

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍAS EN SALUD

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN HISTOCITOTECNOLOGÍA

Título:

Patrones de cantidad y distribución de cristales de oxalato de calcio en el tallo de *Hylocereus costaricensis* (Cactaceae) en respuesta a condiciones lumínicas en Liberia, Guanacaste, Costa Rica, en el 2018

Proponente:

Miguel Francisco Benavides Acevedo- A90875

Comité Asesor:

Director: Ph.D. Víctor Jiménez García

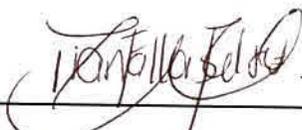
Lector: Dr. Donato Salas Segura

Lector: M.Sc. Alexander Rodríguez Arrieta

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Noviembre 2019

Hoja de aprobación.



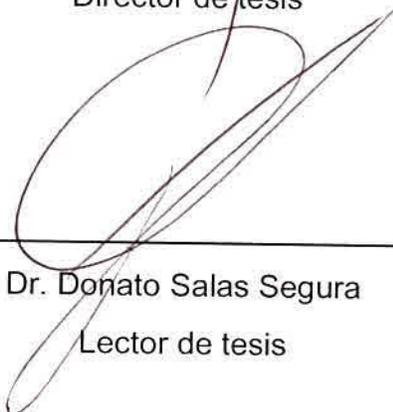
M.Sc. Diana Fallas Rodríguez

Presidente del Tribunal



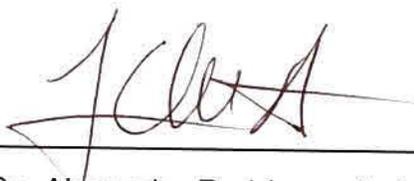
Ph.D. Víctor Jiménez García

Director de tesis



Dr. Donato Salas Segura

Lector de tesis



M.Sc. Alexander Rodríguez Arrieta

Lector de tesis

Derechos de propiedad intelectual

El suscrito Miguel Francisco Benavides Acevedo, cédula 1-1457-0133, estudiante de la carrera Licenciatura en Histocitotecnología de la Universidad de Costa Rica, manifiesta ser el autor de la presente Tesis Final de Graduación. Se prohíbe la reproducción parcial o total de este documento sin previa autorización del autor.

Dedicatoria

Le dedico este documento a mi mamá Yamileth Acevedo Fuentes y a mi papá Jorge Guzmán Saborío por siempre apoyarme al querer estudiar todo lo que he necesitado.

Agradecimientos

Un gran agradecimiento al profesor de profesores Don Mario Arce Fernández por siempre promover que sus estudiantes “usen la neurona” fuera de la caja, y comprender y promover que la histocitotecnología va mucho más allá de simplemente hacer láminas histológicas. Sino que permite ser un eje central para el estudio de tejidos y células animales humanas y no humanas y vegetales.

Le agradezco a Don Marvin Ayala y a Doña Haydeé Hernández por su gran ayuda al dejarme desarrollar este proyecto de investigación en su finca de pitahaya y al apoyarme en el montaje del experimento y en las giras realizadas.

Se le agradece al Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica por permitirme desarrollar el trabajo de laboratorio de esta investigación en sus instalaciones.

Le agradezco al Ph.D. Víctor Jiménez García por creer en mis observaciones científicas, por guiarme y apoyarme en el desarrollo de estas, que culminaron en esta investigación.

También le agradezco al M.Sc. Paúl Solórzano por su ayuda durante las giras y por su guía a la hora de desarrollar el planeamiento del proyecto. De igual forma a la M.Sc. Ester Vargas y a la M.Sc. Andrea Holst por su ayuda en las giras de recolección de muestras. También a la M.Sc. Ethel Sánchez por su guía durante el análisis con microscopía electrónica de barrido. Y al Ing. Ovidio Valerio por su valiosa ayuda en el análisis de imágenes con ImageJ.

Le agradezco al Ph. D. Esteban Avendaño, Director del Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA) de la Universidad de Costa Rica, por su gran ayuda con el análisis de espectroscopia RAMAN.

Le agradezco la ayuda de Ariel Torres durante la toma de las miles de microfotografías necesarias para analizar los cristales de oxalato de calcio.

Un agradecimiento muy especial a mi pareja, Víctor Muñoz Mata, por aguantar mi estrés y, a veces, mal humor y apoyarme sin importar nada.

Este proyecto fue financiado por el Fondo de Apoyo a Trabajos Finales de Graduación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, a la que le agradezco por crear este Fondo que nos permite a los estudiantes de la Universidad participar para este Fondo y poder tener así un respaldo económico para intentar responder nuestras preguntas científicas. Además, esta tesis fue financiada por el proyecto VI-734-B7-07.4, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Finalmente, le agradezco a la Universidad de Costa Rica, y a su sistema de becas, por el cual es que pude acceder a la educación universitaria y llegar a este punto.

Índice general

I.	CÁPITULO I	1
1.	Planteamiento del problema de investigación	1
2.	Objetivos	4
2.1.	Objetivo general.....	4
2.2.	Objetivos específicos:.....	4
3.	Justificación.....	5
4.	Introducción.....	8
I.	CÁPITULO II: MARCO DE REFERENCIA.....	14
1.	<i>Hylocereus spp.</i>	14
2.	El CaOx en tejidos vegetales.....	17
2.1.	Distribución y morfología de los cristales de CaOx.	17
2.2.	Biosíntesis del CaOx.	19
2.3.	Elementos que intervienen en la formación de CaOx.	20
2.4.	Funciones del CaOx.....	21
3.	La histocitotecnología cuantitativa y cualitativa.	23
4.	Los oxalatos en la salud humana.....	24
5.	La histoquímica para el marcaje del CaOx.....	25
6.	El clima de Costa Rica.	28
7.	Tratamiento a la sombra en pitahaya.	29
II.	CÁPITULO III: MARCO METODOLÓGICO	30
1.	Descripción general de la estrategia metodológica.	30
2.	Descripción de la metodología de cada experiencia investigativa.	31
2.1.	Sitio de estudio.	31
3.	Definición y operacionalización de las variables del estudio.	31
4.	Definición de los procedimientos de recolección de información.....	31
4.1.	Tipo de muestreo.....	31
4.2.	Factores abióticos.....	39
4.3.	Parámetros de color superficial medidos en los cladodios de pitahaya. ...	39
4.4.	Fijación y procesamiento con fines histológicos.....	40
4.5.	Corte micrométrico.....	41
4.6.	Desparafinización y tinciones.	41
4.7.	Análisis histológico.	42

A.	Características histológicas y citológicas de los tallos de pitahaya.	42
B.	Marcaje de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.	43
C.	Análisis de las morfologías de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.	43
D.	Composición elemental y estado de hidratación de los cristales de CaOx en cladodios de pitahaya.	44
E.	Cuantificación de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.	45
F.	Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx.	46
4.8.	Cuantificación de cristales de CaOx por digestión enzimática.	48
4.9.	Cuantificación de clorofila y carotenoides en las zonas del tejido caulinar de pitahaya.	49
4.10.	Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.	50
5.	Definición de los procedimientos y las técnicas de análisis.	50
6.	Consideraciones éticas.	51
III.	CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.	52
1.	Factores abióticos.	52
2.	Parámetros de color superficial medidos en los cladodios de pitahaya.	55
3.	Análisis de Componentes Principales (PCA).	61
4.	Características histológicas y citológicas de los tallos de pitahaya.	68
5.	Marcaje de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.	70
6.	Análisis de las morfologías de cristales de CaOx encontradas en tallos de pitahaya.	71
7.	Composición elemental y estado de los cristales de CaOx en cladodios de pitahaya.	78
8.	Cuantificación de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.	83
9.	Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx en el tejido caulinar.	86
10.	Cuantificación de cristales de CaOx por digestión enzimática.	96
11.	Cuantificación de clorofila y carotenoides en las zonas del tejido caulinar de pitahaya.	99
12.	Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.	101
IV.	CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	103
1.	Factores abióticos.	103
2.	Parámetros de color superficial en los cladodios de pitahaya.	103

3. Análisis de Componentes Principales (PCA).	107
4. Características histológicas y citológicas de los cladodios de pitahaya.	108
5. Morfologías, composición elemental y estados de hidratación de cristales de CaOx encontrados en los cladodios de pitahaya.	109
6. Cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya y su posible relación con la concentración de clorofila y los carotenoides.	114
7. Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx en el tejido caulinar.	119
8. Cuantificación de cristales de CaOx por medio del método de digestión enzimática.	120
9. Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.	122
V. CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	123
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	129
VI. CAPÍTULO VIII: ANEXOS	147
Anexo 1. <i>Macro</i> del programa ImageJ empleado para el análisis de cristales de CaOx en pitahaya.....	147

Índice de figuras.

Fig. 1. Distribución espacial en filas y columnas de las plantas de <i>H. costaricensis</i> en la finca El Salto de Liberia.....	35
Fig. 2. Visión general de la distribución de los saranes de 50% de sombra sobre las plantas de pitahaya en la Finca El Salto de Liberia, Costa Rica.....	36
Fig. 3. Comparación del porcentaje de humedad relativa con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	52
Fig. 4. Comparación de la temperatura (°C) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	53
Fig. 5. Comparación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^2$) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	54
Fig. 6. Comparación de la radiación solar (lux) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	55
Fig. 7. Comparación de la coordenada de color L^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	56
Fig. 8. Comparación de la coordenada de color a^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	57
Fig. 9. Comparación de la coordenada de color b^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	58
Fig. 10. Comparación del parámetro de color YI con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	59
Fig. 11. Comparación del parámetro de color h^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.....	60
Fig. 12. Plot de correlación entre las variables incluidas en el análisis de PCA para el análisis de cristales de CaOx en tallos de pitahaya.....	62
Fig. 13. Porcentaje de varianza explicada por cada una de las dimensiones generadas en el análisis de PCA para el análisis de cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya.....	63
Fig. 14. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA para el análisis de cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya.....	64
Fig. 15. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra.....	65

Fig. 16. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto a la zona de tejido.....	66
Fig. 17. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto al punto cardinal.	67
Fig. 18. Microfotografías representativas de las tres partes principales del tallo de la pitahaya teñidas con azul de toluidina.....	69
Fig. 19. Controles positivos y negativos de CaOx. Controles positivo y negativo de CaOx.....	71
Fig. 20. Microfotografías representativas del análisis de imágenes realizado con el programa ImageJ.....	72
Fig. 21. Comparación de las diferentes morfologías de cristales de CaOx encontradas en tallos de pitahaya por microscopía de luz con la técnica de Von Kóssa modificada por Yasue (figuras de la columna de la izquierda) y en SEM (columna de la derecha).....	74
Fig. 22. Diferentes morfologías tridimensionales específicas de cristales de CaOx encontrados en tallos de pitahaya por medio de SEM.....	76
Fig. 23. Microfotografías representativas de las zonas del tejido caulinar estudiadas del tallo de la pitahaya. Las muestras están marcadas con la técnica de Von Kóssa modificada por Yasue..	77
Fig. 24. Microfotografías representativas de cristales de CaOx contenidos en organelas celulares del cladodio de la pitahaya..	78
Fig. 25. Análisis por SEM con rayos X y espectroscopia RAMAN para determinar la composición elemental y estado de hidratación de los cristales de CaOx, respectivamente.....	82
Fig. 26. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto de acuerdo con los tratamientos al sol y a la sombra en tallos de pitahaya.....	84
Fig. 27. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X de acuerdo con la zona del tejido analizado en tallos de pitahaya.	85
Fig. 28. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto al área total de la microfotografía, de acuerdo con el punto cardinal de donde se tomaron los tallos de pitahaya según el tratamiento al sol y a la sombra..	86

Fig. 29. Comparación del número de cristales por microfotografía a 200X de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra en cladodios de pitahaya. Los círculos vacíos sobre los boxplots corresponden a valores extremos.	89
Fig. 30. Comparación del número de cristales de CaOx por microfotografía a 200X de cladodios de pitahaya de acuerdo con el rango de clasificación del área de los cristales (μm^2)..	90
Fig. 31. Comparación del número de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido y al tratamiento al sol (A) y a la sombra (B) de cladodios de pitahaya..	92
Fig. 32. Comparación del promedio del área de cristales (μm^2) de CaOx por microfotografía a 200X de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra en cladodios de pitahaya.	93
Fig. 33. Comparación del promedio del área de cristales de CaOx por microfotografía a 200X de cladodios de pitahaya de acuerdo con el rango de clasificación del área de los cristales (μm^2).....	94
Fig. 34. Comparación del promedio del área de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido y al tratamiento al sol (A) y a la sombra (B) en cladodios de pitahaya..	95
Fig. 35. Cristales de CaOx encontrados en los desechos de los diferentes pasos de la extracción de CaOx por medio de digestión enzimática..	98
Fig. 36. Comparación de los pigmentos fotosintéticos en tallos de pitahaya sometidos a tratamiento al sol y a la sombra.....	99
Fig. 37. Comparación de los pigmentos fotosintéticos en la cumbre (Cu), corteza (C) y médula (M) de tallos de pitahaya.....	100
Fig. 38. Comparación del número de botones florales por planta de pitahaya el 5 de abril del 2018, al final del tratamiento al sol y a la sombra.	101
Fig. 39. Comparación del número de frutos por planta de pitahaya el 5 de abril del 2018, al final del tratamiento al sol y a la sombra.....	102

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Definición y operacionalización de las variables del objetivo específico 1: “Describir diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas en 30 plantas de <i>H. costaricensis</i> que crecen a mayor y menor intensidad lumínica”.	32
Cuadro 2. Definición y operacionalización de las variables del objetivo específico 2: “Describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en 30 plantas de <i>H. costaricensis</i> que crecen a mayor y menor intensidad lumínica”.	37
Cuadro 3. Ejemplo del cuadro con las distancias x y z para el análisis del vecino más cercano.	47
Cuadro 4. Resultados generales del análisis con la prueba de Tukey HSD para análisis de la cantidad de cristales de CaOx en tallos de pitahaya representada por el % CaOx (ver Ecuación 3) con respecto a las variables categóricas analizadas.	83
Cuadro 5. Resultados específicos del análisis con la prueba de Tukey HSD para análisis de la cantidad de cristales de CaOx en tallos de pitahaya representada por el % CaOx (ver Ecuación 3) con respecto al tratamiento y a la zona.	87
Cuadro 6. Resultados de la prueba de Hines para aleatoriedad para determinar la distribución espacial de cristales de CaOx en cladodios de pitahaya bajo tratamientos al sol y a la sombra.	96

Índice de ecuaciones.

Ecuación 1. Índice de la abundancia del color amarillo.	39
Ecuación 2. Ángulo de Hue.....	39
Ecuación 3. Porcentaje de cristales del área de cristales de CaOx por microfotografía a 200X (% CaOx)	46
Ecuación 4. Prueba de Hines.....	47
Ecuación 5. Cristales de CaOx por mL (Cr/mL).....	48
Ecuación 6. Cristales de CaOx por gramo (Cr/g).....	49
Ecuación 7. Cuantificación de clorofila a.	49
Ecuación 8. Cuantificación de clorofila b.	49
Ecuación 9. Cuantificación de carotenoides totales.	49

Lista de abreviaturas.

CaOx.	Oxalato de calcio.
HR.	Humedad ambiental relativa.
IHC.	Inmunohistoquímica.
FISH.	<i>Fluorescent in situ hybridization.</i>
PAS.	Ácido periódico de Schiff.
PAR.	Radiación fotosintéticamente activa.
msnm.	Metros sobre el nivel del mar.
RS.	Radiación solar total.
SEM.	Microscopía Electrónica de Barrido.
T.	Temperatura en ° C.
TEM.	Microscopía Electrónica de Transmisión.

Glosario.

a^* . Es un parámetro que representa el cambio de tonalidades verdes a rojizas en el sistema CIELAB. Entre mayor sea el valor de a^* , mayor es la abundancia de color rojo de la muestra medida.

b^* . Es un parámetro que representa el cambio de tonalidades azules a amarillas en el sistema CIELAB. Entre mayor sea el valor de b^* , mayor la abundancia de amarillo de la muestra medida.

L^* . Es un parámetro que representa el cambio de luminosidad en el sistema CIELAB. Entre mayor sea el valor de L^* , mayor es la luminosidad de la muestra medida.

Distribución agregada. Se refiere a cuando los elementos se encuentran agrupados en distintos sectores, y la presencia de un elemento aumenta la probabilidad de encontrar otro.

Distribución aleatoria. Se refiere a cuando los elementos están espaciados de forma irregular, y la presencia de un elemento no afecta la ubicación espacial de otros.

Distribución homogénea. Se refiere cuando los elementos están espaciados de forma uniforme en un área determinada, y la presencia de un elemento disminuye la probabilidad de encontrar otro elemento cercano.

Zona tisular cumbre. Se refiere a la cresta superior de una costilla del cladodio de *H. costaricensis*, que es la zona más alejada al haz vascular central.

Zona tisular corteza. Se refiere a la corteza de una de las costillas del cladodio de *H. costaricensis*.

Zona tisular médula. Se refiere a la médula de una de las costillas del cladodio de *H. costaricensis*.

Resumen.

La histocitotecnología vegetal permite realizar la descripción microscópica tisular y citológica de los componentes de una célula, estructura, órgano, u organismo vegetal, ya sea para fines anatómicos, funcionales, o moleculares. Las técnicas funcionales de la histoquímica marcan un compuesto de forma más o menos específica. La técnica de Von Kóssa marca sales de calcio, por relaciones argentafines, que permitiría marcar, por ejemplo, el carbonato de calcio de los cistolitos, o el oxalato de calcio (CaOx) de los idioblastos. La pitahaya comprende un grupo de cactus originario de México, Centroamérica y Suramérica, que produce frutos en forma de bayas de color amarillo o púrpura de interés económico. *Hylocereus* es el género de pitahaya que se comercializa predominantemente en Costa Rica. Este género presenta hábitos epífitos en árboles vivos, rocas y muros de forma natural, y en plantaciones agrícolas para la producción de sus frutos. El objetivo de esta investigación es describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en el tallo de *Hylocereus costaricensis* como marcador de estrés abiótico de acuerdo con el grado de exposición solar durante febrero del 2018 a abril del 2018 en la finca El Salto de Liberia, Guanacaste, Costa Rica. Se encontró que la técnica de Von Kóssa modificada permitió el marcaje específico de cristales de CaOx y que, junto con el programa ImageJ, permitió la cuantificación por microfotografía de los cristales de CaOx. Además, se observó que el tejido en condiciones de sombra es el que tuvo una mayor cantidad de cristales de CaOx. Dentro de las zonas tisulares, la zona de la cumbre, que es la cresta superior de una costilla del cladodio de la pitahaya, fue la que tuvo la mayor cantidad de cristales de CaOx seguido de la corteza y de la médula. Esto coincidió con una mayor concentración de clorofilas y carotenoides en la zona de la cumbre, seguido de la corteza y de la médula. Esto sugiere que el CaOx puede tener la función de almacenamiento de carbono, además de otras funciones, como la protección contra herbivoría. Los cristales en el tejido se encontraron en una distribución agrupada, y presentaron diferentes morfologías: aciculares o rafidios, prismáticos rectangulares, romboides, cuadrados y tetragonales, que estaban formados por CaOx monohidrato, y drusas compactas, drusas compuestas por cristales prismáticos tetragonales, drusas tipo laberinto y

drusas amorfas que estaban compuestas por CaOx dihidrato. Esto sugiere que la morfología de los cristales de CaOx se determina de forma multifactorial, por regulación de la concentración de los precursores del CaOx, por proteínas relacionadas a los cristales de CaOx y por la morfología de la cámara de los cristales de los idioblastos.

I. CAPÍTULO I

1. Planteamiento del problema de investigación

Técnicas de histoquímica funcional, como la de Von Kóssa modificada (1), permiten marcar los cristales de oxalato de calcio (CaOx), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos entre los organismos fotosintéticos (2–5). Su presencia ha sido previamente reportada en varios géneros de cactus, incluyendo a *Hylocereus costaricensis* (6).

Sin embargo, en estos estudios histológicos se obtuvo resultados cualitativos, de presencia o ausencia de los cristales de CaOx, así como su ubicación espacial. Datos cuantitativos, que demuestren estadísticamente la distribución de los cristales, y la cantidad de éstos en las diferentes capas del tejido, a nivel microscópico, aún se desconocen casi por completo en la mayoría de las especies vegetales. Los estudios realizados a nivel microscópico en algunas Solanaceae, como tomate, tabaco, papa, o en *Pyrus malus* L., *Glycine max* L. Mer, *Dioscorea polystachya*, no realizan una cuantificación de los cristales según su localización microscópica para determinar su patrón de distribución espacial, sino que solo se usan para ver los tipos de cristales presentes en una o más etapas de desarrollo, y su ubicación relativa (2,7,8).

Los factores abióticos, como la temperatura, la humedad ambiental, y la exposición lumínica, pueden afectar la fisiología y el metabolismo de las plantas, entre ellos la síntesis del CaOx como respuesta ante el estrés (9–12). Sin embargo, los efectos de estos factores se desconocen en gran medida a nivel microscópico en tejidos vegetales.

Aunque se han desarrollado estudios en los que se explica la síntesis del CaOx, todavía se desconoce gran parte del detalle de las enzimas que intervienen en su síntesis y degradación, y de los factores bióticos y abióticos que afectan dichos procesos (5,6,12–19). Establecer algunos de los factores bióticos o abióticos que intervienen en la síntesis y degradación del CaOx, permitiría establecer el momento más adecuado para realizar el muestreo de una plantación, para futuras investigaciones sobre el metabolismo del CaOx.

Existen análisis estadísticos de muestreos cuantitativos, como el análisis del vecino más cercano, que se basan en la medición de la distancia que separa a los objetos de interés para determinar si se distribuyen espacialmente con un patrón aleatorio, uniforme o agrupado, por medio de un coeficiente de dispersión que permita la comparación estadística de diferentes grupos, que han sido ampliamente empleados para realizar investigaciones sobre la distribución de especies a diferentes niveles espaciales (20–24), pero cuyo principio matemático se puede utilizar para estudiar el patrón de distribución de una molécula marcada a nivel microscópico con alguna técnica histoquímica, y obtener el coeficiente de distribución de cada muestra para realizar análisis estadísticos comparando diferentes grupos, para determinar si hay variaciones estadísticamente significativas entre éstos.

Ante este contexto, y considerando uno de los factores ambientales más relevantes que podría estar involucrado con la acumulación de cristales de CaOx, surge la pregunta: ¿Existe diferencia en la síntesis de cristales de CaOx en los tallos de *H. costaricensis* que se mantienen con radiación solar directa diaria, con respecto a tallos que crecen bajo sombra?

Esta pregunta, y los vacíos del conocimiento antes mencionados, se pueden solventar al caracterizar los patrones de distribución y cantidad de cristales de CaOx con la técnica histoquímica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1), y cuantificando su distribución espacial con el análisis del vecino más cercano (20–24).

Al caracterizar los efectos de estos factores abióticos sobre la síntesis de CaOx en los tallos de pitahaya, se podrían describir por primera vez la distribución y cantidad de cristales de CaOx a nivel microscópico en los cladodios de esta planta. Además, se podrían cuantificar estas variables, y compararlas para determinar, de forma estadística, si existe diferencia entre las condiciones lumínicas a las que se sometieron las plantas de pitahaya.

Como la técnica de Von Kóssa modificada por Yasue ya ha sido aplicada para el marcaje de cristales de CaOx (1), y el análisis del vecino más cercano ha sido usado

ampliamente en investigaciones para determinar la distribución espacial de un objeto de interés (20–24), se espera que al combinar ambas metodologías se pueda obtener un protocolo para cuantificar la cantidad de cristales de CaOx y su patrón de distribución espacial a nivel histológico y citológico, en tallos de *H. costaricensis* expuestos a diferentes grados de radiación lumínica.

Además, al ser *H. costaricensis* una planta hemiepífita, que naturalmente crece en troncos de árboles bajo su sombra, se podría esperar que la exposición a la radiación solar directa diaria provoque estrés a la planta, que puede generar un aumento en la síntesis de cristales de CaOx como respuesta. Por ello, se puede hipotetizar que las plantas expuestas al sol tienen una mayor cantidad de cristales de CaOx, así como se ha hipotetizado en la literatura para otros organismos vegetales, y que la posible distribución de los cristales sea de manera agregada alrededor de la epidermis, debido al estrés ambiental, generando una protección (4,5,12,26–29).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en el tallo de *Hylocereus costaricensis* como marcador de estrés abiótico de acuerdo con el grado de exposición solar durante febrero del 2018 a junio del 2019 en El Salto de Liberia, Guanacaste, Costa Rica.

2.2. Objetivos específicos:

1. Describir diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas en 30 plantas de *Hylocereus costaricensis* que crecen a mayor y menor intensidad lumínica
2. Describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en 30 plantas de *Hylocereus costaricensis* que crecen a mayor y menor intensidad lumínica

3. Justificación.

La histocitotecnología provee de diversas herramientas para poder explicar y caracterizar fenómenos naturales. La histocitoquímica vegetal permite determinar la presencia de sales de calcio, como el CaOx, en tallos, hojas, y frutos, lo que limita la posibilidad de emplearlos como fuente de alimento para el ser humano, ya que su consumo reiterado puede causar abrasión en los dientes, y la ingesta alta de oxalato, uno de los componentes de los cristales, se ha asociado como una de las principales causas de la hiperoxaluria no hereditaria de causas multifactoriales, entre ellas por el consumo excesivo de oxalatos y CaOx, y de la urolitiasis, donde el 70% de todos los cálculos renales están compuestos principalmente por CaOx, provocando así, problemas a la salud humana. Además, al ser el ácido oxálico un metabolito secundario presente en todos los organismos vegetales en diferentes concentraciones dependiendo de la especie y el órgano, cuya alta ingesta suele correlacionarse con la formación de piedras renales, es importante describir las condiciones en las que se encuentran los cristales de CaOx en los tejidos vegetales antes de ser consumidos por el ser humano (5,13,30,31), ya que una parte del CaOx al pasar a través del tracto digestivo, principalmente en los ácidos estomacales, se va a degradar y formar ácido oxálico que puede ser absorbido a nivel intestinal y al consumirlo en altas cantidades puede provocar hiperoxaluria (32,33).

Esta investigación forma parte del proyecto “Estudio de cristales de oxalato de calcio y de sus compuestos precursores en frutos y plantas de pitahaya (*H. costaricensis*)”, del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS), inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. Este proyecto pretende entender a profundidad el metabolismo de síntesis y degradación del CaOx, y de las enzimas que intervienen en estos procesos. Para ello se requiere establecer la distribución y cantidad basal de cristales de CaOx en tallos de pitahaya, y determinar si presentan cambios al exponer las plantas a estrés ambientales, información que se pretende obtener con esta investigación por medio de técnicas de histocitoquímica.

Se estableció a *H. costaricensis* como el organismo de estudio, debido a que es la especie de cactus cuyos frutos más se comercializan en Costa Rica, que ha tenido

un crecimiento en el mercado nacional e internacional en los últimos años (34). Además, esta especie produce un fruto rico nutricionalmente para el consumo humano, ya que tiene un contenido de proteína de entre 0,3% y 1,5% del peso total del fruto. También es rico en prolina, potasio, magnesio, calcio y betalaínas, las cuales también tienen importancia comercial (35), así como producir una gran cantidad de cladodios que pueden ser una potencial fuente de alimentación por su contenido alto en vitaminas, minerales y fibras (36–43).

La cuantificación de estructuras o macromoléculas en histología y citología es poco común, ya que normalmente los que realizan los estudios en estas áreas se enfocan en desarrollar una descripción morfológica de los tejidos y las células. Por ello, establecer un método cuantitativo para una molécula por medio del marcaje por histoquímica funcional resulta de gran importancia para la obtención del patrón de distribución del CaOx y el valor del coeficiente de variación según el análisis del vecino más cercano según la Prueba de Hines, lo que permite realizar pruebas estadísticas para determinar los resultados con un rango de confianza determinado y comparaciones entre diferentes tratamientos (20–24).

También, la metodología que se establezca puede servir como base para otras investigaciones en histología vegetal, e histopatología animal, ya sea para la cuantificación de cristales de CaOx en otras especies de plantas o animales, o de otra macromolécula de interés.

Los resultados que se obtengan también son de importancia para la ciencia básica, ya que el CaOx forma parte del sistema de defensa de la planta contra estrés biótico y abiótico, como mecanismo de reserva de calcio, y como molécula de reserva de carbono producto de la fotosíntesis. Por ello, determinar la respuesta de producción de cristales de CaOx ante un estrés, por ejemplo, de radiación solar, permitiría apoyar o refutar la hipótesis de que la síntesis de CaOx es un proceso dinámico que la planta puede regular en cuestión de horas. Además, al comprender el efecto que los factores ambientales ejercen sobre la producción de cristales de CaOx, se pueden identificar plantas con una menor cantidad de cristales de CaOx, para su selección artificial, con miras a generar variedades de una especie con bajos niveles

de CaOx que sean aptas para el consumo (5,9,11,26,28,29,44), aprovechando así tanto los frutos como los cladodios, para la alimentación de animales, incluidos los seres humanos. Existen varias especies de cactus cuyos cladodios actualmente se emplean como alimento, debido que son fuente de vitaminas, minerales y alto contenido de fibra (45–47).

Además, los resultados obtenidos con esta investigación serán un insumo para la Carrera de Histocitotecnología y para la Escuela de Tecnologías en Salud, respecto al abordaje para el desarrollo de aplicaciones de las técnicas histológicas y citológicas a organismos vegetales, ya que todas las especies animales, incluidos los seres humanos, dependen de los organismos primarios fotosintéticos para sobrevivir. Así, conocer la biología básica de los mecanismos del metabolismo primario y secundario, como el CaOx, permite su manipulación en beneficio de la sociedad para apoyar la seguridad alimentaria.

Finalmente, los resultados de esta investigación pueden ayudar al adecuado manejo de plantaciones de pitahaya, ya que permitiría conocer el efecto de la radiación solar más intensa sobre el estado general de las plantas y sobre la acumulación de cristales de CaOx, lo cual podría ser un indicio de que las plantas se encuentran bajo estrés, el cual se ha reportado que produce clorosis en los cladodios, lo que disminuye la capacidad fotosintética de las plantas, y puede afectar la producción (28,29,48,49). Una vez identificado y caracterizado el fenómeno, se pueden plantear posibles soluciones al problema, para proteger el cultivo y aumentar su producción.

4. Introducción.

La histocitotecnología se centra en dos grandes áreas principales de estudio: la aplicación de técnicas histocitoquímicas y tecnologías para el estudio de las células y tejidos animales, y vegetales. La histocitotecnología vegetal permite realizar la descripción microscópica tisular y citológica de los componentes de una célula, estructura, órgano, u organismo vegetal, ya sea para fines anatómicos, funcionales o moleculares (50–53).

Las técnicas topográficas de la histoquímica marcan de forma general los componentes tisulares, para así permitir la observación y descripción de la morfología de la muestra. Dentro de esta categoría, para la histocitotecnología vegetal, se encuentran las tinciones con azul de toluidina, que es un colorante metacromático, la tinción de safranina-verde rápido, la tinción de safranina-azul alcian, entre otras (52,53).

Las técnicas funcionales de la histoquímica marcan un compuesto de forma más o menos específica. Dependiendo de la técnica en particular, puede ser un marcaje para lípidos, carbohidratos, proteínas o minerales. Por ejemplo, la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS) (54) es una técnica que marca glicosaminoglucanos neutros, como la celulosa de las paredes celulares vegetales (50–52); la técnica de Von Kóssa (25) marca sales de calcio, por relaciones argentafines, que permitiría marcar, por ejemplo, el carbonato de calcio de los cistolitos, o el oxalato de calcio (CaOx) de los idioblastos (5,6,12).

Las técnicas moleculares aplicadas a la histocitotecnología permiten marcar macromoléculas de interés con una alta precisión. Por ejemplo, para el marcaje de proteínas se puede emplear la inmunohistoquímica (IHC), técnica en la cual se emplean anticuerpos desarrollados específicamente para que reconozcan la proteína de interés y se unen a ésta. La unión antígeno-anticuerpo es reconocida por un anticuerpo secundario, y es revelada por medio de un producto final de reacción coloreada dentro del ámbito de luz visible por medio de un cromógeno. En la (IHC) indirecta éstos son revelados visualmente por medio de una sustancia cromogénica como la diaminobencidina (55–58).

Toda esta serie de técnicas de la histocitotecnología vegetal permiten desarrollar aplicaciones para identificar y explicar un fenómeno natural y su posible funcionamiento. Por ejemplo, los cactus son de gran interés científico como objeto de investigación, para entender su capacidad de sobrevivir con cantidades muy limitadas de agua disponible durante sequías, por su importancia económica como fuente ornamental, y como fuente de alimento para el ser humano y otros animales con sus frutos y tallos fotosintéticos llamados cladodios. Los cladodios de los cactus poseen una corteza verde fotosintética externa con células de paredes rígidas, la capa de células más interna almacena agua en forma de mucílago. Estas células mucinosas tienen una pared más flexible para controlar la pérdida de agua y, en situaciones de riesgo, donar agua a las células externas para que no se compriman y no liberen ácido abscísico que ocasiona el cierre de los estomas, lo que afectaría el metabolismo de la planta (5,14,45,46,59,60).

La pitahaya comprende un grupo de cactus originario de México, Centroamérica y Suramérica, que produce frutos en forma de bayas de color amarillo o púrpura de interés económico (26). Varios géneros de la familia Cactaceae producen los frutos denominados pitahaya, como *Stenocereus* Britton & Rose y *Cereus* Mill; pero, los más comerciales son *Hylocereus* y *Selenicereus* (61,62). *Hylocereus* es el género que se comercializa predominantemente en Costa Rica (34). Este género presenta hábitos epífitos en árboles vivos, rocas y muros de forma natural, y en plantaciones agrícolas para la producción de sus frutos (63). Pueden crecer en suelos levemente ácidos, alcalinos, arenosos, rocosos, y hasta con concentraciones altas en sales, por lo que se favorece su uso en suelos poco ricos para otros cultivos (64).

Debido a que la pitahaya muchas veces se cultiva comercialmente en terrenos que se encuentran expuestos a radiación solar intensa a lo largo del día, al ser una planta naturalmente hemiepífita, se puede generar una coloración clorótica en sus cladodios y el estrés persistente incluso puede producir quemaduras solares en estos, producto de un exceso de radiación lumínica, y del aumento excesivo de temperatura en los cladodios más expuestos (65). Este estrés abiótico genera respuestas morfológicas en la planta para tratar de contrarrestar o protegerse de la

radiación solar excesiva y sus efectos. Una de estas respuestas puede ser modificar la distribución y cantidad de cristales de CaOx en su epidermis y parénquima (14,66).

Microscópicamente se han caracterizado ciertas generalidades de *Stenocereus*, como que presenta una baja densidad estomática, de entre 30 y 42 estomas/mm². El grosor de la cutícula varía entre 13 y 17 µm, el tallo presenta aerénquima, el cual también es abundante en raíces y brotes, y se localiza en el lado adaxial mientras que el clorénquima en el lado abaxial (64). Al ser *Stenocereus* un género, filogenéticamente hablando, cercano a *Hylocereus*, esta información resulta importante para tener un punto de comparación.

Existen virus, hongos, otros microorganismos, así como agentes abióticos, que afectan a las plantas vasculares, que si bien, carecen de un sistema inmune y circulatorio adaptativo, poseen una serie de mecanismos de defensa en contra de cuerpos extraños. Muchas veces las plantas responden ante el estrés abiótico al que están sometidas, modificando sus medios de protección, como el grosor de la epidermis, el área parenquimática del tallo, la densidad o morfología de los cristales de CaOx y a nivel celular, ocurre una respuesta de proliferación o autólisis, según sea el caso, para así adaptarse ante las condiciones de su medio y aumentar su defensa contra condiciones adversas (14,66).

Los cristales de CaOx son producto del metabolismo secundario y se encuentran ampliamente distribuidos entre los organismos fotosintéticos (2,3,5,67). Se forman por la reacción entre el ácido oxálico (C₂H₂O₄), producido de manera endógena por la planta, con el calcio que se encuentra en el ambiente (5,7). Se ha propuesto que la función de estos compuestos dentro de la planta se relaciona con la regulación de calcio dentro de los tejidos, protección contra herbivoría y detoxificación de metales pesados (9–12).

Los procesos de formación y acumulación de cristales de CaOx en plantas han sido sujeto de estudio en algunas especies. Existen reportes de estudios funcionales en donde se evalúan mutantes de *Medicago truncatula* (Fabaceae) con acumulaciones reducidas de cristales de CaOx (68), o por el contrario, plantas de *Arabidopsis*

thaliana transformadas para aumentar la acumulación de dichos cristales (27). Gracias a este tipo de estudios, en la literatura y en bases de datos internacionales se han reportado secuencias de genes que participan en la vía de síntesis de los cristales de CaOx en plantas, lo que da las bases para su estudio en pitahaya. La presencia de los cristales de CaOx ha sido previamente reportada en varios géneros de cactus, incluyendo también a *Hylocereus* (6,69).

Una caracterización de los cristales de CaOx de la pitahaya se hizo en el marco del proyecto “Caracterización de cristales de CaOx en frutos y tallos de diferentes genotipos de *Hylocereus* sp. (Cactaceae)”, VI-810-BO-176, de la Universidad de Costa Rica, especialmente en las partes comestibles (69). Su consumo puede causar abrasión en los dientes, y la ingesta alta de oxalato, uno de los componentes de los cristales, se han asociado con la formación de piedras en los riñones, provocando problemas a la salud humana (5,31,70). Además, se conoce que el consumo de oxalato puede disminuir la absorción gastrointestinal de calcio, magnesio, hierro y otros cationes, lo que puede provocar una deficiencia mineral si su consumo es constante en la dieta (71).

Sin embargo, el área principal de trabajo de la histología y de la citología, tanto animal como vegetal, ha sido la descripción morfológica de las células y tejidos, dejando casi siempre de lado el establecimiento de protocolos de cuantificación de estructuras, células o macromoléculas de interés (44,72–77). Por ello, aún se desconoce la distribución y cantidad de cristales de CaOX a nivel de cortes microscópicos transversales, de patologías humanas en las que interviene el CaOx, y en los tejidos vegetales, incluyendo el tallo de pitahaya (6,31,69,70).

La técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1) se puede emplear para marcar cristales de calcio, que junto con análisis de las distancias entre los cristales caulinares, se puede usar para determinar el patrón de distribución de los cristales de CaOx, los tamaños bidimensionales de los mismos, y su ubicación dentro del parénquima y de las células. Estos análisis estadísticos de distancias son muestreos cuantitativos como el análisis del vecino más cercano, que a su vez, se basan en la medición de la distancia que separa a los objetos de interés para determinar si se

distribuyen espacialmente con un patrón aleatorio, uniforme o agregado, por medio de un coeficiente de dispersión que permite la comparación estadística de diferentes grupos (20–24).

Ante estas observaciones, en esta investigación se pretende describir “Patrones de cantidad y distribución de cristales de oxalato de calcio en el tallo de *H. costaricensis* en respuesta a condiciones lumínicas en una finca en Liberia de Guanacaste, Costa Rica.”

La información obtenida a partir de los resultados de esta investigación es de gran importancia al establecer un protocolo cuantitativo para análisis histológicos y citológicos, que permita realizar comparaciones estadísticas. Además, es importante ya que permite caracterizar la distribución espacial y la concentración de cristales de CaOx en los tejidos que acumulan CaOx, por causas patológicas en el caso de futuras investigaciones basadas en tejidos animales, o por causas fisiológicas naturales en el caso de tejidos vegetales. También es muy importante a la hora de comparar plantas que se encuentran bajo diferentes tipos de estrés biótico o abiótico, como los diferentes ambientes lumínicos naturales o artificiales que tienen niveles de radiación lumínica muy por debajo o mucho más allá de los niveles óptimos. También para determinar si existe una correlación estadística entre la radiación lumínica y el aumento o disminución en la síntesis de CaOx, así como cambios en el patrón de distribución espacial histológica y citológica. Lo anterior es importante ya que podría indicar una mayor actividad enzimática de síntesis o degradación, cuya identificación resulta de mucha importancia para posteriores estudios en el metabolismo del CaOx, y en la identificación de algunas de las enzimas, que aún se desconocen, que intervienen en los procesos de síntesis y degradación del CaOx (5,6,12,14,66).

La caracterización por realizar también permitiría identificar los genotipos aptos para el consumo humano o animal, con bajos niveles de CaOx en sus tejidos. También se podrían identificar genotipos que produzcan un alto contenido de CaOx que puedan tener aplicaciones industriales. Estas características pueden ser seleccionadas, potenciadas y heredadas a generaciones posteriores en programas

de mejoramiento genético, para la generación de tejidos aptos para el consumo del humano y otros animales, y así explotar tanto los frutos como los cladodios para el beneficio del ser humano, generando otras líneas de trabajo que se pueden ampliar en otras investigaciones científicas (45–47).

I. CAPÍTULO II: MARCO DE REFERENCIA

En este apartado se abordaron tópicos centrales que fundamentan el proyecto de investigación.

1. *Hylocereus* spp.

La pitahaya pertenece a un grupo de cactus originario de México, Centroamérica y Suramérica, que produce frutos en forma de bayas de color amarillo o púrpura de interés económico (26). Varios géneros de la familia Cactaceae producen los frutos denominados pitahaya, como *Stenocereus* Britton & Rose y *Cereus* Mill; pero, los más comerciales son *Hylocereus* y *Selenicereus* (61,65). *Hylocereus* es el género que se comercializa predominantemente en Costa Rica (34), que posee especies de interés comercial, tanto por su fruto, como por la planta como tal para fines ornamentales, ya que algunas producen flores muy atractivas (61,65).

Como característica, el género presenta hábitos hemiepífitos en árboles vivos, rocas y muros de forma natural, y en plantaciones agrícolas para la producción de sus frutos (63,65). Pueden crecer en una gran variedad de suelos, como en suelos: levemente ácidos, alcalinos, arenosos, rocosos, y hasta con concentraciones altas en sales. Además, es un género resistente a un ámbito amplio de temperaturas a partir de los 12°C, ya que por debajo de esta temperatura se ha reportado que los tallos sufren necrosis, y hasta altas temperaturas, de hasta 38°C a 40°C. A altas temperaturas, dependiendo del grado de exposición solar directa, pueden surgir quemaduras solares que provocan cambios en la coloración de los cladodios, que pasan de ser verdes a tomar coloraciones rojizas y cloróticas, y si la exposición se mantiene por largos períodos puede provocar necrosis tisular. El hábitat se ubica inclusive a altitudes de 2750 msnm (65). Todas estas características favorecen su cultivo en suelos y climas que resultan estresantes o intolerables para otros cultivos (64).

El fruto de la pitahaya, en su parte comestible consiste en el mesocarpo, el cual posee una textura mucilaginosa, con miles de pequeñas semillas distribuidas de forma homogénea a lo largo del mesocarpo. La pulpa del fruto se compone

aproximadamente entre el 60% y el 80% del peso total del fruto. El contenido de proteína varía según los reportes, entre 0,3% y 1,5% del peso total del fruto. El aminoácido más abundante en el jugo del fruto de pitahaya es la prolina, con una concentración de entre 1,1 g/L y 1,6 g/L. En cuanto al contenido mineral, el ion más abundante es el potasio, seguido del magnesio y del calcio (35).

En cuanto a la vitamina C, posee un contenido bajo, de 11 mg/L. El color rojomorado de los frutos es producto de la presencia de betalaínas. Las betalaínas son pigmentos de interés comercial como colorantes para alimentos y antioxidantes para el consumo de los seres humanos, que sirven como un factor de protección en contra de ciertos desórdenes de estrés oxidativo. Se ha reportado una actividad antiradical del jugo de pitahaya, de aproximadamente 10 μmol en unidades equivalentes a Trolox obtenidas con el método ORAC mediado con fluoresceína (35,65,78). Además, posee sorbitol, fenoles, flavonoides y otros antioxidantes en la pulpa y en la cáscara del fruto, que pueden ser importantes para la dieta humana (79).

Hace 25 años la pitahaya era un cultivo prácticamente desconocido en muchos países; sin embargo, actualmente ocupa un nicho creciente en el mercado europeo, vietnamita, colombiano, mexicano, costarricense y nicaragüense, como fruta comercial o como cultivo doméstico (80,81). Al ser plantas semiepífitas, en las plantaciones suelen aprovechar que pueden crecer sobre soportes naturales o artificiales, como árboles postes de madera, cemento o metálicos, para facilitar su cultivo (26,65). En Nicaragua, *Hylocereus undatus* es una especie productora de frutos importante para la exportación a Europa (82).

Para *Hylocereus*, se ha reportado que hormigas de los géneros *Atta* y *Solenopsis* pueden causarle daño a las plantas, flores y frutos. También se han reportado diferentes especies de áfidos que succionan el floema de los tallos de *Hylocereus* (65,78). Otros organismos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia lunata*, *Neoscytalidium dimidiatum* y *Enterobacter cloacae* ocasionan la pudrición blanda y lesiones necróticas en los tallos y frutos (83). La infección de *N. dimidiatum* produce el chancro en la pitahaya, y es considerada la enfermedad más severa que afecta

a esta planta en muchos países asiáticos, que son los mayores productores de pitahaya en el mundo. Al tener una infección paulatina, que pasa por la formación primaria de pequeños puntos naranja, que después evolucionan hasta formar los chancros, y por último llega de digerir el tejido del tallo, es de esperar que se puedan encontrar cambios en la morfología del tejido epidérmico, parenquimatoso y en patrones celulares durante la infección, debido a los mecanismos de defensa propios de la planta (83,84), incluyendo el aumento de la síntesis de CaOx.

Algunos cactus como el nopal (*Opuntia* spp.) se emplea como fuente de alimento para el ser humano y otros animales. Este tiene cantidades elevadas de fibra, calcio, magnesio, hierro y sodio (85). *Acanthocereus tetragonus* (Cactaceae) contiene 5 g de proteína cruda y 16.3 g de fibra cruda por cada 100 g de materia seca, y 4.68 mg/kg de calcio en base seca (36). *H. undatus* reportó 14.84 g de proteína cruda, 21.50 g de fibra cruda, y 36.94 g de extracto libre de nitrógeno (86). Para *A. tetragonus*, *A. subinermis*, e *H. undatus*, se han reportado ser ricos en fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, cobre, hierro, manganeso y zinc (87). En el caso de que se logren identificar variedades de *H. costaricensis* con una baja concentración de CaOx, sus cladodios se podrían utilizar para la obtención de productos para la alimentación humana, como antes mencionados, y así obtener otro beneficio económico y social más allá de la producción de frutos.

No hay reportes del consumo de los cladodios de *H. costaricensis*; sin embargo, los cactus son parte de la dieta humana desde hace más de 9000 años (87). Se ha reportado el consumo de cactus barril (*Ferocactus* sp.) por la oveja *Ovis canadensis* en Arizona (46) y el consumo de cactus de desierto, como *Opuntia* sp., por *Tayassu tajacu* (60). Los cladodios del nopal se han empleado para la obtención de harina muy rica en fibra para el consumo de seres humanos (45). El consumo de los frutos de pitahaya y cladodios de *A. tetragonus*, *A. subinermis*, e *H. undatus* es parte de la dieta de varios países latinoamericanos (87–89), y en el caso de *Opuntia* spp. se ha consumido desde los Andes peruanos hasta las zonas tropicales de México (90), así como muchos otros cactus que forman parte de la dieta en muchos países. Sin embargo, pese a que no hay reportes del consumo de cladodios de *H. costaricensis*,

sólo de su fruto, por medio de la cuantificación de la cantidad de cristales de CaOx se pueden identificar individuos con bajo contenido de cristales, potenciar y propagar dicha característica por mejoramiento genético, mutagénesis o ingeniería genética, a una variedad de esta especie cuyos cladodios puedan ser consumidos por los seres humanos u otros animales (5,9,11,26,28,29,44).

2. El CaOx en tejidos vegetales.

Los cristales de CaOx están ampliamente distribuidos en los organismos fotosintéticos. Se producen de forma natural en algas, plantas no vasculares, y son particularmente abundante en angiospermas y gimnospermas, pero no todas las plantas los producen (5). Su presencia ha sido previamente reportada en varios géneros de cactus, incluyendo también a *Hylocereus* (6,69).

Existen diferentes propuestas acerca de la función del CaOx en las plantas. En la mayor parte de la literatura se relaciona como un compuesto protector contra herbivoría, y como molécula reguladora de los niveles de calcio endógenos (5). Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto que los cristales de CaOx también sirven como una fuente interna de carbono en las plantas (59).

El CaOx es un compuesto altamente insoluble en agua con una $K_{ps} = 2.32 \times 10^{-9}$ para su forma monohidratada. Su síntesis química se lleva a cabo por medio de la reacción del ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) con el calcio. El ácido oxálico es un ácido orgánico fuerte con las constantes de disociación de $pK_1 = 1.46$, y $pK_2 = 4.40$ producido de forma endógena en la planta como producto final de varias vías metabólicas. El calcio es un macronutriente secundario, absorbido del medio ambiente junto con el agua por medio del xilema radicular (5).

2.1. Distribución y morfología de los cristales de CaOx.

La distribución y morfología de cristales es muy variable dependiendo de la especie en particular. Se pueden encontrar en múltiples tejidos o en uno en particular, ya sea vegetativo, reproductivo o de almacenamiento en órganos en desarrollo. Su deposición se puede dar de forma intracitoplasmática, rodeada de una cámara vacuolar en los idioblastos, o en algunas otras células parenquimatosas o

epidérmicas, y de forma extracelular, asociados a la pared celular principalmente de las plantas gimnospermas, o en la pared celular de las astroesclereidas (3,5).

Dentro de las morfologías más comunes, en las que se clasifican los cristales de CaOx de plantas, se pueden encontrar (5,91,92):

- Cristales prismáticos: Son cristales de CaOx con forma de bloques romboédricos, o de prisma, presentes como cristales únicos o múltiples por célula. Principalmente se encuentran en la pared celular.
- Cristales puntiformes o arena de cristales: Son pequeños cristales de CaOx de morfología variable, que al observarlos poseen una apariencia puntiforme similar a la arena.
- Rafidios: Son cristales de CaOx con forma acicular, frecuentemente con surcos a lo largo de sus lados, que pueden encontrarse como puñados de cientos o miles de cristales dentro de su cámara vacuolar.
- Cristales en drusa: Son cristales multifacéticos aglomerados de forma relativamente esférica, que se pueden encontrar formados por un solo cristal, o por múltiples cristales.

Sin embargo, hay cristales que frecuentemente presentan modificaciones, como surcos y barbas, no consistentes con la dinámica de precipitación fisicoquímica del CaOx (5).

Se ha reportado que hay especies de plantas en las que sólo se sintetiza una morfología específica de cristal, lo cual indica que la genética propia del organismo controla la morfología de síntesis del CaOx. Pero otras características, como el estado de hidratación, la concentración de CaOx, la presencia de agentes de nucleación, o contaminantes, y estructuras celulares especializadas, pueden participar en la determinación de la morfología de los cristales de CaOx (5).

En plantas existen dos estados de hidratación, el monohidratado conocido como whewelita, y el dihidratado conocido como weddelita. El estado de hidratación regula la morfología del cristal, junto con el equilibrio dinámico del Ca con respecto a los iones de oxalato. Normalmente existe una alta correlación entre el estado de

hidratación y la morfología de los cristales. Sin embargo, para algunas morfologías, como las drusas en diferentes especies, pueden ser monohidratados o dihidratados (5).

2.2. Biosíntesis del CaOx.

En plantas, el CaOx no se forma en soluciones libres, sino en asociación con estructuras celulares, y éstas participan en la determinación de su morfología. Se teoriza que la cámara vacuolar del cristal, y sus membranas asociadas, son de las estructuras más importantes para la formación del cristal de CaOx, que comienzan siendo pequeñas, y crecen conforme el cristal crece, ya sea de forma bidireccional o de forma coordinada en todas direcciones de forma simultánea. Puede que dentro de la cámara se mantenga el balance químico que afecta la dinámica de cristalización, o que la cámara tenga canales transmembrana que regulan de forma selectiva la acumulación de ácido oxálico, de calcio, y de otras sustancias orgánicas, dentro de ésta, y dicho balance afecta la morfología del cristal (5).

La biosíntesis del CaOx en la célula se lleva a cabo mediante la acumulación de calcio y de ácido oxálico. La síntesis del ácido oxálico debe coordinarse con los niveles de acumulación de calcio, y el desarrollo de los cristales de CaOx. El ácido oxálico puede ser formado por medio de la oxidación del glicolato, y del glioxilato por medio de la actividad de la glicolato oxidasa. Estos sustratos son productos secundarios de la fotorespiración en los tejidos fotosintéticamente activos, y la glicolato oxidasa sobre una enzima del peroxisoma muy abundante en tejidos clorofílicos. Además, el oxalato puede ser sintetizado por medio de la acción del isocitrato liasa en el isocitrato, y a través de la oxidación del oxalacetato, cuya enzima sigue siendo desconocida. También se puede sintetizar por medio del ácido L-ascórbico, mediado por enzimas no identificadas que participan en esta vía metabólica (5).

2.3. Elementos que intervienen en la formación de CaOx.

Las características particulares de los idioblastos son aspectos muy importantes en la formación de los cristales de CaOx. Estos normalmente poseen un citoplasma muy denso, con abundante presencia de retículo endoplasmático y aparatos de Golgi, ya que son células metabólicamente muy activas con un rápido crecimiento, además de poseer vesículas pequeñas, plastidios inusuales, y una membrana con estructuras especializadas, que se asocian con la vacuola de los cristales. El retículo endoplasmático es muy importante en la regulación de la actividad del calcio citoplasmático, ya que regula la capacidad de proteínas lumenales, como la calreticulina, la cual se acumula en compartimentos especializados del retículo endoplasmático de los idioblastos con rafidios. Además, puede proveer una mayor área superficial, para mejorar la absorción de calcio del citoplasma, lo cual a su vez le facilita a la calreticulina su función de regulación del calcio que entra al retículo endoplasmático. Esta capacidad de regulación permite la síntesis de cristales de CaOx en un periodo de tiempo que se ha documentado puede ser de hasta una hora, en caso de que el organismo se encuentre bajo condiciones extremas de altas concentraciones de calcio. Esto indica el gran flujo de calcio del apoplasto hacia el citoplasma (5).

Las membranas que rodean a los cristales de CaOx en las vacuolas de los idioblastos producen una asociación intravacuolar que forma una cámara que rodean a los cristales, la cual se forma *de novo* junto con la vacuola. Durante la fase de crecimiento del cristal, las superficies de la cámara de la vacuola y de la membrana citoplasmática, se expanden y permiten el crecimiento del cristal sin dañar las organelas celulares (5). No se ha determinado la naturaleza de la membrana que rodea los cristales de CaOx. En algunas especies se observa como si fuera una membrana lipídica, pero en otras, la estructura que las rodea se asemeja más a una capa producto de precipitación proteica (5,93).

La membrana de la cámara vacuolar podría regular la morfología de los cristales al controlar la transferencia iónica de calcio y ácido oxálico con el citoplasma, ya que la proporción de éstos puede afectar su morfología. Sin embargo, los mecanismos

por los cuales se regula este intercambio son desconocidos. Se hipotetiza que las propiedades químicas de las membranas pueden proveer diferentes coeficientes de difusión para estos iones, los cuales provocan un gradiente de difusión a través de la membrana. Otra explicación sugiere que puede que participen canales iónicos y fusión de vesículas con los precursores necesarios, como agentes de nucleación, para que se lleve a cabo la formación de los cristales. Solamente una matriz proteica de CaOx ha sido aislada del cristal, y parcialmente caracterizada, y se ha encontrado que es una proteína nueva, específica de los cristales de los idioblastos, la cual posee una cantidad considerable de residuos de aminoácidos y la propiedad de realizar fuertes enlaces con el calcio (5,94).

Cuando se lleva a cabo la desmineralización de cristales de CaOx se deja atrás una matriz fantasma, que generalmente conserva la forma última del cristal, y puede promover la formación de nuevos cristales dentro de sí (5).

Los plastidios en los idioblastos son muy característicos, ya que poseen una estructura inusual. No poseen tilacoides ni grana, ni contienen Rubisco, por lo que no son fotosintéticos, ni cuándo se encuentran inmersos dentro de un parénquima fotosintético. Algunos autores los llaman cristaloplastidios. Se hipotetiza que debido a los sistemas extensos de membranas formados en las células, una de las funciones de estos plastidios sea la síntesis de lípidos, y que se encuentren involucrados en el sistema de síntesis de ácido oxálico (5).

2.4. Funciones del CaOx.

En cuanto a la función del CaOx en las plantas, se han planteado diversas hipótesis, debido a su gran diversidad de formas, tamaños, y distribución en diferentes organismos vegetales. La regulación interna de calcio es una de las primeras funciones que se propuso para los cristales de CaOx. Varios estudios han mostrado el rol del CaOx en los mecanismos de regulación del calcio en los tejidos y órganos de la planta (3,5,27,95).

Esta regulación es especialmente necesaria en plantas que crecen en sustratos con altas concentraciones de calcio debido a que la planta busca mantener una

regulación controlada de la absorción del calcio a nivel del apoplasto en la raíz, ya que el organismo requiere nivelar la concentración interna de este elemento, porque su déficit o exceso puede provocar problemas metabólicos, debido a que el calcio participa en la transducción de la señal de vías metabólicas, y en la regulación de procesos bioquímicos en la célula. Por lo anterior, grandes cantidades de calcio pueden ser precipitadas como CaOx, el cual es fisiológicamente y osmóticamente inactivo, y es acumulado, dependiendo de la planta, en tejidos maduros, o en órganos en desarrollo (5).

La pared celular es capaz de crear enlaces de unión con el calcio; sin embargo, la acumulación de calcio en los apoplastos de células jóvenes puede interferir con el proceso normal de expansión celular, provocado por los enlaces cruzados con residuos ácidos de los polímeros de la pared celular. Por lo anterior, la formación de idioplastos en tejidos en desarrollo puede tener como función primaria, la acumulación de calcio, para reducir la concentración apoplástica de este elemento en las células contiguas, permitiendo un desarrollo normal. En el caso de tejidos maduros con deficiencia de calcio, se ha identificado a la oxalato oxidasa, como una posible enzima que participa en el proceso de degradación del CaOx, para la liberación del calcio en forma de iones en disolución (5).

Otra de las funciones propuestas para el CaOx es la protección mecánica de la planta contra herbívoros. Puede tener un rol pasivo en la defensa mecánica de la planta, o un rol activo como en *Tragia ramosa* (Euphorbiaceae). En este caso, la planta está cubierta con pelos astringentes, que contienen cristales aciculares con un canal a lo largo del cristal hasta su base ramificada. Cuando un animal toca o roza estos pelos, la punta de las células se rompen, y permiten que los cristales puncen la epidermis del animal, permitiendo que una toxina sea transportada a lo largo del canal, hasta el sitio de la herida, causando irritación dérmica, y sensación astringente (5). Un caso del rol pasivo ocurre en *Agave*, cuyo jugo se usa para hacer tequila, ya que posee más de 6000 cristales por mililitro de jugo, los cuales causan dermatitis con el contacto epidérmico a los trabajadores de las destilerías, y se lo

provocaría de forma similar a los herbívoros que llegasen a alimentarse de la planta de *Agave* (5,96).

La función más novedosa que se ha propuesto en los últimos años para el CaOx, es que sirve como una molécula de reserva de carbono. Esto debido a que en experimentos con *Amaranthus hybridus* (Amaranthaceae) se han observado fluctuaciones en el volumen total de CaOx en cortos periodos de tiempo, así como cambios diurnos y nocturnos. Además, se ha observado que durante el cierre estomático de *Dianthus chinensis* (Cariophyllaceae), *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae) y *Portulacaria afra* (Portulacaceae), se lleva a cabo la descomposición de cristales, por el incremento en el oxalato oxidasa, que convierte el oxalato en dióxido de carbono. También en *A. hybridus*, a pesar del cierre estomático, se presenta un metabolismo fotosintéticamente activo, por lo que se hipotetiza que, en hojas, los cristales de CaOx pueden cumplir una función de reserva bioquímica de carbono no atmosférico, durante la noche, y que durante el día su degradación puede proveer carbón para la asimilación fotosintética. Esto le confiere ventajas adaptativas, que podrían justificar la gran presencia de los cristales CaOx en plantas, ventajas como el ahorro de agua, disminuir las pérdidas de carbono a la atmósfera, y un menor riesgo de fotoinhibición (59).

3. La histocitotecnología cuantitativa y cualitativa.

A lo largo de la historia la histoquímica y la citoquímica se han empleado para realizar descripciones morfológicas de tejidos normales o afectados por distintas patologías, así como para la identificación de presencia o ausencia de macromoléculas por medio de técnicas de histoquímica funcional o molecular (55,70,75–77,97). En el caso de la IHC, se pueden obtener resultados semicuantitativos al establecer categorías de positividad mediante el empleo de un sistema de cuatro cruces (+, ++, +++, +++) que indica de forma subjetiva qué tan positiva es la muestra (98).

La tendencia hacia la falta de datos cuantitativos en los trabajos de histología y citología muchas veces impide el análisis estadístico de las muestras y con ello, el respaldo matemático de los resultados obtenidos mediante un rango de confianza.

Por ello es de gran importancia para la histocitotecnología establecer protocolos cuantitativos.

En el caso de esta investigación, combinar la técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1) para el marcaje de cristales de CaOx con el análisis del vecino más cercano, que ha sido ampliamente utilizado para analizar los patrones de distribución espacial y obtención del coeficiente de variación de diferentes especies (20–24), permite obtener datos cuantitativos a partir del análisis de células y tejidos a nivel microscópico.

4. Los oxalatos en la salud humana.

Los cristales de CaOx no se encuentran de forma normal en tejidos animales, excepto en la tiroides humana, donde se encuentra en el 79% de las autopsias (99). Sin embargo, estos cristales se han identificado en tejidos humanos que sufren de ciertas patologías a nivel del riñón, del miocardio, y del cerebro. La presencia de cristales de CaOx se ha reportado en casos de nefrosis, oxalosis primaria y enfermedad renal crónica con uremia (18,31,70,100–103). En Estados Unidos, así como en varios otros países, el CaOx está directamente relacionado con la mayor parte de las piedras del tracto urinario (71).

La ingesta de plantas es la fuente principal de oxalatos, y debido a esto se han hecho esfuerzos para disminuir la concentración de oxalatos en los alimentos, identificando germoplasma, condiciones de cultivo, prácticas agronómicas y, en los últimos años, la manipulación genética para producir cultivos con menores niveles de oxalato en sus tejidos, como en espinaca, pimienta, nueces, plátanos, entre otros. El oxalato se considera un antinutriente, debido a que retiene el calcio, y otros minerales, evitando que se puedan absorber (5,104–106).

Pese a que la asociación principal del CaOx es con la urolitiasis y la oxalosis en el ser humano, ha ido ganando atención en otras condiciones médicas, y se teoriza que tiene un papel independiente del manejo renal, incluyendo pancreatitis, insuficiencia pancreática exocrina y casos de aterosclerosis coronaria (71). Existe

controversia en cuanto a la relación entre el CaOx y la formación de piedras, debido principalmente a la falta de la comprensión total del proceso de la enfermedad.

Sin embargo, pese a que la hiperoxaluria puede ser controlada con la suplementación de calcio en las comidas, no se tiene claro cómo los valores de consumo del oxalato intervienen en la formación de piedras. Muchos autores relacionan directamente el consumo del oxalato y CaOx con su formación en un porcentaje importante de los pacientes que padecen de piedras renales. No obstante, aún se desconocen las vías metabólicas que participan en la absorción y producción de oxalato, la formación o acumulación del CaOx en los tejidos del ser humano, y la patología que pueden causar (71).

5. La histoquímica para el marcaje del CaOx.

La histoquímica surge como ciencia entre 1830 y 1855, aplicando los conocimientos de la química y la bioquímica a las ciencias biológicas para comprender el dinamismo de los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en los organismos. Este origen fue primeramente botánico, sentando sus bases con las primeras publicaciones como: el tratado de Francois-Vincent Raspail, el fundador de la histoquímica, titulado *Clinique Microscopique Appliquée á la Physiologie* en 1830, su tratado *Nouveau Systéme de Chimie Organique* en 1833, *New System of Organic Chemistry* en 1834, y el tratado de *Lehmann Lehrbuch der physiologischen Chemie* en 1842 (107).

Posteriormente, la histoquímica comenzó a surgir en el campo de la histología animal, surgiendo los estudios microanatómicos e histopatológicos de animales a principios del siglo XX. El trabajo más importante en esta área fue el tratado de Lison, titulado *Histochemie animale* publicado en 1936. Surgieron así nuevas técnicas de marcaje topográfico para la observación de la morfología general de los tejidos, y el marcaje funcional para teñir de forma selectiva una estructura o un compuesto específico de interés, mediante la aplicación de los conocimientos en histoquímica y citoquímica tanto en tejidos animales como vegetales (107). En las últimas décadas han surgido nuevas aplicaciones para la utilización de técnicas de biología molecular para el marcaje de ácidos nucleicos, macromoléculas, y otros

compuestos de interés, en muestras histológicas y citológicas, como la IHC, la hibridación *in situ*, *FISH* (*Fluorescent in situ hybridization*), entre otras técnicas (50–52).

El caso específico del marcaje de sales de calcio por medio de técnicas de histoquímica funcional se publicó por primera vez por Julius von Kóssa en su artículo *Ueber die im Organismus künstlich erzeugen Verkalkungen* en 1901, en la que, por medio de una reacción argentafin mediada por fotones, que precipita plata metálica sobre las sales de calcio, se marcan estas sales de color negro en los tejidos (25). Sin embargo, hay dudas de que este haya sido el primer estudio en el que se marcó por primera vez sales de calcio, ya que Flesch en 1885 demostró la presencia de depósitos de calcio, y Lemberg en 1892 describió que el calcio podría ser detectado por medio del tratamiento de los minerales con nitrato de plata, seguido de una reducción con pirogalol (108).

El problema de la técnica propuesta por Von Kóssa es que no puede marcar de forma específica cada una de las sales de calcio de manera diferenciada, sino que marca todas las sales de calcio de la misma forma. El mismo autor tenía claro este asunto, ya que admite que tanto fosfato de calcio como otros derivados orgánicos eran marcados (25,108).

En algunos casos se ha reportado que el marcaje con nitrato de plata no es una prueba para calcio o fosfato, sino que la reacción que se visualiza de color negro, se da con una variedad de depósitos sólidos, en donde el anión de la molécula es más importante que el metal, pero esto va en contra de los resultados de otros estudios que demuestran que la reacción de Von Kóssa se da con las sales de calcio, marcándolas de forma general (1,18,70,109–111). Además, esta es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para el marcaje de sales de calcio, como carbonato de calcio y fosfato de calcio, en laboratorios de anatomía patológica humana (50–52), lo que respalda que es una técnica adecuada para el marcaje de sales de calcio.

Existen otras técnicas para el marcaje de depósitos de calcio, como el protocolo con alizarina, el cual marca depósitos de estroncio y de calcio, los cuales tiñen de color

rojo con atrapurpurina de alizarina. La tinción del calcio es en ciertos casos, como en el hueso, relativamente débil, por lo que se pueden usar mordentes, como ácido fosfotúngstico, ácido fosfomolibdico o sulfato de potasio, para potenciar la tinción. Sin embargo, también es una tinción generalista para el marcaje de las diferentes sales de calcio (108).

Ahora bien, en cuanto al marcaje propiamente del CaOx, se ha trabajado tanto en tejidos animales como en tejidos vegetales. El primer reporte se realizó en animales, en donde se planteó la modificación del protocolo original de von Kóssa, agregándole una digestión para el carbonato de calcio y el fosfato de calcio, que son las sales más abundantes y comunes en tejidos animales, con ácido acético al 5% v/v por 30 min, seguido del marcaje argentafín del CaOx, que según Yasue (1) resiste la digestión con ácido acético, con nitrato de plata, y una potenciación de la tinción con la solución saturada ditioamida en alcohol etílico de 70% v/v, con dos gotas de amoniaco por cada 100 mL de solución (1). El protocolo se puso a prueba al correr junto con sus muestras controles positivos y negativos para carbonato de calcio, CaOx, y fosfato de calcio, y realizando sus digestiones con diferentes tipos de ácidos inorgánicos a distintas concentraciones.

Este mismo protocolo de von Kóssa, modificado por Yasue (1), se puso a prueba en el marcaje de CaOx en plantas, con buenos resultados. McKenzie & Schultz (112) lo pusieron a prueba en *Panicum maximum*, *P. bisulcatum* y en *Digitaria sanguinalis*, todas especies de la familia Poaceae. Los autores, de igual forma, corrieron controles positivos y negativos para el CaOx, marcando y caracterizando los cristales a nivel histológico (112). Macnish et al. (18) también emplearon este protocolo en *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae), logrando la identificación de los cristales de CaOx en sus cortes histológicos, y con microscopía electrónica, espectroscopia de rayos X, y otras técnicas para la caracterización de cristales.

6. El clima de Costa Rica.

Costa Rica se encuentra en el cinturón del Trópico Ecuatorial con una latitud media de 10° Norte, y posee una estación seca y una lluviosa. La variación térmica mensual es de menos de 4°C, y las costas son afectadas por las Corrientes Costales del Pacífico Costarricense. Debido a la posición latitudinal del país, los sistemas atmosféricos son determinados por la Zona con Convergencia Intertropical, los frentes fríos, las olas del este, y por las brisas marinas y terrestres (113,114).

En términos generales la época seca en el país se extiende de diciembre a abril, y la lluviosa de mayo a noviembre. El promedio de la temperatura anual varía desde los 27.6°C en la costa Norte de Puntarenas, 26°C en la costa del Caribe, hasta los 6°C en el Cerro Chirripó, y hasta 35°C en la provincia de Guanacaste (113,114). El gradiente térmico anual es de -5.7°C por cada 1000 m de incremento altitudinal en la vertiente Pacífica, y de -5.2°C en la vertiente Caribe. El promedio de la variación mensual de temperatura no excede los 4°C entre los meses de marzo o abril, que son usualmente los meses más calientes del año, ni en el mes de noviembre, que suele ser el más frío (114).

En ausencia de cobertura nubosa, el sol se mantiene sobre el horizonte por 11.41 horas en el solsticio de invierno, el 22 de diciembre, y por 12.58 horas en el solsticio de verano, el 21 de junio. Sin embargo, entre los 600 msnm a los 2.200 msnm, las horas de luz solar directa se reducen al menos un 50%. El ámbito de radiación solar en el décimo paralelo varía entre 37.5 MJ/m² en abril, a 30.7 MJ/m² en noviembre. Sin embargo, el promedio diario medido en la estación seca es de 23 MJ/m², con un mínimo de 13 MJ/m² en sitios muy nubosos (114).

La precipitación anual varía desde los 1300 mm en el clima seco de la Provincia de Guanacaste, a los 7467 mm en la cuenca del Río Grande de Orosí, en la vertiente Caribe. Y el promedio mensual de humedad relativa varía entre el 65% y 90%, el promedio por hora varía entre el 52% al 98% (114).

La región climática de las planicies del Pacífico Norte incluye la cuenca del Río Tempisque, la Península de Nicoya, y parte de la franja costera del este del Golfo

de Nicoya de acuerdo con el régimen de precipitación y es una zona de ligera a moderadamente árida, pero con una sequía no tan severa como en las planicies y colinas de la Provincia de Guanacaste (114). Guanacaste es la provincia en donde se alcanzan temperaturas máximas de hasta 35°C, que posee vegetación característica de bosque tropical seco, y presenta sequías frecuentes en muchas localidades de la provincia (113). Debido a estas características de la provincia de Guanacaste, los cultivos de pitahaya que se encuentren en exposición directa y continua de radiación solar, al ser naturalmente plantas hemiepifitas, pueden sufrir quemaduras solares, que pueden generar la necrosis del tejido caulinar, y por ello se recomienda colocarles una cubierta que les brinde una sombra relativa (28,29,48,65).

7. Tratamiento a la sombra en pitahaya.

El estrés abiótico causado por la exposición a radiación solar directa y continua a las plantas de pitahaya genera respuestas morfológicas para tratar de contrarrestar o protegerse de la radiación solar excesiva y sus efectos. Una de estas respuestas puede ser modificar la distribución y cantidad de cristales de CaOx en su epidermis y parénquima (14,66).

Debido a esto, en cultivos expuestos en una zona con alta radiación solar se emplean sombras naturales, como árboles que protejan a las plantas de pitahaya de la radiación, o sombras artificiales, como saranes con diferentes porcentajes de sombra, para cumplir dicho objetivo. En varios estudios en *H. undatus*, en los cuales emplearon saranes como sombras artificiales, los cultivos respondieron de buena manera a una sombra del 40%, en *Selenicereus megalanthus* (Cactaceae) a una sombra de entre el 40% al 60%, y en *Hylocereus polyrhizus* (Cactaceae) a una sombra del 50%, con los que mantuvieron similares su patrón de floración óptimo, el contenido de azúcares y minerales de la pulpa de los frutos, y evitó la formación de quemaduras solares a nivel del tallo de la planta (28,29,48).

II. CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

1. Descripción general de la estrategia metodológica.

Este proyecto de tesis forma parte del proyecto de investigación “Estudio de la acumulación de cristales de oxalato de calcio y de la expresión de genes relacionados con su síntesis en pitahaya (*H. costaricensis*)” VI-734-B7-074”, inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Es una investigación experimental donde se describe la cantidad y distribución de cristales de CaOx en el tallo de *H. costaricensis* como marcadores de estrés abiótico de acuerdo con el grado de exposición solar, que servirá como base para los análisis de expresión génica del proyecto VI-734-B7-074.

Para el desarrollo de la investigación se realizaron muestreos sistemáticos del color de los cladodios de *H. costaricensis*, y de muestras de tejidos del cladodio para el análisis histológico del CaOx, así como para el análisis de digestión enzimática con pectinasa para la cuantificación de cristales de CaOx por volumen y masa del tejido del cladodio.

Una vez realizado el marcaje histoquímico del CaOx, se tomaron microfotografías de las muestras y se analizaron con el análisis del vecino más cercano, basado en la Prueba de Hines, para determinar la distribución espacial de los cristales de CaOx por medio del coeficiente de dispersión obtenido con el análisis estadístico de las distancias existentes entre los cristales. También se contabilizaron la cantidad de cristales por volumen y masa de muestra, obtenidos con la digestión enzimática con pectinasa, con un hemocitómetro Neubauer.

Finalmente, con estos datos cuantitativos se realizó la comparación de los datos obtenidos del análisis microscópico de los cristales de CaOx, y de la concentración de cristales de CaOx por volumen y masa de tejido obtenidos con digestión enzimática con pectinasa.

2. Descripción de la metodología de cada experiencia investigativa.

2.1. Sitio de estudio.

La investigación es de tipo experimental y se realizó en dieciocho meses calendario, en la ciudad de Liberia, Guanacaste, Costa Rica, en la comunidad de El Salto, en la finca “El Salto de Liberia”. Las coordenadas geográficas de la finca son: 10°35'00.4” N, 85°22'57.4” O.

El trabajo de campo en la finca se realizó de febrero del 2018 a abril del 2018. El trabajo en el laboratorio se realizó entre abril del 2018 y febrero del 2019 en el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica. El análisis de los datos y redacción del manuscrito se realizó entre febrero del 2019 y agosto del 2019.

3. Definición y operacionalización de las variables del estudio.

En los cuadros 1 y 2 se especifica la definición y operacionalización de las variables de estudio de los objetivos específicos 1 y 2, respectivamente.

4. Definición de los procedimientos de recolección de información

4.1. Tipo de muestreo.

La finca tiene media hectárea sembrada con *H. costaricensis*. Las plantas se encontraban sembradas en postes de cemento, y en un mismo poste puede haber más de una variedad, ya sea Rosa, San Ignacio, Orejona, o Lisa. Los postes estaban acomodados en filas compuestas por 23 postes. En una misma fila las plantas estaban separadas entre ellas por 2.5 m de distancia, y las filas estaban separadas por 3.5 m de distancia entre ellas.

Las plantas de pitahaya de la finca se encontraban casi todas expuestas a radiación solar directa a lo largo del día. Sin embargo, hubo algunas plantas bajo la sombra de árboles. Por ello, para realizar un muestreo significativo, para comparar plantas que se encontraban expuestas al sol, con respecto a aquellas bajo sombra, se colocaron saranes distribuidos a lo largo de la plantación que les confería una sombra del 50% a 30 plantas.

Cuadro 1. Definición y operacionalización de las variables del objetivo específico 1: “Describir diferencias morfológicas macroscópicas y microscópicas en 30 plantas de *H. costaricensis* que crecen a mayor y menor intensidad lumínica”.

Variab	Tipo de variable	Definición conceptual	Indicadores	Instrumento	Unidad de medida
Porcentaje de humedad relativa al lado de las plantas que forman parte del experimento	Cuantitativo continuo	Porcentaje de agua disuelta en la atmósfera al lado de las plantas que forman parte del experimento tomado entre las 10:30 y las 11:00	Promedio del porcentaje de humedad relativa al lado de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Sensor de porcentaje de humedad relativa del LabChart	Porcentaje de humedad relativa
Temperatura (°C) al lado de las plantas que forman parte del experimento	Cuantitativo continuo	Nivel térmico de la atmósfera al lado de las plantas que forman parte del experimento tomado entre las 10:30 y las 11:00	Promedio de la temperatura al lado de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Sensor de temperatura del LabChart	Grados centígrados
Radiación solar al lado de las plantas que forman parte del experimento	Cuantitativo de razón	Cantidad de energía irradiada por el sol a una superficie determinada de las plantas que forman parte del experimento tomado entre las 10:30 y las 11:00	Promedio de la radiación solar al lado de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Sensor de radiación solar del LabChart	Lux

Continuación del Cuadro 1.

Radiación fotosinteticamente activa al lado de las plantas que forman parte del experimento	Cuantitativo de razón	Radiación integrada de las longitudes de onda que son capaces de producir fotosíntesis en organismos vegetales al lado de las plantas que forman parte del experimento	Promedio de la radiación fotosinteticamente activa al lado de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Sensor de radiación fotosinteticamente activa del LabChart	$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$
Color	Cuantitativa continua	Longitudes de onda reflejadas por la superficie del cladodio de <i>Hylocereus costaricensis</i>	Color según el sistema LAB	Colorímetro digital	L=luminosidad A= posición entre el rojo y el verde B= posición entre el amarillo y el azul
Características citoplasmáticas	Cualitativa	Morfología y contenido citoplasmático	Características citológicas	Microscopio de luz	Cualitativa
Características nucleares	Cualitativa	Morfología y tinción nuclear	Características citológicas	Microscopio de luz	Cualitativa
Homogeneidad celular	Cualitativa	Morfología y distribución de las células a lo largo de las diferentes capas de tejido	Características histológicas y citológicas	Microscopio de luz	Cualitativa
Número de botones florales	Cuantitativo de razón	Número de botones florales por poste que forma parte del experimento	Promedio de botones florales de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Cuantificación visual directa	Número de botones florales / poste

Continuación del Cuadro 1.

Número de frutos	Cuantitativo de razón	Número de frutos por poste que forma parte del experimento	Promedio de frutos al lado de las plantas de pitahaya bajo el tratamiento a la sombra y bajo radiación lumínica directa	Cuantificación visual directa	Número de frutos / poste
------------------	-----------------------	--	---	-------------------------------	--------------------------

Fuente: elaboración propia.

Los saranes se colocaron en el mes de febrero del 2018, y se mantuvieron hasta el final del experimento. En el mes de abril del 2018, en plena estación seca, se realizó un muestreo sistemático de 30 plantas de pitahaya expuestas a radiación solar permanente a lo largo del día, y 30 plantas que se encontraban bajo sombra de sarán de 50% sombra. El muestreo se hizo de forma sistemática de la fila 2 a la fila 7, que poseían plantas de *H. costaricensis* de entre tres y cuatro años, tomando en cuenta solamente las plantas completamente expuestas a radiación solar durante todo el día (Fig. 1).

Los primeros tres postes de las filas con números pares eran de plantas expuestas a radiación solar directa durante todo el día. Se dejaron dos o tres postes de espacio, y los tres postes siguientes de cada columna se cubrieron con sarán de 50% sombra. Para evitar la sombra producida por las casas de sarán a lo largo del día en las plantas que deben estar expuestas a radiación lumínica directa. Este patrón sistemático de muestreo se siguió a lo largo de todas las filas pares. En el caso de las filas con número impar, los primeros tres postes fueron cubiertos con sarán, se dejaron dos o tres postes de espacio para evitar la sombra generada por las casas de sarán, y se tomaron las tres plantas siguientes como plantas expuestas a radiación solar directa durante todo el día, y así consecutivamente con los demás postes de cada fila (ver Fig. 1 y Fig. 2).

Como se observa en la figura 1, la primera fila de postes, la primera columna, la fila ocho y la última columna de postes, no formaron parte del muestreo para tratar de disminuir el efecto borde al que pudieran haber estado expuestas. Además, los postes 2 y 3 de las filas 3, 4 y 5, y los postes del 11 al 22 de las filas 6 y 7, no se

tomaron en cuenta dentro del muestreo debido a que se encontraban bajo algún porcentaje de sombra producida por árboles cercanos. Además, se dejaron dos o tres postes de espacio entre cada trío de plantas expuestas al sol y cubiertas por sarán para asegurarse que la sombra generada por las casas de sarán no afectara en ningún momento del día a los tríos de plantas expuestas al sol.

	Fila 1	Fila 2	Fila 3	Fila 4	Fila 5	Fila 6	Fila 7	Fila 8
Columna 1	1	1	1	1	1	1	1	1
Columna 2	2	2	2	2	2	2	2	2
Columna 3	3	3	3	3	3	3	3	3
Columna 4	4	4	4	4	4	4	4	4
Columna 5	5	5	5	5	5	5	5	5
Columna 6	6	6	6	6	6	6	6	6
Columna 7	7	7	7	7	7	7	7	7
Columna 8	8	8	8	8	8	8	8	8
Columna 9	9	9	9	9	9	9	9	9
Columna 10	10	10	10	10	10	10	10	10
Columna 11	11	11	11	11	11	11	11	11
Columna 12	12	12	12	12	12	12	12	12
Columna 13	13	13	13	13	13	13	13	13
Columna 14	14	14	14	14	14	14	14	14
Columna 15	15	15	15	15	15	15	15	15
Columna 16	16	16	16	16	16	16	16	16
Columna 17	17	17	17	17	17	17	17	17
Columna 18	18	18	18	18	18	18	18	18
Columna 19	19	19	19	19	19	19	19	19
Columna 20	20	20	20	20	20	20	20	20
Columna 21	21	21	21	21	21	21	21	21
Columna 22	22	22	22	22	22	22	22	22
Columna 23	23	23	23	23	23	23	23	23

Fig. 1. Distribución espacial en filas y columnas de las plantas de *H. costaricensis* en la finca El Salto de Liberia. Se muestra el patrón sistemático de muestreo empleado para la toma de muestras de plantas expuestas al sol (amarillas) y plantas bajo sombra (gris).

Fuente: elaboración propia.



Fig. 2. Visión general de la distribución de los saranes de 50% de sombra sobre las plantas de pitahaya en la Finca El Salto de Liberia, Costa Rica.

Fuente: elaboración propia.

De cada uno de los postes con plantas que se encontraban dentro del estudio se tomó el cladodio plagiotrópico que se encontraba más cercano al punto cardinal norte, sur, este y oeste, para realizar la toma de muestras.

Cuadro 2. Definición y operacionalización de las variables del objetivo específico 2: “Describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en 30 plantas de *H. costaricensis* que crecen a mayor y menor intensidad lumínica”.

Variables	Tipo de variable	Definición conceptual	Indicadores	Instrumento	Unidad de medida
Cristales de oxalato de calcio	Cualitativa	Cristales de oxalato de calcio marcados de color negro por la reacción de Von Kóssa	Controles positivos y muestras con CaOx Von Kóssa positivos. Controles negativos Von Kóssa negativos	Microscopio de luz	Controles positivos, negativos, y muestras experimentales
Área total de cristales de CaOx	Cuantitativa	Área de cristales de CaOx presentes por microfotografía a X200	Promedio del área de cristales de CaOx por muestra de cladodio	Microscopio de luz	$\frac{\gamma l}{L^*} =$
Distribución espacial de los cristales de CaOx	Cualitativa y cuantitativa continua	Patrón de distribución en el espacio de los cristales de CaOx	Prueba de aleatoriedad de Hines.	Microscopio de luz y análisis del vecino más cercano.	$h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$
Presencia total de cristales prismáticos de CaOx	Cualitativa	Cristales de CaOx con una morfología en bloque, romboédricos o con forma de prisma por microfotografía a X200	Presencia de cristales de CaOx prismáticos por muestra de cladodio	Microscopio de luz y microscopía electrónica de barrido (SEM).	Presencia de cristales prismáticos de CaOx
Presencia de cristales puntiformes de CaOx	Cualitativa	Presencia de cristales de CaOx con una morfología angular, pequeños que poseen una apariencia puntiforme	Presencia de cristales de CaOx puntiformes por muestra de cladodio	Microscopio de luz y SEM.	Presencia de cristales puntiformes de CaOx

Continuación del Cuadro 2.

Presencia de cristales aciculares de CaOx	Cualitativa	Presencia de cristales de CaOx con una morfología acicular (forma de aguja), también llamados rafidios por microfotografía a X200	Presencia de cristales de CaOx aciculares por muestra de cladodio	Microscopio de luz y SEM.	Presencia de cristales aciculares de CaOx
Presencia de cristales de CaOx en drusa	Cualitativa	Presencia de cristales de CaOx en conglomeración de cristales multifacéticos por microfotografía a X200	Presencia de cristales de CaOx en drusa por muestra de cladodio	Microscopio de luz y SEM.	Presencia de cristales de CaOx en drusa
Número de cristales de CaOx por mL ⁻¹	Cuantitativa de razón	Número de cristales de CaOx presentes en 16 cuadros de 0.0625mm ² del hemocitómetro Neubauer obtenidos por medio de la digestión enzimática con pectinasa	Promedio del número de cristales de CaOx por mL ⁻¹ por muestra de cladodio	Hemocitómetro y microscopio de luz	Cristales por mL ⁻¹ (ver la fórmula en la sección de Cuantificación de cristales de CaOx por maceración)
Número de cristales de CaOx por g ⁻¹	Cuantitativa de razón	Número de cristales de CaOx presentes en 1 g de tejido de cladodio de pitahaya obtenidos por medio de la digestión enzimática con pectinasa	Promedio del número de cristales de CaOx por g ⁻¹ por muestra de cladodio	Hemocitómetro y microscopio de luz	Cristales por g ⁻¹ (ver la fórmula en la sección de Cuantificación de cristales de CaOx por maceración)

Fuente: elaboración propia.

4.2. Factores abióticos.

Durante la recolección de las muestras se realizó la medición de los factores abióticos de la atmósfera al lado de cada una de las plantas que forman parte del experimento. Estas mediciones se realizaron entre las 10:30 y las 11:00 con la interfaz computacional independiente LabQuest (Spectra QUEST America Corp., Sacramento, Estados Unidos). Los factores abióticos medidos fueron: temperatura, porcentaje de humedad relativa, radiación fotosintéticamente activa y radiación solar total.

4.3. Parámetros de color superficial medidos en los cladodios de pitahaya.

De cada una de las plantas que formaron parte del experimento se tomaron mediciones del color de sus cladodios con un colorímetro de superficie marca FRU® MODELO wr-10 (Shenzhen Wave Optoelectronics Technology Co., Ltd, China.), que indica los valores de color en el sistema CIELAB y sus coordenadas $L^*a^*b^*$. Con el colorímetro se tomaron los datos de color del cladodio plagiotrópico que se encontraba más cercano a los puntos cardinales norte, sur, este y oeste. De cada uno de estos cladodios se realizó la medición de color en un punto de la base, del medio y de la cumbre del cladodio, que se encontraba perpendicular al sol cenital.

Además, con las coordenadas $L^*a^*b^*$ se calculó el índice de la abundancia del color amarillo (YI), según la Ecuación 1 y el ángulo de Hue según la ecuación 2 (115):

Ecuación 1. Índice de la abundancia del color amarillo.

$$YI = \frac{142.86 b^*}{L^*}$$

Ecuación 2. Ángulo de Hue.

$$h^* = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (115).$$

4.4. Fijación y procesamiento con fines histológicos.

De los mismos cladodios muestreados en la medición de color, se tomaron al azar tres de los cuatro puntos cardinales. De cada cladodio se tomó un corte transversal de 0,5 cm de ancho por 2,0 cm de largo de una de las costillas del cladodio cuya superficie se encontraba perpendicular al sol cenital. Igualmente, de las plantas que se encontraban bajo la sombra del sarán, se tomó un corte transversal de 0,5 cm de ancho por 2,0 cm de largo de uno de los vértices del cladodio cuya superficie se encontrara perpendicular al sol cenital, de la zona basal del cladodio. Además, se tomó una muestra de 5,0 cm² de cada costilla del cladodio, la cual fue congelada inmediatamente en nitrógeno líquido, y posteriormente fue transferida a una cámara de refrigeración de -40° C para el análisis de contenido de clorofila y carotenoides.

Una vez tomadas las muestras para histología, se colocaron en cassettes de procesamiento histológico en el laboratorio de histología del CIGRAS. Se fijaron inmediatamente por medio químico con inmersión en la solución fijadora F.A.A. (compuesto por 10 % v/v de formalina al 37% v/v, 5 % de ácido acético glacial, y 85% de alcohol etílico al 70% v/v), por un periodo de 48 horas a temperatura ambiente (53). Una vez finalizado el periodo de fijación, se procedió a procesarlas para fines histológicos.

Para el procesamiento histológico de las muestras, se aceleró el intercambio químico intratisular en los cambios de alcohol y xileno, por aumento de la temperatura y la cinética molecular empleando microondas, en cada una de las soluciones con las muestras inmersas en el reactivo, a un rango de 50 °C a 60 °C (116,117). Luego las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcohol etílico, 70% v/v por 5 min, 80% v/v por 5 min, 90% v/v por 5 min, 95% v/v por 10 min, y 2 cambios en alcohol anhidrido por 10 min. Seguidamente las muestras se aclararon en un cambio en la solución de xileno:alcohol anhidrido en una proporción 1:1, y en dos cambios de xileno puro, cada uno por 10 min. Posteriormente, se procedió a realizar la infiltración en Paraplast Plus®. Se realizó un cambio en una solución de xileno:paraplast en una proporción 1:1, por 40 min incubadas en estufa

a 60 °C y luego dos cambios en paraplast puro por 60 min incubadas en estufa a 60 °C (50,53).

4.5. Corte micrométrico.

Una vez finalizado el procesamiento histológico de las muestras, se procedió a incluir las muestras en Paraplast Plus® (52). Cada una de las muestras se colocó en un molde metálico de inclusión histológica, con un tamaño correspondiente al tamaño de la muestra, se orientó de la forma adecuada, para garantizar la observación de las estructuras de interés en el corte micrométrico posterior, y luego se procedió a rellenar los moldes con parafina y se enfriaron en un baño de agua corriente con hielo en refrigeración a 4°C por al menos 10 min. Una vez enfriados, se despegaron los bloques de parafina de los moldes metálicos, y se quitaron los excesos de parafina de los bordes del bloque (50,53).

Se procedió a realizar dos cortes micrométricos por cada muestra. Los bloques se enfriaron por al menos 10 min en un congelador a -15 °C, y se cortaron en un micrótopo de rotación tipo Minot marca Reichert 820H modelo HistoStat (el proveedor original es Reichert-Jung, actualmente la marca pertenece a Leica®, Wetzlar, Alemania), a un grosor de 8 µm. Los cortes se extendieron en un baño de flotación de agua destilada entre 40 °C y 45 °C, y se recogieron en un portaobjetos esmerilado, los cuales fueron posteriormente incubados en una estufa a 60°C por al menos 1 hora (50,52,53).

4.6. Desparafinización y tinciones.

Una vez finalizado el proceso de incubación, las láminas se desparafinaron en una batería de tinción con dos cambios de xileno por 2 min cada uno, y se hidrataron por una serie decreciente de alcoholes etílicos, dos de alcohol anhídrido, alcohol etílico al 95% v/v, y alcohol etílico al 70% v/v, cada uno por 2 min, y finalmente se hidrataron completamente en agua corriente por 5 min (50,52,53).

Se realizó la tinción topográfica de azul de toluidina (AT) al 0.01 % m/v disuelta en una solución acuosa saturada con ácido bórico para cada una de las muestras. Se

colocaron las láminas en el AT por 25 min, se lavaron rápidamente en agua corriente para eliminar los excesos de colorante (53).

Además, se realizó la tinción funcional de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1). Para ello, cada una de las muestras se lavó en tres cambios de agua destilada por 2 min cada uno. Las muestras se colocaron en ácido acético glacial al 5 % m/v por 30 min para disolver otras sales de calcio distintas al CaOx. Es muy importante que las canastillas de tinción que se usaron para esta tinción fueran de plástico o de vidrio. Luego se colocaron en una solución de nitrato de plata al 5% v/v por 20 min, y se lavaron con agua destilada por 5 min. Posteriormente se colocaron en la solución saturada de ditioxamida disuelta en alcohol etílico al 70% añadiendo dos gotas de amoniaco por cada 100 mL. Luego se lavaron por 2 min en una disolución de alcohol etílico al 50% v/v. Finalmente, las láminas se contratiñeron con eosina al 0.2% m/v en solución acuosa (1,9,18,53).

Una vez teñidas las muestras, tanto las que fueron teñidas con AT como las marcadas con la técnica de Von Kóssa, se deshidrataron en un cambio de alcohol etílico al 95% v/v y en dos cambios de alcohol anhídrido, cada cambio de 2 min cada uno. Luego se aclararon en dos cambios de xileno, y se montaron de forma permanente en medio soluble en xileno marca Leica® (Wetzlar, Alemania), y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas (50,52,53).

Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio invertido Olympus IX51 (Tokio, Japón), y las micrografías se tomaron en este microscopio con una cámara Olympus DP71 (Tokio, Japón).

4.7. Análisis histológico.

A. Características histológicas y citológicas de los tallos de pitahaya.

En primera instancia se describió la morfología microscópica de las estructuras generales, las capas de tejido y las características del núcleo y del citoplasma de los diferentes tipos de células de cada una de las muestras por medio de la observación directa en el microscopio de luz Olympus IX51 de cada una de las

muestras teñidas con AT a aumentos de 40X, 100X, 200X y 400X. Se comparó con los reportes previos en otras especies de cactus (118–124).

B. Marcaje de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

El marcaje de los cristales de CaOx se realizó por medio de la técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1).

Para cada corrida de tinción de Von Kóssa que se realizó, se corrió un control positivo de CaOx (99.9% puro, Sigma-Aldrich, CAS: 563-72-4, Darmstadt, Alemania), y uno negativo a CaOx que consistió en una muestra de CaOx (99.9% puro, Sigma-Aldrich, CAS: 563-72-4, Darmstadt, Alemania) a la cual se le aplicó un tratamiento con HCl al 5% v/v por 30 min antes de la aplicación de la tinción de Von Kóssa, para comprobar la especificidad del marcaje del método de Von Kóssa modificado (1).

C. Análisis de las morfologías de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

Para realizar este análisis se utilizó SEM. Para ello se emplearon cinco muestras representativas de cada uno de los tratamientos, las cuales corresponden a las muestras parafinadas empleadas para el análisis en microscopía de luz. Estas se cortaron a 50 μm de grosor, se montaron sobre un portaobjetos, se incubaron en una estufa a 60 ° C, y se desparafinaron e hidrataron como se indicó en la sección anterior, con la diferencia que los tiempos en cada uno de los pasos fue de 20 min cada uno, y las soluciones fueron calentadas entre 50 a 60°C en microondas, para asegurar la correcta desparafinización de los cortes.

Posteriormente, las muestras se colocaron en ácido acético glacial al 5 % m/v por 30 min para disolver otras sales de calcio distintas al CaOx. Se lavaron por 10 min en agua destilada, y se incubaron en una estufa a 60 °C por al menos 1 h.

Luego las muestras se montaron en bases de aluminio, pegándolas con una cinta de carbono de doble cara, se cubrieron con una capa de oro-paladio, y se analizaron en el microscopio Hitachi S-3700 (Tokio, Japón) en el Centro de Investigación de Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica.

Cada cristal de CaOx se categorizó como: 1. Cristal prismático (a los cristales en bloque, romboédricos o con forma de prisma), 2. Cristales puntiformes (a los cristales angulares pequeños que poseen una apariencia como de arena), 3. Cristales en aciculares o rafidios, 4. Cristales en drusa (a la conglomeración de cristales multifacéticos) de acuerdo a la morfología de los cristales individuales que la componen (5,6). También se buscó determinar si estas morfologías se encontraban en todas las zonas del tejido del tallo en los tratamientos al sol y a la sombra o sólo en algunas.

D. Composición elemental y estado de hidratación de los cristales de CaOx en cladodios de pitahaya.

Para los análisis de composición elemental y estado de hidratación se emplearon las mismas muestras que para SEM, con la única diferencia que en este caso no se recubrieron con oro-paladio.

Cada una de las morfologías analizadas con SEM se analizó en el microscopio Hitachi S-3700 con un detector de rayos X de IXRF Systems modelo 550i (Tokio, Japón), para determinar su composición elemental y comprobar que fueran realmente cristales de CaOx.

Posteriormente, las mismas muestras analizadas con rayos X se analizaron por espectroscopia RAMAN en el WITec alpha300 R (Ulm, Alemania), en el Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA) de la Universidad de Costa Rica. El equipo se empleó a una potencia variable de entre 5 y 15 mW, con un láser de 532 nm. Cada una de las morfologías observadas en SEM se analizó para verificar que estuvieran compuestos por CaOx y determinar su estado de hidratación (CaOx monohidrato [whewelita] o CaOx dihidrato [Weddellita]).

En las microfotografías de microscopía de luz se documentó la localización relativa celular de los cristales a nivel histológico, ya fuera en la epidermis del cladodio, en el parénquima cortical, o en el parénquima medular, y a nivel citoplasmático en la región periférica o central de la célula.

E. Cuantificación de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

Para determinar la cantidad de cristales de CaOx y su patrón de distribución, se analizaron cinco microfotografías de cada una de las muestras a 200X con el software ImageJ (125). Aquí se analizó la cumbre de la costilla del tallo muestreado, que se refiere a la cresta de la costilla cladodio, que es la zona más alejada del haz vascular central de cada una de las costillas del cladodio, también zona cortical, que se refiere a la corteza subepidérmica de las costillas del tallo; y la zona medular, que se refiere a la zona central de las costillas del tallo.

Cada una de las microfotografías de las muestras teñidas con la técnica de Von Kóssa (25) modificadas por Yasue (1) se analizaron con el programa ImageJ de forma automatizada. En primera instancia se estableció la escala de la microfotografía. Se ingresó a las pestañas de *Edit – options – colors* y se verificó que el fondo establecido fuera negro y el frente blanco. Se ingresó a las pestañas de *Plugins – macros – record*. Se ingresó a las pestañas de *Image – adjust – color threshold*, donde *color threshold* se colocó como B&W. Se ajustaron los valores de la ventana desplegada tratando de que todos los cristales de CaOx quedaran de color blanco y todo el tejido de color negro, y una vez que esto se logró se le dio clic sobre el botón *macros*. Se ingresó a las pestañas *Analyze, analyze particles*, se seleccionó mostrar las opciones: *Masks, Display results, Summarize, Include holes*, e *in situ Show*. Se copió el *macro* generado. Se ingresó a las pestañas *Process – Batch – Macro* y en la ventana que se despliega se pegaron todos los comandos que se generaron en *macros* y se eliminaron las líneas de comandos “run("Color Threshold...");” y “run("Close");” (los comandos del *macros* usados para este análisis se encuentran en el Anexo 1). Posteriormente, en *Macro*, se seleccionó la carpeta en donde se encontraban todas las imágenes del análisis y la carpeta en donde el programa guardará los datos resultantes y se le dio clic en el botón *Process* para analizar de forma automática todas las imágenes.

Después de que el programa analizó todas las imágenes según los parámetros establecidos, se generó de forma automática un archivo de Excel con todos los resultados obtenidos.

El parámetro de cuantificación empleado se tomó de la siguiente ecuación:

Ecuación 3. Porcentaje de cristales del área de cristales de CaOx por microfotografía a 200X (% CaOx), siendo % CaOx = Porcentaje de cristales del área de cristales de CaOx por microfotografía a 200X. $\sum CM$ = sumatoria de las áreas de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X. A_T = área total de la microfotografía a 200X.

$$\% CaOx = \frac{\sum CM}{A_T} \times 100$$

F. Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx.

Para este análisis se utilizó ImageJ con el fin de determinar el patrón de distribución espacial de los cristales por microfotografía. Para ello se analizaron cuatro imágenes representativas aleatorias de la cumbre de la costilla del tallo muestreado, de la zona cortical, y de la zona medular del tratamiento al sol y del tratamiento a la sombra.

Para cada una de las microfotografías se eligió un punto aleatorio y se midió la distancia al cristal de CaOx que se encontraba más cercano de este punto aleatorio. A partir de este primer cristal, se midió la distancia al cristal más cercano a este, empleando un semicírculo, y así consecutivamente hasta medir las distancias de 30 cristales por microfotografía. Con estas mediciones se construyó un cuadro con los datos por microfotografía de x , que es la distancia en μm al individuo observado, y z que es la distancia al vecino más cercano de la forma en que se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Ejemplo del cuadro con las distancias x y z para el análisis del vecino más cercano.

Punto de muestreo	Distancia (x) al individuo observado (μm)	Distancia (z) al vecino más cercano (μm)
1	12.6	8.7
2	8.7	4.5
3	4.5	6.7
4	6.7	9.5

Una vez determinadas las distancias x y z se realizó la prueba de Hines (h_T) para aleatoriedad (126), como se muestra en la Ecuación 4.

Ecuación 4. Prueba de Hines. Donde h_T es la prueba de Hines para aleatoriedad, siendo T el muestreo, n es el tamaño de muestra, x_i es la distancia del punto al individuo, y z_i es la distancia al vecino más cercano (126).

$$h_T = \frac{2n[2 \sum(x_i^2) + \sum(z_i^2)]}{[\sqrt{2} \sum(x_i) + \sum(z_i)]^2}$$

Una vez que se obtuvo el valor de h_T para cada microfotografía, este se comparó con el valor h_T de referencia a un n de 30 en la tabla de Hines y Hines (126). Si el valor obtenido fue mayor al valor de referencia se consideró que la distribución espacial de los cristales era agregada, si era menor se consideró que la distribución era uniforme u homogénea, y si $h_T = a 1.27$ se consideró que la distribución espacial era aleatoria (126) (ver la definición de distribución agregada, aleatoria y homogénea en el Glosario).

Además, a las mismas cuatro imágenes representativas aleatorias de la cumbre de la costilla del tallo muestreado, de la zona cortical, y de la zona medular del

tratamiento al sol y del tratamiento a la sombra se les midió el número total de cristales por microfotografía a X200, y el promedio de cristal general de acuerdo con las siguientes cinco categorías: $[10,100[\mu\text{m}^2$ para los cristales individuales aciculares, y prismáticos pequeños; $[100,1500[\mu\text{m}^2$ para los cristales prismáticos grandes, y drusas pequeñas; $[1500,10000[\mu\text{m}^2$ y $[10000,\infty] \mu\text{m}^2$ para las drusas.

4.8. Cuantificación de cristales de CaOx por digestión enzimática.

La cuantificación de cristales por medio de maceración se realizó de acuerdo con el protocolo de extracción y cuantificación de cristales de Viñas y Jiménez (69). Para ello se tomó una muestra de 3 g de cada uno de los tallos de los que se tomaron los cortes transversales para histología. Posteriormente se incubaron por 5 horas a 120 rpm en 20 mL de Pectinasa 62L-P062L al 10% v/v (Biocatalysis, Cardiff, UK. Fuente: *Aspergillus* sp.) a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se filtraron a través de una malla con un tamaño de poro de 45 μm de diámetro, y se centrifugaron por 9 min a 43 x g. El sobrenadante se descartó, y el pellet de cristales y detritos celulares se resuspendió en 3 mL de sacarosa al 60% m/v, y tres cambios de 3 mL de agua destilada. Luego se centrifugaron por 9 min a 43 x g después de cada cambio. Finalmente, el pellet se resuspendió en 0.5 mL de agua destilada (69).

La cuantificación se realizó colocando una gota de la resuspensión en un hemocitómetro Neubauer (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania), y los cristales se contaron de forma manual directa con un microscopio de luz Olympus IX51 (Tokio, Japón) a 100X. La cantidad de cristales se calculó de la siguiente forma, según reportaron Viñas y Jiménez (69) para el cálculo del número de cristales por mL (Ecuación 5) y el número de cristales por gramo (Ecuación 6):

Ecuación 5. Cristales de CaOx por mL (Cr/mL).

$$\text{Cr/mL} = \frac{\text{Número de cristales de CaOx total} \times 160000}{\text{Número de cuadrados de } 0.0625\text{mm}^2}$$

Ecuación 6. Cristales de CaOx por gramo (Cr/g). Siendo V_f = volumen final. gtf = gramos de tejido fresco.

$$Cr/g = Cr/mL \times V_f \text{ (mL)} / gtf$$

Para cada uno de los pasos del protocolo descrito se analizaron las sustancias que se descartaron en cada uno de ellos para verificar que no se perdieran cristales de CaOx por error.

4.9. Cuantificación de clorofila y carotenoides en las zonas del tejido caulinar de pitahaya.

La extracción de clorofila y carotenoides se realizó según el protocolo de Deaquiz (127) con la única modificación de que las longitudes de onda medidas fueron a: 662 nm, 645 nm, y a 470 nm, debido a que estas son las longitudes de onda reportadas para la detección de clorofilas y carotenoides totales extraídos con acetona (128). Para calcular la concentración de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b) y carotenoides totales (C) se emplearon las siguientes ecuaciones (128):

Ecuación 7. Cuantificación de clorofila a.

$$C_a \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 11.24 A_{662} - 2.04 A_{645}$$

Ecuación 8. Cuantificación de clorofila b.

$$C_b \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 20.13 A_{645} - 4.19 A_{662}$$

Ecuación 9. Cuantificación de carotenoides totales.

$$C \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{(1000 A_{470} - 1.90 C_a - 63.14 C_b)}{214}$$

4.10. Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.

Durante la aplicación del muestreo sistemático para la recolección de las muestras, se realizó la cuantificación manual directa del número total de botones florales y de frutos de cada una de las plantas que formaron parte de este experimento.

5. Definición de los procedimientos y las técnicas de análisis.

La presente investigación tuvo como fin describir la cantidad y distribución de cristales de CaOx en el tallo de *H. costaricensis* como marcador de estrés abiótico de acuerdo con el grado de exposición solar.

La descripción de las características microanatómicas de las muestras analizadas se realizó de forma descriptiva.

Para analizar la cantidad de cristales de CaOx de acuerdo con las zonas de tejido del tratamiento al sol y a la sombra se empleó en primera instancia un análisis de componentes principales (PCA) para ver el comportamiento general y las correlaciones entre las variables analizadas.

Para analizar si los factores abióticos analizados diferían entre los tratamientos, se empleó el análisis de Wilcoxon con el programa estadístico R. Si estos factores no diferían entre los tratamientos, se excluyeron de los análisis posteriores.

Para analizar la cantidad de cristales de CaOx de acuerdo con las zonas de tejido del tratamiento al sol y a la sombra se empleó el análisis estadístico de Tukey para determinar si existieron diferencias entre las categorías con el programa estadístico R. Este análisis también se empleó para comparar el número total de botones florales y frutos con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra.

Además, la cantidad total de cristales de CaOx al sol y a la sombra obtenidos por medio del análisis de microfotografías se comparó con la cantidad obtenida por medio del método de digestión enzimática con pectinasa (69), por medio del análisis de T-student con el programa estadístico R.

Las mediciones de las microfotografías se realizaron con el programa ImageJ para determinar el patrón de distribución, por medio del análisis del vecino más cercano y el análisis de aleatoriedad de Hines (126) comparándolo con el valor de referencia de Hines para un $n = 30$.

Finalmente, la cuantificación de clorofila y carotenoides obtenidos y el número de cristales de CaOx por microfotografía, el tamaño promedio de cristales en las cinco categorías, y la cantidad de los cristales a nivel de la cumbre de la costilla del tallo, del tallo cortical, del tallo medular de acuerdo con el tratamiento, se analizaron con la prueba estadística de Krustal-Wallis en el programa estadístico R.

6. Consideraciones éticas

Para llevar a cabo la recolección de muestras vegetales y el desarrollo experimental de la investigación, se le solicitaron los permisos por escrito a la propietaria de la Finca El Salto de Liberia y al Director del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas de la Universidad de Costa Rica para llevar a cabo los experimentos en las instalaciones del Centro.

III. CAPÍTULO IV: RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.

1. Factores abióticos.

Con respecto a los factores abióticos analizados dentro de cada uno de los tratamientos, el porcentaje de humedad relativa no varió con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra ($Z = 579.5$, $p = 0.06$) (Fig. 3).

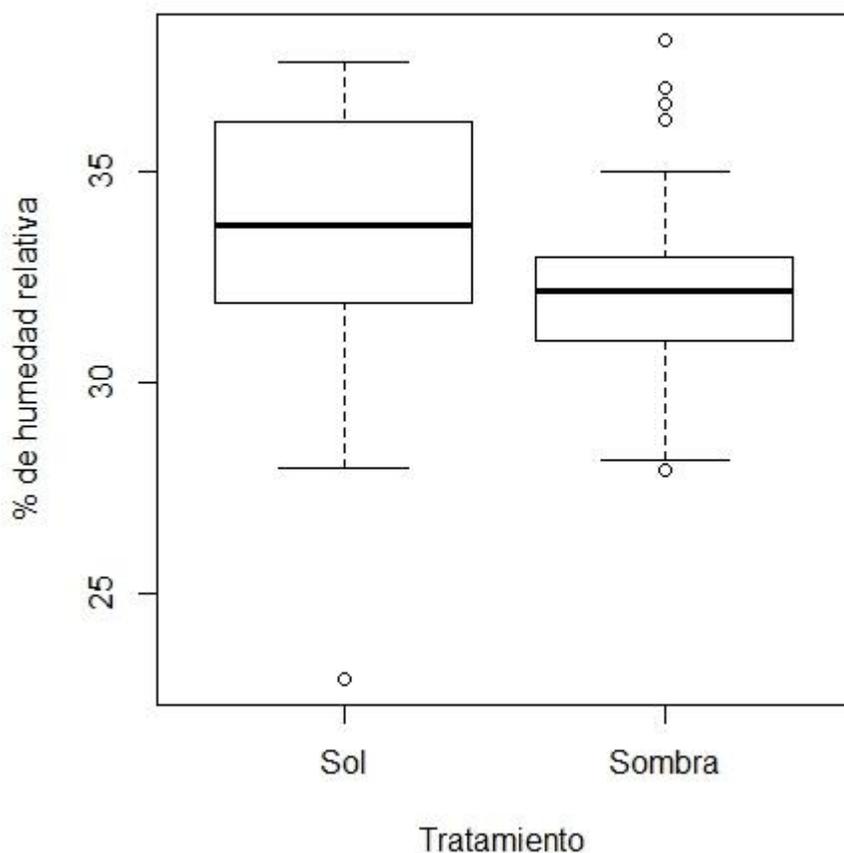


Fig. 3. Comparación del porcentaje de humedad relativa con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.

El promedio de temperatura tampoco varió con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra ($Z = 495$, $p = 0.50$) (Fig. 4). La radiación fotosintéticamente activa sí varió con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra. Como era de esperar, el

promedio fue mayor en las plantas que se encontraban bajo el tratamiento al sol comparado con las que se encontraban bajo las casas de sarán ($Z = 870$, $p < 0.01$) (Fig. 5). De igual forma, la radiación solar total fue mayor en las plantas que se encontraban bajo el tratamiento al sol que en las que se encontraban bajo el tratamiento a la sombra ($Z = 900$, $p < 0.01$) (Fig. 6).

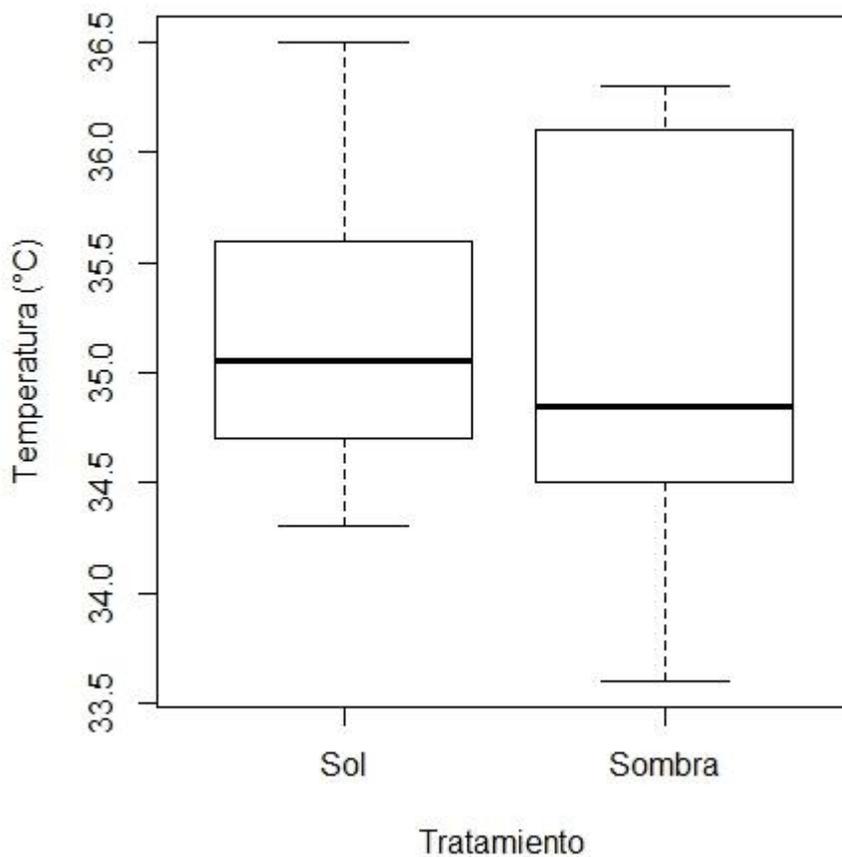


Fig. 4. Comparación de la temperatura (°C) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.

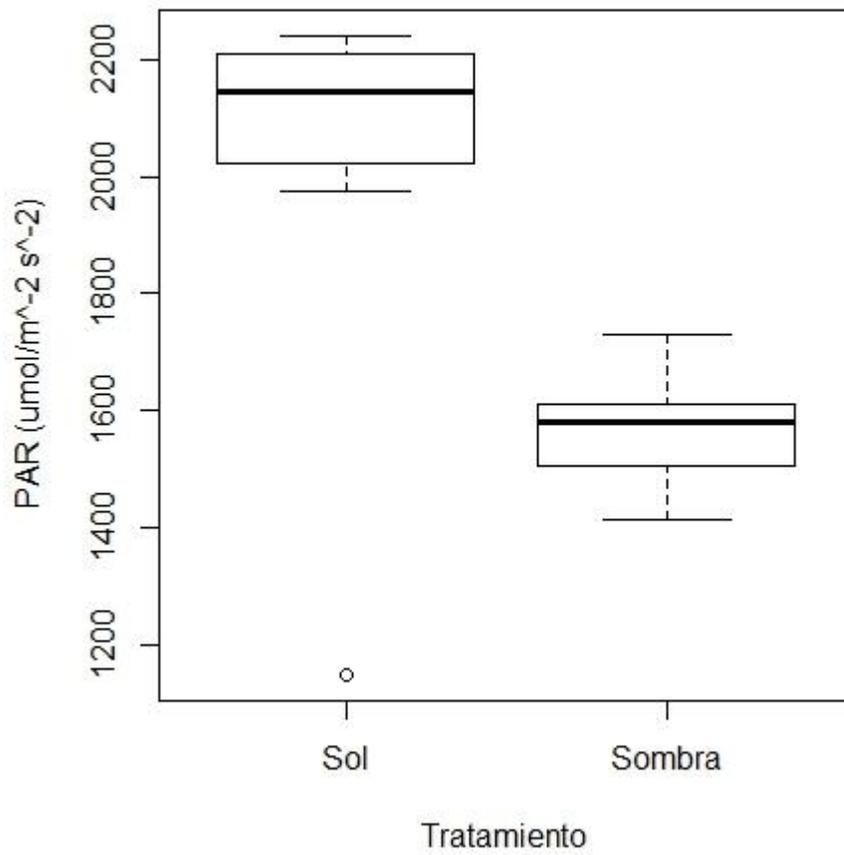


Fig. 5. Comparación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^2$) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.

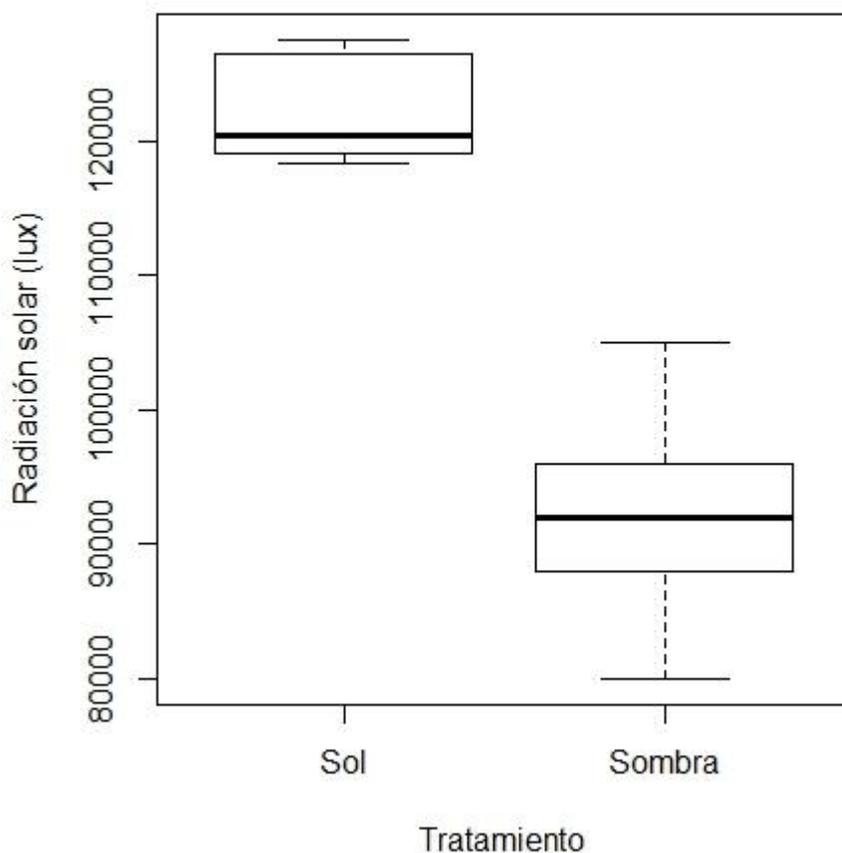


Fig. 6. Comparación de la radiación solar (lux) con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya.

2. Parámetros de color superficial medidos en los cladodios de pitahaya.

En cuanto a las variables de color medidas, se encontró que en el parámetro L^* las plantas al sol tuvieron valores mayores que las plantas a la sombra en todos los puntos cardinales: norte ($Z = 718$, $p < 0.01$) (Fig. 7 A), sur ($Z = 840$, $p < 0.01$) (Fig. 7 B), este ($Z = 794$, $p < 0.01$) (Fig. 7 C), y oeste ($Z = 725$, $p < 0.01$) (Fig. 7 D). En el caso del parámetro a^* , también las plantas al sol tuvieron valores mayores que las plantas a la sombra en todos los puntos cardinales: norte ($Z = 694$, $p < 0.01$) (Fig. 8 A), sur ($Z = 822$, $p < 0.01$) (Fig. 8 B), este ($Z = 790$, $p < 0.01$) (Fig. 8 C), y oeste (Z

= 786, $p < 0.01$) (Fig. 8 D). Con respecto al parámetro b^* , también las plantas al sol tuvieron valores mayores que las plantas a la sombra en todos los puntos cardinales: norte ($Z = 718$, $p < 0.01$) (Fig. 9 A), sur ($Z = 800$, $p < 0.01$) (Fig. 9 B), este ($Z = 837$, $p < 0.01$) (Fig. 9 C), y oeste ($Z = 716$, $p < 0.01$) (Fig. 9 D).

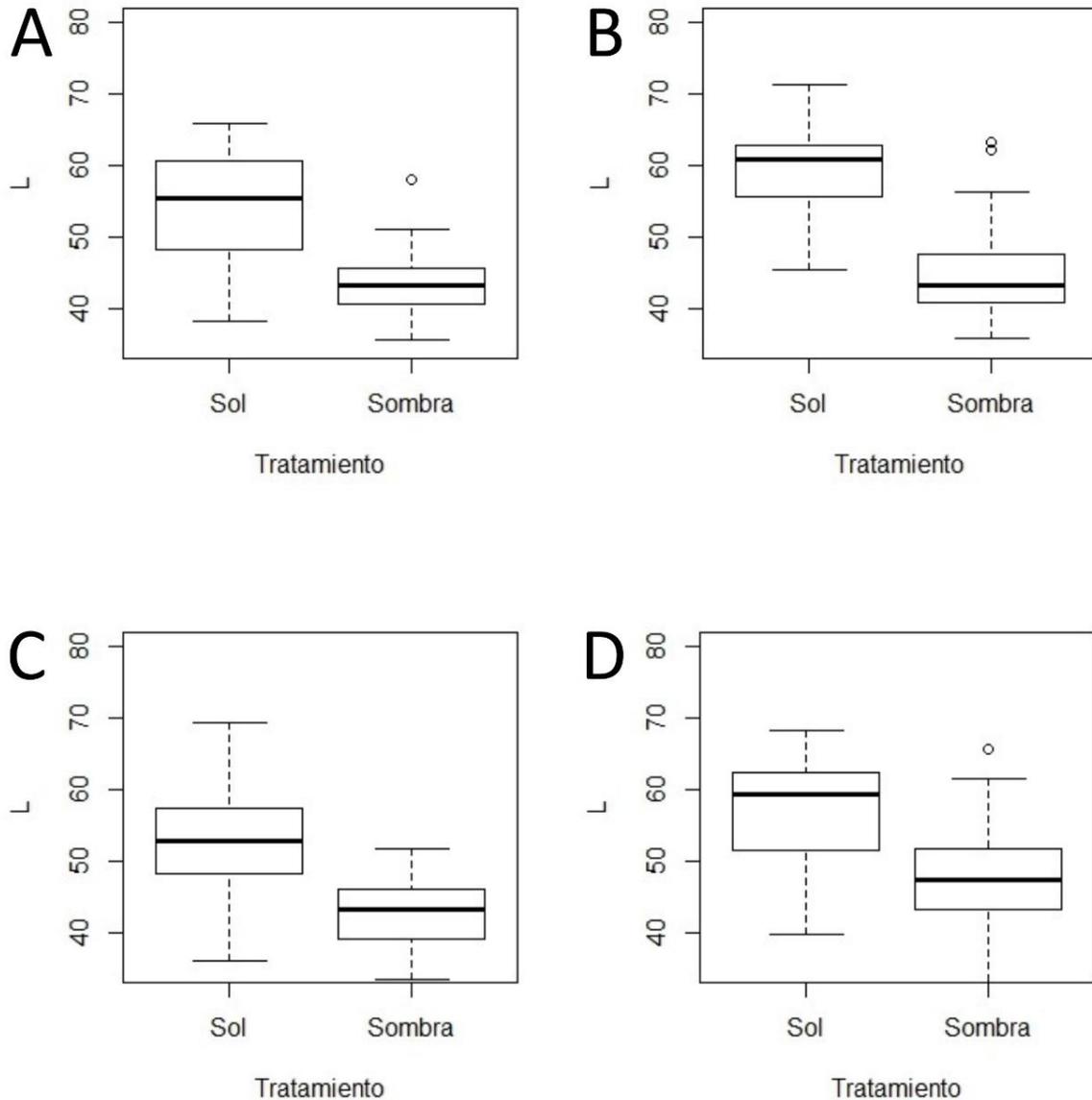


Fig. 7. Comparación de la coordenada de color L^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya de acuerdo con el punto cardinal de donde se recolectó el cladodio correspondiente. **A.** Cladodio recolectado del norte. **B.** Cladodio recolectado del sur. **C.** Cladodio recolectado del este. **D.** Cladodio recolectado del oeste.

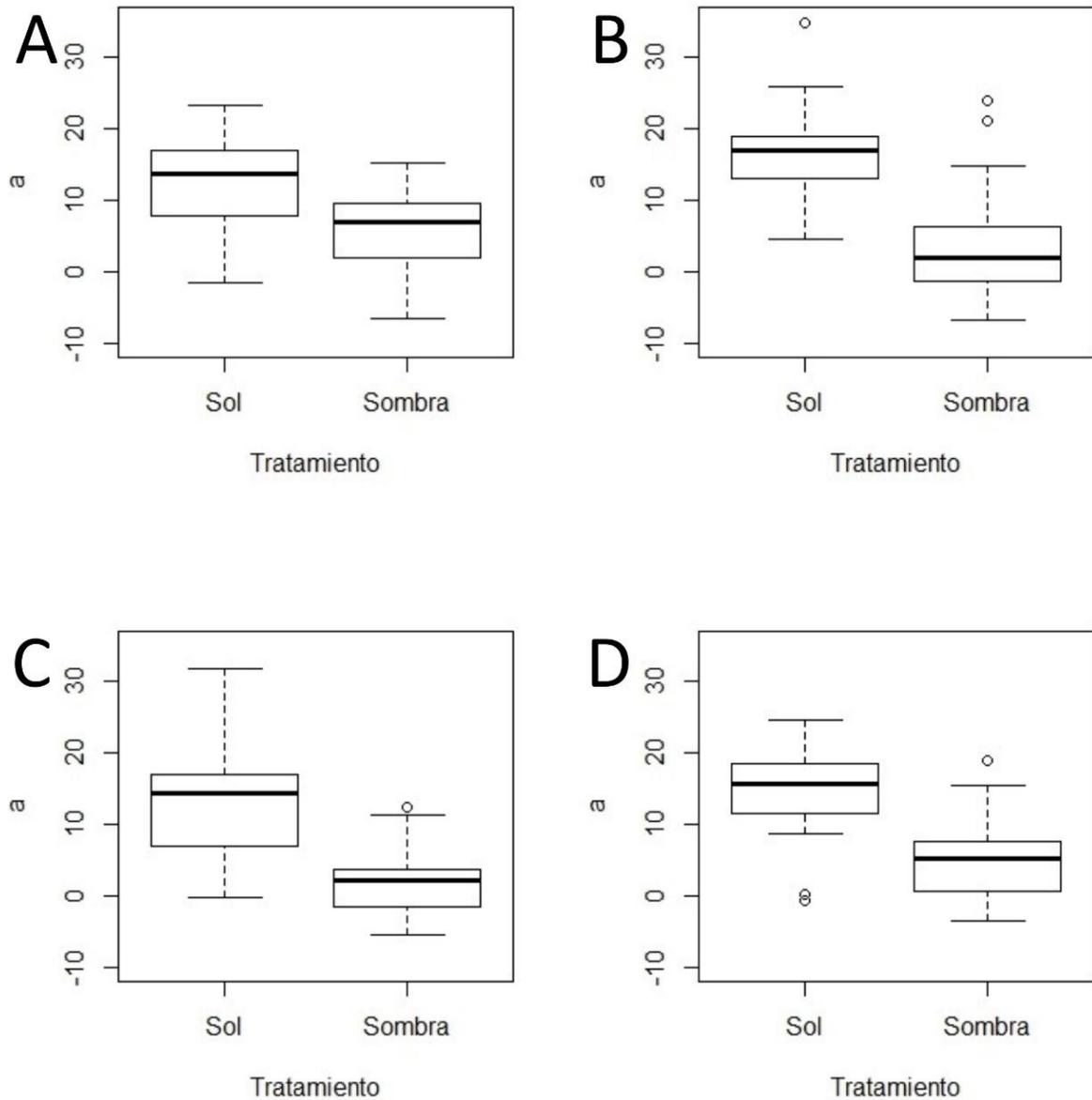


Fig. 8. Comparación de la coordenada de color a^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya de acuerdo con el punto cardinal de donde se recolectó el cladodio correspondiente. **A.** Cladodio recolectado del norte. **B.** Cladodio recolectado del sur. **C.** Cladodio recolectado del este. **D.** Cladodio recolectado del oeste.

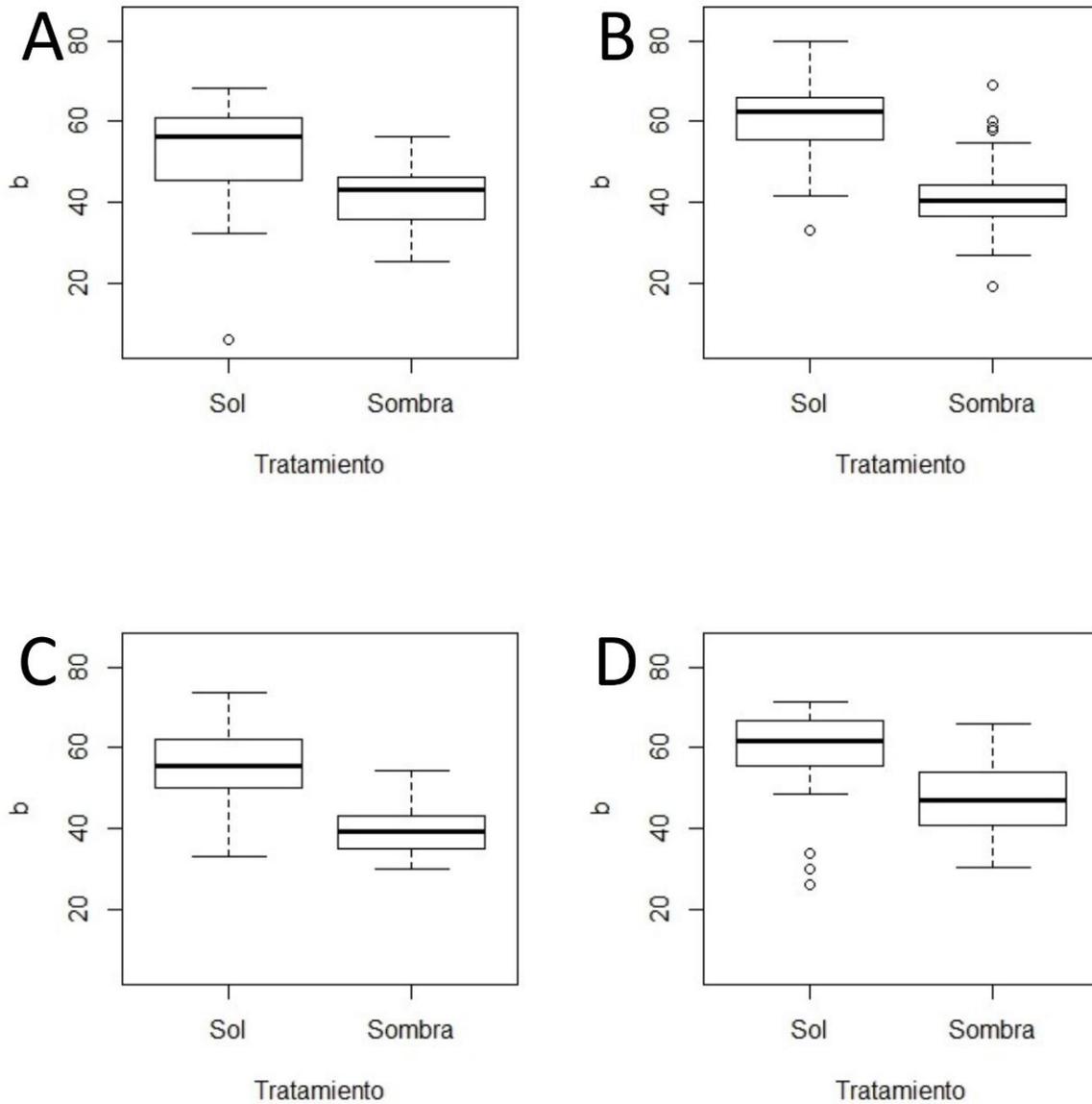


Fig. 9. Comparación de la coordenada de color b^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya de acuerdo con el punto cardinal de donde se recolectó el cladodio correspondiente. **A.** Cladodio recolectado del norte. **B.** Cladodio recolectado del sur. **C.** Cladodio recolectado del este. **D.** Cladodio recolectado del oeste.

Sin embargo, el parámetro Y_I algunas veces varió con respecto al punto cardinal y otras veces no. En el caso de los cladodios recolectados orientados hacia el norte no se encontró diferencia con respecto al tratamiento al sol y a la sombra ($Z = 492$, $p = 0.54$) (Fig. 10 A), ni tampoco en los cladodios recolectados orientados hacia el

oeste ($Z = 488$, $p = 0.58$) (Fig. 10 D). Pero sí se encontró diferencia entre el tratamiento al sol y a la sombra de los cladodios recolectados hacia el sur ($Z = 597$, $p = 0.03$) (Fig. 10 B), y hacia el este ($Z = 720$, $p < 0.01$) (Fig. 10 C).

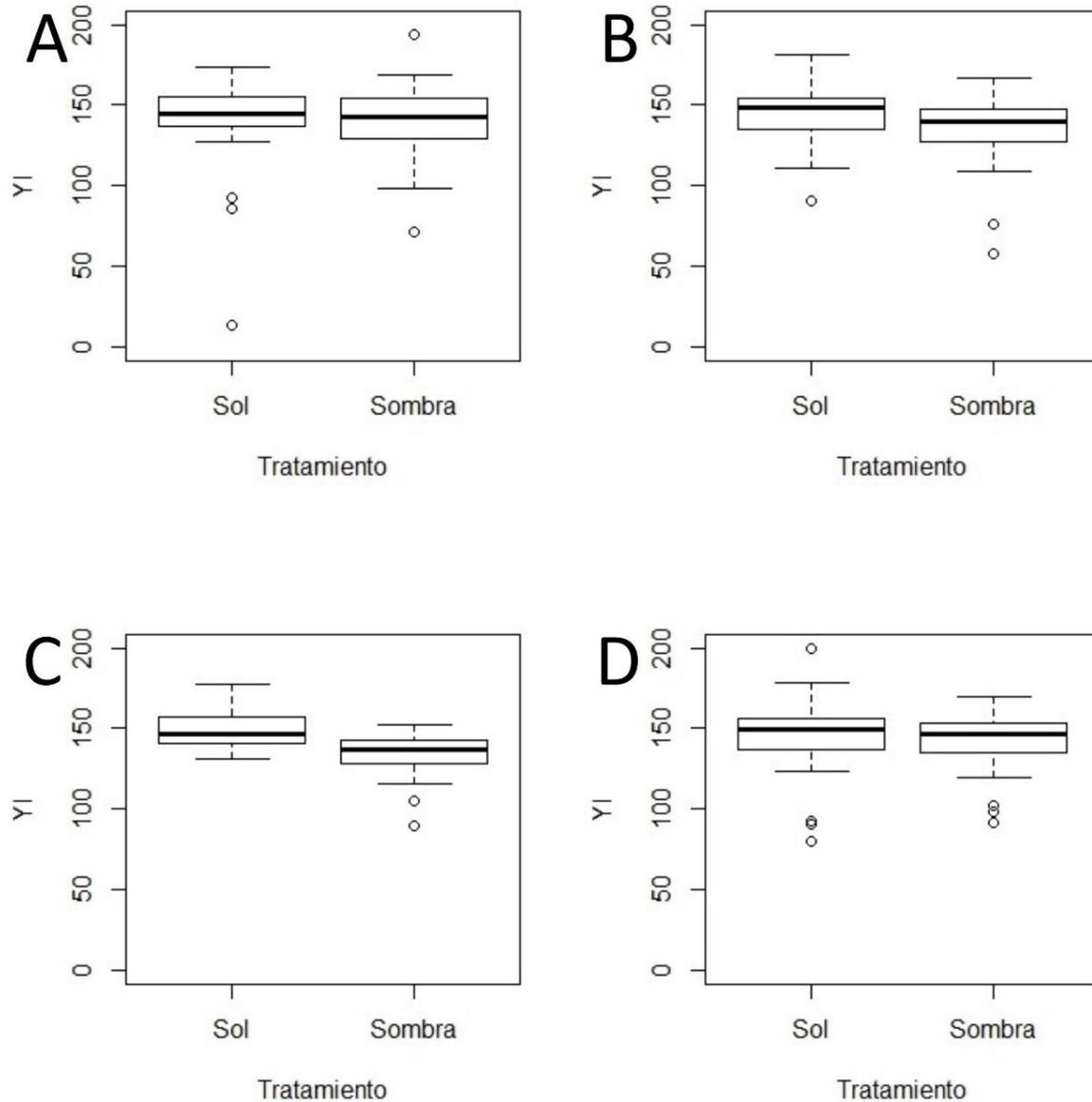


Fig. 10. Comparación del parámetro de color YI con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya de acuerdo con el punto cardinal de donde se recolectó el cladodio correspondiente. **A.** Cladodio recolectado del norte. **B.** Cladodio recolectado del sur. **C.** Cladodio recolectado del este. **D.** Cladodio recolectado del oeste.

El parámetro h^* algunas veces varió con respecto al punto cardinal y otras veces no. En el caso de los cladodios recolectados orientados hacia el norte no se encontró diferencia con respecto al tratamiento al sol y a la sombra ($Z = 350$, $p = 0.14$) (Fig. 11 A), ni tampoco en los cladodios recolectados orientados hacia el sur ($Z = 378$, $p = 0.29$) (Fig. 11 B), ni en los cladodios recolectados orientados hacia el este ($Z = 416$, $p = 0.62$) (Fig. 11 C). Pero sí se encontró diferencia entre el tratamiento al sol y a la sombra de los cladodios recolectados hacia el oeste ($Z = 210$, $p < 0.01$) (Fig. 11 D).

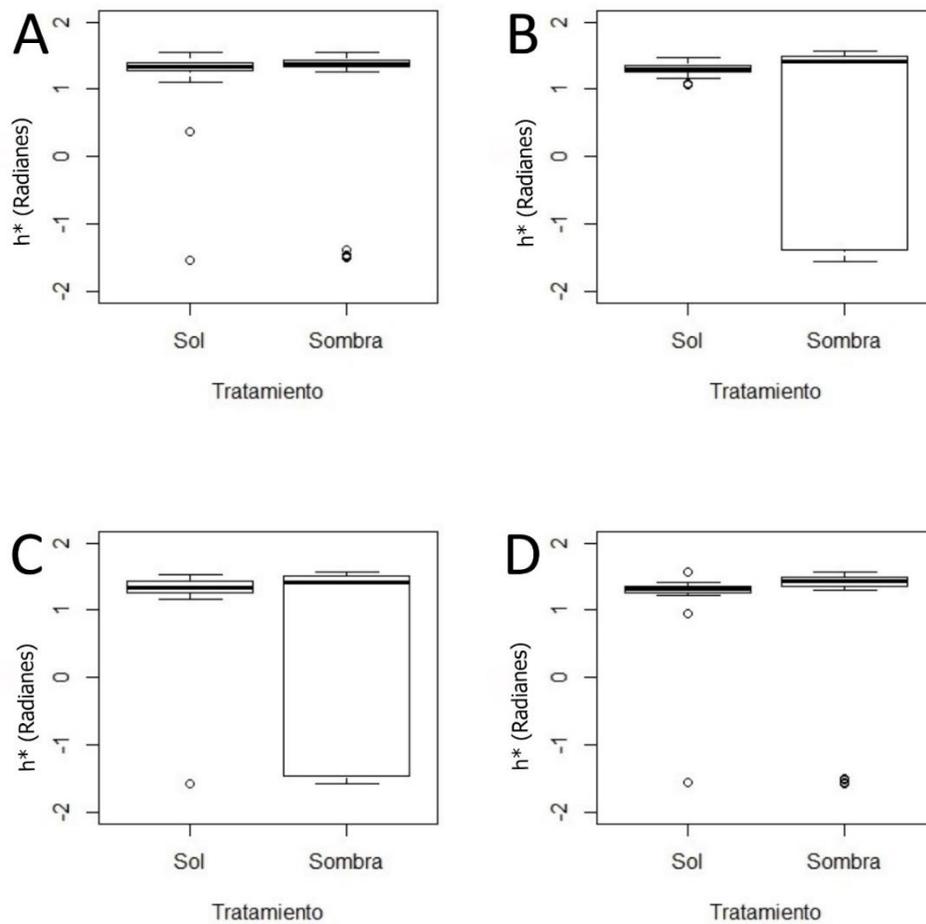


Fig. 11. Comparación del parámetro de color h^* con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra aplicados a la pitahaya de acuerdo con el punto cardinal de donde se recolectó el cladodio correspondiente. **A.** Cladodio recolectado del norte. **B.** Cladodio recolectado del sur. **C.** Cladodio recolectado del este. **D.** Cladodio recolectado del oeste.

3. Análisis de Componentes Principales (PCA).

Para poder observar el comportamiento de los datos y las correlaciones entre las diferentes variables categóricas y cuantitativas se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA). Los factores abióticos que no difirieron entre el tratamiento al sol y a la sombra no se tomaron en cuenta dentro del análisis de PCA. Para este análisis se tomaron en cuenta las primeras dos dimensiones generadas. La primera dimensión está compuesta por las variables: promedio de PAR, promedio de L^* , promedio de a^* , y promedio de b^* , y la segunda dimensión está compuesta únicamente por el % CaOx (ver Ecuación 3) (Fig. 12).

La primera dimensión explica el 56.4 % de la varianza de los datos, y la segunda dimensión explica el 20.1 % de los datos (Fig. 13 y Fig. 14). Como se puede observar en la Fig. 14. el vector que representa el % CaOx (ver Ecuación 3) es el que explica el mayor porcentaje de las variables, y los vectores del promedio de PAR, promedio de L^* , promedio de a^* , y promedio de b^* tuvieron un tamaño menor, por lo que explican un menor porcentaje de la varianza de los datos. Se puede observar que las variables promedio de PAR, promedio de L^* , promedio de a^* , y promedio de b^* al tener sus vectores muy cercanos indica que se encuentran correlacionadas entre ellas.

Al analizar dentro de las dimensiones generadas por el PCA las otras variables discretas del análisis, se observó su distribución en las dimensiones agrupadas en conjuntos. Al analizar los tratamientos al sol y a la sombra dentro de las dimensiones del PCA se observó que, si bien hubo un traslape entre los conjuntos formados por el tratamiento al sol y a la sombra, hubo un número importante de datos que no se traslapan, lo que sugiere que puede que hubiera una diferencia importante de las variables cuantitativas entre los tratamientos (Fig. 15).

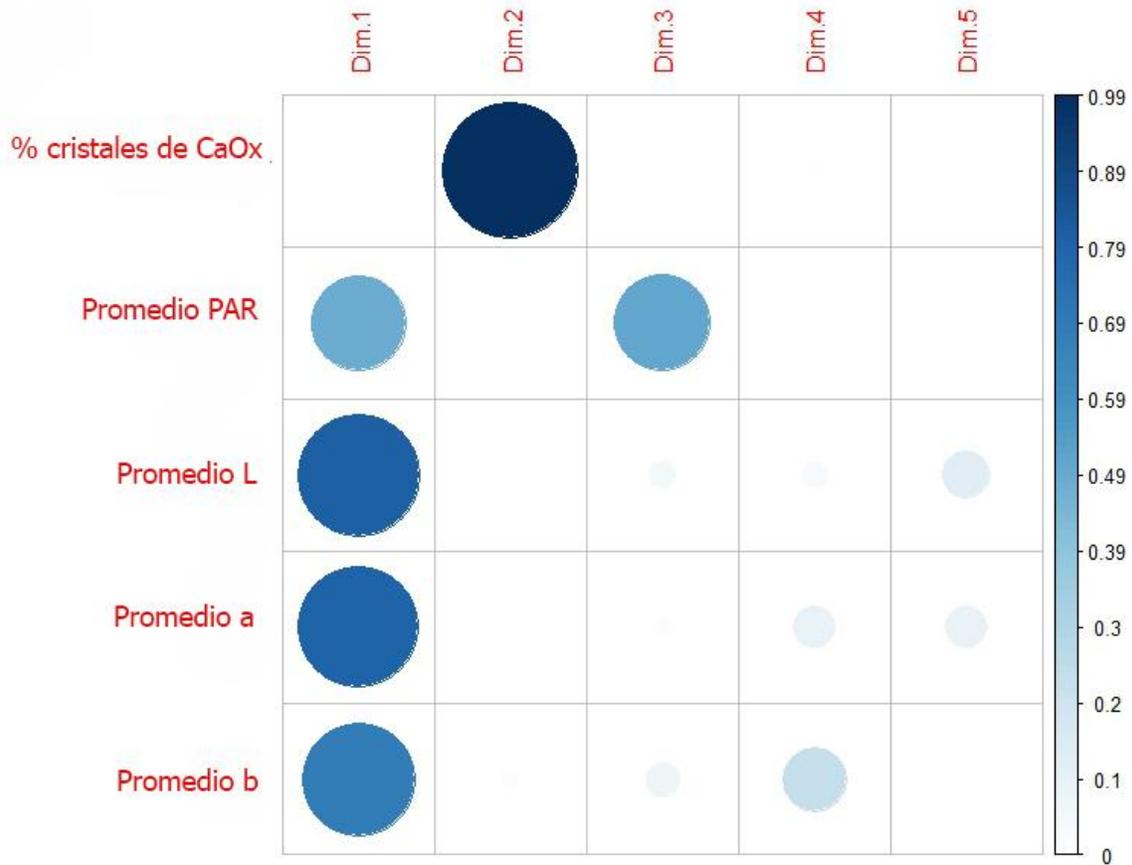


Fig. 12. Plot de correlación entre las variables incluidas en el análisis de PCA (las variables de color rojo de la izquierda de la figura) con las dimensiones generadas (dimensiones de la 1 a la 5 que se encuentran representadas en la parte superior de la figura) para el análisis de cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

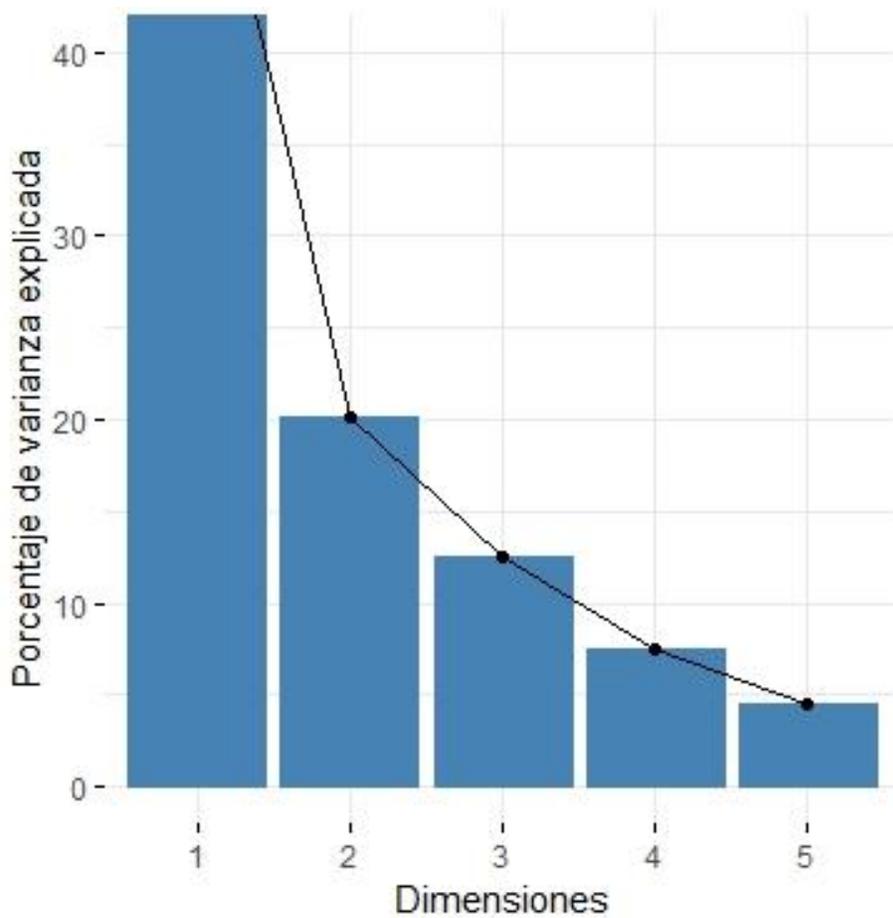


Fig. 13. Porcentaje de varianza explicada por cada una de las dimensiones generadas en el análisis de PCA para el análisis de cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

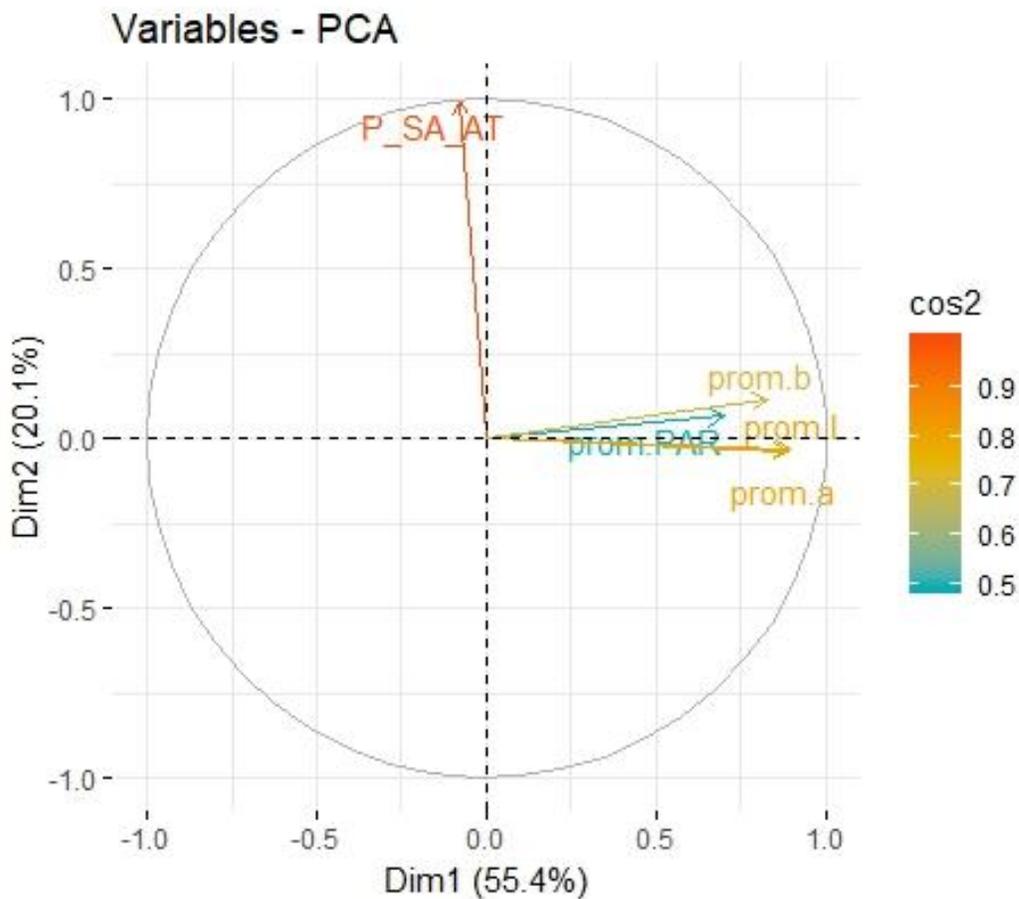


Fig. 14. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA para el análisis de cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya. P_SA_AT = % CaOx (ver Ecuación 3). prom.PAR = promedio de PAR. prom.b = promedio de b^* . prom.a = promedio de a^* .

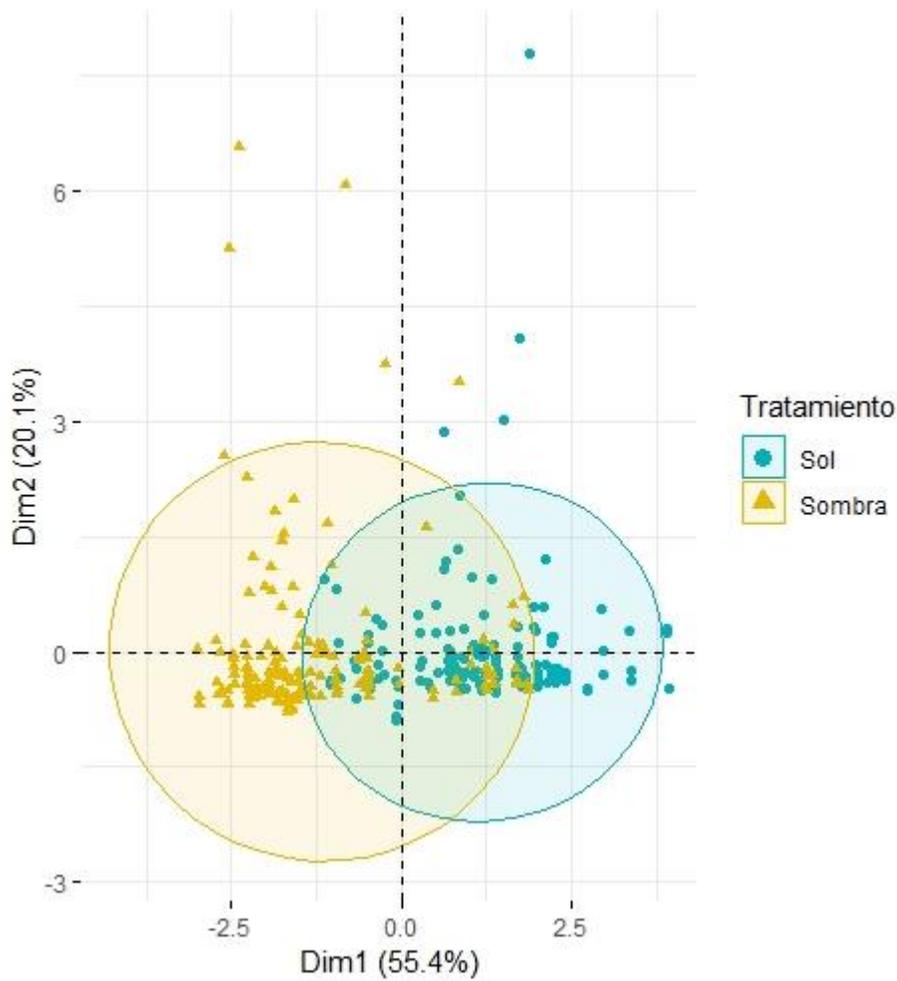


Fig. 15. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra al que fueron sometidas las plantas de pitahaya. $P_{SA_AT} = \% CaOx$ (ver Ecuación 3). $prom.PAR =$ promedio de PAR. $prom.b =$ promedio de b^* . $prom.a =$ promedio de a^* .

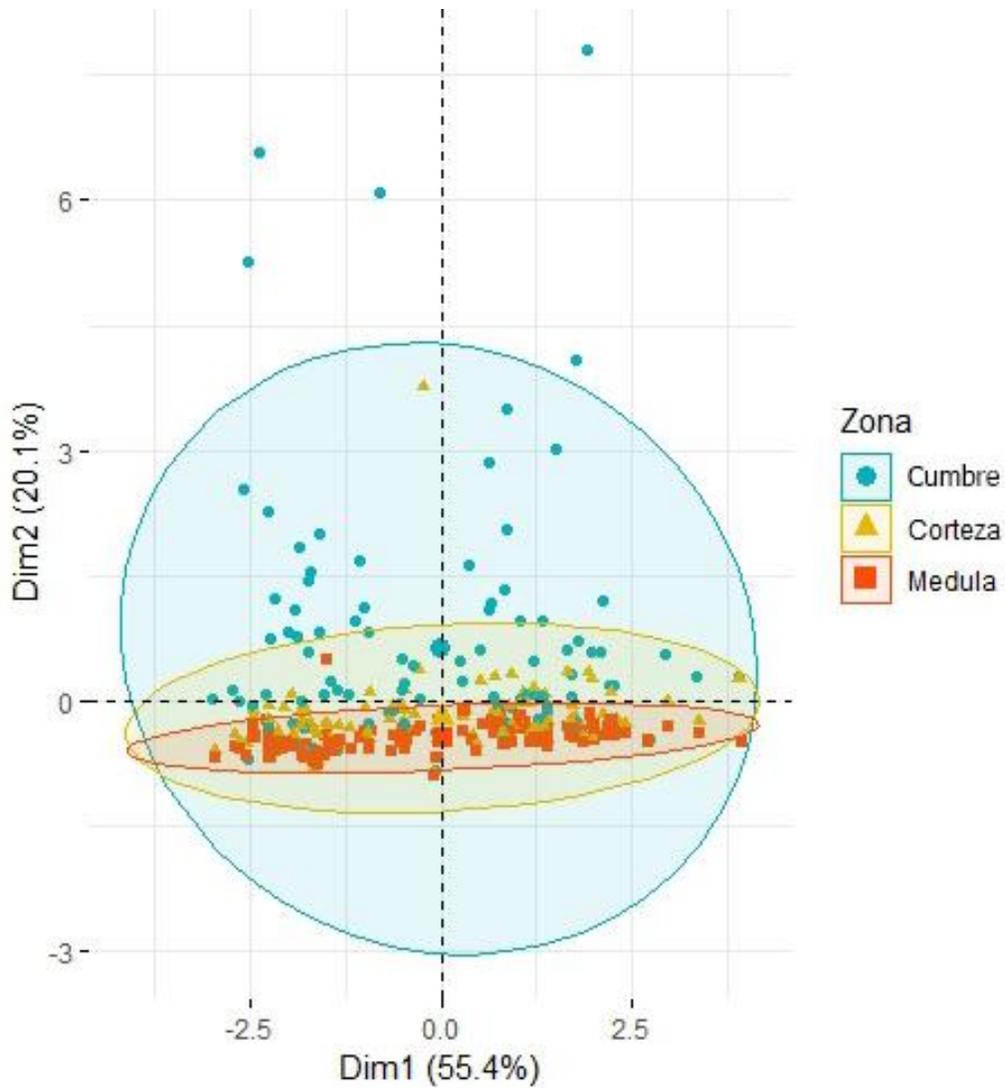


Fig. 16. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto a la zona de tejido en la cual se realizó la cuantificación de cristales de CaOx en tallos de piyahaya. $P_{SA_AT} = \% \text{CaOx}$ (ver Ecuación 3). $\text{prom.PAR} = \text{promedio de PAR}$. $\text{prom.b} = \text{promedio de } b^*$. $\text{prom.a} = \text{promedio de } a^*$.

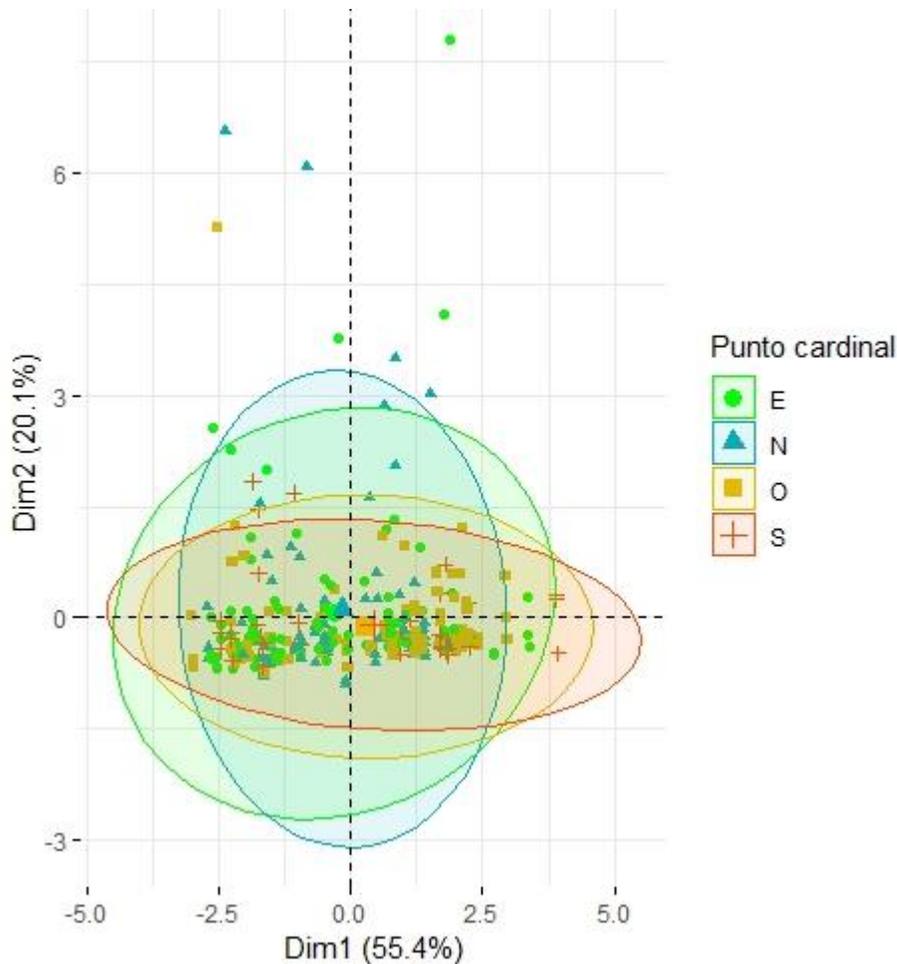


Fig. 17. Resultado de las interacciones de las diferentes variables que componen la primera y segunda dimensión generadas en el análisis de PCA con respecto al punto cardinal del que se tomó la muestra de tejido para cuantificar los cristales de CaOx en los tallos de pitahaya. P_SA_AT % CaOx (ver Ecuación 3). prom.PAR = promedio de PAR. prom.b = promedio de b^* . prom.a = promedio de a^* .

Al analizar la zona de tejido de los tallos de pitahaya en los cuales se estudiaron los cristales de CaOx se encontró que hubo una separación evidente entre los conjuntos formados por la cumbre, la corteza y la médula del tallo, por lo que estas variables pueden diferir de forma significativa entre ellas (Fig. 16). Con respecto al punto cardinal del que se tomó cada muestra de tallo en la Fig. 17, se puede observar que hubo un traslape entre todos los conjuntos formados por los puntos cardinales, lo que sugiere que no hubo una diferencia significativa.

4. Características histológicas y citológicas de los tallos de pitahaya.

La capa más externa de los cladodios de pitahaya es una gruesa capa de cutina (Fig. 18 A), la cual lo recubre para protegerlo contra factores exógenos que puedan dañar el tallo, y para prevenir la pérdida de agua interna. Inferior a la capa de cutina se encuentra una monocapa de células pequeñas con escaso contenido citoplasmático que forma pequeñas crestas (Fig. 18 A); en los valles de cada cresta se encuentran células estomáticas acompañadas de células guardas y una cavidad subestomática subyacente. Subsecuentemente se encuentra una capa de células estratificadas subepidérmicas, en ocasiones llamada hipodermis, con una pared celular muy engrosada cuyo citoplasma no se logra diferenciar de la pared celular (Fig. 18 A). Subyacente a esta capa se encuentra la endodermis, que está formada por una capa aparentemente biestratificada de células ovoides un poco más grandes que las células epidérmicas, con escaso contenido citoplasmático y pocos núcleos evidentes (Fig. 18 A).

La corteza del parénquima del tallo está formada por células ovoides y redondas de un tamaño mayor al de las células de la endodermis, las cuales tuvieron una pared celular aparentemente heterogénea en la mitad de las células y homogénea en la mitad restante. El contenido citoplasmático de estas células es casi inexistente, la mayoría no tuvo núcleos visibles, a causa de que el corte a 8 μm evidencia solamente una pequeña porción de las células en las cuales la presencia o ausencia del núcleo es por azar. Esto se refiere a la probabilidad de obtener en un corte de 8 μm de grosor el núcleo que mide unos pocos micrómetros, que se encuentra inmerso en un citoplasma que puede tener más de 50 μm de diámetro. Bajo estas condiciones, es muy probable que el núcleo se encuentre ausente en la mayor parte de las células observadas en la microfotografía.

En la corteza se encuentran células mucilaginosas que tuvieron un gran tamaño, que aparecen poco en la corteza, y poseen un contenido interno de densidad moderada con apariencia hialina. Finalmente, es importante resaltar que se observan pequeñas aglomeraciones de haces vasculares, cuya xilema se torna de color cian con el azul de toluidina (Fig. 18 B).

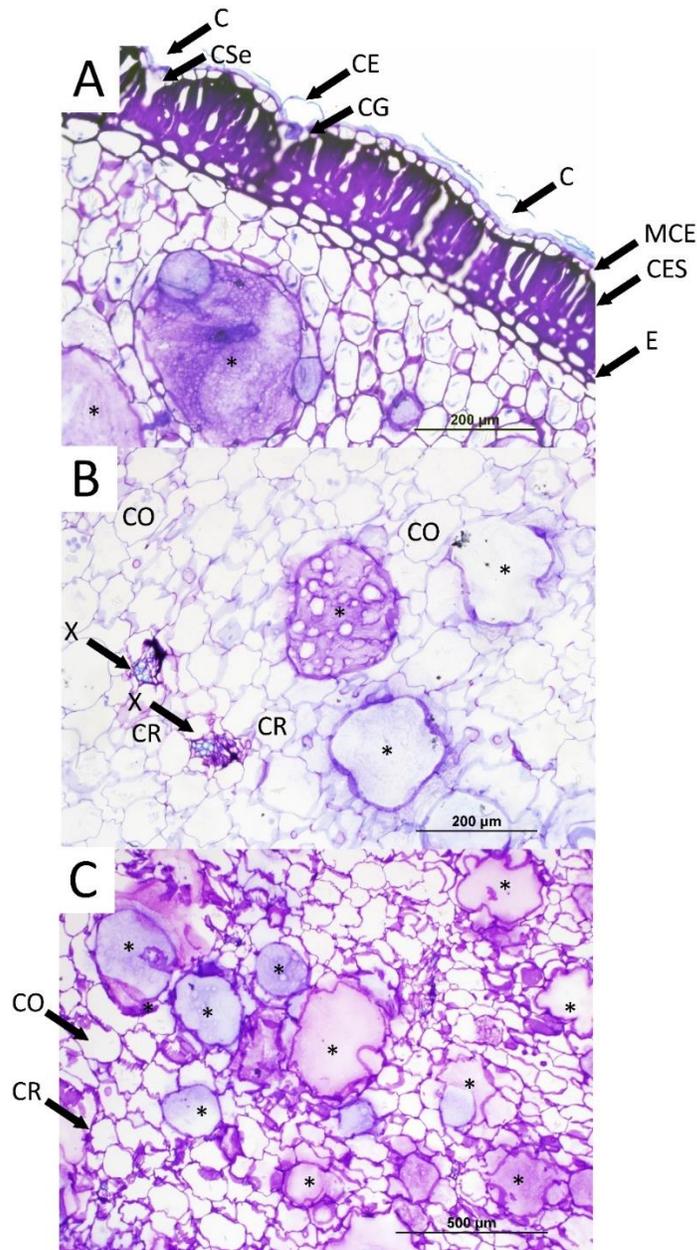


Fig. 18. Microfotografías representativas de las tres partes principales del tallo de la pitahaya teñidas con azul de toluidina. **A.** Microfotografía a X200 de la epidermis del tallo de la pitahaya. **B.** Microfotografía a X200 de la corteza del tallo. **C.** Microfotografía a X100 de la médula del tallo. Los asteriscos señalan células mucilaginosas. C = crestas. CE = células estomáticas. CES = células estratificadas subepidérmicas. CG = células guardas. CO = células ovoides. CR = Células redondas. CSe = cavidad subestomática. E = endodermis. MCE = monocapa de células epidérmicas. X = xilema.

La médula del parénquima del tallo de la pitahaya se encuentra formada por dos tipos de células principales. El primer tipo de fueron de apariencia reminiscente a ovoides y redondas, sin embargo, poseen una pared celular con una morfología muy irregular. La mayor parte de las células tuvieron un escaso contenido citoplasmático, sin núcleo aparente. El otro tipo de células son las mucilaginosas, de gran tamaño, muy abundantes en el parénquima medular, con contenido citoplasmático moderadamente denso, y apariencia hialina de color eosinófilo y azul (Fig. 18 C).

5. Marcaje de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

El marcaje de los cristales se realizó de forma exitosa con las técnicas utilizadas, como se puede observar en la Fig. 18 A. Estos se marcaron de color marrón oscuro a negro con la plata. El leve contraste del fondo realizado con eosina ayudó a diferenciar las estructuras, sin interferir con el análisis de imágenes con ImageJ. Es importante resaltar que los controles CaOx positivo se tiñeron de forma positiva, y los controles CaOX negativos no se tiñeron (Fig. 19).

Para realizar el análisis de imágenes con ImageJ es importante que las microfotografías no tengan la escala, debido a que el programa podría identificarla como un cristal de CaOx. Por ello, la microfotografía de la Fig. 20 A se muestra sin escala. Al realizar la selección de los cristales con la herramienta *color threshold* se obtuvo una imagen monocromática como se observa en la Fig. 20 B, en la cual deben aparecer todos los cristales individuales y grupales que se observan en la imagen original.

Posteriormente, al realizar el análisis de partículas (*particle analysis*) con ImageJ, el programa realizó una identificación automática de los cristales de CaOx individuales y grupales y los numeró de forma automática. Un ejemplo de la numeración generada por el programa se puede observar en la Fig. 20 C.

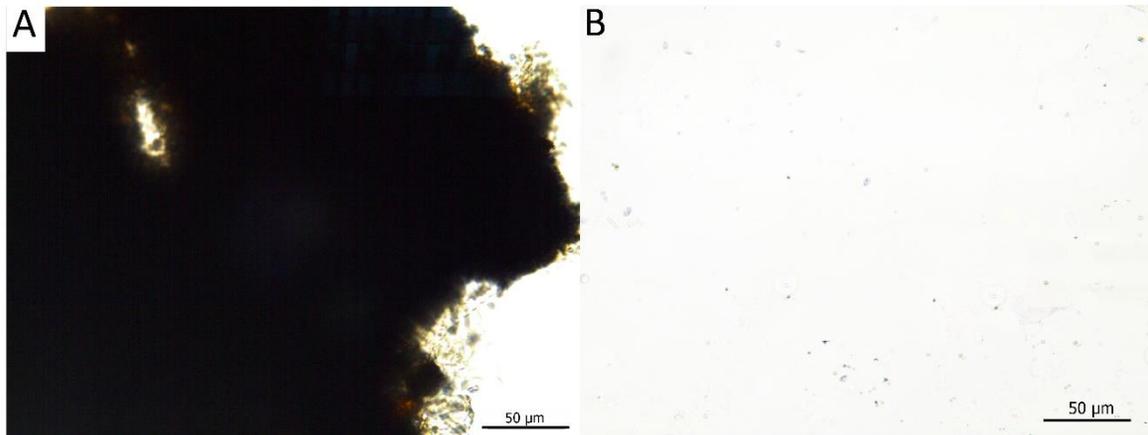


Fig. 19. Controles positivos y negativos de CaOx. Controles positivo y negativo de CaOx. **A.** Control positivo de CaOx. **B.** Control Negativo de CaOx.

6. Análisis de las morfologías de cristales de CaOx encontradas en tallos de pitahaya.

Con los análisis realizados con microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido (SEM) se encontraron cristales de CaOx en tres morfologías principales en todos los tallos de pitahaya sin importar los tratamientos al sol y a la sombra, ni los puntos cardinales en donde los tallos fueron tomados. La primera de ellas fue la morfología acicular, cuyos cristales son también conocidos como rafidios, se caracterizan por la forma prismática que tienen sus extremos puntiagudos (Fig. 21 A y B). La segunda morfología la caracterizó los cristales prismáticos romboides (Fig. 21 C y D). Además, gracias a la técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1), se encontró una morfología que parece concordar con la definición de drusa, que es una aglomeración de cristales. Se podría clasificar dentro de esta categoría, pero posee distintas morfologías (Fig. 21 E-H).

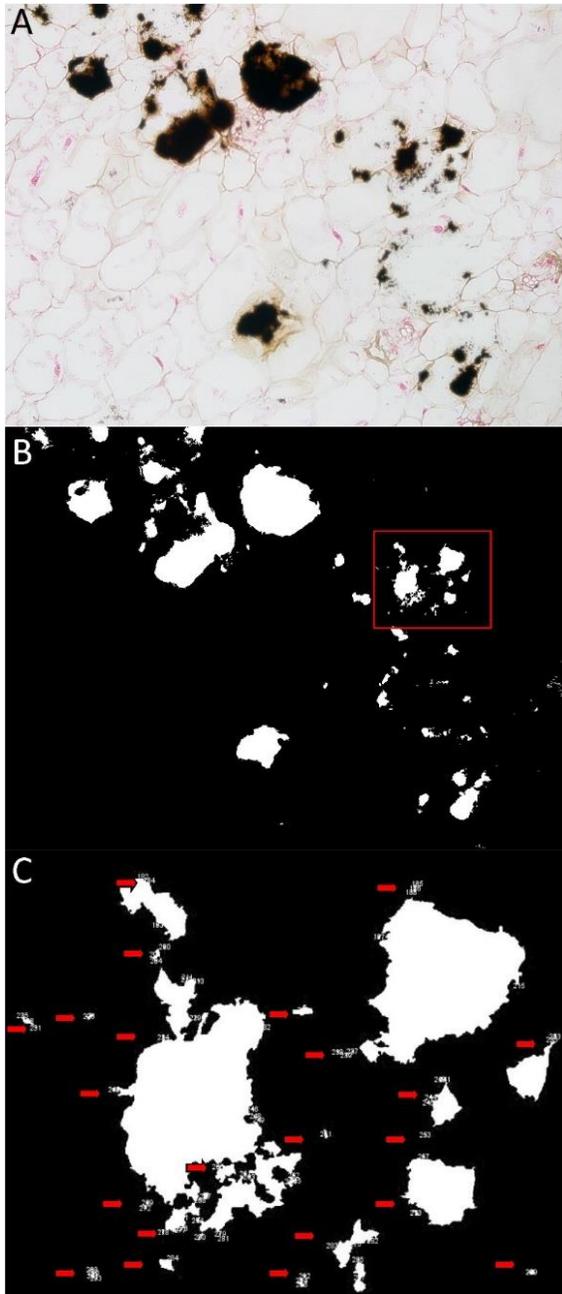


Fig. 20. Microfotografías representativas del análisis de imágenes realizado con el programa ImageJ. **A.** Microfotografía a 200X de la cumbre de una costilla del cladodio de la pitahaya teñida con Von Kóssa modificada por Yasue. **B.** Resultado de la selección de los cristales de CaOx por medio de la herramienta de *color threshold* en tonalidad monocromática. **C.** Ampliación del cuadro señalado en la imagen B. Las flechas señalan algunos de los números que identifican cada uno de los cristales de CaOx seleccionados por el programa.

A nivel de microscopía de luz resulta muy difícil distinguir la morfología de estas drusas, debido a que algunas de ellas se encuentran en proceso de formación, por lo que presentan espacios vacíos dentro de los idioblastos que, en este caso, resultan ser un espacio formado por un conjunto de células que se sacrifican para poder contener los diferentes tipos de drusas (Fig. 21 E y F). Debido a la gran densidad de las drusas y a la composición metálica del cristal de CaOx marcado con plata, los fotones irradiados por la fuente de luz del microscopio no pueden atravesar la drusa, por lo que la luz se refleja contra la superficie, y no se transmite. Por ello, se observa como una masa negra en casi todo su volumen, menos en la periferia de la drusa donde se torna de color marrón oscuro, con pequeñas proyecciones lineares (Fig. 21 G).

A nivel de SEM, las morfologías tridimensionales de las diferentes morfologías de las drusas se observan muy bien, donde se puede ver la aglomeración masiva de cristales de CaOx de diferentes morfologías alrededor de un punto de nucleación (Fig. 21 G). Al indagar en las diferencias morfológicas de las clasificaciones generales de los cristales de CaOx según su forma, se encontró que los cristales aciculares siempre presentaron la misma morfología y se encontraban distribuidos a lo largo de las diferentes capas del tejido caulinar.

Los cristales prismáticos presentaban morfologías cuadradas o romboides, como se observa en la Fig. 21 D, y morfologías rectangulares con diferentes grosores y tamaños, como se observa en la Fig. 22 A y B. Estos cristales también se encontraban en todas las capas del tejido caulinar.

Las drusas fueron las que presentaron una mayor variedad morfológica. Se encontraron drusas formadas por la aglomeración, aparentemente aleatoria, de cristales prismáticos como se observa en las Figs. 21 H y 22 D, en donde su periferia muestra los diferentes cristales prismáticos tetragonales que se proyectaban hacia el espacio intercelular. Estas proyecciones pueden ser las que se observaron con microscopía de luz en la Fig. 21 G.

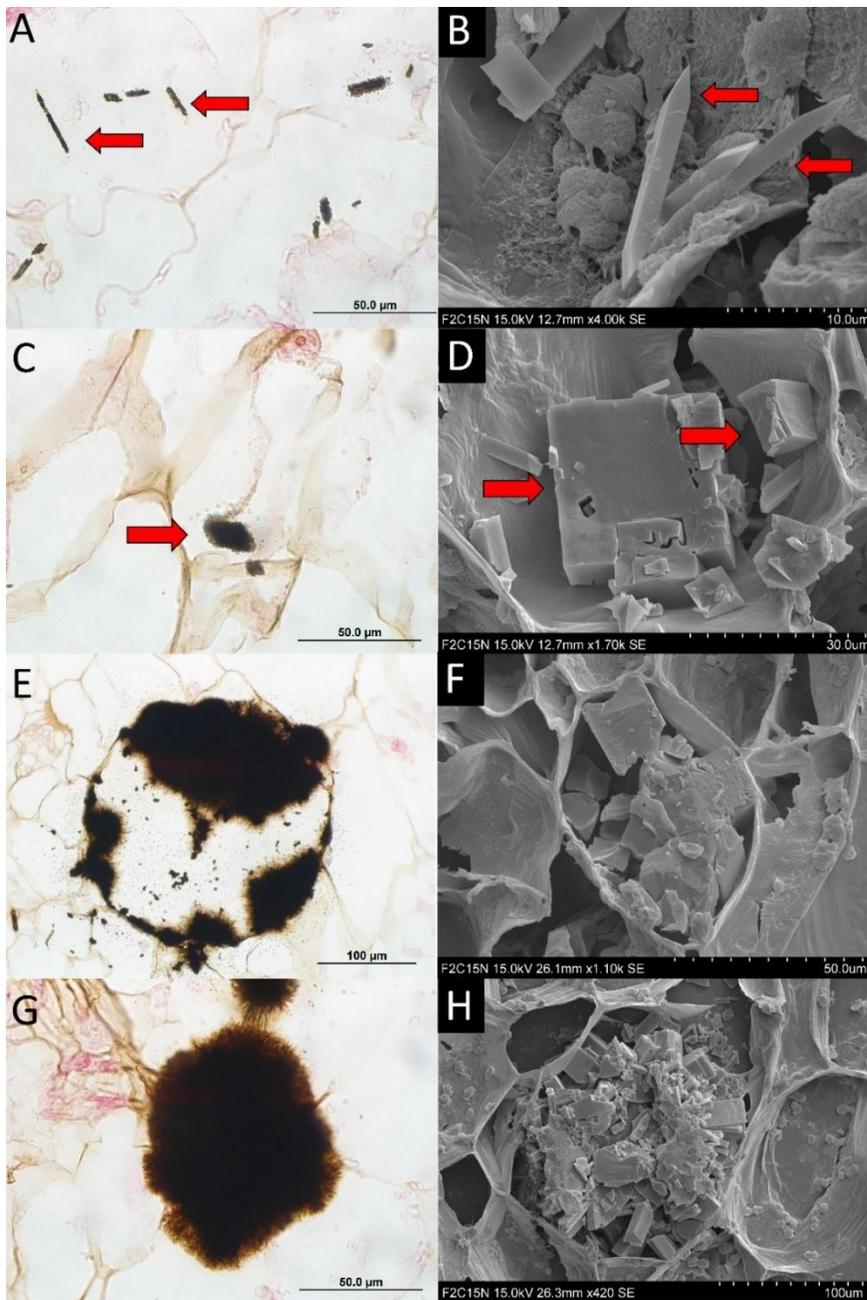


Fig. 21. Comparación de las diferentes morfologías de cristales de CaOx encontradas en tallos de pitahaya por microscopía de luz con la técnica de Von Kóssa modificada por Yasue (figuras de la columna de la izquierda) y en SEM (columna de la derecha). **A y B.** Cristales de CaOx en forma acicular o rafidios (señalados con las flechas rojas). **C y D.** Cristales de CaOx en forma de prismas (señalados con las flechas rojas). **E y F.** Drusa de cristales de CaOx en proceso de formación. **G y H.** Drusa de cristales de CaOx completamente formada.

También se encontraron drusas compactas, cuyo centro se pudo observar gracias a la técnica de montaje de cortes transversales de tallos a 50 μm para su observación en SEM. En la Fig. 22 C se muestra una drusa compacta en la cual se observa la gran densidad de su parte central, y en su periferia no hubo proyecciones hacia el espacio intercelular, sino que se encuentra muy compactada.

La morfología más llamativa que se observó fue la de las drusas tipo laberinto, las cuales están formadas por láminas de cristales que se disponen en el espacio de forma geométrica formando ángulos de 90° perfectos, y se invaginan sobre sí mismas para dar esta morfología fractal que se asemeja a un laberinto (Fig. 22 E).

Otra morfología encontrada para las drusas fueron las drusas amorfas. Éstas estaban formadas por cristales que no tenían una morfología ni distribución en particular. Parecían una aglomeración de cristales amorfos de forma aleatoria que se agrupaban de forma medianamente compacta (Fig. 22 F). Las drusas se encontraron tanto en la cumbre, como en la corteza y en la médula del tallo de la pitahaya, pero eran mucho más abundantes en la cumbre, mientras que en la corteza y en la médula eran poco abundantes (Fig. 23).

Finalmente, en algunas muestras analizadas por microscopía de luz, se encontraron abundantes organelas muy pequeñas que contenían pequeños cristales de CaOx en su interior (Fig. 24 A). Estos cristales no fueron identificados en SEM, probablemente debido a que, al estar inmersos dentro de la matriz orgánica de una organela, lo que se pudo observar fue la superficie externa de la organela (Fig. 24 B), y no su interior, que es el que tiene los cristales.

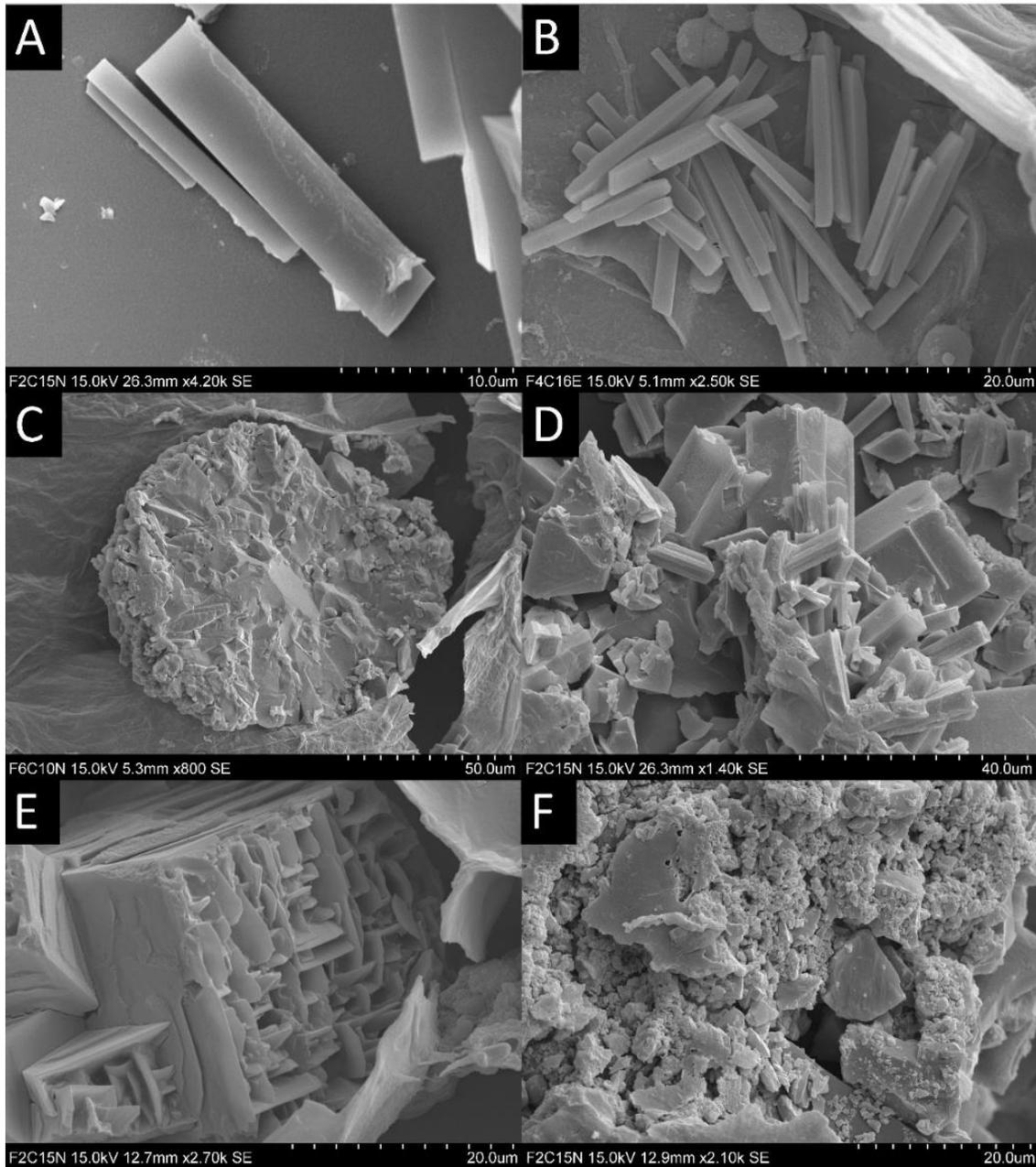


Fig. 22. Diferentes morfologías tridimensionales específicas de cristales de CaOx encontrados en tallos de pitahaya por medio de SEM. **A y B.** Cristales de CaOx prismáticos de forma rectangular de diferentes tamaños y grosores. **C.** Drusa de apariencia compacta de cristales de CaOx partida por la mitad. **D.** Drusa de cristales prismáticos tetragonales de CaOx. **E.** Drusa tipo laberinto de cristales de CaOx. **F.** Drusa amorfa de cristales de CaOx.

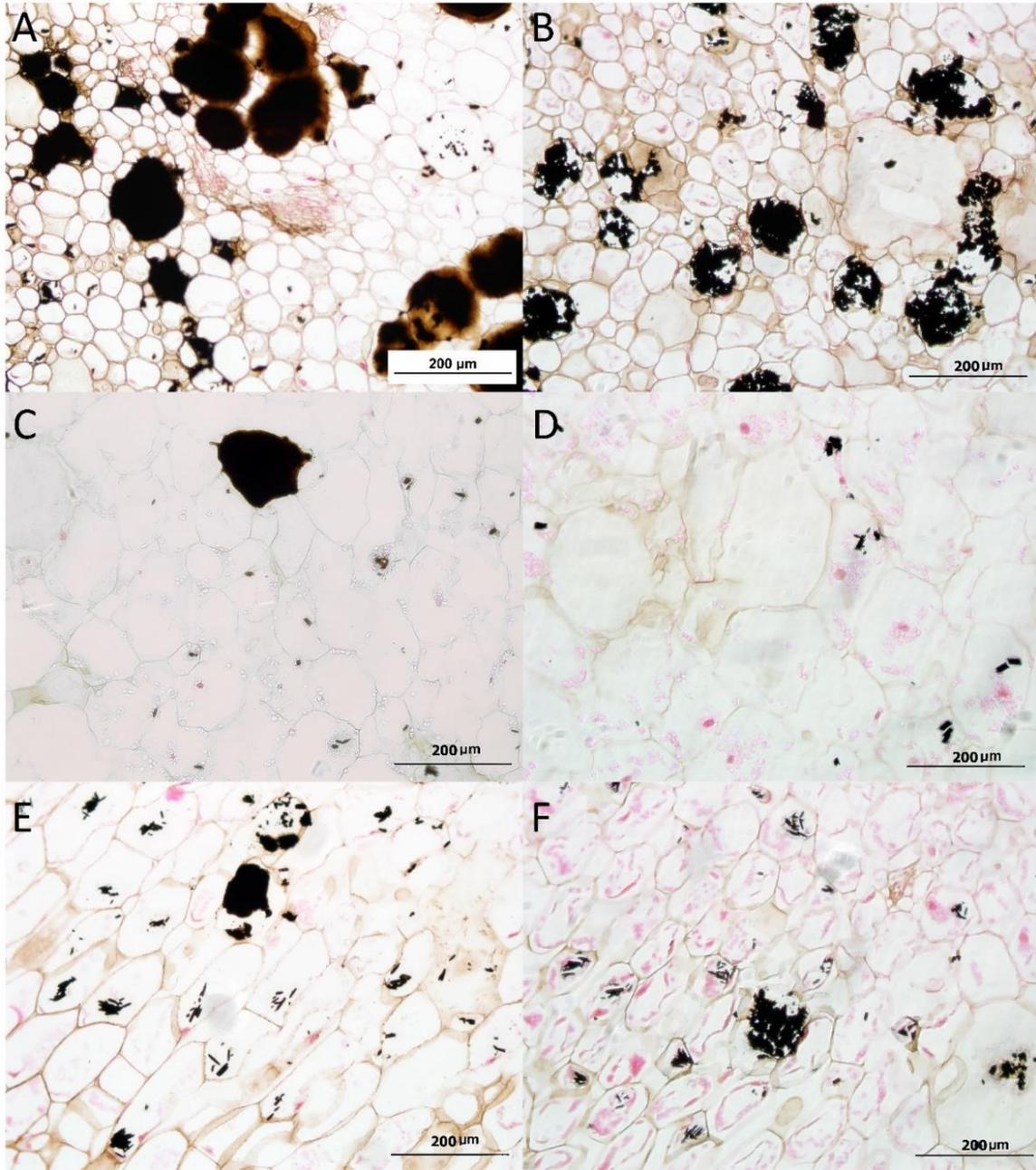


Fig. 23. Microfotografías representativas de las zonas del tejido caulinar estudiadas del tallo de la pitahaya. Las muestras están marcadas con la técnica de Von Kóssa modificada por Yasue. Las microfotografías de la izquierda corresponden al tratamiento al sol. Mientras que las microfotografías de la derecha corresponden al tratamiento a la sombra. **A y B.** Zona de la cumbre. **C y D.** Zona de la corteza del tallo. **E y F.** Zona de la médula del tallo.

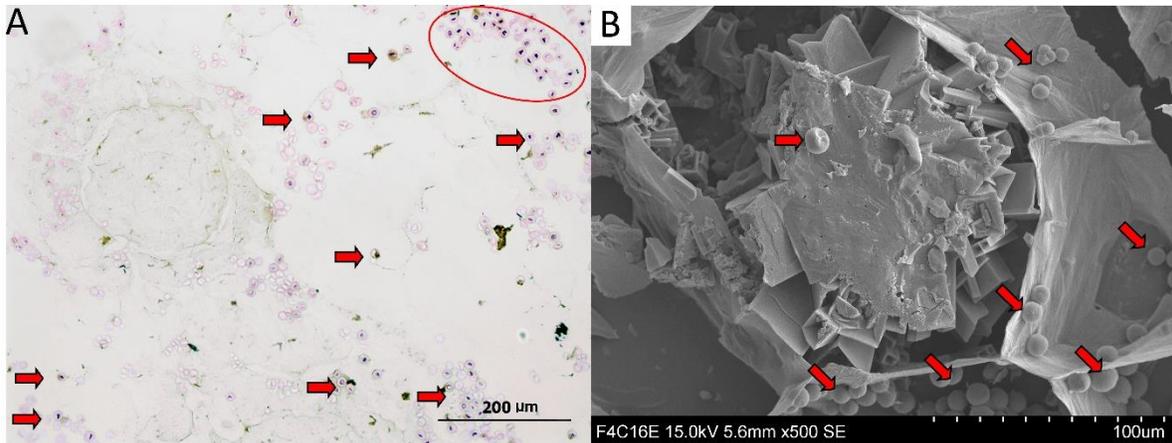


Fig. 24. Microfotografías representativas de cristales de CaOx contenidos en organelas celulares del cladodio de la pitahaya. **A.** Microfotografía por microscopía de luz. Las flechas y el círculo rojo señalan pequeños cristales de CaOx inmersos en una organela. **B.** Microfotografía por SEM de la superficie de las organelas celulares observadas en las células del parénquima de la pitahaya.

7. Composición elemental y estado de los cristales de CaOx en cladodios de pitahaya.

Para comprobar la composición elemental de las diferentes morfologías de los cristales CaOx observados en las microfotografías de luz marcadas con la técnica de Von Kóssa y en las microfotografías de SEM, se realizó un análisis por rayos X de cada una de éstas.

Como se observa en la Fig. 25, todas las morfologías encontradas estuvieron compuestas, según el orden de aparición de los picos de elementos de izquierda a derecha en los gráficos de análisis de la columna central de esa figura, por carbono, oxígeno, silicio y calcio.

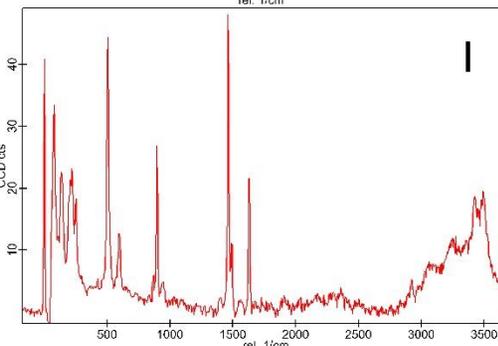
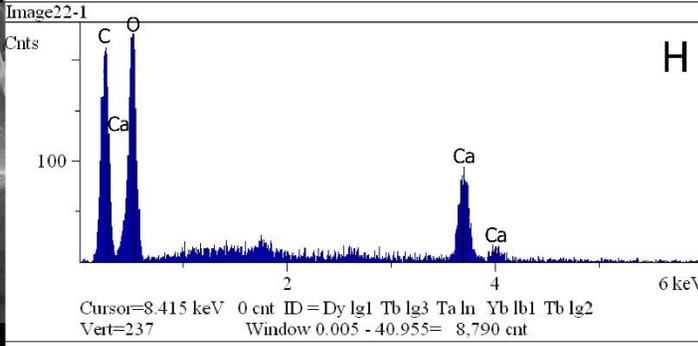
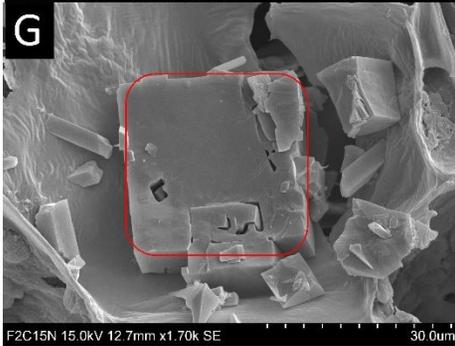
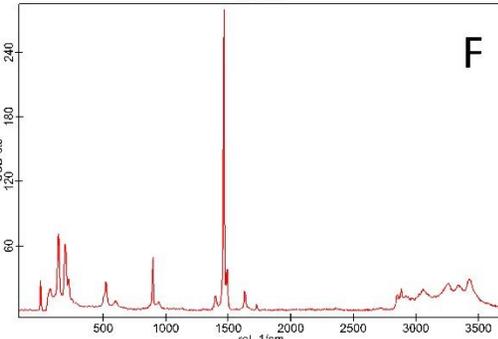
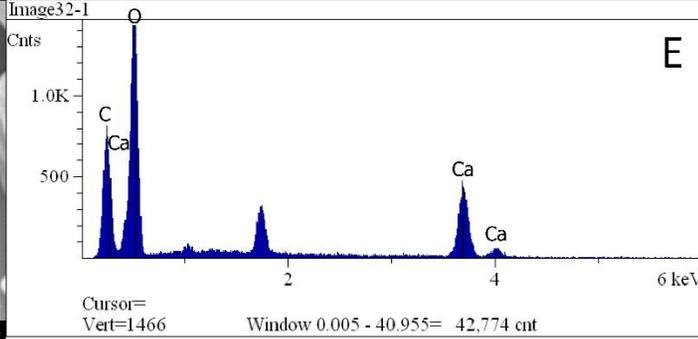
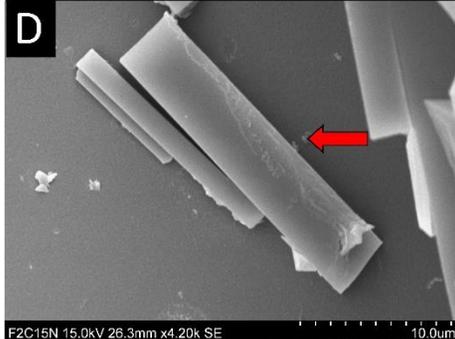
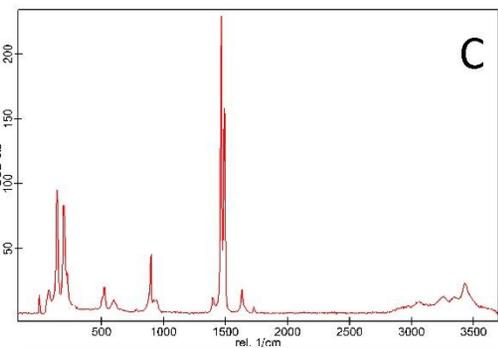
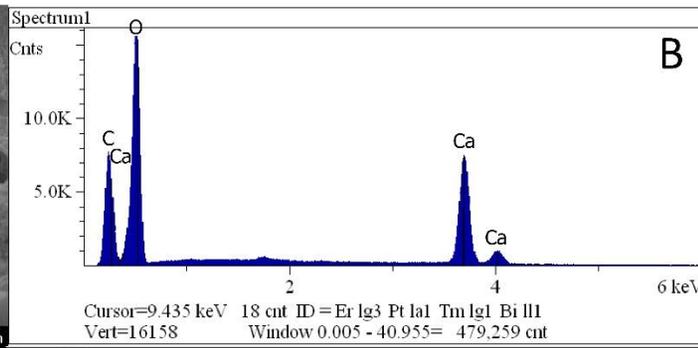
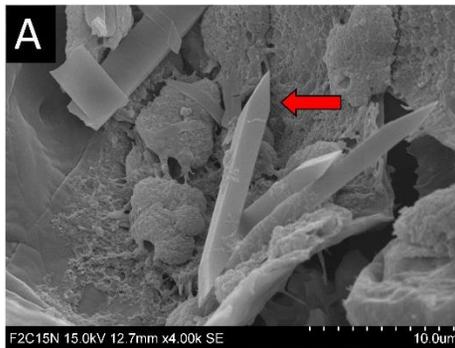
Es importante mencionar que el pico del silicio no está rotulado en la Fig. 25, esto es debido a que se asume que la presencia de este elemento se debe a la composición del portaobjetos de vidrio sobre el que están montados los cortes de los cladodios de la pitahaya, y no a la composición del cristal de CaOx. Al ser el óxido de silicio el componente principal del vidrio es comprensible la detección del

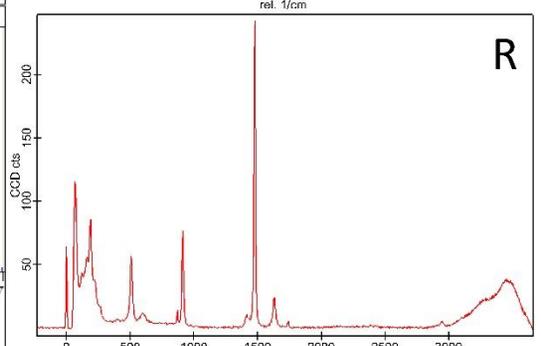
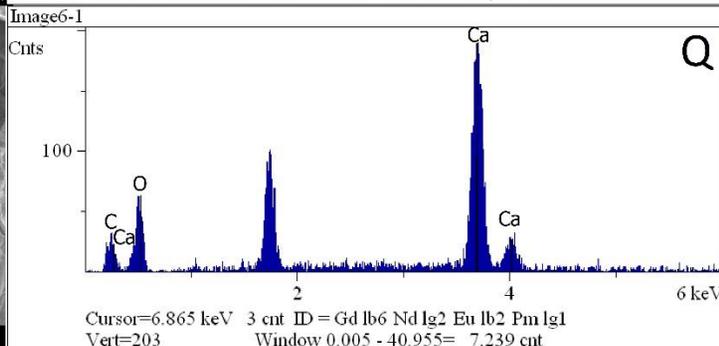
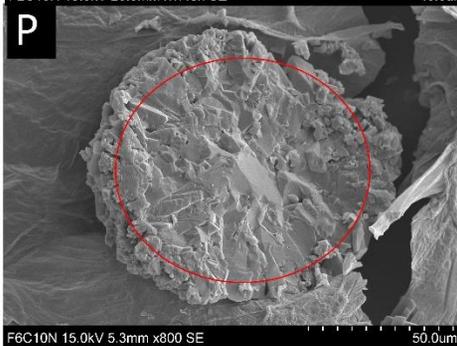
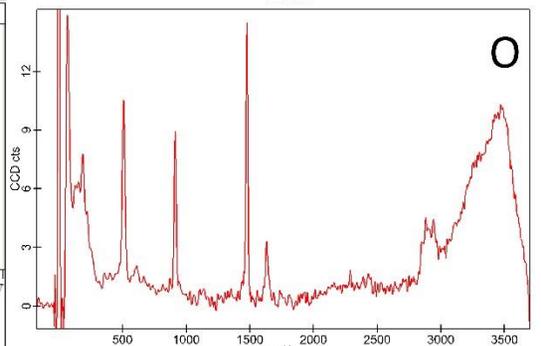
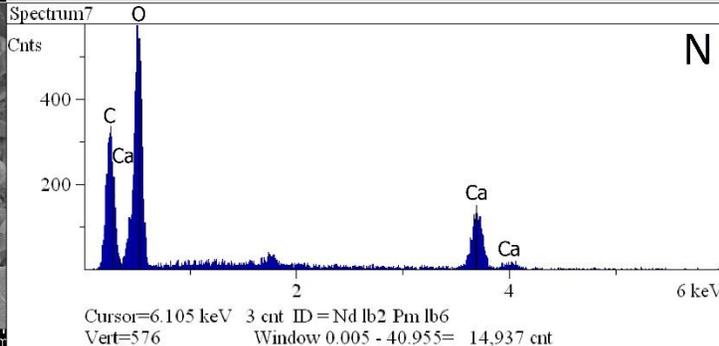
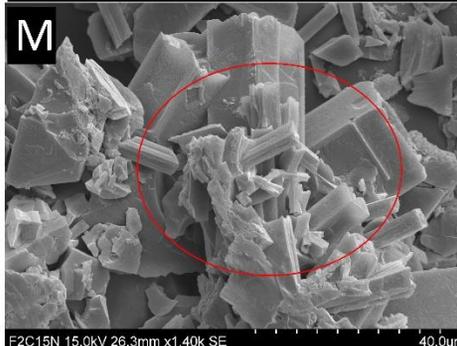
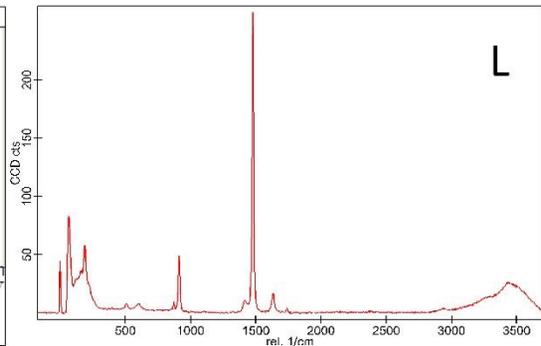
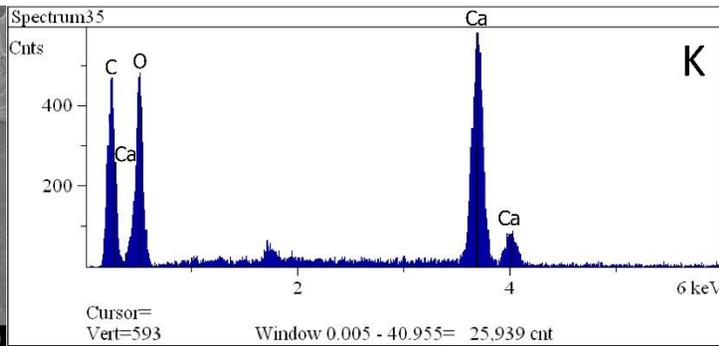
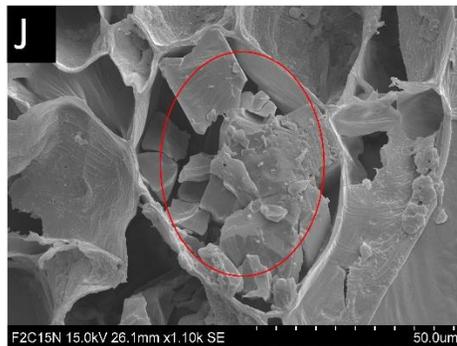
silicio en el análisis. El calcio, al tener tres bandas de emisión electrónica $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ y $K\beta_1$, está presente en cada gráfico tres veces.

La fórmula química de los cristales de CaOx (CaC_2O_4), es congruente con que los elementos C, O, y Ca sean parte de los elementos químicos que forman este compuesto orgánico. Es importante mencionar que con análisis de rayos X no se puede detectar hidrógeno, por lo que los estados de hidratación del compuesto no se pueden determinar con este método.

Además, como se puede observar en la columna de la derecha de la Fig. 25, se encontró que el estado de hidratación del CaOx varía entre CaOx monohidrato y CaOx dihidrato, dependiendo de su morfología. Los rafidios y los cristales prismáticos están compuestos por CaOx monohidrato o whewellita (Fig. 25 C, F e I) y todos los tipos de drusas están compuestas por CaOx dihidrato o weddellita (Fig. 25 L, O, R, U y X). Los picos encontrados del espectro RAMAN del CaOx monohidrato y CaOx dihidrato coincide con lo reportado en la literatura para este compuesto (129–133).

Para hacer una diferenciación rápida entre el espectro RAMAN del CaOx monohidrato y CaOx dihidrato se usaron los picos en 1464 y $1492 \frac{rel.1}{cm}$ característicos del CaOx monohidrato, y el pico en 1475 del CaOx dihidrato, debido a que estos se diferencian a nivel gráfico muy fácilmente (ver Fig. 25 C y F e I).





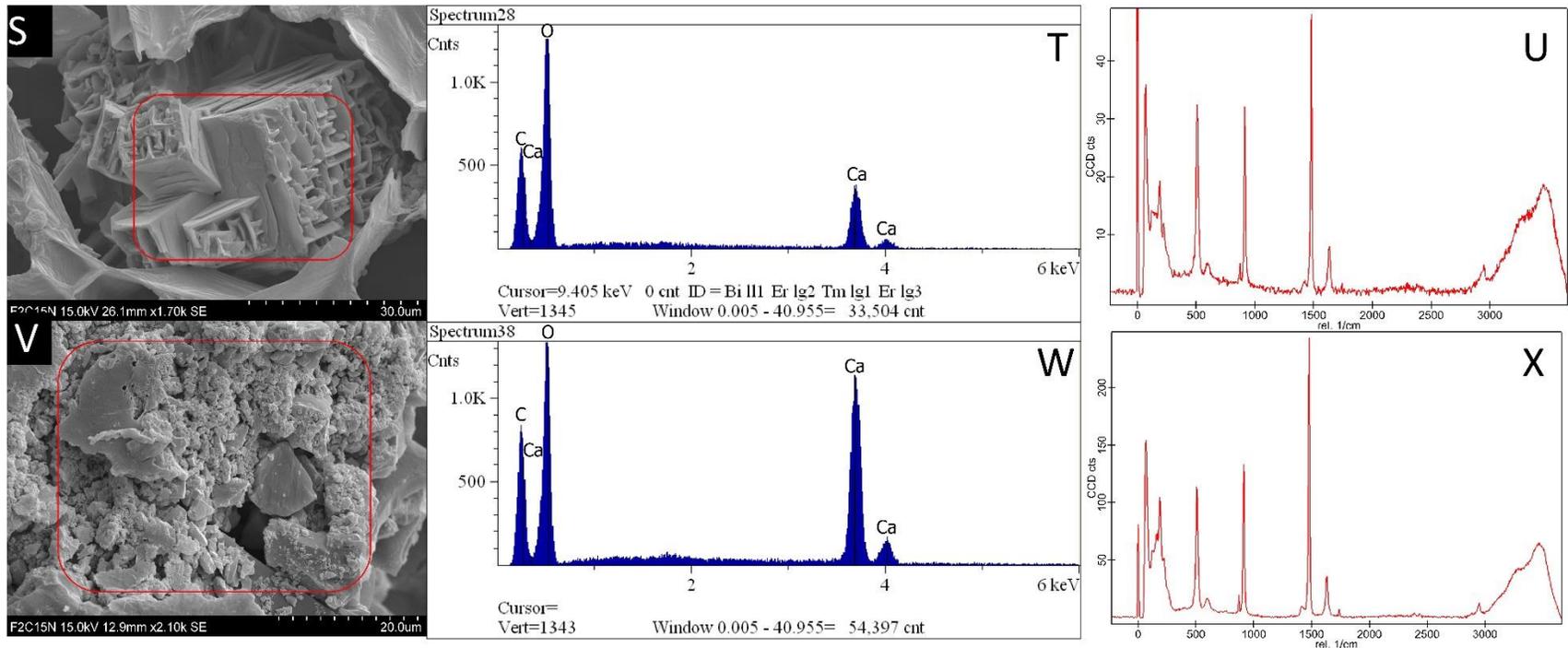


Fig. 25. Análisis por SEM con rayos X y espectroscopia RAMAN para determinar la composición elemental y estado de hidratación de los cristales de CaOx, respectivamente. En las columnas de la izquierda se muestran microfotografías representativas de SEM de los cristales de CaOx. Las columnas centrales muestran los resultados del análisis por SEM con rayos X de los cristales de CaOx (el silicio es el pico no rotulado). En las columnas de la derecha se muestran los resultados de espectroscopia RAMAN de los cristales de CaOx **A-C**. Cristal acicular (flecha roja). **D-F**. Cristal prismático rectangular (flecha roja). **G-I**. Cristal prismático cuadrado (cuadrado rojo). **J-L**. Cristal drusa en formación. **M-O**. Cristal tipo drusa formada por cristales geométricos tetragonales (círculo rojo). **P-R**. Cristal drusa compacta (círculo rojo). **S-U**. Cristal drusa tipo laberinto (cuadrado rojo). **V-X**. Cristal drusa amorfa (cuadrado rojo).

8. Cuantificación de los cristales de CaOx en tallos de pitahaya.

Como se puede observar en el Cuadro 4, al comparar el % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto al área total de la microfotografía, de los tratamientos al sol y a la sombra, se encontró que las plantas del tratamiento a la sombra tuvieron un mayor % de CaOx que las plantas del tratamiento al sol, esto con un 90 % de confianza ($p = 0.052$) (Fig. 26).

Cuadro 4. Resultados generales del análisis con la prueba de Tukey HSD para análisis de la cantidad de cristales de CaOx en tallos de pitahaya representada por el % CaOx (ver Ecuación 3) con respecto a las variables categóricas analizadas.

Variables	diff	lwr	upr	p
Tratamiento: sol y sombra	0.62	-0.006	1.12	0.052
Zona: cumbre y corteza	-5.16	-6.31	-4.01	< 0.01
Zona: cumbre y médula	-6.59	-7.75	-5.44	< 0.01
Zona: corteza y médula	-1.42	-2.24	-.061	< 0.01
Punto cardinal: N y E	0.004	-1.18	1.18	1.00
Punto cardinal: O y E	-0.69	-1.81	0.43	0.45
Punto cardinal: S y E	-0.39	-1.83	1.04	0.94
Punto cardinal: O y N	-0.69	-1.88	0.50	0.50
Punto cardinal: S y N	-0.40	-1.90	1.09	0.95
Punto cardinal: S y O	0.29	-1.15	1.74	0.98

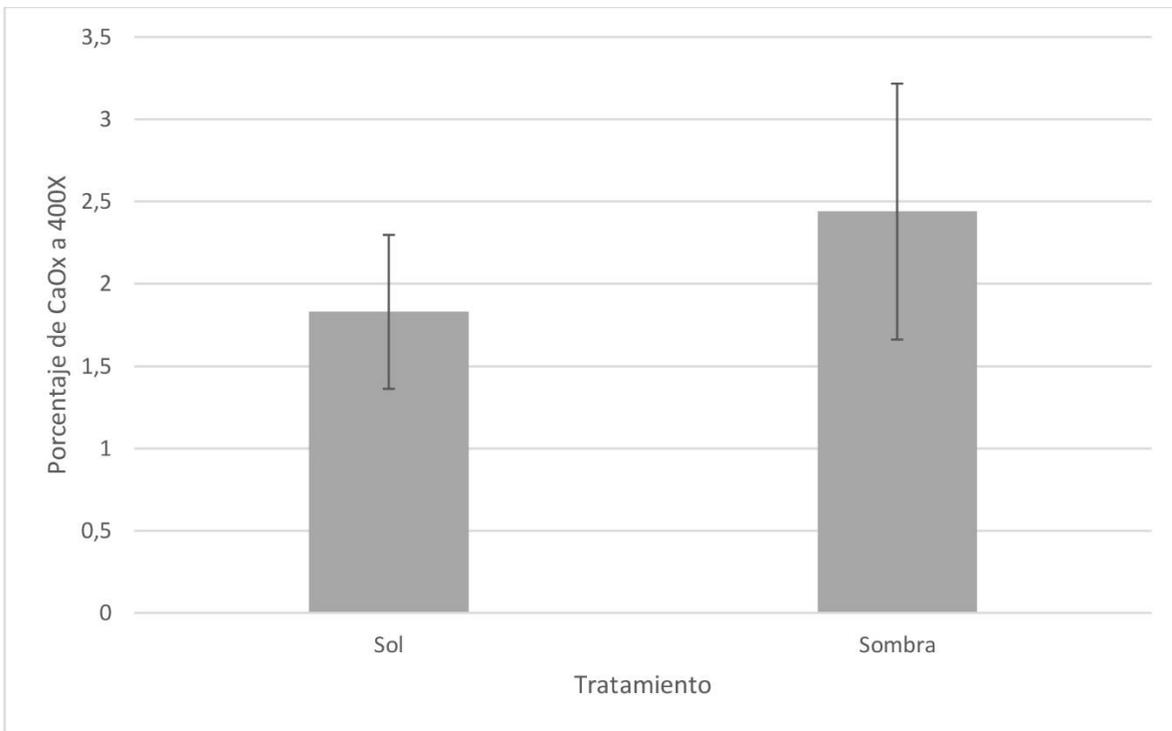


Fig. 26. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto al área total de la microfotografía, de acuerdo con los tratamientos al sol y a la sombra en tallos de pitahaya. Las barras de error representan el error estándar.

Al comparar el % de CaOx de las tres zonas analizadas en el tallo de la pitahaya se encontró diferencia entre la cumbre, corteza y médula del tejido caulinar, la cumbre fue la zona del tejido que presentó un mayor porcentaje de CaOx, la corteza presentó un porcentaje intermedio, y la médula presentó el menor porcentaje (ver Cuadro 4) ($p < 0.01$). En todos los casos se mantuvo constante que el tratamiento a la sombra tuvo un mayor porcentaje de CaOx que el tratamiento al sol (Fig. 27). Mientras que al realizar la comparación entre los puntos cardinales en los cuales se tomaron las muestras de tallo no se encontró ninguna diferencia (ver Cuadro 4) ($p > 0.05$) (Fig. 27 y 28).

Al realizar el análisis de las interacciones entre las diferentes zonas del tejido del tallo de la pitahaya con respecto a otras zonas y los tratamientos al sol y a la sombra, como se observa en el Cuadro 4, difirieron en todos los casos ($p < 0.05$). Siempre

las cumbres tuvieron un mayor porcentaje de CaOx que la corteza ($p < 0.01$) y que la médula ($p < 0.01$), sin importar el tratamiento ni el punto cardinal. En cuanto a la comparación de la corteza con la médula, en la mayor parte de los casos tuvieron un porcentaje de CaOx igual, excepto al comparar la corteza del tratamiento a la sombra que tuvo un porcentaje de CaOx mayor que la médula del tratamiento al sol ($p < 0.01$) y al comparar la corteza del tratamiento a la sombra que tuvo un porcentaje de CaOx mayor que la médula del tratamiento a la sombra ($p = 0.02$) (Cuadro 4).

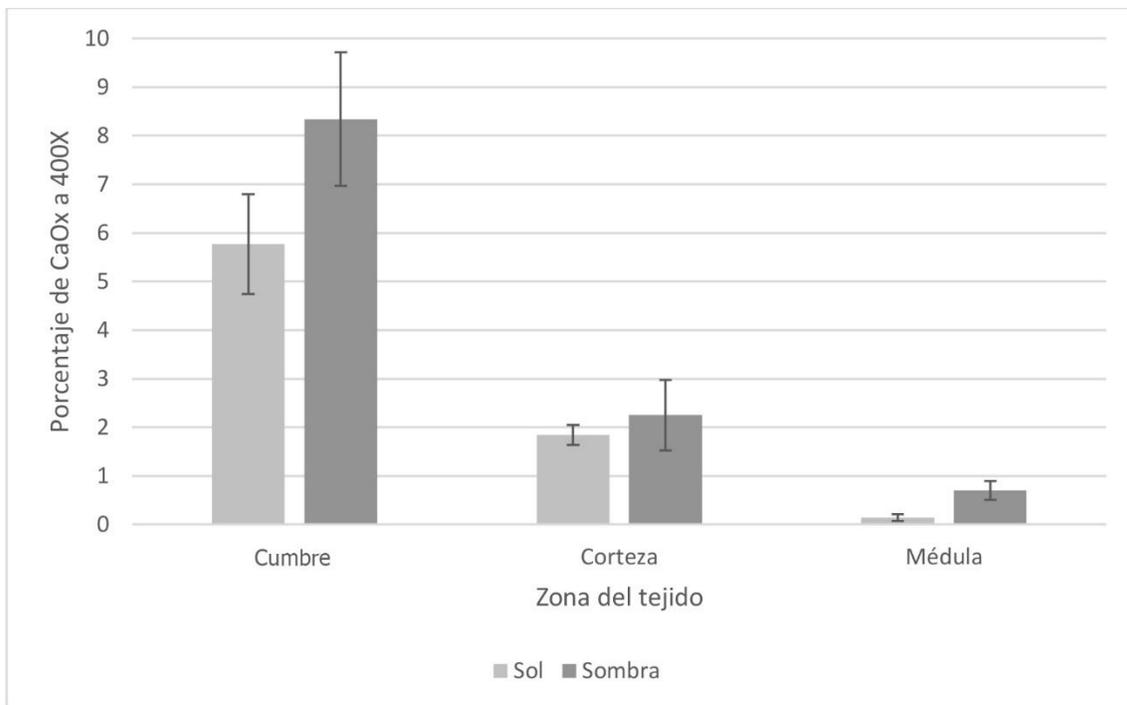


Fig. 27. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto al área total de la microfotografía, de acuerdo con la zona del tejido analizado en tallos de pitahaya según el tratamiento al sol y a la sombra. Las barras de error representan el error estándar.

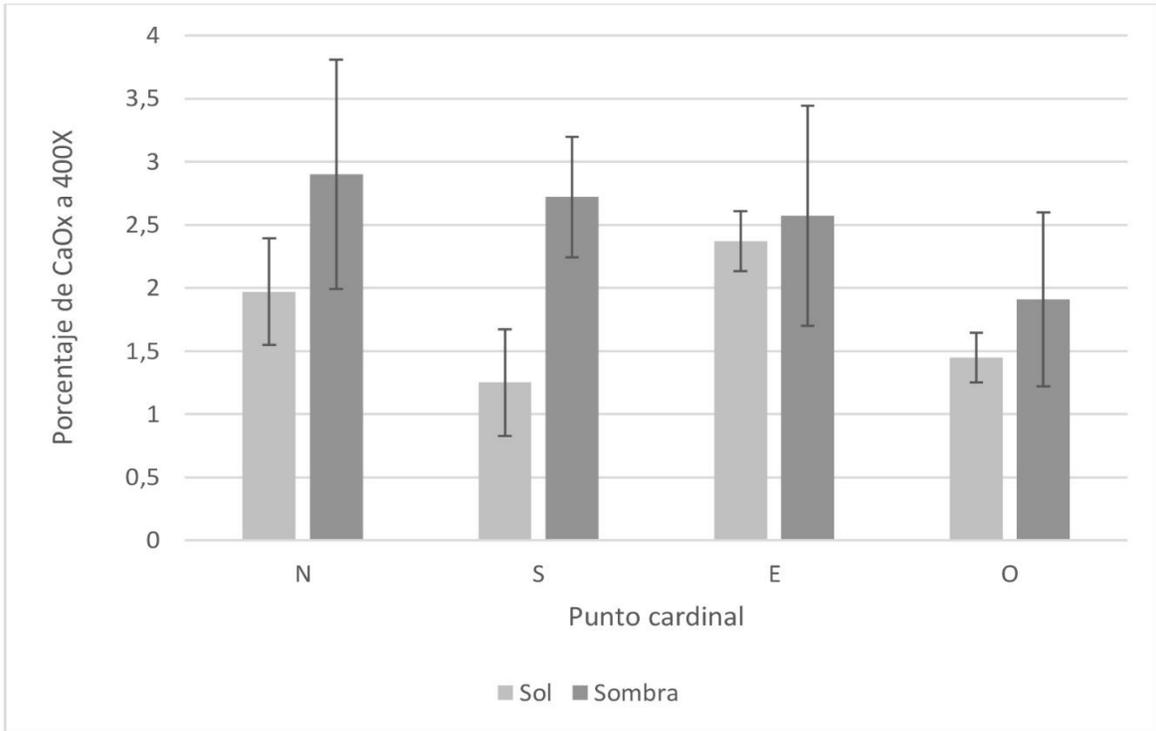


Fig. 28. Comparación del % CaOx, que corresponde al porcentaje de la razón de la sumatoria de los cristales de CaOx por microfotografía a 200X con respecto al área total de la microfotografía, de acuerdo con el punto cardinal de donde se tomaron los tallos de pitahaya según el tratamiento al sol y a la sombra. Las barras de error representan el error estándar.

9. Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx en el tejido caulinar.

En esta sección, sólo se analizaron cuatro microfotografías representativas de las tres zonas de tejido estudiadas de los tratamientos al sol a la sombra, debido a que se tuvo que realizar de forma manual, por no encontrar la forma de realizarlo de forma automática por medio del análisis de imágenes de las más de mil microfotografías generadas.

Las áreas de los cristales encontrados por microfotografía se dividieron en cinco rangos: $[0,10[\mu\text{m}^2$ para los cristales muy pequeños que se percibieron en las imágenes como puntos; $[10,100[\mu\text{m}^2$ para los cristales individuales aciculares, y

prismáticos pequeños; $[100,1500[\mu\text{m}^2$ para los cristales prismáticos grandes, y drusas; $[1500,10000[\mu\text{m}^2$ y $[10000,\infty] \mu\text{m}^2$ para las drusas masivas.

Cuadro 5. Resultados específicos del análisis con la prueba de Tukey HSD para análisis de la cantidad de cristales de CaOx en tallos de pitahaya representada por el % CaOx (ver Ecuación 3) con respecto al tratamiento y a la zona.

Variables	dif	lwr	upr	p
Tratamiento y zona: cumbre al sol : cumbre a la sombra	2.73	0.30	5.18	0.017
Tratamiento y zona: corteza al sol : cumbre a la sol	-3.93	-5.96	-1.90	< 0.01
Tratamiento y zona: corteza a la sombra : cumbre al sol	-3.56	-5.56	-1.55	< 0.01
Tratamiento y zona: médula al sol : cumbre al sol	-5.25	-7.28	-3.22	< 0.01
Tratamiento y zona: médula a la sombra : cumbre al sol	-5.08	-7.89	-3.07	< 0.01
Tratamiento y zona: corteza al sol : cumbre a la sombra	-6.69	-8.31	-4.70	< 0.01
Tratamiento y zona: corteza a la sombra : cumbre a la sombra	-6.30	-8.22	-4.35	< 0.01
Tratamiento y zona: médula al sol : cumbre a la sombra	-7.99	-9.95	-6.03	< 0.01

Continuación del Cuadro 5.

Tratamiento y zona: corteza a la sombra : corteza al sol	0.37	-1.03	1.78	0.97
Tratamiento y zona: médula a la sombra : cumbre a la sombra	-7.81	-9.76	-5.88	< 0.01
Tratamiento y zona: médula al sol : corteza al sol	-1.32	-2.76	0.10	0.09
Tratamiento y zona: médula a la sombra : corteza al sol	-1.15	-2.55	0.25	0.18
Tratamiento y zona: médula al sol con corteza a la sombra	-1.69	-3.10	-0.29	< 0.01
Tratamiento y zona: médula a la sombra: corteza a la sombra	-1.52	-2.89	-0.14	0.020
Tratamiento y zona: médula a la sombra : médula al sol	0.17	-1.22	1.58	0.99

Como se puede observar en la Fig. 29, no hubo diferencia entre el número de cristales de CaOx por microfotografía de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra ($H = 0.05$, $DF = 1$, $p = 0.82$). Al comparar el número de cristales de acuerdo con los rangos analizados, sí se encontró diferencia tanto en el tratamiento al sol ($H = 107$, $DF = 4$, $p = 0.01$) (Fig. 30 A) como en el tratamiento a la sombra ($H = 12.7$, $DF = 4$, $p = 0.01$) (Fig. 30 B).

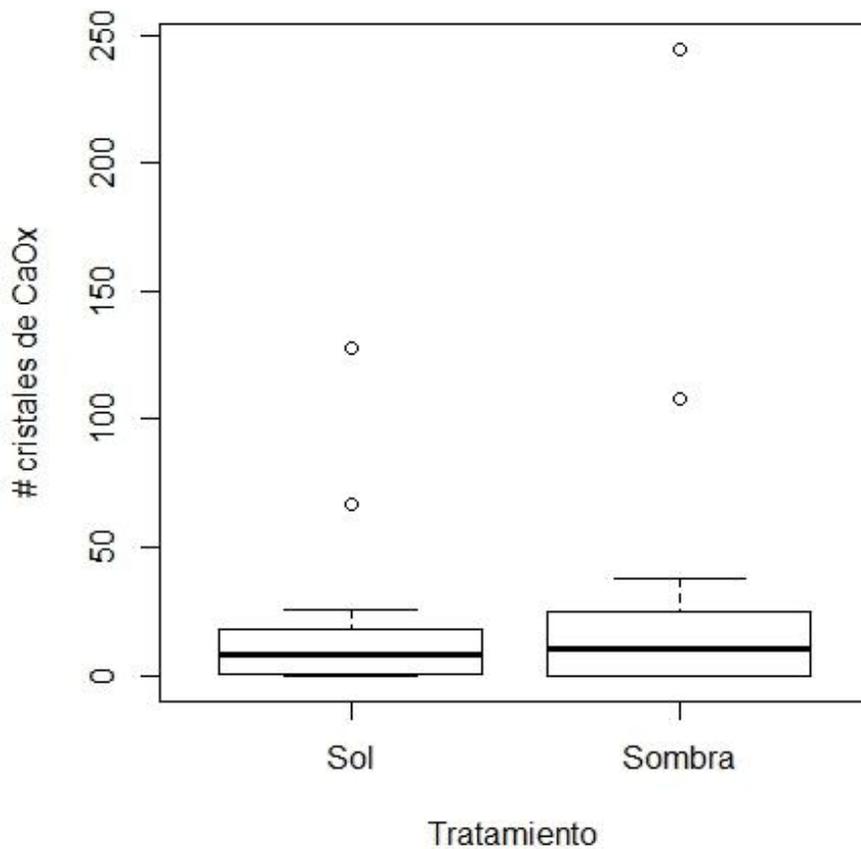


Fig. 29. Comparación del número de cristales por microfotografía a 200X de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra en cladodios de pitahaya. Los círculos vacíos sobre los boxplots corresponden a valores extremos.

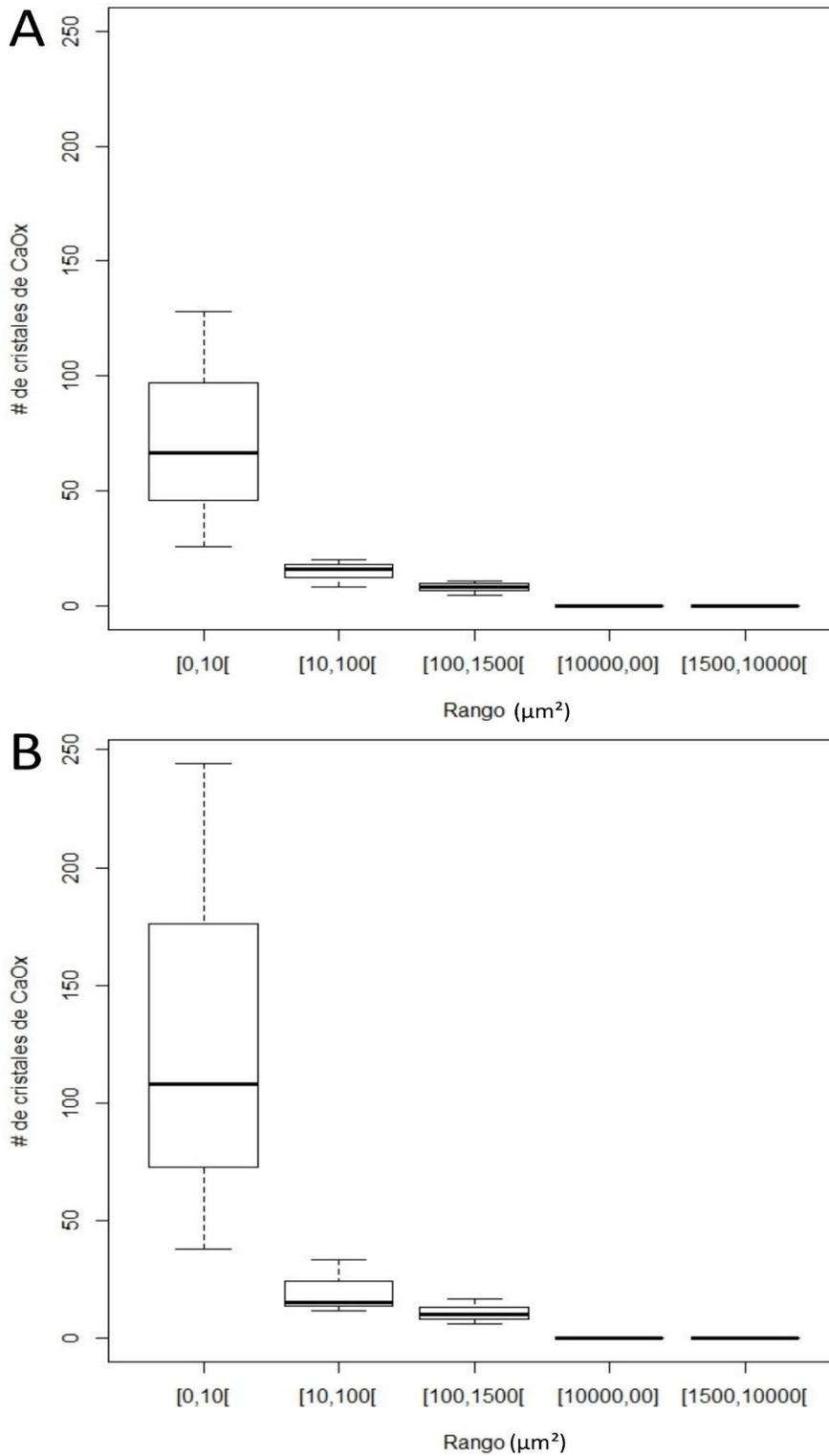


Fig. 30. Comparación del número de cristales de CaOx por microfotografía a 200X de cladodios de pitahaya de acuerdo con el rango de clasificación del área de los cristales (μm^2). **A.** Tratamiento al sol. **B.** Tratamiento a la sombra.

La tendencia del tratamiento al sol y de sombra fue una mayor frecuencia de cristales pequeños, como por ejemplo en el rango de $[10,100[\mu\text{m}^2$, e ir disminuyendo el número de cristales conforme aumentó el tamaño de estos, como se observa en los últimos dos rangos $[1500,10000[\mu\text{m}^2$ y $[10000,\infty[\mu\text{m}^2$ (Fig. 30).

Al analizar el número de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido en donde se hizo la cuantificación, no se encontró diferencia en el tratamiento al sol ($H = 0.91$, $DF = 2$, $p = 0.63$) (Fig. 31 A) ni en el tratamiento a la sombra ($H = 1.2$, $DF = 2$, $p = 0.55$) (Fig. 31 B).

Al comparar el área promedio de cristales de CaOx de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra no se encontró diferencia ($H = 0.035$, $DF = 1$, $p = 0.85$) (Fig. 32). Tampoco se encontró diferencia al comparar el área promedio de cristales de CaOx de acuerdo con los rangos analizados tanto en el tratamiento al sol ($H = 7.5$, $DF = 4$, $p = 0.11$) (Fig. 33 A) como en el a la sombra ($H = 8.2$, $DF = 4$, $p = 0.08$) (Fig. 33 B).

Al analizar el área promedio de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido en donde se hizo la cuantificación no se encontró diferencia en el tratamiento al sol ($H = 0.73$, $DF = 2$, $p = 0.69$) (Fig. 34 A) ni en el tratamiento a la sombra ($H = 1.2$, $DF = 2$, $p = 0.54$) (Fig. 34 B).

Con respecto a la distribución espacial de los cristales de CaOx se encontró que, en todos los casos, sin importar el tratamiento ni la zona del tejido analizado, los cristales tuvieron una distribución agregada, lo cual significa que los cristales de CaOx se encuentran agrupados en distintos sectores, y la presencia de un cristal de CaOx aumenta la probabilidad de encontrar otro. Esto se basa en que el valor de h_T de referencia para un $n = 30$ con un valor $p = 0.05$ es de 1.18. Como se puede observar en el Cuadro 6, el h_T de todas las microfotografías analizadas tuvieron un valor mayor al h_T de referencia. Ello indica que se tiene una distribución agregada.

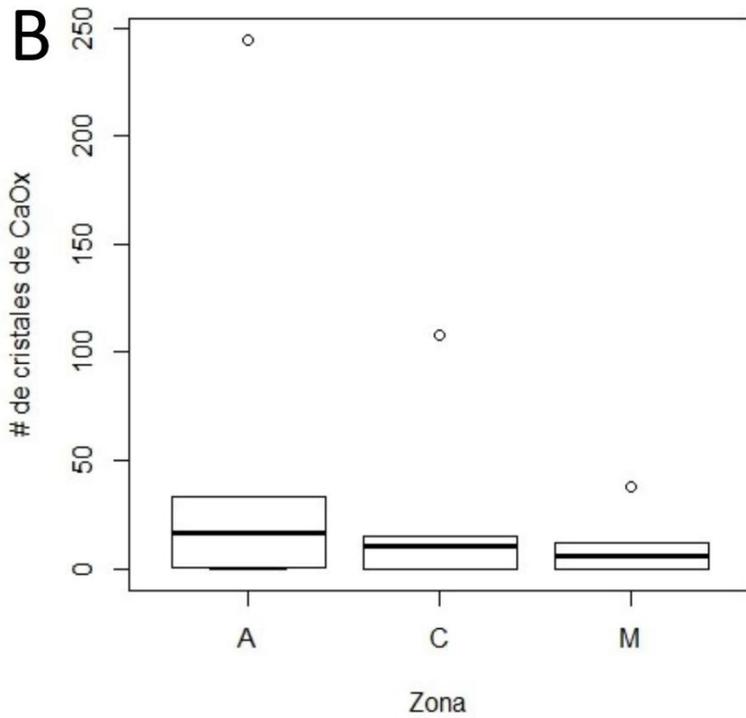
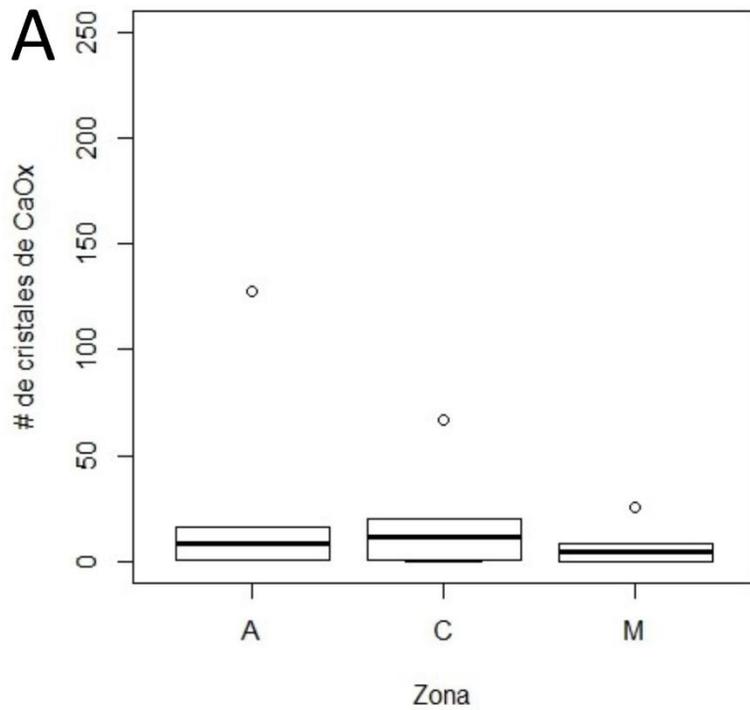


Fig. 31. Comparación del número de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido y al tratamiento al sol (A) y a la sombra (B) de cladodios de pitahaya. Cu = cumbre. C = corteza. M = médula. Los círculos vacíos sobre los boxplots corresponden a valores extremos.

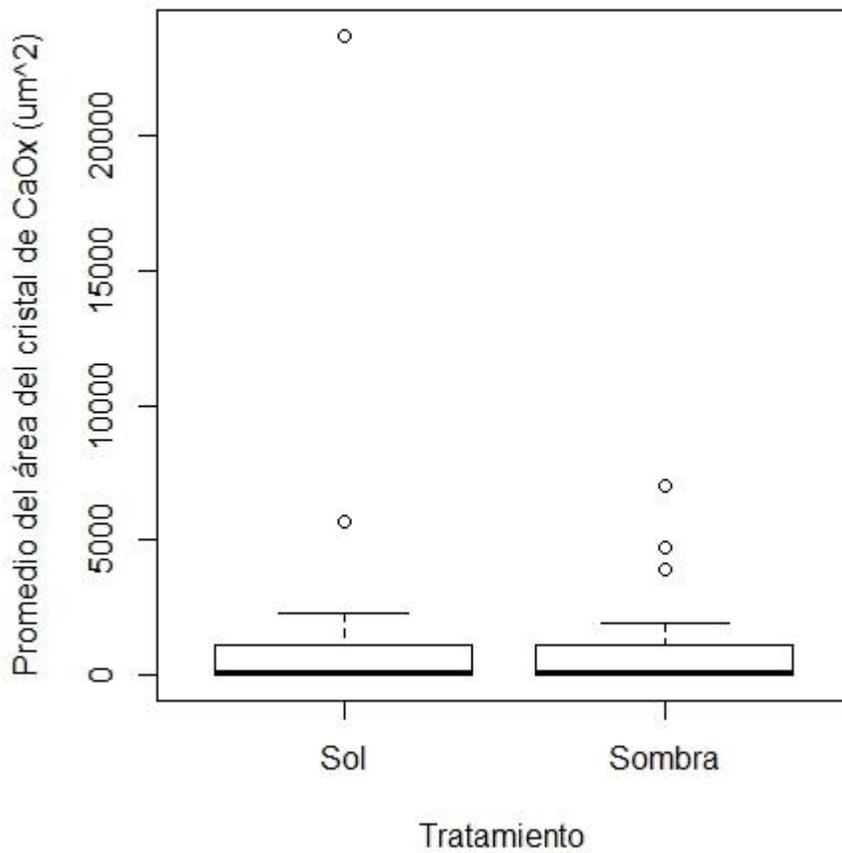


Fig. 32. Comparación del promedio del área de cristales (μm^2) de CaOx por microfotografía a 200X de acuerdo con el tratamiento al sol y a la sombra en cladodios de pitahaya. Los círculos vacíos sobre los boxplots corresponden a valores extremos.

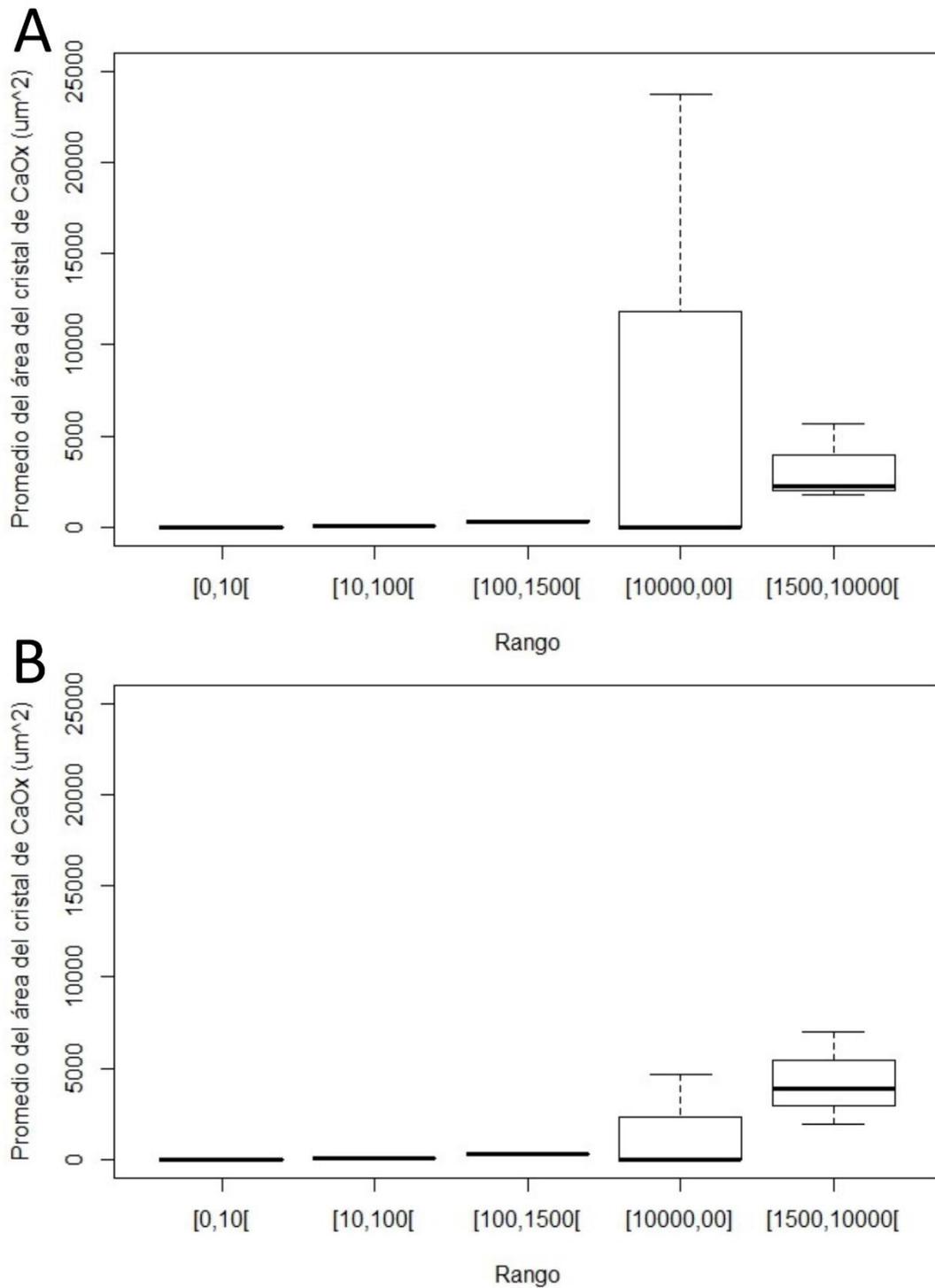


Fig. 33. Comparación del promedio del área de cristales de CaOx por microfotografía a 200X de cladodios de pitahaya de acuerdo con el rango de clasificación del área de los cristales (μm^2). **A.** Tratamiento al sol. **B.** Tratamiento a la sombra.

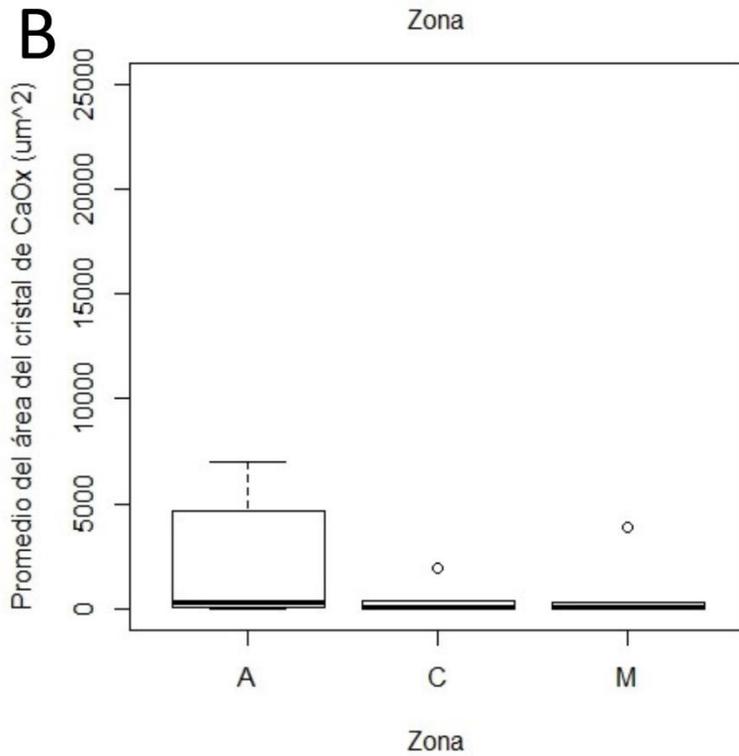
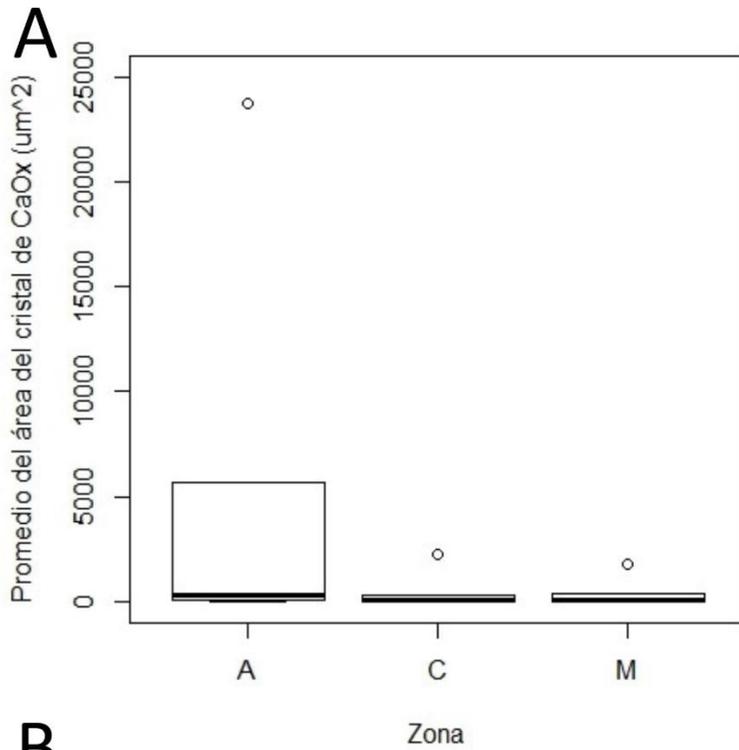


Fig. 34. Comparación del promedio del área de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido y al tratamiento al sol (A) y a la sombra (B) en cladodios de pitahaya. Cu = cumbre. C = corteza. M = médula. Los círculos vacíos sobre los boxplots corresponden a valores extremos.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Hines para aleatoriedad para determinar la distribución espacial de cristales de CaOx en cladodios de pitahaya bajo tratamientos al sol y a la sombra.

Zona	<i>h_T</i> sol	<i>h_T</i> sombra
Cumbre 1	1.44	1.69
Cumbre 2	1.87	2.66
Cumbre 3	1.81	1.87
Cumbre 4	1.63	1.87
Corteza 1	1.93	2.04
Corteza 2	2.00	1.77
Corteza 3	1.44	2.67
Corteza 4	2.06	2.18
Médula 1	2.25	2.11
Médula 2	3.57	1.67
Médula 3	2.93	2.74
Médula 4	2.47	2.88

10. Cuantificación de cristales de CaOx por digestión enzimática.

Al analizar los cristales extraídos por digestión enzimática y purificados según del método de Viñas & Jiménez (69) con el hemocitómetro, no se observaron drusa de ningún tipo; sólo se observaron cristales aciculares y prismáticos. Por ello se generaron dos hipótesis: las drusas se desintegraban durante el procesamiento de las muestras o se perdían durante alguno de los pasos.

Para analizar ambas hipótesis se analizaron todos los residuos de sobrenadantes y restos en la cristalería usada para determinar si las drusas se estaban perdiendo en alguno de los pasos de la digestión enzimática.

Se encontró un gran número de drusas en la cristalería empleada durante la extracción enzimática, lo que puede sugerir que los cristales de CaOx tienen cierta afinidad mediada por cargas eléctricas con la cristalería (Fig. 35 A).

También, como se emplearon filtros de nylon con poros de 45 μm de diámetro, y las drusas pueden medir más de 100 μm (como se puede observar en la Fig. 21), es físicamente imposible que pasen a través del filtro. Por ello es comprensible que se encontraran grandes cantidades de drusas en el filtro de nylon y que no hayan pasado a las fracciones analizadas (Fig. 35 B).

Además, durante las centrifugaciones en sacarosa, no todas las drusas precipitaron en el pellet, probablemente debido a que la centrifugación a 43 g no generó la suficiente fuerza para que cayeran al pellet. Por ello, en el sobrenadante de las centrifugaciones con sacarosa también se encontraron drusas (Fig. 35 C).

Debido a esto, se considera que el protocolo de extracción enzimática descrito por Viñas y Jiménez (69) para analizar cristales de CaOx por medio de un hemocitómetro no es un método adecuado para su cuantificación, ya que no permite la cuantificación de la totalidad de cristales. En caso de que se modificara el protocolo, para no perder las drusas durante el proceso y permitir su precipitación en el pellet, la cuantificación por hemocitómetro no es adecuada, debido a que tomaría a la drusa como un solo cristal, lo cual sería un resultado erróneo ya que puede estar compuesta por cientos o miles de cristales. Por ello, no se realizó la comparación de la cuantificación de cristales de CaOx por digestión enzimática con la cuantificación por análisis de microfotografías marcados con Von Kóssa.

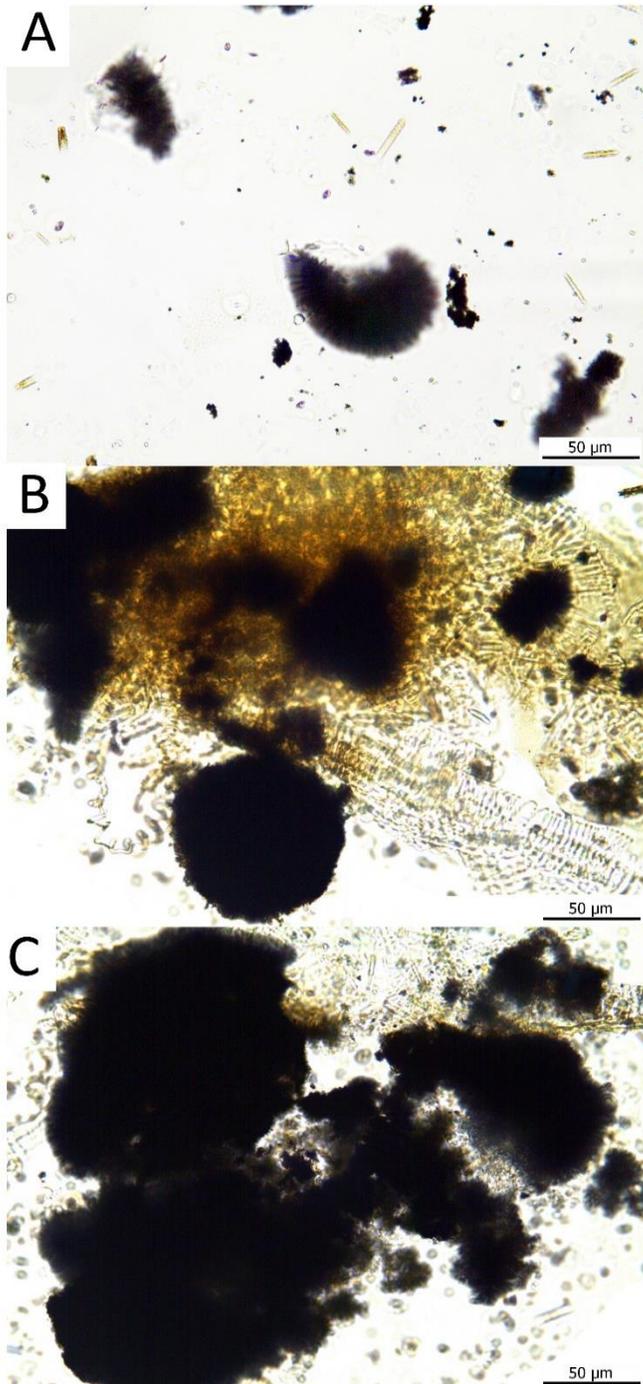


Fig. 35. Cristales de CaOx encontrados en los desechos de los diferentes pasos de la extracción de CaOx por medio de digestión enzimática. **A.** Cristales de CaOx encontrados adheridos a la cristalería empleada para la digestión enzimática. **B.** Cristales de CaOx encontrados en el filtro de nylon. **C.** Cristales de CaOx encontrados en los desechos de las centrifugaciones con sacarosa.

11. Cuantificación de clorofila y carotenoides en las zonas del tejido caulinar de pitahaya.

Se encontró que las plantas del tratamiento a la sombra tenían una mayor concentración de clorofila a ($H = 19.1$, g.l. = 1, $p < 0.01$) (Fig. 36 A), clorofila b ($H = 9.50$, g.l. = 1, $p < 0.01$) (Fig. 36 B) y carotenoides ($H = 7.13$, g.l. = 1, $p < 0.01$) (Fig. 36 C) que las plantas del tratamiento al sol.

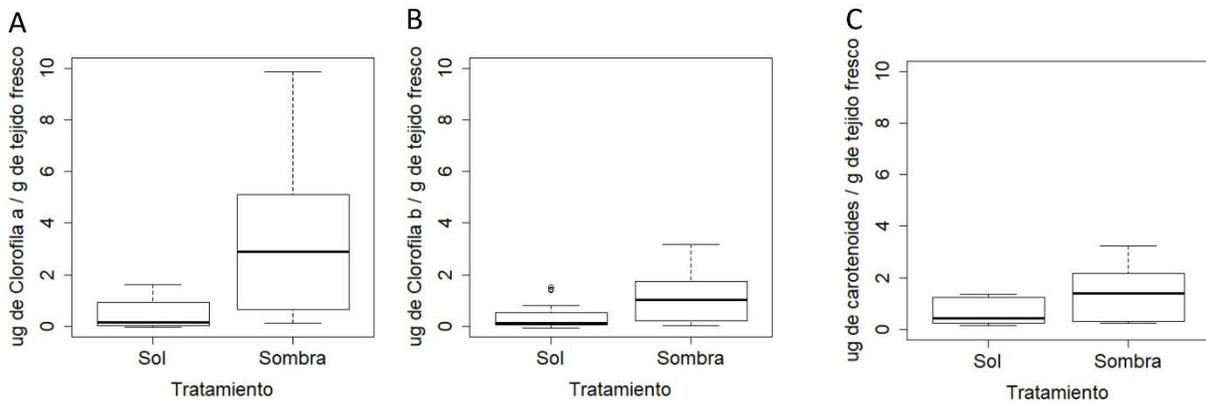


Fig. 36. Comparación de los pigmentos fotosintéticos en tallos de pitahaya sometidos a tratamiento al sol y a la sombra. A. Clorofila a. B. Clorofila b. C. Carotenoides totales.

Al comparar la concentración de pigmentos fotosintéticos en las diferentes zonas de tejido evaluadas como se observa en la Fig. 37, se encontró el mismo patrón tanto en los tallos bajo el tratamiento al sol como en los a la sombra. La cumbre del tallo fue el que tuvo una mayor cantidad de clorofila a (para tallos al sol: $H = 11.84$, g.l. = 2, $p < 0.01$; para tallos a la sombra: $H = 17.36$, g.l. = 2, $p < 0.01$), de clorofila b (para tallos al sol: $H = 5.88$, g.l. = 2, $p < 0.01$; para tallos a la sombra: $H = 17.47$, g.l. = 2, $p < 0.01$), y de carotenoides (para tallos al sol: $H = 16.65$, g.l. = 2, $p < 0.01$; para tallos a la sombra: $H = 19.28$, g.l. = 2, $p < 0.01$). La corteza tuvo una concentración intermedia y la médula del tallo fue la zona que tuvo la menor concentración (las concentraciones se muestran en la Fig. 37).

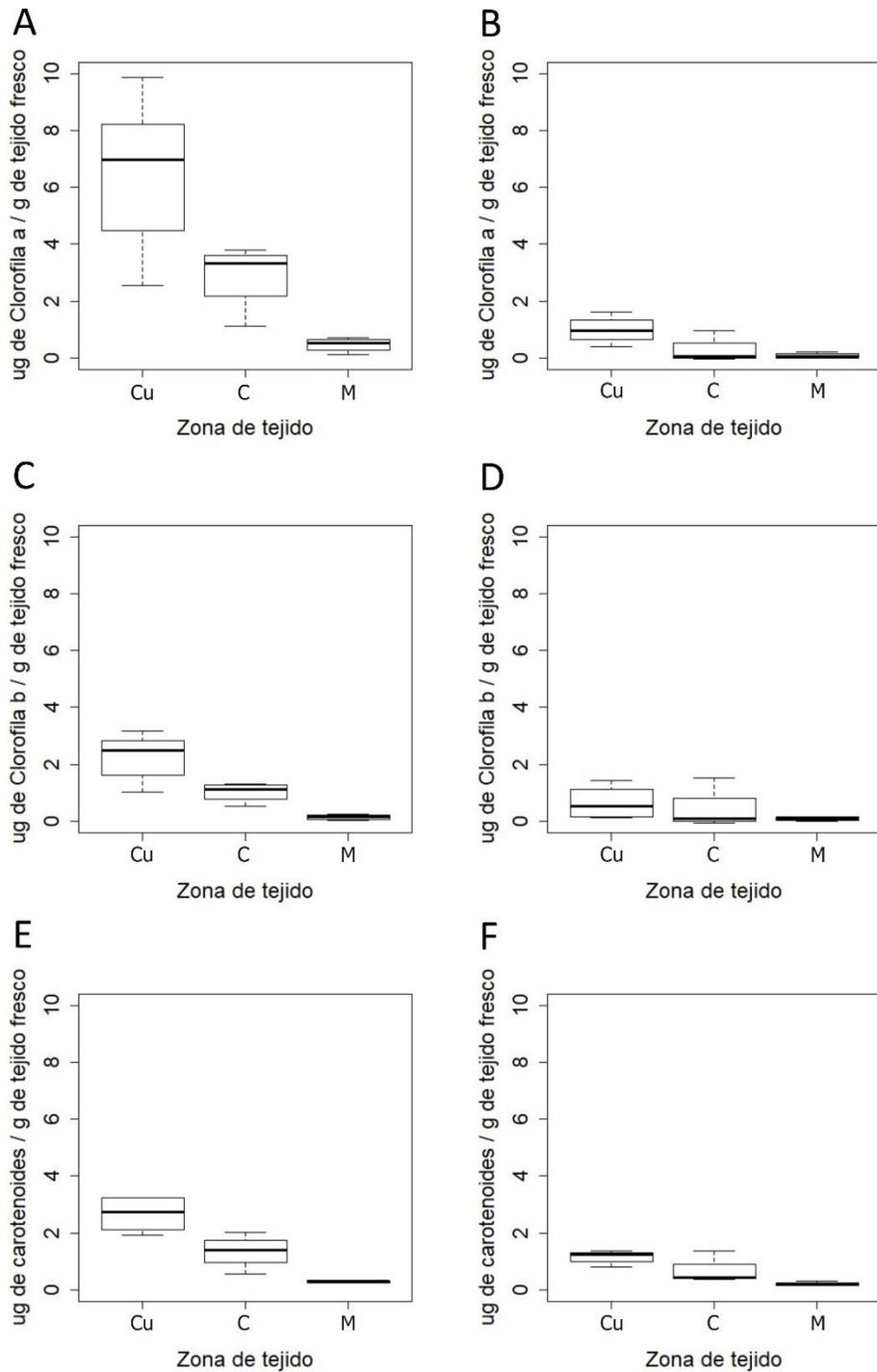


Fig. 37. Comparación de los pigmentos fotosintéticos en la cumbre (Cu), corteza (C) y médula (M) de tallos de pitahaya. Las figuras de la columna de la izquierda corresponden a los tallos sometidos a tratamiento al sol y las figuras de la columna de la derecha corresponden a los tallos sometidos a tratamiento a la sombra. **A y B.** Clorofila a. **C y D.** Clorofila b. **E y F.** Carotenoides totales.

12. Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.

Al comparar el número de botones florales de los tratamientos al sol y a la sombra, el 5 de abril del 2018, al final del periodo de evaluación de los tratamientos, no se encontró diferencia ($Z = 460$, $p = 0.88$) (Fig. 38). El número de frutos por planta tampoco varió al comparar ambos tratamientos ($Z = 480$, $p = 0.62$) (Fig. 39).

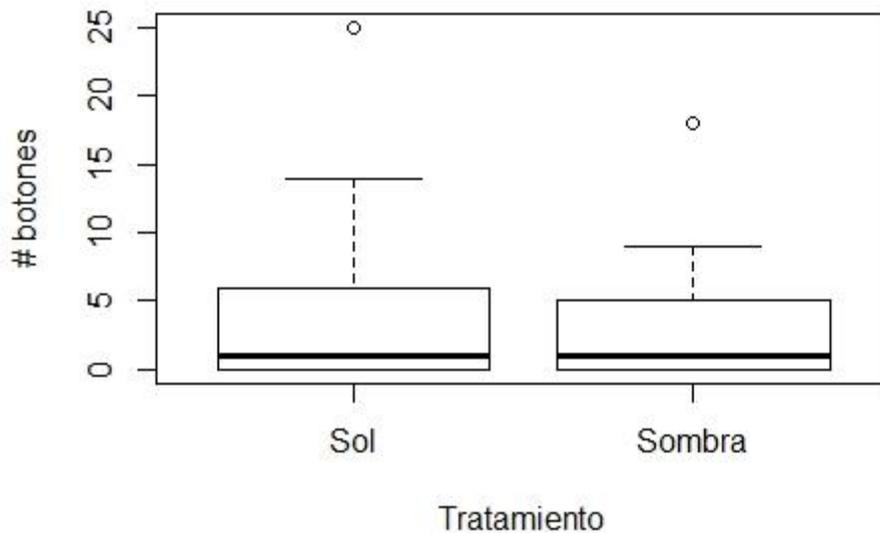


Fig. 38. Comparación del número de botones florales por planta de pitahaya el 5 de abril del 2018, al final del tratamiento al sol y a la sombra.

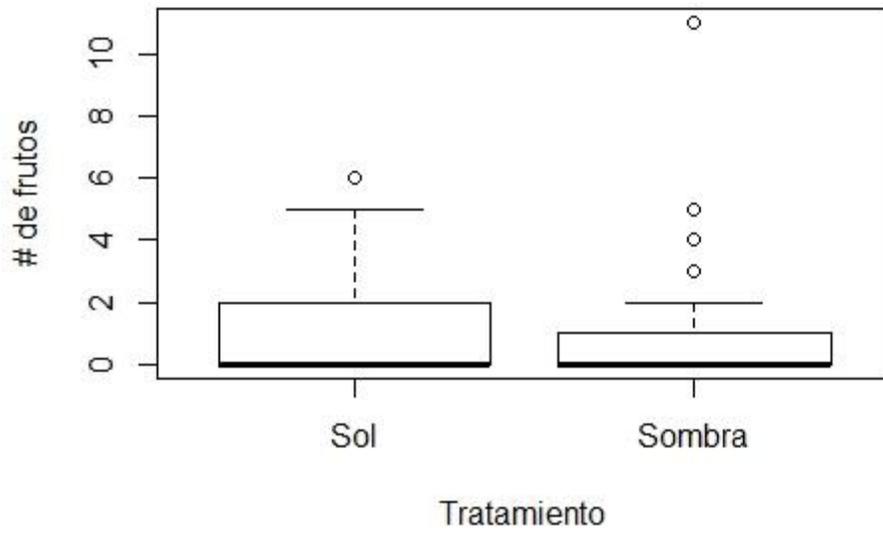


Fig. 39. Comparación del número de frutos por planta de pitahaya el 5 de abril del 2018, al final del tratamiento al sol y a la sombra.

IV. CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

1. Factores abióticos.

Es comprensible haber observado que los factores abióticos, como el porcentaje de humedad relativa (Fig. 3) y la temperatura (Fig. 4) del aire, no variaron con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra debido a que el tamaño relativamente pequeño de las casas de sarán construidas, de aproximadamente 10 m de largo, 4 m de ancho y 3 m de alto, y debido a que el sarán tiene una estructura porosa que permite el intercambio constante con el ambiente externo a las casas de sarán, y con ello se mantiene un equilibrio atmosférico. Esto fue muy conveniente para el desarrollo del experimento porque la única variable que cambió fue entonces la calidad de la luz, por lo que los resultados se podrían atribuir únicamente a esta condición.

En la literatura se han reportado diferentes resultados en las mediciones de temperatura en plantas bajo diferentes tratamientos de sombreado que respaldan estos hallazgos. Por ejemplo, no se encontró diferencia en el porcentaje de humedad relativa entre diferentes tratamientos a la sombra aplicados a plantas de maíz, soya y trigo (134). Además, en un experimento con *S. megalanthus* y con *H. polyrhizus* bajo diferentes tratamientos de sombreado al 30, 60 y 90 % no se encontró diferencia en la temperatura del aire entre los diferentes tratamientos (81,134).

Como era de esperar, las plantas que estaban bajo el tratamiento a la sombra con sarán al 50 % recibían una menor cantidad de PAR (Fig. 5) y de radiación solar total (Fig. 6), casi un 25 % menos, comparado con las plantas que se encontraban expuestas a la radiación solar directa. Esto va acorde con lo que se ha reportado en la literatura para diferentes especies, entre ellas *Hylocereus undatus* y *S. megalanthus* (28,29,134).

2. Parámetros de color superficial en los cladodios de pitahaya.

El color es un fenómeno de percepción que depende tanto de las condiciones ambientales y físicas del tiempo y espacio de la observación, como del observador

(135). En las mediciones científicas, para evitar interpretaciones subjetivas del color observado, se emplean mediciones precisas de las longitudes de onda reflejadas contra una superficie con equipo como, por ejemplo, colorímetros, que se basan en el sistema CIE modificado, que se conoce como CIELAB y mide las coordenadas L^* , a^* , b^* para caracterizar el color medido (136).

De acuerdo con los conceptos empleados por el sistema CIE, la percepción del color en el caso de los humanos se lleva a cabo gracias a tres receptores del ojo humano que permiten percibir el rojo, el verde y el azul, cuyas combinaciones producen toda la gama de colores que podemos percibir dentro del espectro electromagnético de luz visible (135).

En la literatura se ha reportado que los tallos de pitahaya bajo altos niveles de radiación solar sufren de un amarillamiento de los cladodios, que en altos niveles pueden generar quemaduras solares. Dichos síntomas pueden ser revertidos al aplicar un porcentaje a la sombra a las plantas. La tendencia es que entre mayor sea la sombra bajo la cual se encuentran las plantas, más oscuro va a ser la tonalidad de verde de los cladodios, y menor van a ser las tonalidades amarillas de éstos (29). Por ello, es comprensible que se encontrara que los cladodios de las plantas bajo el tratamiento a la sombra tuvieran menores valores de L^* , comparadas con las que estaban expuestas directamente a la radiación solar, ya que este parámetro mide la luminosidad, por lo que entre menor sea el valor de L^* más oscura es la tonalidad medida (Fig. 7) (136).

En cuanto a los valores de a^* , que representa el cambio de tonalidades verdes a rojizas, entre menor sea el valor de a^* más verde es la tonalidad de la muestra, por lo que es congruente que las muestras de cladodios a la sombra tengan valores de a^* menores que los cladodios bajo el tratamiento al sol (Fig. 8) (136). El parámetro b^* representa el cambio de tonalidades azules a amarillas. Entre mayor sea el valor de b^* , más amarilla va a ser la tonalidad de la muestra medida. Debido a esto, los cladodios del tratamiento al sol tuvieron un valor de b^* mayor que los cladodios de las plantas bajo el tratamiento a la sombra (Fig. 9) (136).

El mayor amarillamiento de los cladodios sometidos al tratamiento al sol con respecto a los cladodios sometidos al tratamiento a la sombra es probable que se deba a la degradación de la clorofila producida por el exceso de radiación solar sobre los cladodios, como se ha reportado en *Illicium* spp. (Schisandraceae) (137) y en *H. polyrhizus* (29). Los resultados obtenidos en esta investigación respaldan esta hipótesis. Como se puede observar en la Fig. 36 y Fig. 37 las plantas sometidas al tratamiento a la sombra tuvieron una mayor concentración de clorofila a, clorofila b, y carotenoides que las plantas bajo el tratamiento al sol.

El hallazgo donde los parámetros $L^*a^*b^*$ tenían un valor mayor en las plantas al sol comparado con las plantas a la sombra en todos los puntos cardinales muestreados (Fig. 7, Fig. 8 y Fig. 9), al haber tomado las muestras del cladodio plagiotrópico que se encontrara más cercano al punto cardinal, y de la zona que se encontrara perpendicular al sol cenital, es de esperar que los diferentes puntos cardinales se encontraran bajo las mismas condiciones de incidencia de radiación solar, por lo que la única variación fue el punto cardinal de muestreo.

Puede ser que los hallazgos encontrados se deban a la latitud en que se encuentra Costa Rica. Debido a que Costa Rica se encuentra entre la latitud 9.7489166 y la longitud -83.7534256 (138). Al encontrarse muy cerca del Ecuador, los rayos solares que inciden sobre el territorio costarricense lo hacen de forma casi perpendicular, de forma directa, lo que provoca que estos rayos tengan que cruzar a través de un área de la atmósfera terrestre menor que si lo hicieran de forma aguda u obtusa con respecto al plano incidente en la tierra, como ocurre en latitudes alejadas del ecuador (139). Debido a esto es de esperar que los rayos solares incidentes se distribuyan de forma homogénea a lo largo del día, independientemente del punto cardinal empleado en el muestreo.

El índice de abundancia de color amarillo (YI) indica el grado de abundancia en la medición y el ángulo de Hue (h^*) indica la diferencia de cierto color con respecto al color gris en la misma luminosidad que se ha empleado en la evaluación de parámetros de color en vegetales verdes (115). Un ángulo de Hue de 90° representa al amarillo, 180° al verde, 270° al azul y 0° y 360° representa al rojo (140).

Sin embargo, para la comparación entre el amarillamiento de los cladodios de pitahaya según el tratamiento, si bien se esperaba encontrar un YI que fuera mayor en el tratamiento al sol que en el tratamiento de sombra en todos los puntos cardinales, no hubo diferencias entre los tratamientos en los puntos cardinales norte y oeste, pero sí en los puntos cardinales este y sur, en los cuales el parámetro YI el tratamiento al sol fue ligeramente mayor al de sombra (Fig. 10).

Quizá esto se deba a que este parámetro se ha empleado para la medición de líquidos o superficies casi blancas (115,141), mientras que los cladodios de la pitahaya, independientemente del tratamiento, tuvieron un componente verde producido por la clorofila así como un componente rojo producido por los carotenoides (115). Puede que b^* y L^* en este caso del parámetro YI , puedan producir variaciones que impiden la diferenciación de la abundancia del color amarillo entre los tratamientos (136,142,143). Por esto, puede que YI no sea un parámetro adecuado para medir el amarillamiento de cladodios de pitahaya.

Tampoco se encontró diferencia al emplear h^* en los puntos cardinales norte, sur, y este, pero sí se encontró diferencia en el punto cardinal oeste, en el cual el h^* del tratamiento a la sombra fue ligeramente mayor que el tratamiento al sol (Fig. 11). Sin embargo, este parámetro tuvo un comportamiento muy similar en todos los casos. Como se observa en la Fig. 11, los valores de h^* están en todos los casos cercanos a 1.2 radianes, representaron ángulos cercanos a 70° , que se encuentra dentro del cuadrante II del plano del ángulo de Hue (140). Esto indica el color de los cladodios, los cuales en éste caso, están compuestos por tonalidades verdes y amarillas principalmente (144).

Es importante que, si bien h^* tuvo un valor muy cercano en todos los puntos cardinales (excepto el oeste) independientemente del tratamiento, esto solamente indica el color general de los cladodios, no el grado de amarillamiento. Por lo que, puede ser un parámetro de poca relevancia para estudiar el amarillamiento de los cladodios de pitahaya.

En el caso del punto cardinal oeste, que fue el único en el que se encontró una variación entre el tratamiento al sol y a la sombra, con un ángulo de Hue ligeramente

mayor en el tratamiento a la sombra que en el al sol, se podría pensar que estos cladodios a la sombra tenían un color ligeramente más amarillo que los cladodios al sol. Sin embargo, esto, que puede parecer contradictorio debido a que los cladodios a la sombra tuvieron el parámetro b^* menor al de los cladodios al sol. Lo anterior parece indicar que los cladodios a la sombra eran menos amarillos que los cladodios al sol. Implica que la diferencia radica en el parámetro a^* , ya que los tallos a la sombra tuvieron un color verde más oscuro y por ello tuvieron un valor a^* menor al de los cladodios al sol. Esta variación en a^* fue, posiblemente, la que provocó la diferencia encontrada en los cladodios del punto cardinal oeste.

3. Análisis de Componentes Principales (PCA).

Las primeras dos dimensiones generadas con el análisis de PCA (Fig. 12) tomaron en cuenta las variables abióticas que difirieron entre los tratamientos al sol y a la sombra (PAR), las variables de color que variaron entre los tratamientos (L^* , a^* , b^*) y el porcentaje de cristales de CaOx. Estas dos dimensiones explicaron el 76.5% de la varianza de las variables que formaron parte de esta investigación (Fig. 13 y Fig. 14), lo cual representa un porcentaje muy significativo de la varianza de estas variables.

Los resultados de las interacciones de las variables que componen las primeras dos dimensiones del PCA con respecto a los tratamientos al sol y a la sombra (Fig. 15) mostraron que existió diferencia entre los tratamientos, ya que hubo una porción importante de los datos que no se traslapan entre las dos dimensiones analizadas.

Con respecto a las interacciones de las variables que componen las primeras dos dimensiones del PCA con respecto a las zonas de tejido analizadas (Fig. 16), estas también mostraron que la cumbre se diferencia muy bien de la corteza y la médula. Además, es evidente que la corteza y la médula tuvieron una proporción de datos que se traslapaban, por lo que no existe una diferenciación tan clara.

En cuanto a las interacciones de las variables que componen las primeras dos dimensiones del PCA con respecto a los puntos cardinales en los que fueron recolectadas las muestras (Fig. 17), se evidenció un traslape de todos los puntos

cardinales. Esto confirma que no hubo diferencias importantes entre los diferentes puntos cardinales.

Este análisis mostró el comportamiento general de las variables analizadas en este estudio. Cada una de estas se analizaron de forma específica en las secciones posteriores para respaldar de forma estadística las diferencias encontradas entre cada una de estas.

4. Características histológicas y citológicas de los cladodios de pitahaya.

Las características histológicas y citológicas de los diferentes tejidos que componen el tallo de la pitahaya han sido pobremente descritas en la literatura. Sólo se han caracterizado la morfología macroscópica de las plantas y, en el caso de *Stenocereus* spp., se ha mencionado su densidad estomática y el grosor de su cutícula (64). Por ello, la descripción realizada en esta investigación es la primera descripción de la histología y citología de los cladodios de *H. costaricensis*.

Esta descripción es congruente con lo que se espera encontrar en una Cactaceae. La gruesa capa de cutícula cerosa observada (Fig. 18 A) se ha reportado como una característica morfológica de *H. costaricensis* a nivel macroscópico (43,81), y las hace más tolerantes a altos niveles de radiación solar, comparado con otras especies del género que no poseen esta capa, y también ayuda a prevenir la pérdida de agua del interior. En la epidermis resulta llamativa la formación de crestas, en cuyos valles se encuentran los estomas (145).

La capa de células estratificadas subepidérmicas, llamada hipodermis (124), al tener una pared celular muy engrosada (Fig. 18 A), como también se ha reportado en *Opuntia undulata* (Cactaceae) (123) y en *Polaskia chichipe* (Cactaceae) (124). Esto parece indicar que son células especializadas para la protección contra factores bióticos de herbivoría y patogénicos. Esto se respalda en la literatura, ya que esta función protectora se ha reportado en otras especies, como *Physcomitrella patens* (Funariaceae), en la cual se encontró que la planta producía engrosamiento de su pared celular ante el ataque de hongos que tratan de infectar a la planta (146), y en *Maihuenia* (Cactaceae) para prevenir la pérdida de agua (147).

Las características histológicas de la corteza del parénquima observadas son congruentes con las reportadas para otras Cactaceas como *Mamillaria* (145), que está compuesta principalmente por células con escaso contenido citoplasmático debido a su gran vacuola especializada en el almacenamiento de agua y, en menor grado por células mucosas (Fig. 18 B). Estos tipos de células también se encuentran en la médula del cladodio, con la diferencia que en esta zona aumenta el número de las células mucosas (Fig. 18 C) como se ha reportado en *Polaskia chichipe* (Cactaceae) (124).

5. Morfologías, composición elemental y estados de hidratación de cristales de CaOx encontrados en los cladodios de pitahaya.

El marcaje de los cristales de CaOx se llevó a cabo de la manera correcta con la técnica de Von Kóssa, esto se evidencia con los controles positivos y negativos para CaOx (Fig. 19). Además, el análisis de imágenes automático con el programa ImageJ logró identificar las masas de cristales y cuantificar su área bidimensional (Fig. 20).

La mayor parte de las morfologías encontradas en los cladodios de la pitahaya se han reportado en la literatura. Los cristales aciculares o rafidios (Fig. 21 A y B y Fig. 25 A) se han reportado en *Weberocereus biolleyi* (Cactaceae) (6), en *Eichhornia* (Pontederiaceae) (148), en *Xanthosoma sagittifolium* (Araceae), en *Psychotria punctate* (Rubiaceae) (149,150), en *H. costaricensis* (69), entre otras especies. Normalmente, estos cristales tuvieron diámetros de entre 2 a 4 μm y un largo entre 10 a 80 μm y se ha reportado que se encuentran compuestos por oxalato de calcio monohidrato (6) o whewellita (148). Se han reportado rafidios que se encuentran agrupados (6). El análisis de la composición elemental de los rafidios respalda que los cristales están compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio (Fig. 25 A - B), y que el estado de hidratación del CaOx que los componen es el monohidrato o whewelita (Fig. 25 C) (129–133).

Los cristales prismáticos romboides o cuadrados (Fig. 21 C y D) y los cristales prismáticos rectangulares tetragonales (22 A y B), se pueden encontrar solos (Fig. 22 A) o en grupos (Fig. 22 B), así como se ha reportado en *Lemna perpusilla*

(Lemnaceae) (151), en *Capsicum annuum* (Solanaceae) (152) y en *H. costaricensis* (69), en donde se encontraron cristales de CaOx solitarios y en grupos. Estos también estaban compuestos por oxalato de calcio monohidrato (6) o whewellita (148). El análisis de la composición elemental de los cristales prismáticos romboides o cuadrados muestra que los cristales están compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio, y que el estado de hidratación del CaOx que los componen es el monohidrato o whewellita (Fig. 25 D - I) (129–133).

Dentro de la revisión bibliográfica no se encontró mención sobre la presencia de drusas en proceso de formación, probablemente porque este proceso se visualiza mucho mejor en microscopía de luz por medio del marcaje con Von Kóssa (Fig. 21 E y 23 B). Con esta técnica se puede observar los idioblastos con diferentes niveles de llenado de cristales de CaOx en su interior. Aparentemente la precipitación de cristales comienza en la periferia del idioblasto, y puede darse en diferentes puntos de ésta al mismo tiempo (Fig. 21 E). Esto podría deberse a que dentro de la cámara del idioblasto hay un ambiente propicio para la formación de los cristales de CaOx, pero los precursores deben ingresar a través de la membrana celular del idioblasto. Probablemente cuando ingresa el último componente necesario para formación del CaOx, se desencadena el proceso de nucleación en la zona próxima a su ingreso por la membrana celular. Este luego se extiende por la periferia y comienza a expandirse hacia el centro del idioblasto conforme se va agrandando el cristal. El análisis de la composición elemental de las drusas en proceso de formación muestra que los cristales están compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio (Fig. 25 J y K), y que el estado de hidratación del CaOx que lo componen es el dihidrato o weddellita (Fig. 25 L) (129–133).

Las drusas fueron las que presentaron una mayor diversidad de morfologías. En términos generales se ha reportado que las drusas están compuestas por cristales de CaOx dihidrato (6). La morfología clásica de las drusas se asemeja a una flor cristalina con disposición simétrica de sus apéndices (5,148), y puede medir de 40 μm (148) hasta 70 μm de diámetro (6). Sin embargo, no se observaron drusas con esta morfología. Basado en la definición de drusa, la cual es una aglomeración de

cristales, se propone entonces designar las nuevas morfologías como drusas, aunque no coincidan con las formas clásicas.

Algunas de las morfologías encontradas, ya han sido reportadas por la literatura para otras especies distintas a *H. costaricensis*. Las drusas compactas (Fig. 22 C) se han reportado con una morfología muy similar a la observada en *Gymnocallycium platense* (Cactaceae) (153). Las drusas formadas por cristales prismáticos tetragonales se han reportado en *Brachycereus nesioticus* (Cactaceae) (6). El análisis de la composición elemental de las drusas compactas muestra que los cristales están compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio (Fig. 25 P y Q), de igual forma en el caso de las drusas compuestas por cristales prismáticos tetragonales (Fig. 25 N y O). En ambos casos el estado de hidratación del CaOx es dihidrato o weddelita (Fig. 25 O y R) (129–133).

Hasta donde se conoce, las drusas tipo laberinto (Fig. 22 E) no están reportadas en la literatura relacionada con el género. El reporte más cercano incluye a *Selenicereus grandiflorus* (Cactaceae) (6), donde son denominadas por los autores como drusas formadas por cristales tetragonales, debido a que son cristales prismáticos rectangulares tetragonales. Sin embargo, se observó que su núcleo no estaba completamente denso, como normalmente se observan en cristales prismáticos tetragonales, sino que tenían un contenido interno heterogéneo (6). Las drusas tipo laberinto observadas en este trabajo mostraron por su parte una estructura geométrica interna de láminas de cristales de CaOx que formaban ángulos de 90° de forma reiterativa y el centro de dichas láminas se observaban aparentemente hueco (Fig. 22 E). El análisis de la composición elemental de las drusas tipo laberinto mostró que los cristales también estaban compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio (Fig. 25 S y T), y el estado de hidratación encontrado fue CaOx dihidrato o weddellita (Fig. 25 U) (129–133).

La última morfología de drusa observada fueron las drusas amorfas de cristales de CaOx, que no tenían ningún tipo de forma geométrica específica, sino que se

asemeja a una masa heterogénea que no se encuentra reportada en la literatura consultada. La morfología reportada en la literatura que más se asemeja a la drusa amorfa son los cristales puntiformes o cristales en arena; sin embargo, estas son aglomeraciones no tan compactas como las drusas amorfas y, según lo reportado en la literatura, cada cristal individual tuvo una morfología de polígono con vértices (5,148). Una morfología similar también se ha reportado con el término de drusas esféricas; sin embargo, de igual forma, los cristales individuales que componen estas drusas son polígonos que tienen algunos de sus extremos puntiagudos similares a los vértices de un triángulo (6). El análisis de la composición elemental de las drusas amorfas mostró que los cristales estaban compuestos por Ca, C, y O, que son los elementos que componen el oxalato de calcio (Fig. 25 V y W), y su estado de hidratación del CaOx fue dihidrato o weddellita (Fig. 25 X) (129–133).

También se encontraron cristales individuales inmersos en una organela (Fig. 24). Estos cristales fueron Von Kóssa positivos, por lo que es muy probable que sean cristales de oxalato de calcio. Sin embargo, al estar inmersos en una matriz orgánica, al observarlos en SEM, sólo se visualizó la membrana de la organela y no su contenido, por lo que el análisis elemental de este cristal no se pudo realizar. Para realizar este análisis se debe realizar el estudio con rayos X en un corte nanométrico en TEM. Este tipo de cristales tampoco se pudieron observar en espectroscopia RAMAN, por las mismas razones antes mencionadas.

Algo sobresaliente acerca de la diversidad de morfologías encontradas para las drusas es que, las drusas clásicas en forma de flor (5,148) tienen una forma muy simétrica, al igual que las drusas compactas (Fig. 22 C), y las drusas tipo laberinto (Fig. 22 E). Esto puede sugerir que durante la biosíntesis o ensamblaje de los cristales de CaOx que forman la drusa, su crecimiento se da de forma ordenada, dirigida y precisa, para que así se lleve a cabo la formación de ángulos tan perfectos como los observados en la drusa tipo laberinto.

Sin embargo, de forma antagónica, al observar las drusas de cristales prismáticos tetragonales (Fig. 22 D), y las drusas amorfas (Fig. 22 F), la simetría y el orden se pierden por completo. Esto sugiere que, en el caso de las drusas amorfas, la

biosíntesis de los cristales de CaOx ocurre de forma desordenada, y el ensamblaje de estos dos tipos de drusa parece que ocurre de forma azarosa, sin ningún orden aparente.

En la literatura se reporta que las matrices intravacuolares, como las cámaras de cristales de los idioblastos, son estructuras importantes para determinar la forma y el tamaño del crecimiento de los cristales de CaOx. Estas cámaras de cristales de los idioblastos forman compartimentalizaciones internas de monocapas de lípidos y polisacáridos que limita el espacio en el que el cristal puede desarrollarse (4). Dependiendo de estas compartimentalizaciones, así el cristal individual puede tomar una u otra forma y tamaño.

Se han reportado diferentes proteínas asociadas a los cristales y a su biosíntesis. Sin embargo, no existe una descripción precisa del papel que desempeñan (4). Puede que algunas enzimas promuevan la formación de cristales simétricos, con formas geométricas como los cristales prismáticos encontrados en *H. costaricensis*, y que haya otras enzimas que promuevan la formación de cristales amorfos, como en el caso de las drusas amorfas encontradas en *H. costaricensis*. Así mismo, es posible que sea una enzima o un grupo de enzimas las que siempre intervengan en la biosíntesis del CaOx y dependiendo de las condiciones internas del idioblasto, puedan cambiar su funcionamiento para formar cristales amorfos o geométricos.

Con respecto al ensamblaje de las drusas, dentro de la revisión bibliográfica no se encontró ninguna referencia que explique exactamente cómo se lleva a cabo su proceso de ensamblaje. Si se analiza detenidamente de forma lógica la drusa de cristales prismáticos tetragonales (Fig. 22 D) y se plantea la pregunta ¿Las drusas se forman por el ensamblaje de miles de cristales individuales? La respuesta más probable es que sí se forman por el ensamblaje de cristales individuales, ya que se pueden observar en la superficie muchos cristales prismáticos tetragonales que están unidos a un núcleo.

Sin embargo, al analizar la drusa tipo laberinto (Fig. 22 E) y se plantea la misma pregunta, la respuesta más lógica es ser negativa, que no se forman a partir de cristales individuales. Debido a que, en caso de ser una respuesta positiva,

implicaría que las láminas de CaOx o los cubículos del laberinto observado tienen que desplazarse una distancia determinada para poder ensamblarse y formar la drusa. El desplazamiento micrométrico de láminas de más de 50 μm de largo a nivel celular resulta muy poco probable. En este caso, parece más lógico que la drusa se formara a partir de un punto de nucleación específico, y que a partir de este la drusa crezca paulatinamente hasta formar este tipo de morfología de laberinto.

Si el crecimiento de las drusas se lleva a cabo dentro de un idioblasto, puede que las proteínas de membrana que regulan el transporte de los precursores necesarios para la formación del CaOx, como el ascorbato y el Ca, del espacio intercelular hacia dentro del idioblasto, pueden intervenir en la formación de cristales de CaOx en una morfología determinada dependiendo de su concentración (4,149).

Ahora si bien, como se mencionó anteriormente, dentro de la cámara de cristales del idioblasto hay compartimentalizaciones que aparentemente limitan el crecimiento de los cristales de CaOx y determinan su morfología. Es difícil concebir que existan compartimentalizaciones tan complejas que tengan una morfología interna de tipo laberinto para que determinen este tipo de forma. Es posible que intervengan otros factores físicos y enzimáticos que colaboren a la formación de este tipo de drusas.

6. Cuantificación de cristales de CaOx en tallos de pitahaya y su posible relación con la concentración de clorofila y los carotenoides.

Al comparar el porcentaje del área bidimensional de cristales de CaOx con respecto al área total de las microfotografías a X200, el tratamiento que tuvo mayor área con cristales de CaOx fue el tratamiento a la sombra (Fig. 26). Este resultado contradice la hipótesis inicial, que suponía que el tratamiento de exposición al sol iba a tener una mayor cantidad de cristales de CaOx debido a que el estrés generado por el exceso de radiación lumínica que provocaba el aumento en la síntesis de CaOx para aumentar las defensas de la planta contra factores bióticos y abióticos, así como lo reportó Retana-Sánchez (154) y lo han postulado otros autores (5,6,148).

Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo parecen respaldar los resultados obtenidos por Tooulakou et al. (59), en donde se relaciona la biosíntesis de CaOx con la fotosíntesis. Se propone que el CaOx puede ser una molécula cuya función alternativa es la reserva de carbono para la planta (59). En ese sentido, las plantas a la sombra, como ya se indicó en la sección de análisis de factores abióticos, eran más verdes, por lo que se espera que tengan mayor concentración de clorofila en sus cladodios, lo que le permite tener mejores condiciones para fotosintetizar y formar así moléculas de reserva energética que las plantas sometidas al tratamiento al sol, que tuvieron cladodios más amarillos, con menos clorofila disponible para fotosintetizar.

La primera parte de esta premisa se comprueba con los resultados obtenidos en la cuantificación de clorofila en plantas al sol y a la sombra. Como se observa en la Fig. 36, los cladodios sometidos al tratamiento de sombra tuvieron mayor concentración de clorofila a, clorofila b, y carotenoides totales, comparado con los cladodios sometidos al tratamiento al sol. En el caso de las clorofilas, lo anterior se ha reportado en *Fagus sylvatica* (Fagaceae) (155), en *Tetrastigma hemsleyanum* (Vitaceae) (156), en *S. megalanthus* y en *H. polyrhizus* (Cactaceae) (81). En el caso de los carotenoides, además de participar como molécula fotorreceptora para la fotosíntesis, también desempeñan un papel importante en la protección del aparato fotosintético durante la exposición a niveles de radiación solar peligrosos (157,158).

Por ello, es de esperar que las plantas a la sombra, que tuvieron un color más verde, mayor concentración de clorofila, y mayor concentración de carotenoides, se encuentren mejor adaptadas para realizar el proceso de fotosíntesis que las plantas al sol. Si una de las funciones del CaOx es de almacenamiento de carbono, como lo proponen Tooulakou et al. (59), es comprensible que las plantas de pitahaya a la sombra tuvieran una mayor concentración de CaOx que las plantas expuestas al sol, debido a que, como tienen mejores condiciones para fotosintetizar, pueden hacerlo de mejor manera, y producir más moléculas de almacenamiento energético.

Al comparar el porcentaje del área bidimensional de cristales de CaOx con respecto al área total de las microfotografías a X200 de acuerdo con la zona del tejido

analizado, se obtuvo que la cumbre fue la zona que tuvo un mayor porcentaje de CaOx, seguido de la corteza, y finalmente de la médula en el caso del tratamiento a la sombra (Fig. 27). Sin embargo, el tratamiento al sol no siguió exactamente este patrón (ver Cuadro 5). La tendencia general de las zonas de tejido del tratamiento a la sombra siguió la misma tendencia que la concentración de clorofila y de carotenoides por zona, donde la cumbre tuvo la mayor concentración de clorofilas y carotenoides, seguido de la corteza y por último la médula (Fig. 37).

Esto puede tener la misma explicación mencionada anteriormente: la cumbre y la corteza tuvieron una mayor concentración de clorofila y carotenoides, por lo que tuvieron una mayor tasa fotosintética que la médula que tuvo la menor concentración de clorofila y carotenoides. Por ello, si el CaOx es una molécula de almacenamiento de carbono, es comprensible que se biosintetice más en las zonas que tengan mayor concentración de clorofila y carotenoides. De forma similar a como Tooulakou et al. (59) encontró una mayor biosíntesis de CaOx en las plantas de *A. thaliana* con mayor fotorrespiración.

Un punto sobresaliente es que sea la zona de la cumbre de la costilla del cladodio, que es la zona más alejada del haz vascular central del cladodio, la que tuviera el mayor porcentaje tanto de clorofila, como de carotenoides y de CaOx. El porcentaje que alcanzó en las plantas a la sombra, como se puede observar en la Fig. 27, fue de más de un 8 % del área total de la imagen a 200X. Si se toma en cuenta que la mayor parte del volumen citoplasmático, y por ende histológico, es agua o mucílago, lo cual se observa muy bien en la Fig. 18, en donde las células del parénquima están casi vacías, debido a que su contenido se pierde durante el procesamiento histológico, que un 8 % del total del área sea CaOx es muy sobresaliente. Esto podría significar que el CaOx es uno de los metabolitos secundarios que más se biosintetizan en *H. costaricensis*.

En la literatura se ha reportado en cormos de *Colocasia esculenta* (Araceae) que menos del 0.2% del peso fresco de los cormos está constituido por oxalatos solubles e insolubles (159). En *Lemna minor* (Araceae) se reportó que el peso fresco de la planta está compuesto por un porcentaje menor al 0.5% de CaOx (160).

Comparando estos resultados con el 8% encontrado del área por microfotografía de la zona de la cumbre, sugiere que *H. costaricensis* probablemente produce más cristales de CaOx dentro de esta zona de sus cladodios, que los reportes de *C. eszzlenta* y *L. minor*.

Debido a lo anterior, puede que los resultados reportados por Retana-Sánchez (154) no se deban necesariamente a la diferencia de exposición solar, en donde no se mencionan las condiciones abióticas de las plantas que estaban expuestas a pleno sol ni de las plantas que estaban bajo porcentajes a la sombra. Puede que esta diferencia encontrada en los porcentajes de concentración de calcio se deba a una respuesta de defensa contra la enfermedad de la mancha blanca, que se cree que se produce por un desbalance fisiológico de minerales, o a algún otro factor abiótico o biótico distinto a la radiación lumínica. Por ejemplo, en *Sida rhombifolia* (Malvaceae) se ha reportado el incremento en la concentración de cristales de CaOx en hojas de plantas que fueron sometidas a herbivoría (161). Un reporte similar se dio en *Pancratium sickenbergeri* (Amaryllidaceae) (162). En cacao se ha reportado el incremento de cristales de CaOx en tejidos infectados por *Moniliophthora perniciosa* (163).

Es importante dejar claro que la función propuesta, de la participación del CaOx como molécula almacenadora de carbono, no excluye las otras funciones que se han propuesto para este compuesto como la participación de esta molécula en la regulación interna de calcio (3,5,27,95). El CaOx, fisiológicamente y osmóticamente inactivo, puede ser acumulado en tejidos maduros, o en órganos en desarrollo (5) para dar rigidez a la pared celular primaria y secundaria (5) y para la protección mecánica de la planta contra herbívoros (5,96). Por lo tanto, el CaOx es un compuesto con diferentes funciones simultáneas que intervienen en la fisiología y en los sistemas de defensa de las plantas.

En la cresta superior del borde de las costillas de los cladodios, que en este estudio se llamó “cumbre”, es la zona más expuesta ante posibles ataques de herbívoros. La cumbre fue la zona en donde hubo una mayor abundancia de cristales de CaOx. Esto sugiere que, además de ser un compuesto que interviene en la reserva de

carbono en la planta, tener una función de protección contra la herbivoría en el cladodio (5,96).

Con respecto al tratamiento al sol, si bien la cumbre tuvo un mayor porcentaje de cristales de CaOx que la corteza y la médula, como en el tratamiento a la sombra, no se encontró una diferencia significativa entre la corteza y la médula (Cuadro 5). Esto puede deberse a que el tratamiento al sol tuvo una concentración más baja de clorofila y de carotenoides que el tratamiento a la sombra (Fig. 37) y, en consecuencia, disminuyera la biosíntesis de cristales de CaOx en la corteza y la médula a una concentración tal que no se encontrara diferencia entre la corteza y la médula del cladodio.

Como se observa en el Cuadro 5, existieron algunas relaciones entre la médula del tratamiento a la sombra y la corteza del tratamiento al sol, donde no se observó diferencia significativa en cuanto al porcentaje de CaOx. El tratamiento a la sombra tuvo un mayor porcentaje de CaOx al compararlo con el tratamiento al sol; en ambos casos la tendencia fue que la corteza tuvo un mayor porcentaje con respecto a la médula. Esto, por lo tanto, sugiere que las diferencias encontradas se deben a que la médula del tratamiento a la sombra tuvo un porcentaje de CaOx muy similar a la corteza del tratamiento al sol.

Como se explicó en la sección de análisis de factores abióticos (Capítulo IV. 1.), por la posición cercana al ecuador es comprensible que no hubiera diferencia en la radiación solar incidente, independientemente del punto cardinal en que se recolectaran las muestras. Por ello es comprensible no haber encontrado diferencia en la cantidad de cristales de CaOx en ninguno de los tratamientos, en ninguno de los puntos cardinales (Fig. 28).

7. Análisis de la distribución espacial de los cristales de CaOx en el tejido caulinar.

Las áreas de los cristales encontrados por microfotografía se dividieron en cinco rangos: $[0,10[\mu\text{m}^2$ que abarca los cristales muy pequeños que se perciben en las imágenes como puntos; $[10,100[\mu\text{m}^2$ para los cristales individuales aciculares, y prismáticos pequeños; $[100,1500[\mu\text{m}^2$ para los cristales prismáticos grandes, y drusas pequeñas; $[1500,10000[\mu\text{m}^2$ y $[10000,\infty[\mu\text{m}^2$ para las drusas masivas (Fig. 33).

El no hallar diferencia significativa en el número de cristales de CaOx encontrados los tratamientos al sol y a la sombra (Fig. 29), ni en el promedio de cristales de CaOx por microfotografía (Fig. 32), indica que estos parámetros no son los indicados para realizar la comparación de la abundancia de cristales de CaOx entre los tratamientos. Los cristales tipo drusa, que son los que poseen el mayor tamaño y área, en comparación con los cristales individuales, están compuestos por cientos o miles de cristales, pero se cuantifican como un solo cristal, lo cual provocaría un sesgo en los resultados.

Como se observa en la Fig. 30, los cristales individuales con un área menor a $10 \mu\text{m}^2$ fueron los más abundantes, tanto en el tratamiento al sol como en el ala sombra, y la abundancia disminuyó conforme aumentó el área de los cristales. Esto tiene sentido debido a que, al ser los cristales dentro de este rango los más simples, son mucho más fáciles de sintetizar que una drusa compuesta por cientos o miles de cristales de CaOx.

No se encontró diferencias en el número de cristales de CaOx entre las diferentes zonas del tejido (Fig. 31), ni en el promedio del área de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido y al tratamiento al sol y a la sombra (Fig. 34). Esto sugiere que se pueden encontrar cristales de cualquier tamaño a lo largo de todo el tejido. Sin embargo, que no se encontraran diferencias significativas al comparar el promedio del área de cristales de CaOx de acuerdo con la zona de tejido puede ser un efecto de que sólo se analizaron cuatro microfotografías por zona de tejido y por tratamiento. En la Fig. 34 se puede observar que, si bien el promedio del área de

los cristales de acuerdo con la zona de tejido fue muy similar en todas las zonas, la varianza del área de los cristales de CaOx de la cumbre fue mucho mayor que la varianza de los cristales de la corteza y la médula. Puede que la diferencia entre estas varianzas no fue lo suficientemente grande para ser estadísticamente significativa debido al n tan pequeño analizado.

Como se observa en el Cuadro 6, en todos los casos, sin importar el tratamiento ni la zona de tejido analizado, los cristales tuvieron una distribución espacial agrupada. Probablemente esta distribución favorece la formación de agrupaciones de cristales o drusas de diferentes morfologías y tamaños.

8. Cuantificación de cristales de CaOx por medio del método de digestión enzimática.

Basado en los resultados obtenidos con este trabajo en cuanto a la cuantificación de CaOx por medio de la digestión enzimática con pectinasa, se puede establecer que el protocolo implementado por Viñas & Jiménez (69) no es el más adecuado para la cuantificación de los cristales en *H. costaricensis*. Lo anterior se debe a que en este protocolo se emplea un filtro de 45 μm de diámetro para separar la solución con los otros restos digeridos del tejido del cladodio del resto de detritos tisulares (Fig. 35), sin tomar en cuenta que las drusas pueden llegar a tener diámetros de más de 100 μm (Fig. 21, Fig. 22 y Fig. 23), por lo que no van a poder pasar a través del diámetro del filtro, y no se van a poder cuantificar.

Además, las drusas con un diámetro menor a 45 μm que logren atravesar el filtro pueden perderse al quedarse adheridas con la cristalería empleada o pueden quedarse en la parte superior de la centrifugación con las diferentes soluciones de sacarosa empleadas, como se observó en este trabajo.

Finalmente, en caso de que se logre corregir las fallas del protocolo, y que se establezca uno que permita la obtención de todos los cristales de CaOx, en sus diferentes morfologías y tamaños, la cuantificación realizada por medio del hemocitómetro tampoco es adecuada para cuantificar los cristales de CaOx en ninguna especie que tenga drusas. Lo anterior se debe a que, dentro del campo de

cuantificación del hemocitómetro, una drusa se cuantifica como un solo cristal, pese a que está compuesta por cientos o miles de cristales. Como no se puede determinar el número de cristales de CaOx que compone una drusa, la cuantificación obtenida sería incorrecta y no representaría bien a la concentración de cristales de CaOx por gramo de tejido.

El protocolo que se propone en esta investigación resulta adecuado para la cuantificación del CaOx en cladodios de *H. costaricensis* por medio de análisis de imágenes a nivel microscópico con la técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1). La limitación de esta cuantificación es que se realiza de forma bidimensional por medio de la comparación del área de una microfotografía cubierta por cristales de CaOx con respecto al área total de la microfotografía. Esto limita la cuantificación a nivel bidimensional, y no permite extrapolar a nivel tridimensional. Sin embargo, dentro de las ventajas que tiene el método de cuantificación que se propone es que permite determinar la ubicación a nivel tisular y celular de los cristales de CaOx y que, al realizar el análisis de cortes histológicos con rayos X en SEM y con RAMAN se puede determinar el estado de hidratación de las diferentes morfologías de los cristales de CaOx.

Otras técnicas de cuantificación, como la *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), permiten la cuantificación de metabolitos secundarios como el ácido oxálico y el CaOx. Se ha reportado la cuantificación de CaOx en *Colocasia esculenta* (159), en *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) (164), en *L. minor* (160), entre otras especies. Este tipo de cuantificación permitiría determinar la concentración de CaOx por gramo de tejido. Sin embargo, no puede determinar ni el estado de hidratación del CaOx ni la ubicación espacial de los cristales, y requiere de un equipo muy especializado, económicamente costoso y de protocolos estandarizados para llevar a cabo la cuantificación.

9. Comparación de la floración y producción de frutos de los tallos sometidos a los tratamientos al sol y a la sombra.

Como se puede observar en las Fig. 38 y 39, no hubo diferencia en cuanto a la producción de botones florales y frutos entre los tratamientos al sol y a la sombra. Es posible que no se detectara diferencia debido que el número de plantas muestreadas no tuvo el tamaño adecuado como para encontrar una diferencia estadísticamente significativa, o debido a que, para observar cambios en la producción hay que esperar un mayor tiempo con el tratamiento a la sombra, y esperar hasta dos años para observar diferencias significativas en la producción (81).

Esto se respalda en la literatura, en donde se ha reportado que el porcentaje óptimo de sombra, para obtener una producción óptima, varía dependiendo de la especie, por ejemplo, en el caso de *H. polyrhizus* el porcentaje de sombra óptimo es de 30%, mientras que para *S. megalanthus* es de 60%. *H. polyrhizus* aumentó el número de flores bajo el tratamiento a la sombra el 30% comparado con el testigo. En estos casos, ambas especies aumentaron su producción al ser cultivadas bajo el porcentaje de sombra óptima al segundo año de producción (81).

Con los resultados de esta investigación se puede concluir que, en el caso de *H. costaricensis*, el sarán de 50% de sombra protege a las plantas que se encuentran bajo la radiación solar directa durante todo el día contra quemaduras por sol y contra el amarillamiento de sus cladodios (Figuras 2, 7, 8 y 9). Además, en sólo dos meses del tratamiento a la sombra al 50% se observó un ligero aumento en la cantidad de cristales de CaOx en los cladodios (Fig. 26 y Fig. 27), y la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides en los cladodios (Fig. 35 y Fig. 36). Esto se traduce en cladodios más saludables, con mayor capacidad fotosintética, y probablemente mejores defensas contra la herbivoría y mayores moléculas de almacenamiento energético.

V. CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se puede concluir que el tratamiento a la sombra con sarán al 50% disminuye el amarillamiento de los cladodios de *H. costaricensis* y aumenta el verdor de los tallos, lo cual se refleja en valores menos positivos de $L^*a^*b^*$, mayor concentración de clorofila a y b y de carotenoides totales. Sin embargo, se desconoce si este porcentaje de sombra es el porcentaje óptimo para esta especie, debido a que el porcentaje óptimo varía entre especies (81), y que no se encontró diferencia en la producción de botones florales y frutos en los tratamientos analizados. Para determinar esto se deben poner a prueba diferentes porcentajes de sombra y realizar un monitoreo de flores, botones florales, y frutos producidos por un periodo de al menos dos años de los diferentes tratamientos a la sombra y del testigo.

La técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1) fue muy efectiva para el marcaje argentafín de cristales de CaOx en cladodios de *H. costaricensis*. El emplear una contratinción que resalte el contraste de los cristales con el fondo del tejido, como la eosina empleada, permite el análisis de imágenes automatizado con el programa ImageJ, con lo que se puede cuantificar el área de cada uno de los cristales por microfotografía, y realizar análisis cuantitativos con los datos obtenidos. Este protocolo de análisis de imágenes resulta de gran importancia para la histocitotecnología debido a que permite la cuantificación de cristales de oxalato de calcio, que permite realizar análisis estadísticos para variables cuantitativas. Además, este análisis realizado con ImageJ puede servir como base para llevar a cabo una cuantificación similar de otras macromoléculas, que se puedan detectar con otras técnicas histocitoquímicas, además de otros parámetros celulares.

La luz incidente afecta la biosíntesis de cristales de CaOx. En el tratamiento a la sombra fue en el que se observó mayor abundancia de cristales de CaOx. Esto sugiere que el CaOx puede estar implicado como molécula de almacenamiento de carbono al ser un producto alterno de la fotosíntesis, según la hipótesis de Tooulakou et al. (59). Además, al encontrar mayor abundancia de cristales de CaOx en la cresta de las costillas de los cladodios, que es la zona más alejada del haz vascular central, que se encuentra más expuesta ante posibles ataques de

herbivoría, parece que estos cumplen una multiplicidad de funciones en la planta. Estas funciones van desde la protección contra herbivoría, regulación de los niveles de Ca en la planta y reserva de carbono, entre otras posibles funciones que resultan beneficiosas para la planta.

La abundancia de los cristales de CaOx es mayor conforme disminuye el área de estos. Por ello, los cristales individuales, como los rafidios y los cristales prismáticos tetragonales, fueron muy abundantes. Mientras que las drusas, que tienen áreas de entre 100 μm hasta más de 10.000 μm , fueron menos abundantes, pero contienen un área que supera a la sumatoria de todos los cristales individuales de una microfotografía a 200X.

Para determinar la morfología precisa de los cristales de CaOx se requiere necesariamente de SEM. La técnica empleada de analizar en SEM cortes de 50 μm montadas sobre portaobjetos permite obtener información sobre la superficie externa e interna de los cristales de CaOx. Se encontraron cristales con las morfologías reportadas por la literatura (rafidios o cristales aciculares, cristales prismáticos cuadrados, rectangulares y tetragonales, que están compuestos por CaOx monohidrato o whewelita). En cuanto a las drusas, se considera que se debe ampliar su clasificación debido a sus diversas morfologías. Se encontraron drusas compactas y drusas formadas por cristales prismáticos tetragonales que se han reportado en la literatura para especies distintas a *H. costaricensis*. También se encontraron drusas tipo laberinto y amorfas, que no han sido reportadas para ninguna especie, basado en la revisión bibliográfica realizada. Todas las drusas están compuestas por CaOx dihidrato o weddelita.

Puede que las drusas no sean simplemente una acumulación de cristales individuales, sino que una drusa podría formarse a partir de uno o más puntos de nucleación que finalmente convergen, pero que pueden desarrollarse y crecer aun cuando la drusa ya ha sido formada. Con la técnica de Von Kóssa se encontraron drusas en proceso de formación, comenzando en la periferia del idioblasto, hasta llenar el volumen total de éste.

Una aporía surge debido a que los cristales prismáticos tetragonales individuales están compuestos por CaOx monohidrato, y las drusas compuestas por cristales prismáticos se encuentran formados por CaOx dihidrato. Esto postula dos posibilidades: para que los cristales prismáticos individuales se unan al formar una drusa deben de modificar su estado de hidratación de monohidrato a dihidrato o los cristales prismáticos individuales son distintos a los que componen las drusas de cristales prismáticos.

Esto puede sugerir que la membrana del idioblasto posee proteínas de transporte selectivo que regula la concentración de los precursores necesarios para la formación de cristales de CaOx. Es importante también considerar que la compartimentalización de la cámara de cristales del idioblasto no es el único factor que determina la morfología de los cristales, ya que es poco probable encontrar una compartimentalización con un sistema morfológico tan complejo que forme las drusas tipo laberinto sin ayuda de la regulación de la concentración de los precursores y de enzimas relacionadas con la formación de los cristales de CaOx. Además, que hay un factor químico o enzimático que genera ese cambio del estado de hidratación de monohidrato de los cristales prismáticos simples al estado dihidrato de las drusas.

Los cristales de CaOx se encuentran en una distribución espacial agrupada. Esto implica que los idioblastos en el tejido deberían encontrarse agrupados. Además, puede que esta agrupación de los cristales individuales contribuya a la formación del gran número de drusas encontrados.

El protocolo de cuantificación de cristales de CaOx por medio de la digestión enzimática propuesto por Viñas & Jiménez (69) puede no ser adecuado para la cuantificación de cristales de CaOx en los cladodios de *H. costaricensis*. Esto debido a que en este protocolo se emplea un filtro de 45 μm de diámetro para separar la solución digerida del tejido del cladodio, sin tomar en cuenta que las drusas pueden llegar a tener diámetros de más de 100 μm , por lo que no van a poder pasar a través del diámetro del filtro, y no se van a poder cuantificar.

Además, las drusas con un diámetro menor a 45 μm que logren atravesar el filtro pueden perderse al quedarse adheridas con la cristalería empleada o pueden quedarse en la parte superior de la centrifugación con las diferentes soluciones de sacarosa empleadas. Y en caso de que se logre corregir las fallas del protocolo, y que se establezca uno que permita la obtención de todos los cristales de CaOx, en sus diferentes morfologías y tamaños, la cuantificación realizada por medio del hemocitómetro no es adecuada para cuantificar los cristales de CaOx en ninguna especie que tenga drusas, debido a que dentro del campo de cuantificación del hemocitómetro una drusa se cuantifica como un solo cristal, pese a que está compuesto por cientos o miles de cristales. Como no se pudo determinar el número de cristales de CaOx que compone una drusa, la cuantificación obtenida sería incorrecta y no representaría bien a la concentración de cristales de CaOx por gramo de tejido.

El protocolo que se propone en esta investigación resulta adecuado para la cuantificación del CaOx en cladodios de *H. costaricensis* con de análisis de imágenes a nivel microscópico por medio de la técnica de Von Kóssa (25) modificada por Yasue (1) analizadas con ImageJ. La limitación de este método es que se realiza de forma bidimensional por medio de la comparación del área de una microfotografía cubierta por cristales de CaOx con respecto al área total de la microfotografía. Esta cuantificación a nivel bidimensional no permite extrapolar a nivel tridimensional (como a nivel de un volumen de muestra) de forma directa, sino que se tiene que estudiar la relación entre el porcentaje de área de cristales de CaOx por microfotografía, con la cantidad (g) de CaOx por gramo de peso fresco o seco de tejido, para así determinar si ambas funciones poseen el mismo comportamiento.

Dentro de las ventajas que tiene este método de cuantificación es que permite determinar la ubicación a nivel tisular y celular de los cristales de CaOx y que, al realizar análisis paralelos de cortes histológicos con rayos X en SEM y con RAMAN, se puede determinar el estado de hidratación de las diferentes morfologías de los cristales de CaOx.

Este protocolo de cuantificación de cristales de CaOx se puede emplear en estudios posteriores para identificar si el porcentaje de CaOx por microfotografía en cladodios de *H. costaricensis* varía dependiendo de la variedad, y de otros factores bióticos o abióticos. Además, se puede emplear para encontrar individuos de *H. costaricensis* que produzcan muchos o pocos cristales de CaOx, para someterlos a un proceso de selección artificial y generar así variedades *H. costaricensis* que no produzcan cristales de CaOx, cuyos cladodios puedan ser utilizados para el consumo animal. También se puede emplear para encontrar plantas que sintetizen CaOx en exceso que puedan emplearse para su extracción con fines industriales.

El protocolo de cuantificación de CaOx que se propone en esta investigación se puede emplear para cuantificar y caracterizar los cristales de CaOx en tejidos vegetales de probablemente cualquier especie. Esto podría tener valor para la clasificación taxonómico y nutricional, de acuerdo con el objetivo de la investigación y a la especie con la que se trabaje. Por ejemplo, al poder conocer el contenido de CaOx de especies cuyos tejidos se emplean para el consumo del ser humano y otros animales, se podría probar si realmente existe una correlación causal entre el consumo de oxalatos y la formación de piedras renales, así como lo proponen diferentes autores (5, 13, 30-33). Para así poder comprender mejor la patogénesis de la nefrolitiasis y, en el caso de que la correlación sea causal, quizá disminuir su incidencia al evitar el consumo de especies con una alta concentración de CaOx en sus tejidos comestibles.

Además, el análisis de imágenes propuesto para esta investigación se puede extrapolar para la cuantificación de otras moléculas de interés científico. Como, por ejemplo, el marcaje de anticuerpos por medio de IHC que puede emplear la diaminobencidina como cromógeno, que produce un producto final de reacción coloreado muy similar al producto de la tinción de Von Kóssa (55, 70, 75-77, 97). Para el diagnóstico patológico por medio de IHC se suele realizar un análisis semicuantitativo empleando un sistema de cruces para la cuantificación aproximada de la expresión de la reacción antígeno-anticuerpo en la muestra (98). Esta interpretación, se encuentra sujeta a la interpretación del observador. Es posible

que se pueda cuantificar de forma precisa, por medio del análisis de imágenes propuesto en esta investigación, la sumatoria del área de las células positivas para un anticuerpo en específico con respecto al área total de la microfotografía a una magnificación determinada, y así poder obtener resultados objetivos, precisos y de forma rápida, que faciliten el diagnóstico patológico de enfermedades.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

1. Yasue T. Histochemical identification of calcium oxalate. *Acta Histochem Cytochem.* 1969;2(3):83–96.
2. Gallaher RN. The occurrence of calcium in plant tissue as crystals of calcium oxalate. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 1975;6(3):315–30.
3. Horner H, Wagner B. Calcium oxalate in higher plants. En: Saeed K, editor. *Calcium oxalate in biological systems.* 1a ed. New York; 1995. p. 53–73.
4. Nakata PA. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci.* 2003;164(6):901–9.
5. Franceschi VR, Nakata PA. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu Rev Plant Biol.* 2005;56:41–71.
6. Hartl WP, Klapper H, Barbier B, Ensikat HJ, Dronskowski R, Müller P, et al. Diversity of calcium oxalate crystals in Cactaceae. *Can J Bot.* 2007;85(5):501–17.
7. Levy-Lior A, Weiner S, Addadi L. Achiral calcium-oxalate crystals with chiral morphology from the leaves of some Solanacea plants. *Helv Chim Acta.* 2003;86(12):4007–17.
8. Raman V, Horner H, Khan I. New and unusual forms of calcium oxalate raphide crystals in the plant kingdom. *J Plant Res.* 2014;127(6):721–30.
9. Finley D. Patterns of calcium oxalate crystals in young tropical leaves: a possible role as an anti-herbivory defense. *Rev Biol Trop.* 1999;47(1–2):27–31.
10. Korth KL, Doege SJ, Park S-H, Goggin FL, Wang Q, Gomez SK, et al. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiol.* mayo de 2006;141(1):188–95.
11. Singer DM, Johnson SB, Catalano JG, Farges F, Brown Jr GE.

- Sequestration of Sr(II) by calcium oxalate—A batch uptake study and EXAFS analysis of model compounds and reaction products. *Geochim Cosmochim Acta*. 2008;72(20):5055–69.
12. Nakata PA. Influence of calcium oxalate crystal accumulation on the calcium content of seeds from *Medicago truncatula*. *Plant Sci*. 2012;185–186:246–9.
 13. McConn MM, Nakata PA. Oxalate reduces calcium availability in the pads of the prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. *J Agric Food Chem*. 2004;52(5):1371–4.
 14. Lebeda A, Luhová L, Sedlářova M, Jančová D. Verlag Eugen Ulmer KG The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *J Plant Dis Prot*. 2001;108(1):89–111.
 15. Tian HQ, Russell SD. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*. 1997;202(1):93–105.
 16. Hepler PK, Wayne RO. Calcium and plant development. *Annu Rev Plant Physiol*. 1985;36(1):397–439. Disponible en:
<http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415324A009%5Cnhttp://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pp.36.060185.002145>
 17. Li LG, Hui QT, Russell SD. Calcium function and distribution during fertilization in angiosperms. *Am J Bot*. 2007;94(6):1046–60.
 18. Macnish AJ, Irving DE, Joyce DC, Vithanage V, Wearing AH, Webb RI, et al. Identification of intracellular calcium oxalate crystals in *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Aust J Bot*. 2003;51(5):565–72.
 19. Schmitt AD, Cobert F, Bourgeade P, Ertlen D, Labolle F, Gangloff S, et al. Calcium isotope fractionation during plant growth under a limited nutrient supply. *Geochim Cosmochim Acta*. 2013;110:70–83.
 20. Pöcke SR, Aldunce IMF. Distribución, superficie y accesibilidad de las áreas verdes en Santiago de Chile. *Eure*. 2010;36(109):89–110.

21. Seco FM. Clasificadores eficaces basados en algoritmos rapidos de búsqueda del vecino más cercano. Universidad de Alicante. Universidad de Alicante; 2004. Disponible en:
<http://grfia.dlsi.ua.es/repositori/grfia/pubs/241/tesis.pdf>
22. Martínez R. Control de la correlación espacial en experimentos de campo en el sector agrícola. Agron Colomb. 1994;XI(1):83–9.
23. Jiménez-Pérez J, Aguirre-Calderón O, Kramer H. Análisis de la estructura horizontal y vertical en un ecosistema multicohortal de pino-encino en el norte de México. Investig Agrar Sist y Recur For. 2001;10(2):355–66. Disponible en: <http://www.inia.es/IASPF/2001/vol10-2/jimen.PDF>
24. Espino G, Sánchez-Santillán N, Esquivel A. Análisis temporal y espacial fisicoquímico de una laguna tropical a través del análisis multivariado. Hidrobiológica. 1998;8(2):89–96.
25. Von Kóssa J. Ueber die im Organismus kunstlich erzeugen Verkalkungen. BeitrPathAnat. 1901;29:163–202.
26. Nerd A, Tel-Zur N, Mizrahi Y. Fruits of vine and columnar cacti. En: Nobel P, editor. Cacti: Biology and Uses. University of California Press; 2002. p. 185–98.
27. Nakata P. Engineering calcium oxalate crystal formation in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 2012;53(7):1275–82.
28. Khaimov A, Mizrahi Y. Effects of day-length, radiation, flower thinning and growth regulators on flowering of the vine cacti *Hylocereus undatus* and *Selenicereus megalanthus*. J Hortic Sci Biotechnol. 2006;81(3):465–70.
29. Chang PT, Hsieh CC, Jiang YL. Responses of “Shih Huo Chuan” pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britt. & Rose) to different degrees of shading nets. Sci Hortic. 2016;198:154–62. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.024>
30. Lund T, Reske-Nielsen E. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis with calcium

- oxalate crystals in the kidneys and other organs. *Acta Path.* 1955;38(5):353–562.
31. Bennington J, Harber S, Smith J, Warner N. Crystals of calcium oxalate in the human kidney. *Am J Clin Pathol.* 1964;41(1):8–14.
 32. Attalla K, De S, Monga M. Oxalate content of food: A tangled web. *Urology.* 2014;84(3):555–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2014.03.053>
 33. Bernardino M, Parmar MS. Oxalate nephropathy from cashew nut intake. *Cmaj.* 2017;189(10):E405–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1503/cmaj.151327>
 34. García-Barquero ME, Quirós-Madrigal O. Análisis del comportamiento de mercado de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) en Costa Rica. *Tecnol en Marcha.* 2010;23(2):14–24.
 35. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *Eur Food Res Technol.* 2003;216(4):303–11. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-002-0657-0>
 36. Córdoba-Laguna M, Hernández-Martínez M, Sánchez-Martínez E. Contribution to the present knowledge of *Acanthocereus tetragonus* (Linnaeus) Hummelink from the Sierra Gorda of Queretaro. *Cactáceas y Suculentas Mex.* 2000;45(2):34–9.
 37. Ow-Phyi R. Isolation, purification and characterization of natural red pigment from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Psychiatry.* University of Malaya; 2012.
 38. Jamilah B, Shu CE, Kharidah M, Dzulkifly MA, Noranizan A. Physico-chemical characteristics of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Int Food Res J.* 2011;18(1):279–86.
 39. Charoensiri R, Kongkachuichai R, Suknicom S, Sungpuag P. Beta-carotene,

lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem.* 2009;113(1):202–7. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.074>

40. Nurul SR, Asmah R. Variability in nutritional composition and phytochemical properties of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) from Malaysia and Australia. *Int Food Res J.* 2014;21(4):1689–97.
41. Tze NL, Han CP, Yusof YA, Ling CN, Talib RA, Taip FS, et al. Physicochemical and nutritional properties of spray-dried pitaya fruit powder as natural colorant. *Food Sci Biotechnol.* 2012;21(3):675–82.
42. Valente A, Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Costa HS. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Res Int.* 2011;44(7):2237–42. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.012>
43. Ortiz-Hernández YD, Carrillo-salazar JA. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a short review. *Comun Sci.* 2012;3(November):220–37.
44. Jayaseelan C, Abdul Rahuman A, Ramkumar R, Perumal P, Rajakumar G, Vishnu Kirthi A, et al. Effect of sub-acute exposure to nickel nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014;107:220–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.012>
45. Sáenz C. Cladodes: a source of dietary fiber. *J Prof Assoc Cactus Dev.* 1997;2(1):117–23. Disponible en:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=19991402494&site=ehost-live>
46. Warrick GD, Krausman PR. Barrel cacti consumption by desert bighorn sheep. *Southwest Nat.* 1989;34(4):483–6.
47. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur Food Res Technol.* 2001;212(4):396–407.

48. Nerd A, Sitrit Y, Kaushik RA, Mizrahi Y. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus* spp.). *Sci Hortic.* 2002;96(1–4):343–50.
49. Weiss I, Mizrahi Y, Raveh E. Effect of elevated CO₂ on vegetative and reproductive growth characteristics of the CAM plants *Hylocereus undatus* and *Selenicereus megalanthus*. *Sci Hortic.* 2010;123(4):531–6.
50. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L, editores. Métodos histotecnológicos. Registro de patología de los Estados Unidos de América e Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washinton D.C.; 1995.
51. Lillie R. *Biological Stains*. 9a ed. Estados Unidos de Norte América: The Williams y Wilking Company.; 1977.
52. García R. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. Madrid: Interamericana McGraw Hill; 1993.
53. Sandoval E. *Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal*. Mexico D.F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.
54. McManus JFA. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 1948;23(3):99–108.
55. Gaykema RPA, van der Kuil J, Hersh LB, Luiten PGM. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: Anterograde tracing with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience.* 1991;43(2–3):349–60.
56. Hanken J, Klymkowsky MW, Summers CH, Seufert DW, Ingebrigtsen N. Cranial ontogeny in the direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae), analyzed using whole-mount immunohistochemistry. *J Morphol.* 1992;211(1):95–118.
57. Mohan KH, Pai S, Rao R, Sripathi H, Prabhu S. Techniques of

immunofluorescence and their significance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(4):415–9. Disponible en:
<http://www.bioline.org.br/pdf?dv08185>

58. Bragoni A, Gambella A, Pigozzi S, Grigolini M, Fiocca R, Mastracci L, et al. Quality control in diagnostic immunohistochemistry: integrated on-slide positive controls. *Histochem Cell Biol.* 2017; Disponible en:
<http://link.springer.com/10.1007/s00418-017-1596-y>
59. Tooulakou G, Giannopoulos A, Nikolopoulos D, Bresta P, Dotsika E, Orkoula MG, et al. “Alarm photosynthesis”: calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants. *Plant Physiol.* 2016;171(4):2577–85.
60. Tayassu J, Carol D, Crosswhite CD. The significance of cacti in the diet of the javelina. *Desert Plants.* 1984;6(1):3–5.
61. Britton N, Rose J. Descriptions and illustrations of plants of the cactus family. Volume I. New York: The Carnegie Institution of Washington; 1919. 183–195 p.
62. Mizrahi Y, Nerd A. Cacti as crops. *Hortic Rev.* 1997;18(1):291–320.
63. Delascio F, Lopez R. Cactaceas del estado de Cojedes, Venezuela. *Acta Botánica Venezuéllica.* 1995;18(1/2):136–49.
64. Novel P, Barrios-Pimienta E. Pitaya (*Stenocereus* spp ., Cactaceae): an ancient and modern fruit crop of Mexico. *Econ Bot.* 1994;48(1):76–83.
65. Le Bellec F, Vaillant F, Imbert E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits.* 2006;61(1):237–50.
66. Chartzoulakis K, Patakas A, Bosabalidis AM. Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environ Exp Bot.* 1999;42(2):113–20.
67. Kostman T, Franceschi V, Nakata P. Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal

- idioblasts of *Pistia stratiotes* L. Plant Sci. 2003;165(1):205–12.
68. Foster J, Luo B, Nakata P. An oxalyl-CoA dependent pathway of oxalate catabolism plays a role in regulating calcium oxalate crystal accumulation and defending against oxalate-secreting phytopathogens in *Medicago truncatula*. PLoS One. 2016;11(2):1–15.
 69. Viñas M, Jiménez VM. Occurrence and characterisation of calcium oxalate crystals in stems and fruits of *Hylocereus costaricensis* and *Selenicereus megalanthus* (Cactaceae: Hylocereeae). Micron. 2016;89:21–7.
 70. Lund T, Reske-Nielsen E. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis with calcium oxalate crystals in the kidneys and other organs. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl. 1956;39(111):102–4.
 71. Penniston L. Dietary oxalate and calcium oxalate stones: a theoretical or real concern? En: Pearle SM, Nakada YS, editores. Practical Controversies in Medical Management of Stone Disease. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 7–28.
 72. Hassaninezhad L, Safahieh AR, Salamat N, Savari A, Majd NE. Assessment of gill pathological responses in the tropical fish yellowfin seabream of Persian Gulf under mercury exposure. Toxicol Reports. 2014;1:621–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.016>
 73. Bianchini A, Monserrat JM. Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of Sesamol. Ecotoxicol Environ Saf. 2007;67(1):100–8.
 74. Barja-Fernández S, Míguez JM, Álvarez-Otero R. Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). Ecotoxicol Environ Saf. 2013;95:60–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.028>
 75. Camargo MMP, Martínez CBR. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. Neotrop Ichthyol. 2007;5(3):327–

- 36.
76. Rosseleena E, Ismail R. Somatic embryogenesis of mangosteen. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2012;110(1):251–9.
77. Nursyazwani S, Emelda M, Rohani R, Ismail I. Somatic embryogenesis and metabolic differences between embryogenic and non-embryogenic structures in mangosteen. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 2016; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-016-1068-4>
78. Le Bellec F. La pitaya (*Hylocereus* sp.) en culture de diversification à l'île de la Réunion. *Natl. Hortic. (INH).* Angers, France; 2003. 1–53 p.
79. Hua Q, Chen C, Tel Zur N, Wang H, Wu J, Chen J, et al. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors. *Plant Physiol Biochem.* 2018;126:117–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.027>
80. Nerd A, Mizrahi Y. Reproductive biology of cactus fruit crops. *Hortic Rev.* 1997;18(1):321–46.
81. Raveh E, Nerd A, Mizrahi Y. Responses of two hemiepiphytic fruit crop cacti to different degrees of shade. *Sci Hortic.* 1998;73(2–3):151–64.
82. Barbeau G. The strawberry pear a new tropical fruit. *Fruits.* 1990;45(1):141–7.
83. Mohd MH, Salleh B, Zakaria L. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *J Phytopathol.* 2013;161(11–12):841–9.
84. Chu-ping L, Hui-fang N, Pao-jen A, Hong-ren Y, Jiao-wen H, Ming-Fuh C, et al. Pathogen identification and management of pitaya canker and soft rot in Taiwan. En: *Improving Pitaya Production and Marketing.* 2012. p. 107–19.
85. García-Osuna HT. Identificación de pectinas y mucílago de cuatro

- variedades de nopal (*Opuntia ficus-indica* L.) Miller y validación de su actividad hipoglucémica. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2013.
86. Martínez R, Ebel R, Calix de Dios H, Ferral J, Nava R. Handbook for the sustainable production of pitahaya in the Yucatan Peninsula , Mexico. México: Secretaría de Desarrollo Social y Universidad Autónoma Chapingo; 1997. 42 p.
 87. Juárez-Cruz A, Livera-Muñoz M, Sosa-Montes E, Goytia-Jiménez MA, González-Hernández VA, Bárcena-Gama R. Composición química de tallos inmaduros de *Acanthocereus* spp. e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. Rev Fitotec Mex. 2012;35(2):171–5.
 88. Goytia-Jimenez MA, Garcia G. *Acanthocereus tetragonus* y *A . subinermis*: parte de la diversidad fitogenética y gastronómica de México. UNM Digit Repos. 2016;1–3. Disponible en: http://digitalrepository.unm.edu/el_centro_feim Recommended
 89. Chízmar-Fernández C. Plantas comestibles de Centroamérica. 1a ed. San José, Costa Rica: Editorial INBio; 2009. 1–360 p.
 90. Sáenz C, Berger H, Rodríguez-Félix A, Galletti L, Corrales J, Sepúlveda E, et al. Agro-industrial utilization of cactus pear. 1a ed. Roma: FAO-CACTUSNET; 2013. 169 p.
 91. Frey-Wyssling A. Crystallography of the two hydrates of crystalline calcium oxalate in plants. Am J Bot. 1981;68(1):130–41.
 92. Arnott H, Webb M. Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): implications for crystal stability and function. International Journal of Plant Sciences,. 2000;161(1):133–42.
 93. Volk G, Goss L, Franceschi V. Calcium channels are involved in calcium oxalate crystal formation in specialized cells of *Pistia stratiotes* L. Ann Bot. 2004;93(6):741–53.
 94. Li X, Zhang D, Lynch-Holm VJ, Okita TW, Franceschi VR. Isolation of a

crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol.* 2003;133(2):549–59.

95. Webb MA. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell Online.* 1999;11(4):751–61. Disponible en: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.11.4.751>
96. Salinas M, Ogura T, Soffchi L. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis.* 2001;44(1):94–6.
97. Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;69(1):112–20.
98. Pfaltz K, Mertz K, Rose C, Scheidegger P, Pfaltz M, Kempf W. C3d immunohistochemistry on formalin-fixed tissue is a valuable tool in the diagnosis of bullous pemphigoid of the skin. *J Cutan Pathol.* 2010;37(6):654–8.
99. Hagiya H, Fushimi S, Itakura J, Otsuka F. Calcium oxalate crystals in the thyroid. *Intern Med.* 2014;53(17):2025–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25175145>
100. Richter M, Kenneth S, McCarty B. Anisotropic crystals in the human thyroid gland. *Am J Pathol.* 1953;30(3):545–53.
101. Burke C, Owen A. Oxalosis. *Pediatrics.* 1955;15(1):383–91.
102. Hughes DTD. The clinical and pathological background of two cases of oxalosis. *J Clin Pathol.* 1959;12(1):498–510.
103. Fanger H, Esparza A. Crystals of calcium oxalate in kidneys in uremia. *Am J Clin Pathol.* 1964;41(6):597–603.
104. Sugiyama N, Okutani I. Relationship between nitrate reduction and oxalate

- synthesis in spinach leaves. *J Plant Physiol.* 1997;149(1–2):14–8. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80166-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80166-0)
105. Ahmed AK, Johnson KA. The effect of the ammonium: Nitrate nitrogen ratio, total nitrogen, salinity (NaCl) and calcium on the oxalate levels of *Tetragonia tetragonioides* Pallas. Kunz. *J Hortic Sci Biotechnol.* 2000;75(5):533–8.
 106. Rinallo C, Modi G. Content of oxalate in *Actinidia deliciosa* plants grown in nutrient solutions with different nitrogen forms. *Biol Plant.* 2002;45(1):137–9.
 107. Everson-Pearse A. *Histochemistry: theoretical and applied.* Londres: Lettles, Brown and Company Boston; 1953. 1–594 p.
 108. Cameron GR, Scholar G. The staining of calcium. *J Pathol Bacteriol.* 1930;33(4):929–55. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700330409>
 109. McGee-Russell S. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1957;6(1):22–42.
 110. Wolman M, Goldring D. Histochemical demonstration of calcium oxalate crystals. *J. of Hist & Cyt* 1962;10(4);505–6.
 111. Chaplin a J. Histopathological occurrence and characterisation of calcium oxalate: a review. *J Clin Pathol.* 1977;30(9):800–11. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=476564&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
 112. McKenzie R, Schultz K. Confirmation of the presence of CaOx crystals in some tropical grasses. *J Agric Sci Camb.* 1982;100(1):249–50.
 113. Herrera W. *Climas de Costa Rica.* Gomez L, editor. San José; 1985. 1–118 p.
 114. Herrera W. *Climate of Costa Rica.* En: Kappelle M, editor. *Costa Rican Ecosystems.* Chicago: The University of Chicago Press; 2016. p. 19–29.
 115. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. Colour measurement and analysis in

- fresh and processed foods: a review. *Food Bioprocess Technol.* 2013;6(1):36–60.
116. Buesa RJ. Microwave-assisted tissue processing: real impact on the histology workflow. *Ann Diagn Pathol.* 2007;11(3):206–11.
 117. Leong ASY. Microwaves and turnaround times in histoprocessing: Is this a new era in histotechnology? *Am J Clin Pathol.* 2004;121(4):460–2.
 118. Puente ME, Li CY, Bashan Y. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ Exp Bot.* 2009;66(3):402–8.
 119. Moghadam A, Ardebili Z, Rezaie L. Effect of indole butyric acid on micrografting of cactus. *African J Biotechnol.* 2012;11(24):6484–93.
 120. Megías M, Molist P, Pombal M. Tejidos vegetales: parénquima. *Atlas de Histología Vegetal y Animal.* 2014. p. 11. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/v-sosten.pdf>
 121. Estrada-Luna AA, López-Peralta C, Cárdenas-Soriano E. In vitro micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (*Opuntia* spp.). *Sci Hortic (Amsterdam).* 2002;92(3–4):317–27.
 122. Megías M, Molist P, Pombal A. M. Órganos vegetales: tallo. Vol. 1, *Atlas de histología vegetal y animal.* 2015. p. 1–15. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1870-34532007000200013&lng=en&nrm=iso&tlng=en%5Cnhttp://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/o-imagenes-grandes/tallo-primario-m.php%5Cnhttp://academic.uprm.edu/jvelezg/plantas.pdf
 123. da Silva MGS, Dubeux JCB, Assis LC da SLC, Mota DL, da Silva LLS, dos Santos MVF, et al. Anatomy of different forage cacti with contrasting insect resistance. *J Arid Environ.* 2010;74(6):718–22.
 124. Gibson A, Horak K. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar

- cacti. *Ann Missouri Bot Gard.* 1969;65(4):999–1057.
125. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671–5.
 126. Hines WGS, Hines RJO har. The Eberhardt statistic and the detection of nonrandomness of spatial point distributions. *Biometrika.* 1979;66(1):73–9.
 127. Deaquiz YA., Álvarez-Herrera J., Fischer G. Ethylene and 1-MCP affect the postharvest behavior of yellow pitahaya fruits (*Selenicereus megalanthus* Haw.). *Agron Colomb.* 2014;32(1):44–51. Disponible en:
<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84901049565&partnerID=40&md5=89df959633e19fb4df0e3071fe8e6686>
 128. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids measurement and UV-VIS characterization. *Curr Protoc Food Anal Chem.* 2001;F4.3.1-F4.(Supplement 1):1–8.
 129. Edwards HGM, Farwell DW, Jenkins R, Seaward MRD. Vibrational Raman spectroscopic studies of calcium oxalate monohydrate and dihydrate in lichen encrustations on renaissance frescoes. *J Raman Spectrosc.* 1992;23(3):185–9.
 130. Frausto-Reyes C, Loza-Cornejo S, Terrazas T, De La Luz Miranda-Beltrán M, Aparicio-Fernández X, López-Macía BM, et al. Raman spectroscopy study of calcium oxalate extracted from cacti stems. *Appl Spectrosc.* 2014;68(11):1260–5.
 131. Frost RL, Weier ML. Thermal treatment of weddellite - A Raman and infrared emission spectroscopic study. *Thermochim Acta.* 2003;406(1–2):221–32.
 132. Frost RL, Weier ML. Thermal treatment of whewellite - A thermal analysis and Raman spectroscopic study. *Thermochim Acta.* 2004;409(1):79–85.
 133. Frost RL, Weier ML. Raman spectroscopy of natural oxalates at 298 and 77 K. *J Raman Spectrosc.* 2003;34(10):776–85.

134. Thompson W, Niseen S. Influence of shade and irrigation on the response of corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), and wheat (*Triticum aestivum*) to Carfentrazone–Ethyl 1. *Weed Technol.* 2006;16(2):314–8.
135. Sahin S, Gülüm S. Physical properties of foods. Heldman D, editor. New York: Springer; 2006. 267 pp.
136. Granato D, Masson ML. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2010;30(4):1090–6.
137. Griffin JJ, Ranney TG, Pharr DM. Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence, and Carbohydrate Content of *Illicium Taxa* Grown under Varied Irradiance. *J Am Soc Hortic Sci.* 2004;129(1):46–53.
138. ©GeoDatos. Coordenadas geográficas de Costa Rica. Coordenadas geográficas de Costa Rica. 2019 [citado el 11 de agosto de 2019]. p. 1. Disponible en: <https://www.geodatos.net/coordenadas/costa-rica>
139. Ahrens D. Essentials of meteorology. An invitation to the atmosphere. 7th ed. Australia: Cengage Learning; 2015. 1–525 p.
140. Mclellan MR, Lind LR, Kime RW. Hue angle determinations and statistical. *J Food Qual.* 1994;18(1995):235–40.
141. Rhim J, Wu Y, Weller C, Schenepf M. Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. *J Food Sci.* 1999;64(1):149–52.
142. López A, Piqué MT, Boatella J, Romero A, Ferrán A, García J. Influence of drying conditions on the hazelnut quality: III. Browning. *Dry Technol.* 1997;15(3–4):989–1002.
143. Barreiro JA, Milan M, Sandoval AJ. Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. *J Food Eng.* 1997;33(1):359–71.

144. Seim T. CIE Div 1 , R1-47 Hue angles of Elementary Colours. 53rd meeting of ISO/TC159/ SC 4/ WG 2 "Visual display requirements. 2009.
145. Gasson P. Epidermal anatomy of some North American globular cacti. Br Cactus Succul Soc. 1981;43(4):101–8.
146. Oliver JP, Castro A, Gaggero C, Cascón T, Schmelz EA, Castresana C, et al. *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. Planta. 2009;230(3):569–79.
147. Mauseth JD. Anatomical adaptations to xeric conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a relictual, leaf-bearing cactus. J Plant Res. 1999;112(1107):307–15.
148. Franceschi VR, Horner HT. Calcium oxalate crystals in plants. Bot Rev. 1980;46(4):361–427.
149. Franceschi VR, Horner, Jr. HT. Use of *Psychotria punctata* callus in study of calcium oxalate crystal idioblast formation. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1978;92(1):61–75.
150. Horner HT, Whitmoyer RE. Raphide crystal cell development in leaves of *Psychotria punctata* (Rubiaceae). J Cell Sci. 1972;11(2):339–55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4342516>
151. Chui M., Falk RH. Ultrastructural study on *Lemna perpusilla*. Cytologia (Tokyo). 1975;40:313–22.
152. Horner H, Wagner B. The association of druse Crystals with the developing stomium of *Capsicum annuum* (Solanaceae) anthers. Am J Bot. 1980;67(9):1347–60.
153. Monje P V, Baran EJ. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. Plant Physiol. 2002;128(February):707–13.
154. Retana-Sánchez K, Castro-Zúñiga O, Blanco-Meneses M. Determinación de la presencia de cristales de oxalato de calcio asociados a la enfermedad

- abiótica conocida como “mancha blanca” en *Hylocereus costaricensis*. *Agron Costarric*. 2019;43(2):75–89.
155. Lichtenthaler HK, Buschmann C, Döll M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, et al. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res*. 1981;2(2):115–41.
 156. Dai Y, Shen Z, Liu Y, Wang L, Hannaway D, Lu H. Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. *Environ Exp Bot*. 2009;65(2–3):177–82.
 157. Demmig-Adams B, Adams WW. Responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1992;43:599–626.
 158. Boardman NK. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann Rev Plant Physiol*. 1977;28:355–77.
 159. Huang AS, Tanudjaja LS. Application of anion-exchange High-Performance Liquid Chromatography in determining oxalates in taro (*Colocasia Esculenta*) corms. *J Agric Food Chem*. 1992;40(11):2123–6.
 160. Mazon AM a, Zhang D, Franceschi VR. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytol*. 2003;161:435–48.
 161. Molano-Flores B. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Ann Bot*. 2001;88(3):387–91.
 162. Ward D, Spiegel M, Saltz D. Gazelle herbivory and interpopulation differences in calcium oxalate content of leaves of a desert lily. *J Chem Ecol*. 1997;23(2):333–46.
 163. Rio MCSD, De Oliveira B V., De Tomazella DPT, Silva JAF Da, Pereira GAG. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete

Moniliophthora perniciosa, the causal agent of Witches' Broom disease of Cacao. *Curr Microbiol.* 2008;56(4):363–70.

164. Mongkolrat S, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Quality assessment and liriodenine quantification of *Nelumbo nucifera* dried leaf in Thailand. *Pharmacogn J.* 2012;4(32):24–8.

VI. CAPÍTULO VIII: ANEXOS

Anexo 1. *Macro* del programa ImageJ empleado para el análisis de cristales de CaOx en pitahaya.

```
// Color Thresholder 2.0.0-rc-64/1.52d
```

```
// Autogenerated macro, single images only!
```

```
min=newArray(3);
```

```
max=newArray(3);
```

```
filter=newArray(3);
```

```
a=getTitle();
```

```
run("HSB Stack");
```

```
run("Convert Stack to Images");
```

```
selectWindow("Hue");
```

```
rename("0");
```

```
selectWindow("Saturation");
```

```
rename("1");
```

```
selectWindow("Brightness");
```

```
rename("2");
```

```
min[0]=0;
```

```
max[0]=255;
```

```
filter[0]="pass";
```

```
min[1]=0;
```

```
max[1]=255;
```

```
filter[1]="pass";
```

```
min[2]=0;
```

```
max[2]=122;
```

```
filter[2]="pass";
```

```
for (i=0;i<3;i++){
```

```
    selectWindow(""+i);
```

```
    setThreshold(min[i], max[i]);
```

```
run("Convert to Mask");
if (filter[i]=="stop") run("Invert");
}
imageCalculator("AND create", "0","1");
imageCalculator("AND create", "Result of 0","2");
for (i=0;i<3;i++){
  selectWindow(""+i);
  close();
}
selectWindow("Result of 0");
close();
selectWindow("Result of Result of 0");
rename(a);
// Colour Thresholding-----
run("Set Scale...", "distance=400 known=200 pixel=1 unit=um");
run("Analyze Particles...", "display include in_situ");
```