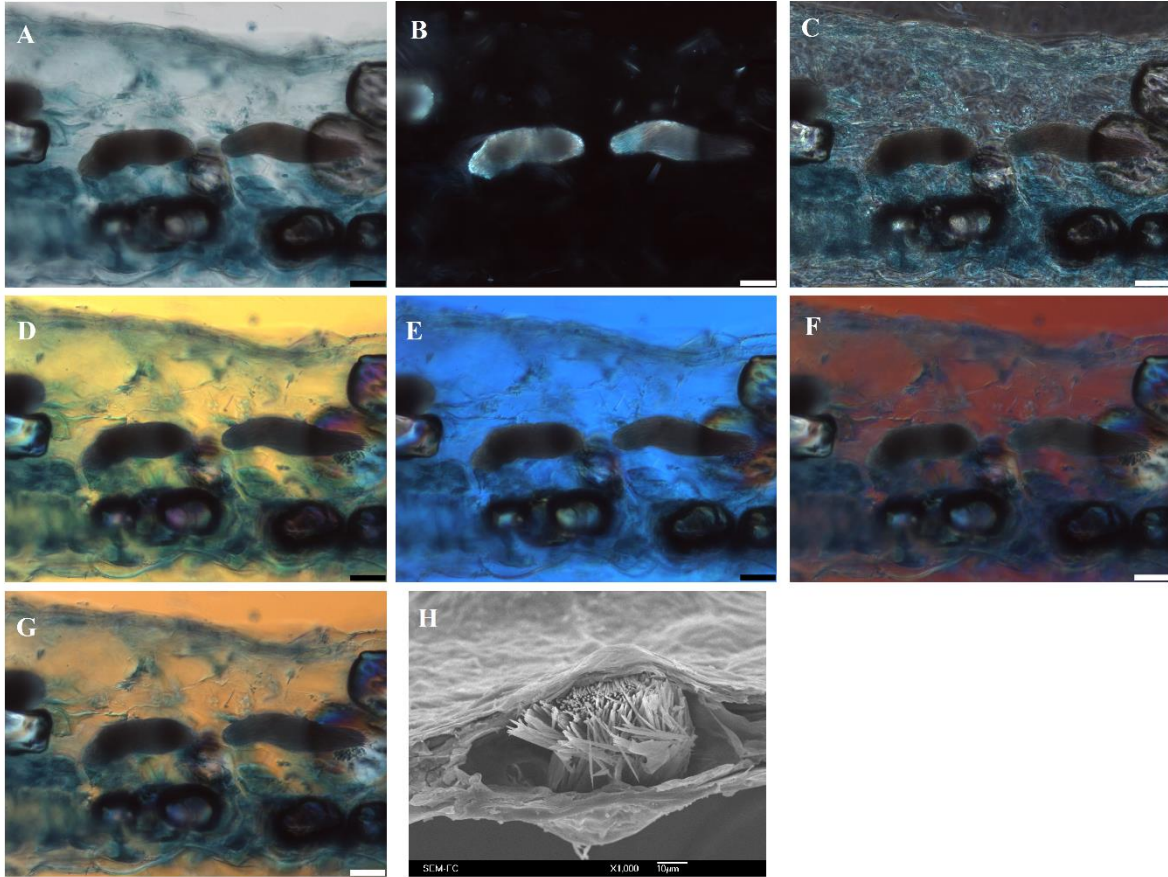


Figura 42. Secciones transversales de la lámina foliar de *Phytolacca rugosa*, presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima esponjoso del mesófilo. MF (A-G), MEB (H). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios con birrefringencia sobresaliente en los extremos en luz polarizada; (c) Rafidios en contraste de fases; (D-G) Rafidios en CDI en tono marrón, contrastantes con el fondo. MEB (H) Rafidios como paquetes de miles de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos rodeados de un membrana fina dentro del idioblasto. Escala A-G 40μm.

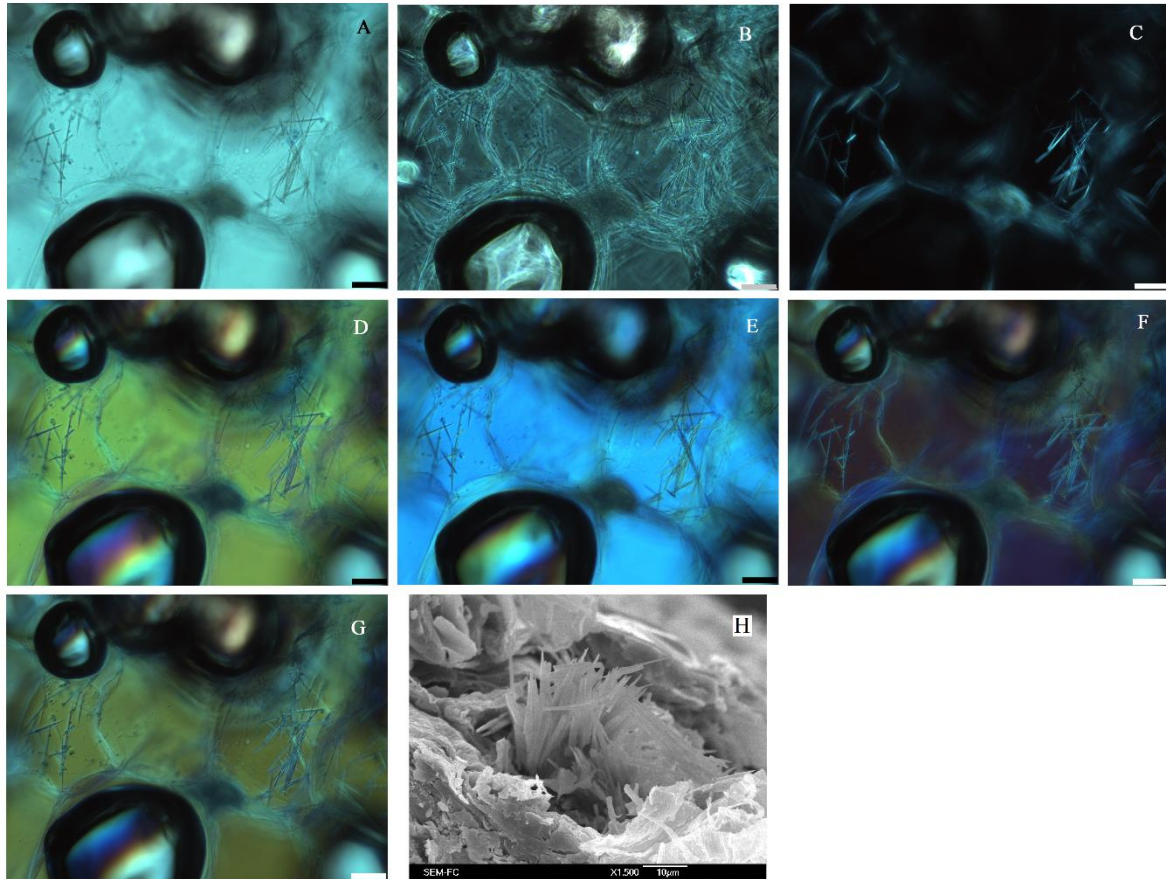


Figura 43. Secciones transversales del peciolo de *Phytolacca rugosa*, presencia de idioblastos con rafidios en el parénquima del córtex. MF (A-G), MEB (H). (A) Rafidios en campo claro; (B) Rafidios en contraste de fases; (C) Rafidios birrefringentes en luz polarizada; (D-G) Rafidios en CDI, en todos los fondos presentan relieve, (D, F, G) cristales de tono azul, contrastantes con el fondo y ligeramente birrefringentes, (E) cristales en tono verde, contrastantes con el fondo. MEB (H) Rafidios en haz de cristales aciculares finos con extremos puntiagudos. Escala A-G 40 μ m.

Punica granatum

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 44) bajo MF se hallaron abundantes idioblastos con drusas y cristales primáticos, los prismas del doble de tamaño que las drusas; las drusas tenían protuberancias redondeadas y los primas tenían aspecto romboide. Ambos cristales estaban distribuidos a mitad del mesófilo, entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso. Ambos cristales fueron claramente visibles en campo claro, su morfología, tamaño y ubicación se distinguían en el tejido teñido. Bajo luz polarizada, ambos cristales fueron birrefringentes, la morfología, tamaño, ubicación y bordes de sus formas eran

características visibles. En la observación en contraste de fases ambos cristales contrastaron junto con el tejido, sin embargo sobresalen y se pueden identificar sus morfologías. En todos los fondos de CDI las drusas se observaron en tono marrón, los cristales prismáticos se tornaron ligeramente grises, en todos los colores de interferencia y ambos cristales contrastaban, presentaban relieve de sus superficies y birrefringencia. En la observación al MEB se hallaron drusas con apariencia de prismas rectangulares aglomerados, prismas rectangulares con caras planas y cóncavas.

Pecíolo

En el pecíolo de la hoja (Figura 45) bajo MF se observaron drusas y prismas intracelulares de tamaños similares, aunque había prismas de mayor tamaño; las drusas aparentaban tener protuberancias puntiagudas y los cristales prismáticos eran romboides, ambos se distribuían ampliamente por todo el parénquima del córtex y fueron claramente visibles en todos los campos de observación. Ambos cristales contrastan en campo claro; fueron birrefringentes en luz polarizada, en este sistema de iluminación se distinguían las caras de los cristales prismáticos y las protuberancias de las drusas. En contraste de fases los cristales contrastaban y se distinguió su morfología. Ambos cristales fueron ligeramente grises y contrastantes en todas las observaciones de CDI donde se distinguían con mayor claridad y apariencia de volumen las caras del prisma y las protuberancias de las drusas, además mostraron birrefringencia. La observación al MEB mostró idioblastos con drusas que aparentan prismas de diferentes tamaños aglomerados en distintas orientaciones e idioblastos con cristales prismáticos cúbicos y romboides de caras planas; ambos abundantes en el parénquima del córtex.

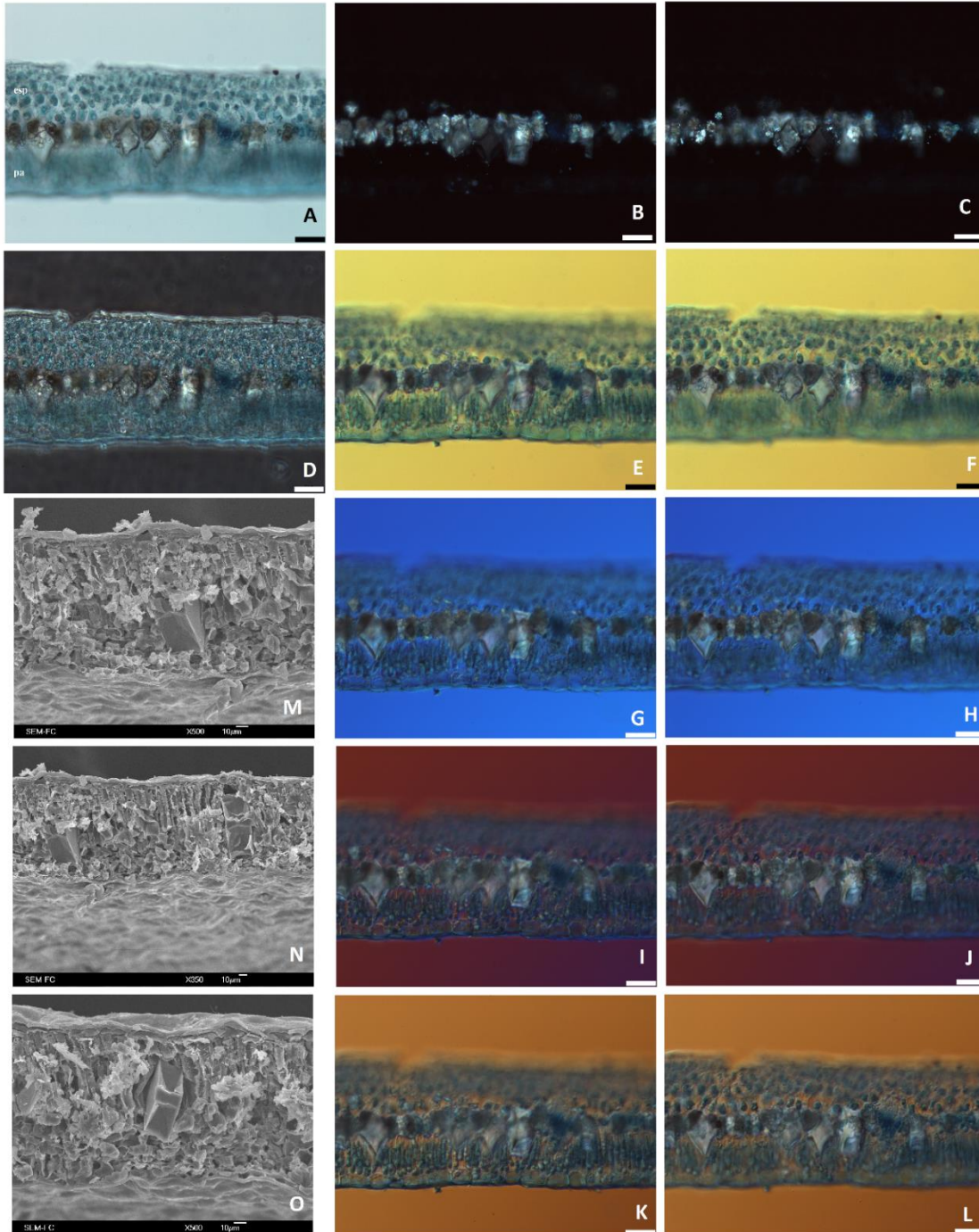


Figura 44. Secciones transversales de la lámina foliar de *Punica granatum* con presencia de drusas y prismáticos entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso del mesófilo. MF (A-L), MEB (M-O). (A) Drusas y prismáticos contrastantes en campo claro; (B-C) drusas y cristales prismáticos birrefringentes en luz polarizada; (D) drusas y prismáticos en contraste de fases. (E-L) drusas y prismáticos en CDI, drusas en tono marrón, prismáticos en tono gris, en todos los fondos de interferencia, ambos cristales contrastan, presentan relieve y birrefringencia. MEB, (M) pequeña drusa con apariencia de prismas rectangulares aglomerados, (M-O) cristales prismáticos con caras laterales cóncavas, en el mesófilo de la hoja. (esp-parénquima esponjoso, pa-parénquima en empalizada). Escala A-L 40µm.

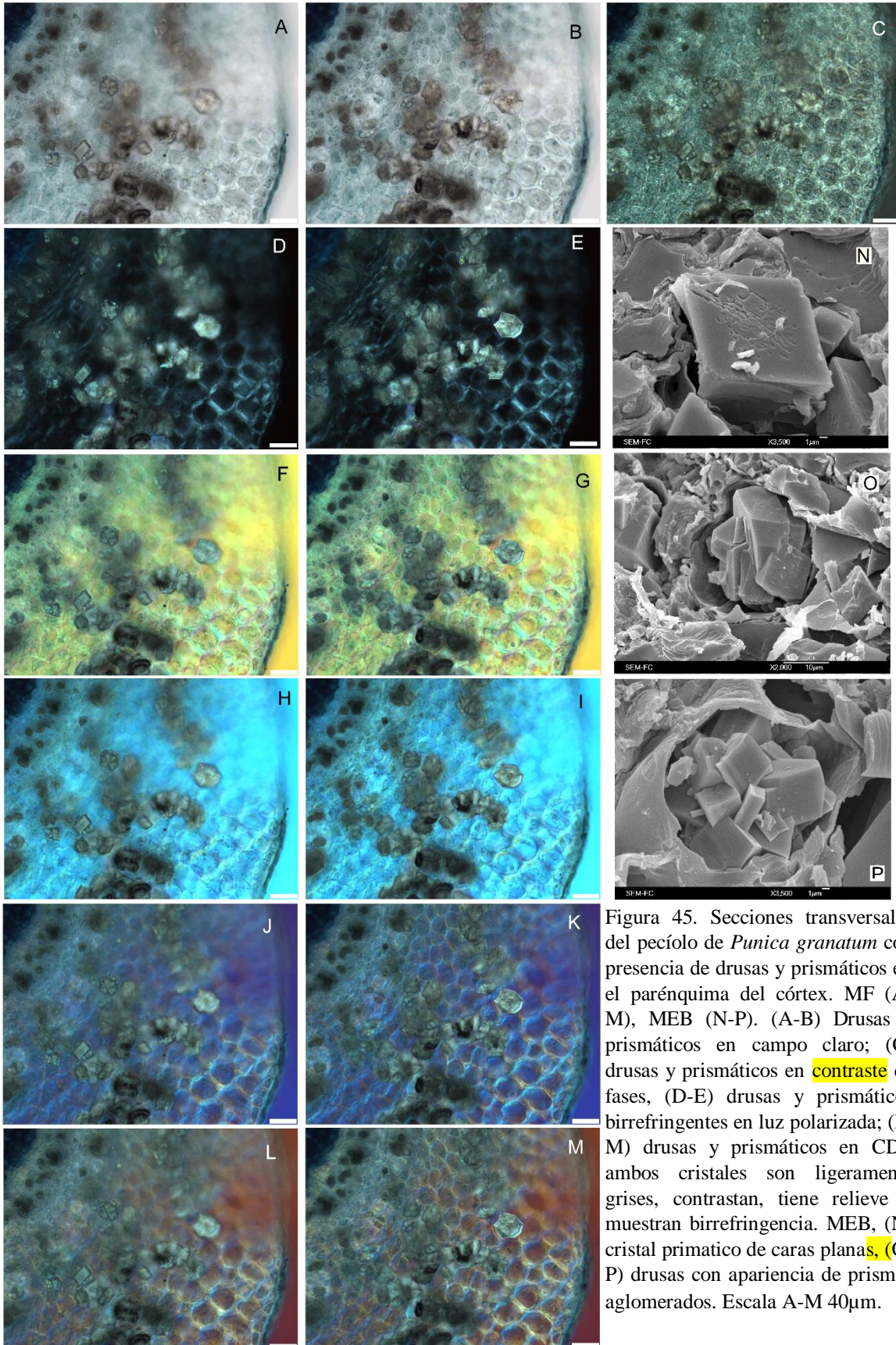


Figura 45. Secciones transversales del pecíolo de *Punica granatum* con presencia de drusas y prismáticos en el parénquima del córtex. MF (A-M), MEB (N-P). (A-B) Drusas y prismáticos en campo claro; (C) drusas y prismáticos en **contraste** de fases, (D-E) drusas y prismáticos birrefringentes en luz polarizada; (F-M) drusas y prismáticos en CDI, ambos cristales son ligeramente grises, contrastan, tiene relieve y muestran birrefringencia. MEB, (N) cristal primático de caras planas, (O-P) drusas con apariencia de prismas aglomerados. Escala A-M 40µm.

Tradescantia fluminensis

Lámina foliar

En la lámina foliar (Figura 46; 47) bajo MF se hallaron idioblastos en la epidermis con cristales prismáticos, drusas, pequeños rafidios y estiloideos, todos ellos de tamaños diferentes. Se hallaron idioblastos con un sólo cristal e idioblastos dúplex, estos últimos con combinaciones de rafidios pequeños y drusas, cristales prismáticos y drusas y, cristales prismáticos y estiloideos. Todos los cristales fueron claramente visibles en campo claro, se observó su ubicación en el tejido y en los idioblastos, las drusas se observaron con protuberancias puntiagudas, los cristales prismáticos se observaron con forma rectangular (Figura 47-A), los rafidios se observaron desordenados y pequeños, y los estiloideos tenían la misma longitud que los idioblastos. Bajo luz polarizada, todos los cristales mencionados eran birrefringentes y su morfología, ubicación y tamaño eran mucho más evidentes. En la observación en contraste de fases todos los cristales contrastaron en el tejido delgado. En microscopía de CDI todos los cristales se observaron de tono gris y azul en fondo purpura, azul y dorado, en fondo amarillo se tornaron ligeramente azules y verdes; en todos los fondos de interferencia los cristales contrastaron, presentaron relieve y mostraron birrefringencia. En la observación al MEB el tejido de la lámina fue delicado, la mayoría de los cristales parecían estar fuera de su sitio original ya que no se observaron idioblastos que los contuvieran; sobre la epidermis de la hoja se hallaron estiloideos y rafidios (Figuras 46-M, N; 47-I, L). En el mesófilo de la hoja se encontraron drusas de protuberancias radiales con apariencia de prismas aglomerados en forma de punta de canoa que parecían emerger del núcleo (Figura 46-O; 47-J), también había cristales prismáticos con extremos piramidales (Figura 47-K) rafidios pequeños de 20-25 μm y rafidios grandes de más de 100 μm de longitud. No se observaron idioblastos dúplex.

Pecíolo

En el pecíolo envainado de la hoja (Figuras 48) bajo MF se hallaron pocos cristales prismáticos, rafidios con extremos puntiagudos y escasas arenas en el parénquima. No se observaron idioblastos dúplex. En campo claro todos los cristales mencionados fueron vistos con dificultad, pues el tejido tenía escasa tinción. Bajo luz polarizada, todos fueron birrefringentes y se podía observar su morfología, tamaño y extremos. La observación en

contraste de fases fue difícil y los pequeños cristales se perdían en el tejido. En microscopía CDI los cristales se observaron en diferentes tonos en cada color de interferencia, las arenas se observaron ligeramente azules en todos los fondos, los rafidios y cristales primáticos fueron ligeramente azules en fondo amarillo y dorado, grises en fondo púrpura y ligeramente púrpuras en fondo azul; en todos los colores de interferencia los cristales contrastaron, tenían ligero relieve y mostraron birrefringencia. En la observación al MEB se encontraron cristales prismáticos alargados con extremos piramidales dentro de idioblastos y rafidios de tres o cuatro lados con extremos puntiagudos. No se observaron arenas ni idioblastos dúplex.

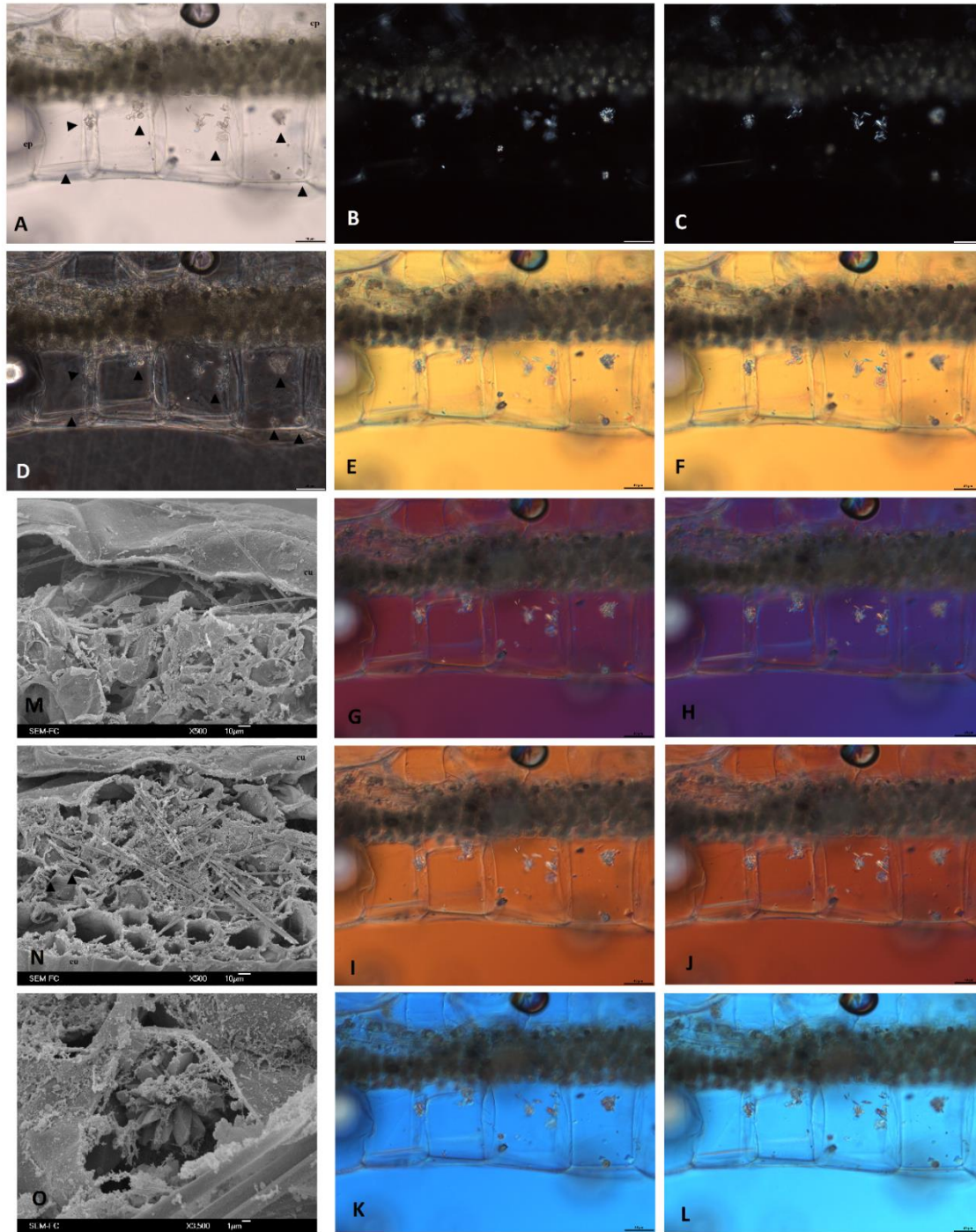


Figura 46. Sección transversal de la lámina foliar de *Tradescantia fluminensis*, con presencia de idioblastos epidérmicos dúplex rafidios-drusa, drusa-estiloideo MF (A-L), MEB (M-O). (A) En campo claro drusas, estiloideo y rafidios pequeños se ven claramente; (B-C) drusas, estiloideo y rafidios pequeños birrefringentes en luz polarizada; (D) drusas, estiloideo y rafidios pequeños contrastan en interferencia de fases; (E-L) drusas, estiloideo y rafidios pequeños en CDI. MEB, (N, O) drusas con apariencia de cristales aglomerados en forma de punta de canoa, (M) rafidios desordenados en la epidermis y (N) en el mesófilo. Cabezas de flecha indican cristales. (cu-cutícula, ep-epidermis). Escala A-L 40µm.

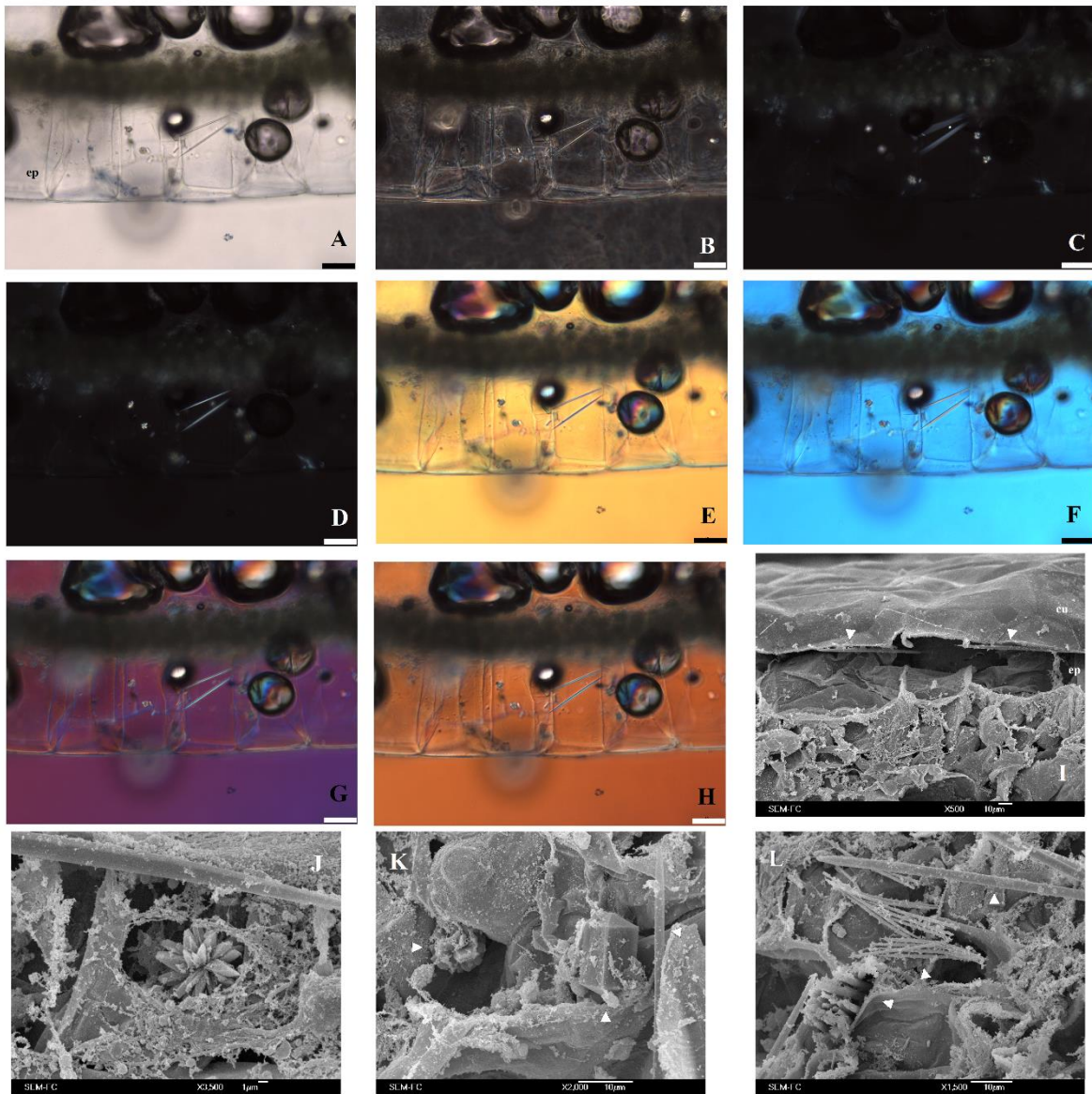


Figura 47. Sección transversal de la lámina de *Tradescantia fluminensis*, con presencia de idioblastos epidérmicos con un sólo cristal y dúplex drusa-prisma y prisma-estiloideo. MF (A-L), MEB (M-O). (A) En campo claro las drusas, cristales prismáticos y estiloideos se ven claramente; (B) en contraste de fases las drusas, cristales prismáticos y estiloideos contrastan; (C-D) drusas, cristales prismáticos y estiloideos birrefringentes en luz polarizada, (E-H) drusas, cristales prismáticos y estiloideos en CDI, contrastan en tono azul, presentan birrefringentes. MEB, (J, K) drusas con apariencia de prismas aglomerados en forma de punta de canoa; (K) cristal prismático con extremos piramidales; (I) estiloideos con extremos puntiagudos en la epidermis de la hoja, (J, K, L) y en el mesófilo; (L) rafidios grandes dentro de su idioblasto y pequeños en el parénquima del mesófilo de la hoja. Cabezas de flechas indican cristales (cu-cutícula, ep-epidemis). Escala A-H 40 μ m.

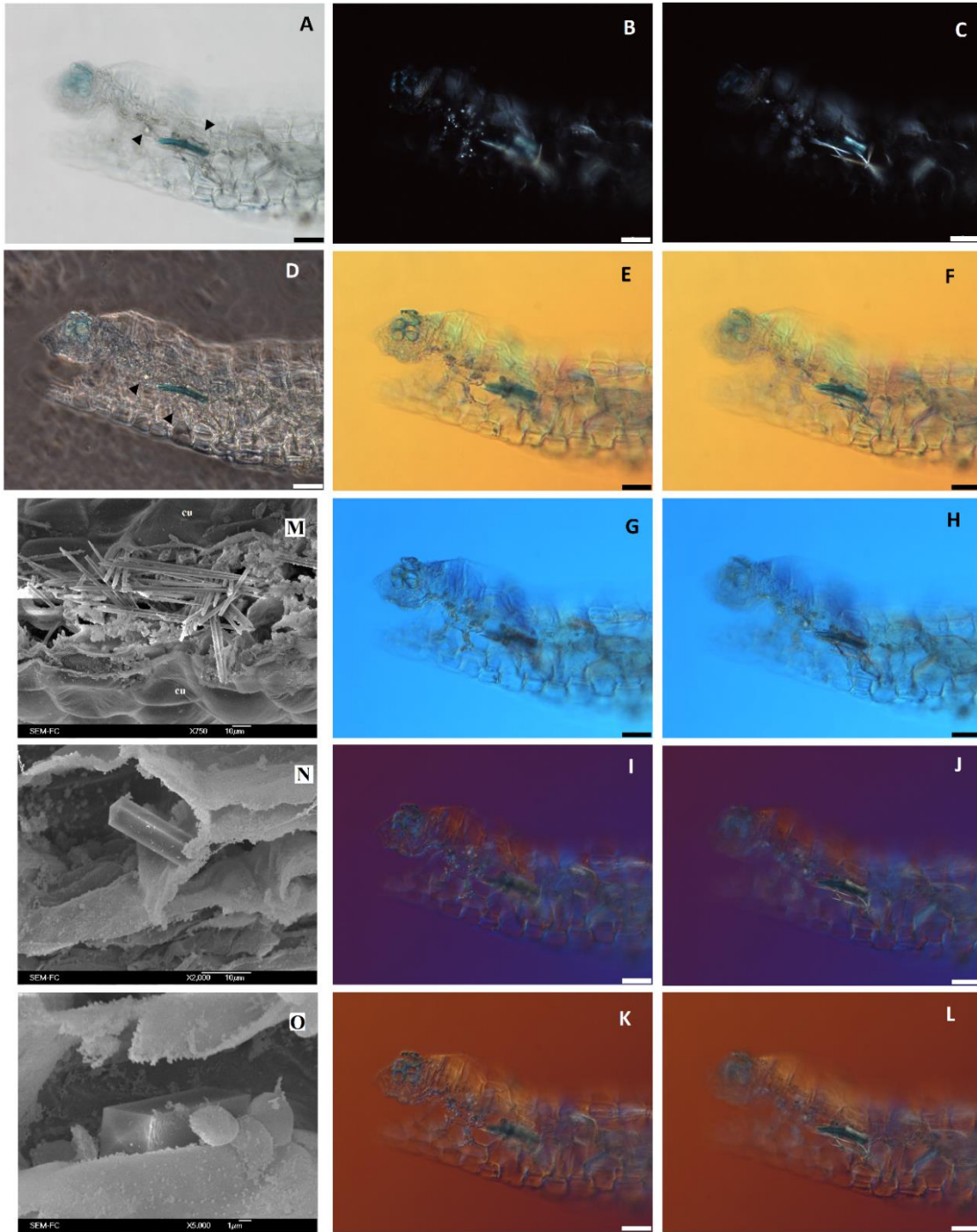


Figura 48. Sección transversal del pecíolo envainado de *Tradescantia fluminensis*, con presencia de cristales prismáticos, estiloideos y arenas. MF (A-L), MEB (M-O). (A) En campo claro, prismáticos, estiloideos y arenas se distinguen difícilmente; (B, C) arenas, prismáticos y estiloideos birrefringentes en luz polarizada; (D) en contraste de fases, prismáticos, estiloideos y arenas son pobremente contrastantes, se pierden en el tejido; (E-L) en CDI, arenas ligeramente azules en todos los fondos, (E,F, K, L) rafidios y prismáticos ligeramente azules, (I, J) rafidios y prismáticos grises, (G,H) rafidios y prismáticos ligeramente purpuras, todos los cristales contrastan, tienen poco relieve y son birrefringentes. MEB, (M) rafidios desordenados sobre el mesófilo, (N-O) cristal prismático con extremos piramidales. Cabezas de flecha indican cristales. (cutícula). Escala A-L 40μm.