



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS
CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO DE LA HOJA DE
AMARANTO EN CONDICIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO**

Tesis que presenta
Ivan Takeshi Cerritos Castro

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2023



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización histológica y molecular de los cristales de oxalato de calcio de la hoja de amaranto en condición de estrés hídrico**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ivan Takeshi Cerritos Castro** y aprobada el **día 12 de Septiembre del 2023** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Directora de la tesis

Dra. Olga Araceli Patrón Soberano

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Mario Pedraza Reyes

Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 719217 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Acta de examen

Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina, por el espacio, tiempo y apoyo que me brindó en su laboratorio para desarrollarme profesionalmente.

Al M.C. Alberto Barrera Pacheco; sin su constante apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Araceli Patrón Soberano, por el gran apoyo y tutoría en la obtención de cortes histológicos, microscopía y desarrollo en general de este trabajo.

Al Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías por el apoyo con los estudios de fotosíntesis.

Al M.C. Alberto Barrera, Dr. Hugo Magdaleno, Dra. Araceli Patrón, Dr. Luis Salazar, M.C. Selma Valles, M. C. Oscar Calva por su participación en el video documental realizado para la divulgación de este trabajo.

A mi comité tutorial: Dra. Araceli Patrón, el Dr. Alejandro De Las Peñas y Dr. Mario Pedraza por sus acertadas críticas y reconocimientos que ayudaron mucho a mi formación.

A la Q.F.B. Dalia Pichardo Ortega por su invaluable apoyo y cariño sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Erandi Vargas Ortiz, por el apoyo constante en mi formación.

Al M.C. Óscar Calva, Dr. Esaú Bojórquez y Dr. Jorge González, que gracias a su sentido crítico y amistad la experiencia en el laboratorio 2 fue realmente nutritiva e inspiradora.

A la M.C. Selma Valles, Dr. Abraham García y Dr. Guillermo Salcedo, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al M.C. Gerardo Pichardo y Arq. Luis Arcos, por su gran apoyo para poder llevar a cabo la exposición fotográfica.

A mi familia, especialmente mi mama y hermano Diego quienes han sido un gran apoyo para que llegue sano hasta este punto.

A todo el personal del IPICYT que hace posible que el instituto funcione día a día.

Al CONAHCYT, IPICYT y FONCA por el apoyo recibido.

A mis compañeros de laboratorio 2, por las buenas experiencias.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Lista de tablas	ix
Glosario	ix
Lista de figuras	x
Resumen	xiii
Abstract	xiv
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO E HISTOLOGÍA DE LA HOJA DE AMARANTO	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Los cristales de oxalato de calcio y su contexto histológico en la hoja	1
1.2 Morfología de los cristales de CaOx en plantas	3
1.3 Composición y ultraestructura asociada a los cristales de CaOx	5
1.4 Proteínas asociadas a los cristales de CaOx	6
1.5 Justificación	9
1.6 Objetivo	9
1.7 Hipótesis	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1 Material vegetal	10
2.2 Preparación de muestras para microscopía	10

2.3 Microscopía óptica	11
2.4 Microscopía electrónica	11
2.5 Aislamiento e identificación de las proteínas asociadas a los cristales de CaOx	12
2.6 Tinción de cortes histológicos en resina	13
2.7 Análisis inmunohistoquímico e inmunoro	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Histología de la hoja de amaranto y distribución de sus idioblastos cristaleros	14
3.2 Estructura y composición de los cristales de la hoja de amaranto	21
3.3 Identificación de las proteínas asociadas a los cristales de CaOx de amaranto	24
3.4 Rasgos histológicos y ultraestructurales asociados a la acumulación de cristales de arena	27
3.5 Rasgos histológicos y ultraestructurales asociados a la acumulación de drusas	31
3.6 Localización ultraestructural de enzimas fotosintéticas en el idioblasto cristalero	36
4. DISCUSIÓN	39
5. CONCLUSIONES	43
6. PRODUCTOS ACADÉMICOS OBTENIDOS	44
CAPÍTULO II: EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LOS CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO E HISTOLOGÍA DE LA HOJA DE AMARANTO	45
7. INTRODUCCIÓN	45
7.1 Objetivo	48
7.2 Hipótesis	48
8. MATERIALES Y MÉTODOS	48
8.1 Crecimiento de plantas y diseño experimental	48
8.2 Observación de los cambios en los cristales de CaOx	50

8.3 Análisis de la acumulación de <i>RbcL</i> y <i>Oxo</i>	51
9. RESULTADOS	52
9.1 Ensayo preliminar de tolerancia al estrés hídrico	52
9.2 Experimento definitivo – estrés hídrico severo	54
9.3 Producción de semilla	58
9.4 Desarrollo de las plantas y niveles de recuperación del estrés hídrico	61
9.5 Efecto del estrés hídrico y senescencia en el desarrollo y recuperación de las hojas	68
9.6 Efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis	73
9.7 Origen del idioblasto cristalero	83
9.8 Efecto del estrés hídrico y la senescencia en la acumulación de cristales de CaOx	85
9.9 Efecto del estrés hídrico y la senescencia en la solubilidad de los cristales de CaOx	95
9.10 Efecto del estrés hídrico y recuperación en la histología y acumulación de <i>RbcL</i> y <i>Oxo</i> en la hoja	98
9.11 Efecto de la acumulación aberrante de cristales en la histología de la hoja	104
10. DISCUSIÓN	106
11. CONCLUSIONES	111
12. PRODUCTOS ACADÉMICOS Y CULTURALES (EN PROCESO)	112
13. REFERENCIAS	113

Lista de tablas

Tabla 1. Extractos proteínicos asilados de cristales de CaOx y matriz orgánica en estudios previos	8
Tabla 2. Proteínas asociadas a los cristales de CaOx de amaranto identificadas por LC-MS/MS	26

Glosario

CaOx	Oxalato de calcio
Idioblasto	Célula vegetal con características morfológicas distintas a las de su entorno.
RuBisCO	Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa
nLC-MS/MS	Nano-cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
CM	Célula de mesófilo
CVH	Célula de la vaina del haz
PHI-Ox	Proteínas hidrofílicas embebidas en los cristales de CaOx
PHF-Ox	Proteínas hidrofóbicas embebidas en los cristales de CaOx
PHI-Vac	Proteínas hidrofílicas vacuolares
PHF-Vac	Proteínas hidrofóbicas vacuolares
LRW	Resina LR White

Lista de figuras

Figura 1	Molécula de oxalato de calcio	1
Figura 2	Microscopía electrónica de transmisión de un idioblasto cristalero en la testa de la semilla de <i>Phaseolus vulgaris</i>	2
Figura 3	Fotosíntesis C3, C4 y anatomía de Kranz	3
Figura 4	Microscopía electrónica de barrido de cristales de CaOx de diferentes orígenes	4
Figura 5	Microscopía electrónica de transmisión de los elementos ultraestructurales asociados a la formación de cristales de CaOx	6
Figura 6	Anatomía de la hoja de amaranto y planos de corte	15
Figura 7	Arquitectura celular observada en un corte transversal de la lámina de la hoja	16
Figura 8	Arquitectura celular observada en un corte transversal de una vena secundaria	16
Figura 9	Arquitectura celular observada en un corte paradermal de hoja de amaranto	17
Figura 10	Distribución histológica de los cristales de CaOx en hoja de amaranto	19
Figura 11	Propiedades autofluorescentes de los cristales de amaranto	20
Figura 12	Morfología y composición de los cristales aislados de hoja de amaranto	22
Figura 13	Estructuras de las drusas y su relación con la autofluorescencia	23
Figura 14	Proteínas asociadas a los cristales de CaOx	25
Figura 15	Características histológicas y ultraestructurales de la acumulación de cristales de arena	28
Figura 16	La cámara del cristal podría estar controlado físicamente la forma de los cristales	29
Figura 17	Correlación ultraestructural entre la degradación de cloroplastos y acumulación de cristales	30
Figura 18	Características histológicas y ultraestructurales asociadas a la acumulación de drusas	32
Figura 19	Células del mesófilo convirtiéndose en un joven idioblasto formador de drusa	33
Figura 20	Idioblasto formador de drusas diferenciado	34
Figura 21	Idioblasto formador de drusa maduro	35

Figura 22	Patrón de acumulación de Rbcl en hojas de amaranto	37
Figura 23	Patrón de acumulación de ATP sintasa subunidad b en hojas de amaranto	38
Figura 24	Rutas metabólicas en plantas relacionadas con la síntesis y degradación del oxalato	46
Figura 25	Ruta del glicolato para la recuperación de CO ₂	47
Figura 26	Ensayo preliminar de tolerancia al estrés hídrico en la planta de amaranto	53
Figura 27	Diseño experimental definitivo – estrés severo	56
Figura 28	Invernadero experimental y registro de sus variables	57
Figura 29	Desarrollo y producción de semillas plantas sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico	59
Figura 30	Producción y peso unitario de las semillas producidas	60
Figura 31	Desarrollo de las plantas del grupo control	62
Figura 32	Desarrollo de las plantas recuperación	63
Figura 33	Morfologías de las plantas recuperadas del estrés hídrico severo	64
Figura 34A	Niveles de recuperación del estrés hídrico severo	66
Figura 34B	Niveles de recuperación del estrés hídrico severo	67
Figura 35A	Muestreo de la cuarta hoja verdadera	69
Figura 35B	Muestreo de la sexta hoja verdadera	70
Figura 35C	Muestreo de la octava hoja verdadera	71
Figura 35D	Muestreo de la décima hoja verdadera	72
Figura 36A	Mediciones de fotosíntesis – procesos lumínicos	75
Figura 36B	Mediciones de fotosíntesis – procesos lumínicos	76
Figura 37A	Mediciones de fotosíntesis – procesos de intercambio de gases	78
Figura 37B	Mediciones de fotosíntesis – procesos de intercambio de gases	79

Figura 38A	Mediciones de fotosíntesis – curvas de respuesta a la asimilación de CO ₂	81
Figura 38B	Mediciones de fotosíntesis – curvas de respuesta a la asimilación de CO ₂	82
Figura 39	Acumulación de cristales de CaOx en etapas embrionarias de la hoja.	84
Figura 40	Acumulación de cristales de CaOx en una hoja madura	85
Figura 41A	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 4	87
Figura 41B	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 6	88
Figura 41C	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 8	89
Figura 41D	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 10	90
Figura 42	Efecto de la senescencia en la acumulación de cristales de CaOx	91
Figura 43	Efecto del estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx	92
Figura 44	Acumulación aberrante de cristales a causa del estrés hídrico	93
Figura 45	Efecto de la recuperación del estrés hídrico en los cristales de CaOx	94
Figura 46	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la solubilidad de los cristales de CaOx – microscopía de polarización	96
Figura 47	Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la solubilidad de los cristales de CaOx. – Microscopía de campo claro	97
Figura 48	Efecto del estrés hídrico en la histología de la hoja	99
Figura 49	Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la histología de la hoja	100
Figura 50	Efecto del estrés hídrico en la acumulación de <i>RbcL</i> y <i>OxO</i> en la hoja	101
Figura 51	Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la acumulación de <i>RbcL</i> y <i>Oxo</i> . de la hoja	102
Figura 52	Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la acumulación de <i>Oxo</i> y <i>RbcL</i> – vista paradermal	103
Figura 53	Efecto de la acumulación aberrante de cristales en la histología de la hoja	105

Resumen

CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO DE LA HOJA DE AMARANTO EN CONDICIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO

En las plantas, los cristales de oxalato de calcio (CaOx) se forman en células de idioblastos cristaleros y tienen formas geométricas específicas. Sus funciones propuestas incluyen la homeostasis del calcio y la fuente de carbono, entre otras. El amaranto es una planta que presenta alta tolerancia a estreses abióticos y acumula cantidades considerables de cristales de CaOx; sin embargo, pocos estudios se han centrado en caracterizar la ultraestructura de los cristales y ninguno está relacionado con la identificación de proteínas unidas a ellos. Esta información es de gran interés para comprender los mecanismos relacionados con la formación de cristales de CaOx y para apoyar las funciones propuestas. Así, este trabajo tuvo como objetivo caracterizar los cristales de CaOx en hojas de amaranto. Los cristales se purificaron y las proteínas unidas a ellos fueron aisladas e identificadas por nano-cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (nLC-MS/MS). Se analizaron cortes histológicos de hoja mediante microscopía óptica y electrónica. Las proteínas identificadas están relacionadas con el cloroplasto, como la ATP sintasa subunidad b, la subunidad grande de la Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa (RuBisCO) y proteínas relacionadas con la pared celular, que fueron validadas *in situ* mediante inmunohistoquímica y marcaje con inmunorojo. Además, se observó que los idioblastos cristaleros se formaban a partir de células de parénquima asociadas al mesófilo y las venas, en las que las membranas tilacoides de los cloroplastos degradados se convierten en cámaras de cristales. Estos resultados son un avance significativo en la comprensión de los mecanismos de formación de cristales de CaOx y de su función potencial como fuente alternativa de carbono en las hojas.

PALABRAS CLAVE: *Amaranthus*, Cristales de oxalato de calcio, Degradación de cloroplastos, Biomineralización, nLC-MS/MS, RuBisCO.

Abstract

HISTOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALS FROM AMARANTH LEAF UNDER WATER STRESS CONDITION

Calcium oxalate (CaOx) crystals in plants are formed in crystal idioblast cells and have specific geometric shapes. Their proposed functions include calcium homeostasis and carbon source, among others. Amaranth is a plant that presents high tolerance to abiotic stresses and accumulates considerable amounts of CaOx crystals; however, few studies have focused on characterizing the crystals ultrastructure and none is related to identifying proteins bound to them. This information is central to understand the mechanisms related to CaOx crystal formation and to support their postulated functions. Thus, this work aimed to characterize CaOx crystals in amaranth leaves. Crystals were purified and proteins bound to them were isolated and identified by nLC-MS/MS. Leaf sections were analyzed by light and electron microscopy. The identified proteins are related to the chloroplast such as ATP synthase, RuBisCO large subunit, also cell wall-related proteins were identified, which were validated *in situ* by immunohistochemistry and immunogold labeling. In addition, CaOx crystal idioblasts are formed from parenchyma cells associated with mesophyll and veins, in which the thylakoid membranes of degraded chloroplasts turn into crystal chambers. These results significantly advance our understanding of CaOx crystal formation and its potential function as an alternative carbon source in leaves.

Keywords: *Amaranthus*, Calcium oxalate crystals, Chloroplast degradation, Biomineralization, nLC-MS/MS, RuBisCO.

CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO E HISTOLOGÍA DE LA HOJA DE AMARANTO

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los cristales de oxalato de calcio y su contexto histológico en la hoja

El oxalato de calcio (CaOx, Figura 1) es una sal orgánica formada por carbono, oxígeno y calcio que posee una baja solubilidad en agua, alrededor de 5×10^{-5} M, por lo que tiende a precipitar (Ibis et al., 2020; Pedersen, 1939). Su forma soluble está presente en la mayoría de plantas fotosintéticas. Sin embargo, en algunas plantas está presente su forma insoluble en forma de cristales. Estos cristales pueden llegar a constituir hasta el 80% de la masa seca de una planta (Franceschi y Nakata, 2005).

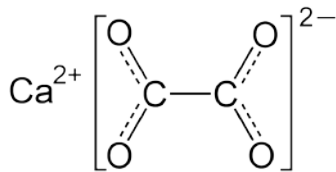


Figura 1. Molécula de oxalato de calcio. El anión oxalato puede formar complejos con distintos cationes formando sales insolubles.

Los cristales de CaOx se encuentran como depósitos intra y extracelulares en diversos órganos de las plantas como raíces, tallos, hojas, flores y semillas (Bouropoulos et al., 2001; Franceschi y Nakata, 2005). Su formación a nivel intracelular se lleva a cabo en la vacuola de células especializadas llamadas idioblastos cristaleros (Figura 2). Los idioblastos cristaleros se encuentran distribuidos entre las demás células del órgano en el que están presentes. Su origen celular no es claro, sin embargo, se ha propuesto que puede ser de células tempranas no diferenciadas (meristemáticas) o por la dediferenciación de células de mesófilo (Kostman y Franceschi, 2000; Volk et al., 2002).

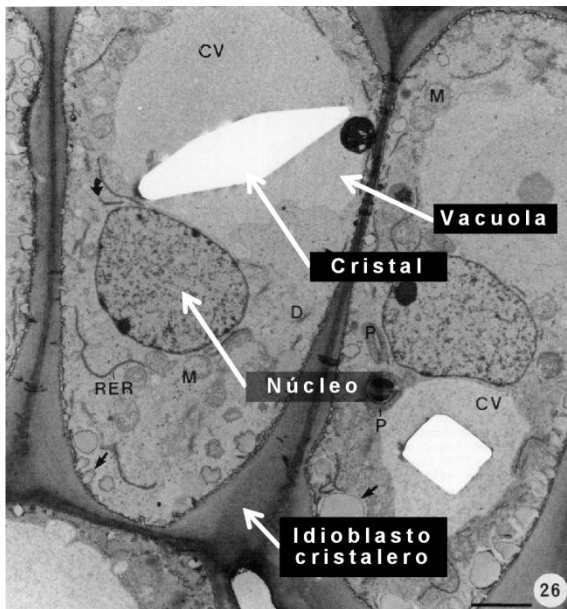


Figura 2 Microscopía electrónica de transmisión de un idioblasto cristalero en la testa de la semilla de *Phaseolus vulgaris*. El cristal de CaOx se forma en el interior de la vacuola del idioblasto cristalero. Barra: 1 µm.

Por otro lado, la distribución y morfología de las células del mesófilo (CM) en las hojas de las plantas da origen a dos clasificaciones: plantas C_3 y C_4 . Las hojas poseen haces vasculares rodeados por células de la vaina del haz (CVH), seguido de CM y por último las epidermis. En las plantas C_3 , las CM son grandes, poseen cloroplastos y se encargan de llevar a cabo la fijación de carbono a través del Ciclo de Calvin. En las plantas C_4 , además de las CM, las CVH también son grandes, poseen cloroplastos y son las que se encargan de llevar a cabo la fijación de carbono. Esta diferencia en el sitio de fijación de carbono entre plantas C_3 y C_4 se da gracias a la compartimentalización de las enzimas encargadas de dicho proceso, particularmente la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa abreviada como RuBisCO (Figura 3), y da lugar la histología conocida como “anatomía de Kranz” (del alemán “corona”).

La planta de amaranto es del tipo C_4 , por lo que presenta la anatomía de Kranz y además acumula cristales de CaOx en sus hojas. Sin embargo, no se ha descrito de manera exhaustiva la localización y características celulares de sus idioblastos cristaleros (Tooulakou et al., 2018). Aunado a estos vacíos en el conocimiento, surge la interrogante **¿Qué papel juegan los idioblastos cristaleros en el contexto tisular y fisiológico de la hoja C_4 ?**

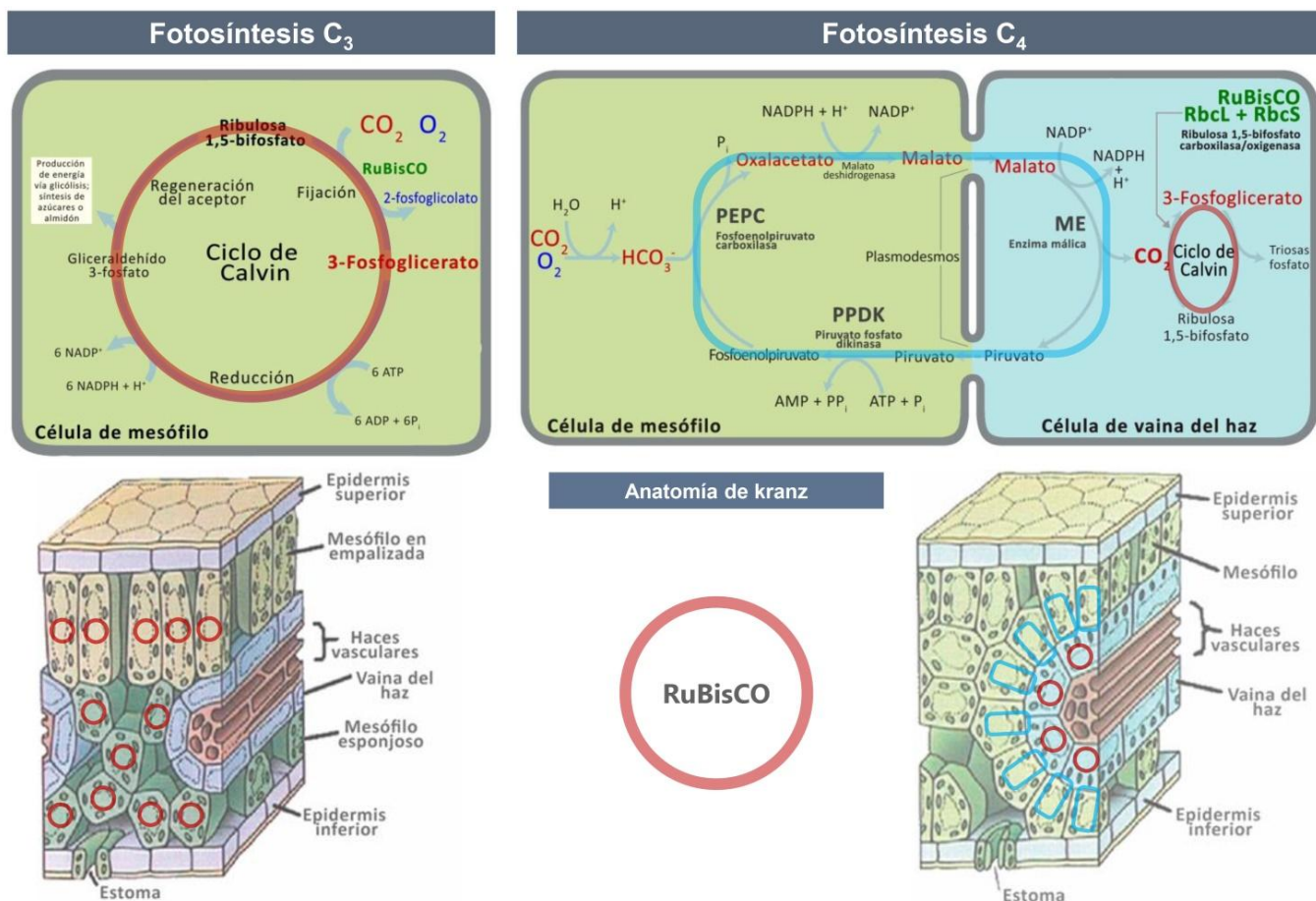


Figura 3. Fotosíntesis C₃, C₄ y anatomía de Kranz. En las plantas con fotosíntesis C₃ el ciclo de Calvin se lleva a cabo en las células del mesófilo (CM). En las plantas con fotosíntesis C₄ las CM transportan el CO₂ a las células de la vaina del haz (CVH) para llevar a cabo en ellas el ciclo de Calvin. Esta compartimentalización en las plantas C₄ evita la fijación de O₂ (fotorespiración). Además, genera que las CM y CVH formen aros alrededor de los haces vasculares, la llamada anatomía de Kranz (del alemán “corona”).

1.2 Morfología de los cristales de CaOx de plantas

En contraste con los cristales amorfos de CaOx que se obtienen por precipitación *in vitro*, los cristales generados por las plantas *in vivo* tienen formas geométricas peculiares. Dentro de estas formas están los cristales prismáticos, estiloides, cristales de arena, rafidios y drusas. Los cuatro primeros son cristales individuales, mientras que las drusas son conglomerados de múltiples cristales individuales. Así mismo, cada idioblasto cristalero puede formar uno o muchos de estos cristales dentro de su vacuola, con una

tendencia específica para cada morfología (Figura 4) (Bouropoulos et al., 2001; Franceschi y Nakata, 2005; Prychid y Rudall, 1999; Webb et al., 1995; Webb, 1999). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en *A. thaliana* (no productora de cristales), se le introdujo el gen *obc1* de *Burkholderia mallei* encargado de la síntesis de oxalato para que la planta acumulara cristales de CaOx. Aunque la planta efectivamente comenzó a acumular cristales, estos carecían de la morfología típica observada en plantas que los acumulan de forma natural. Aunado a ello, se ha observado que la forma del cristal es especie y tejido-específica, por lo que se cree que su acumulación y la adquisición de su forma son regulados por más de un gen (Webb, 1999). Sin embargo, hasta la fecha no se sabe con exactitud que genes y/o proteínas participan en estos procesos.

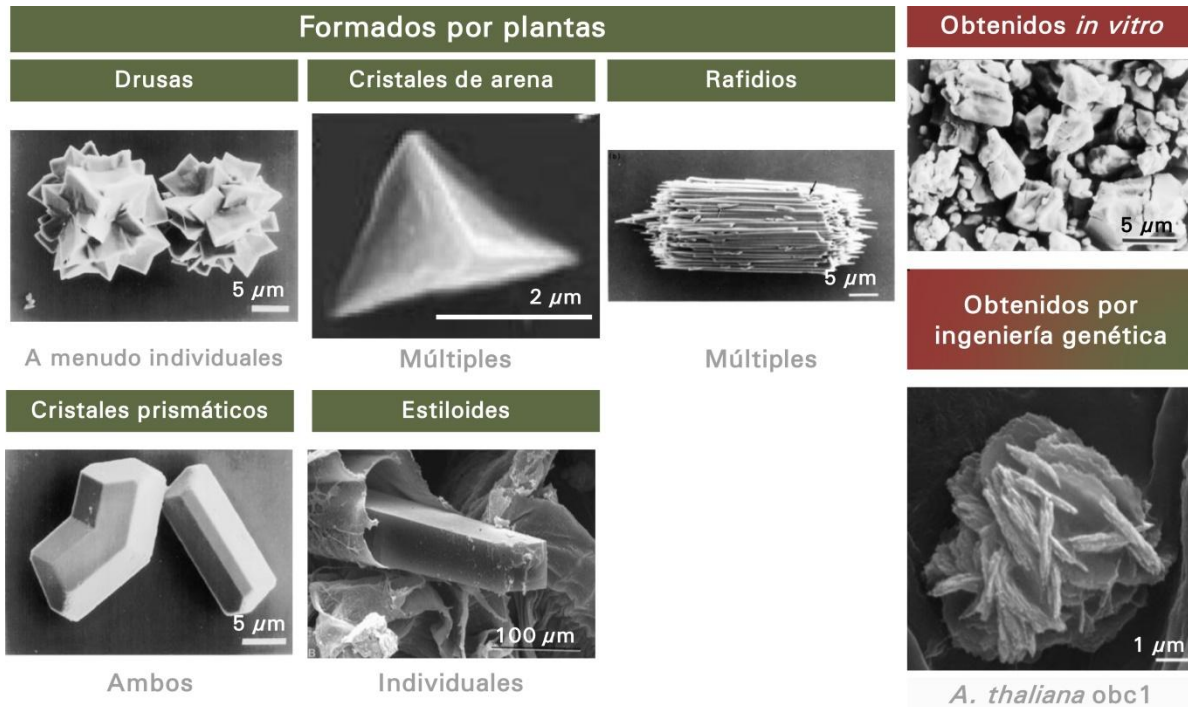


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de cristales de CaOx de diferentes orígenes. A diferencia del CaOx sintetizado *in vitro*, el CaOx acumulado en plantas tiene formas específicas. Incluso, la precipitación *in vivo* a través de la ingeniería genética en una planta que no acumula cristales de forma natural (*A. thaliana*), no da lugar a las morfologías geométricas observadas en plantas. Los cristales de CaOx tienden a aparecer de forma individual o múltiple por célula en función de su morfología.

1.3 Composición y ultraestructura asociada a los cristales de CaOx

Aunque el CaOx precipitado en las plantas tiene formas geométricas particulares, presenta birrefringencia y son llamados “cristales”, en realidad no se tiene certeza de si estos poseen un arreglo cristalino y si están compuestos únicamente por CaOx. Sin embargo, la evidencia indica que su composición es compleja y se trata de una combinación heterogénea de oxalato de calcio y materia orgánica (Weber et al., 2016). Esta materia orgánica tiene origen en tres elementos ultraestructurales que participan en la formación del cristal dentro de la vacuola del idioblasto cristalero: la cámara del cristal, vesículas, y una matriz orgánica (Frank and Jensen, 1970; Prychid et al., 2008; Webb, 1999).

La cámara del cristal consiste en una membrana de naturaleza lipídica que envuelve estrechamente cada cristal individual en crecimiento. Las vesículas son estructuras redondeadas también de naturaleza lipídica, que podrían participar en el transporte vesicular. Los reportes sugieren que estas vesículas eventualmente se convierten en cámaras del cristal al comenzar a nuclear CaOx en su interior o incorporarse a la cámara de un cristal en crecimiento. Por último, el término “matriz orgánica” es ambiguo y ha sido usado subjetivamente en la bibliografía (Figura 5) (Prychid y Rudall, 1999; Volk et al., 2002; Webb et al., 1995).

En términos generales “matriz orgánica” puede referirse a cualquier material orgánico (incluso en ocasiones las propias cámaras del cristal y vesículas) que se encuentre dentro de la vacuola del idioblasto cristalero (vacuolar), o embebida en el propio cristal (del cristal). Esta ambigüedad atañe a dos factores. El primero es que la cantidad, ubicación y propiedades fisicoquímicas de la matriz orgánica varían en función del tipo de cristal y probablemente la especie de planta. La segunda, es por el gran vacío en el conocimiento respecto a su composición y función, derivado también de la falta de métodos que ayuden a aislar y purificar este material (Frank y Jensen, 1970; Li et al., 2003; Prychid et al., 2008)

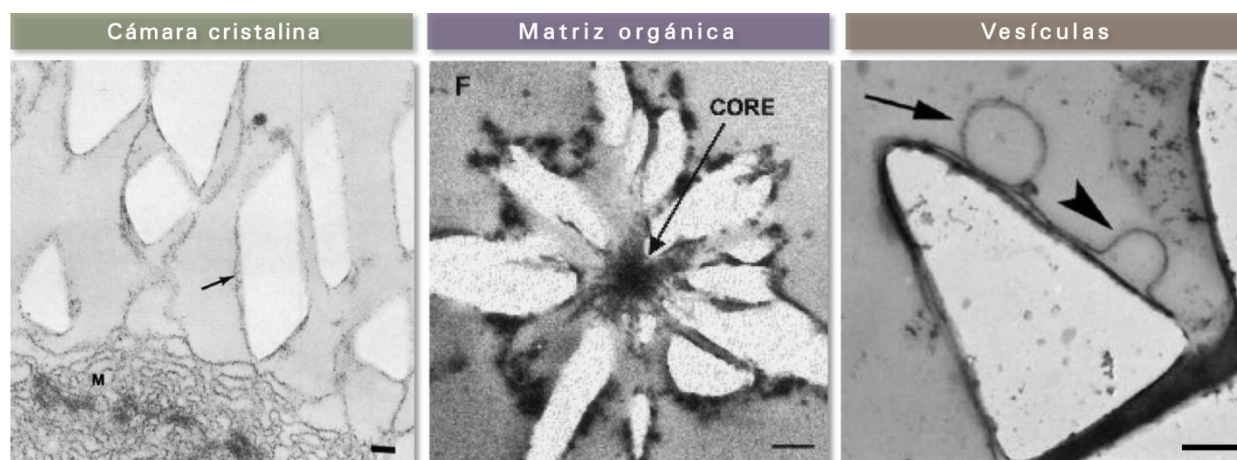


Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de los elementos ultraestructurales asociados a la formación de cristales de CaOx. La cámara cristalina es un material membranoso de naturaleza aparentemente lipídica que rodea cada cristal en formación. La matriz orgánica es un término genérico que puede referir a cualquier material no mineral asociado a los cristales. La cámara cristalina podría convertirse eventualmente en matriz orgánica. Las vesículas, de naturaleza aparentemente lipídica se forman en organelos de la célula y posteriormente viajan a la vacuola para incorporarse a las cámaras del cristal de los cristales en crecimiento. Barras de izquierda a derecha: 0.1 μm , 0.5 μm y 2.0 μm .

La matriz orgánica podría tener la información para resolver las dos principales incógnitas respecto a los cristales de CaOx: ¿Cómo adquieren su forma y qué funciones tienen? Se especula que la matriz orgánica y/o la cámara cristalina son las ultraestructuras responsables de dar la forma característica a los cristales de CaOx en plantas. En el caso de la cámara cristalina, a través de un “moldeado” del cristal en crecimiento al limitar geométricamente el espacio en el que éste puede expandirse. En el caso de la matriz orgánica, no se ha propuesto un mecanismo, pero podría ser a través de interacciones a nivel molecular (Li et al., 2003; Webb, 1999).

1.4 Proteínas asociadas a los cristales de CaOx

Se ha reportado que la matriz orgánica está compuesta por polisacáridos, lípidos y proteínas (Webb et al., 1995). Se ha dado especial atención a las proteínas, las cuales se cree podrían tener una participación especial en la precipitación y moldeado del cristal (Bouropoulos et al., 2001; David Jáuregui-Zúñiga et al., 2005b; Li et al., 2003; Paull et al., 2022; Webb et al., 1995). No obstante, para abordar los hallazgos previos entorno al

aislamiento de proteínas de cristales de CaOx, vale la pena acotar las posibles localizaciones ultraestructurales de dichas proteínas. Primero, podríamos dividir las proteínas embebidas en el cristal (del cristal) de las que están en su periferia (vacuolares), y después hacer una subdivisión en proteínas hidrófilas o hidrófobas.

Los estudios que han aislado proteínas vacuolares se han realizado en rafidios. Los rafidios se pueden aislar fácilmente con solventes orgánicos estando aún dentro de su vacuola. Después, con soluciones acuosas se disgrega la vacuola, se liberan los rafidios y el sobrenadante resultante contiene proteínas hidrofílicas (PHI-Vac). Posteriormente, los sedimentos formados por los rafidios y restos de la vacuola son tratados con detergentes y agentes caotrópicos para extraer proteínas hidrofóbicas (PHF-Vac). Ambos grupos de proteínas tendrían su origen en el propio contenido de la vacuola y/o superficies externas de los rafidios (Tabla 1).

Por otro lado, hay estudios que han aislado proteínas embebidas en los cristales de CaOx (del cristal), y se han realizado en más variedad de morfologías además de los rafidios. En ellos, los cristales son aislados y purificados de residuos celulares (incluida la vacuola), y posteriormente son disueltos en un medio acuoso con ayuda de EDTA o resinas de intercambio iónico. Tras la disolución, se obtiene una fase acuosa y un sedimento. La fase acuosa puede contener proteínas hidrofílicas del cristal (PHI-Ox). Posteriormente, el sedimento es lavado y tratado con detergentes y agentes caotrópicos para extraer proteínas hidrofóbicas también del cristal (PHF-Ox). Dos estudios refieren haber encontrado PHI-Ox en cristales prismáticos y de arena (Bouropoulos et al., 2001; Jáuregui-Zúñiga et al., 2005b). En contraparte, un estudio refiere no haber detectado ninguna PHI-Ox, pero si PHF-Ox en drusas y rafidios (Li et al., 2003)(Tabla 1).

Tabla 1. Extractos proteínicos asilados de cristales de CaOx y matriz orgánica en estudios previos

Referencia	Especie	Órgano	Morfología	PHI-Ox	PHF-Ox	PHI-Vac	PHF-Vac	Análisis realizado	Proteínas identificadas
Webb et al., 1995)	<i>Vitis labrusca</i>	Hojas	Rafidios	---	---	✓	✓ ¹	SDS-PAGE	Ninguna
(Bouropoulos et al., 2001)	<i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Nicotiana tabacum</i>	Hojas	Cristales de arena y prismáticos	✓	---	---	---	Aminograma	Ninguna
(Li et al., 2003)	<i>Pistia stratiotes</i>	Hojas	Rafidios y drusas	ND	✓	---	---	SDS-PAGE Aminograma	Ninguna
(Jáuregui-Zúñiga et al., 2005b)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Testa de la semilla	Cristales prismáticos	✓	---	---	---	SDS-PAGE	Ninguna
(X Li et al., 2014)	<i>Musa spp.</i>	Pseudotallos	Rafidios	✓	✓ ²	---	---	SDS-PAGE	Proteína desconocida con dominio DnaJ (chaperona)
(Paull et al., 2022)	<i>Colocasia esculenta</i>	Pecíolos	Rafidios	---	---	✓	✓ ²	Secuenciación de péptidos por GC-MS	Varias, destacando profilinas, actina, y subunidades de la ATPasa.

PHI-Ox: Proteínas hidrofílicas embebidas en los cristales de CaOx

PHF-Ox: Proteínas hidrofóbicas embebidas en los cristales de CaOx

PHI-Vac: Proteínas hidrofílicas vacuolares

PHF-Vac: Proteínas hidrofóbicas vacuolares

ND: No detectado

¹: Disolvieron la MO en agua para extraer proteínas hidrófilas y después extrajeron las hidrófobas con detergentes. Los rafidios no fueron disueltos.

²: Se analizó proteína total

En cuanto a proteínas vacuolares, se han identificado varias en los rafidios de la planta del taro (*Colocasi esculenta*), destacando profilinas, actina y subunidades de la ATPasa (Paull et al., 2022). En cuanto a proteínas del cristal, se han identificado solamente una “proteína desconocida” con un motivo conservado DnaJ (Tabla 1). DnaJ es una chaperona de bacterias cuyo ortólogo en eucariotas es la cochaperona Hsp40 (Heat shock protein) que funciona en interacción con Hsp70, involucrada a su vez en respuesta a estrés (Li et al., 2014). En estudios inmunohistoquímicos se han identificado tres proteínas asociadas a los bordes de los cristales de CaOx: calreticulina, extensinas y proteínas arabinogalactanas (AGPs) (Leszczuk et al., 2019; Nakata et al., 2003; Płachno et al., 2020).

La calreticulina es una proteína del retículo endoplásmico con alta afinidad por el calcio. Se hipotetiza que esta proteína podría participar en la regulación de las concentraciones de calcio en el idioblasto cristalero, coadyuvando a la formación del

crystal (Nakata et al., 2003). Las extensinas y AGPs son proteínas relacionadas con la pared celular cuya función en los cristales de CaOx no es claro. No obstante, existe más evidencia que apunta a la participación de proteínas de pared celular en la formación de cristales. En un estudio realizado por Nakata y McConn (2002) observaron que la acumulación de cristales de CaOx está asociada con un incremento en la expresión de genes relacionados con la pared celular.

1.5 Justificación

El conocimiento actual que se tiene sobre los cristales de CaOx es disperso y en ocasiones ambiguo. Las preguntas principales entorno a ellos son: ¿Cómo adquieren su forma y cuál es su función? Aunque se han propuesto una variedad de respuestas, hace falta generar más y mejores evidencias que soporten dichas hipótesis. Por otro lado, en nuestro grupo de investigación proponemos que el metabolismo C₄ y los cristales de CaOx podrían estar relacionados con la tolerancia al estrés hídrico en la planta de amaranto, mediante el flujo de carbono entre sus células.

1.6 Objetivo

Caracterizar la morfología, histología, ultraestructura y proteínas asociadas a los cristales de la hoja de *A. cruentus* por medio de análisis histológicos y de herramientas proteómicas, a fin de obtener evidencias que ayuden a entender cómo adquieren su forma y cuál es su función.

1.7 Hipótesis

Los cristales de oxalato de calcio contienen proteínas embebidas en su interior, las cuales estarían relacionadas con la adquisición de su forma y funciones fisiológicas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Las semillas de *A. cruentus* L. cv. Amaranteca, amablemente proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), se germinaron en mezcla de sustrato BM2 para germinación de semillas (Berger, Saint-Modeste, Quebec, CA). Las plántulas de 8 días se trasplantaron a 500 g del mismo sustrato y se transfirieron a una cámara climática a 25 °C con 12 h de luz/oscuridad. Las plantas se fertilizaron con 200 mL de solución nutritiva de 1,5 g/L (Hydro-Environment, México) cada tres días. Después de tres semanas, se cosechó la cuarta hoja completamente expandida.

2.2 Preparación de muestras para microscopía

Se limpió un fragmento de tejido foliar como se ha descrito previamente (Warner et al., 2014) y se tomaron micrografías de campo claro en un microscopio Zeiss Discovery V8 (Carl-Zeiss, Oberkochen, GE). Las muestras de hojas aclaradas y sin aclarar se incluyeron en crioglue y se montaron en un soporte de criostato a -20 °C. Se obtuvieron cortes paradermales y transversales (de 20 µm de grosor) para microscopía óptica y SEM. Los cortes para microscopía SEM se colocaron sobre un cubreobjetos y no se trataron con tetróxido de osmio.

Otros fragmentos de hoja se fijaron en glutaraldehído al 3% en PBS sódico (fosfato sódico 10 mM, NaCl 130 mM, pH 7,4) a 4 °C durante 1 h, y se lavaron tres veces con PBS durante 10 min. Las muestras se posfijaron con OsO₄ al 2 % en PBS durante 1 h a 4 °C, se lavaron tres veces con PBS durante 10 min y se deshidrataron en series de etanol del 30 % al absoluto a 4 °C 10 min cada vez. La preinclusión se realizó en resina LR White (LRW) en relación 1:1 resina:etanol absoluto durante 2 h, y después en LRW pura durante toda la noche, seguida de 2 h de incubación con LRW fresca y finalmente transferida a LRW fresca en cápsulas de gelatina y polimerizada a 50 °C durante 48 h. Para microscopía óptica y

electrónica, se obtuvieron cortes semifinos y ultrafinos respectivamente en un ultramicrotomo (RMC, Boeckeler Instruments, Inc., Tucson, AZ, USA).

2.3 Microscopía óptica

Se tomaron micrografías de campo claro, contraste de interferencia diferencial (DIC) y epifluorescencia en un microscopio Zeiss Axio imager M2 equipado con filtros dicróicos (Carl-Zeiss). Se utilizaron tres señales de autofluorescencia: la emisión azul se capturó con un filtro Bandpass (BP) 445/50; la emisión verde se capturó con un filtro BP 525/50 nm; y la emisión roja se capturó con un filtro Longpass (LP) 615 nm. Según la longitud de onda de excitación, las imágenes se identificaron como 360 nm, 470 nm y 560 nm, respectivamente. Se realizaron ajustes de exposición, contraste, brillo y saturación del color en las imágenes digitales capturadas.

2.4 Microscopía electrónica

Los cortes ultrafinos de resina se colocaron en una rejilla de cobre de 150 hoyos cubierta con película de formvar y carbón(FCF-150 Cu),. Se contrastaron con acetato de uranilo al 2% durante 10 min, seguido de citrato de plomo al 2% durante 4 min. Por último, las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) JEM-200 CX (JEOL, Ltd., Akishima, TYO, JP) a 100 kV equipado con una cámara digital (SIA, Duluth, GA, EE.UU.).

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), la mayoría de las muestras se sometieron al "procesamiento clásico". Dicho procesamiento consistió en la fijación, deshidratación gradual y secado de punto crítico en un Samdri-PVT-3D (Tousimis, Rockville, MD, EE.UU.). Las muestras secas se recubrieron con oro en un recubridor 108 Auto /SE (Cressington Scientific Instruments Ltd., Watford, Reino Unido). A continuación, las muestras se examinaron en el microscopio electrónico de barrido FEI-ESEM QUANTA FEG-250 (FEI Co., Hillsboro, OR, EE.UU.) funcionando a 15 kV. Por otra parte, algunos

bloques de resina pulida (con su respectiva muestra expuesta en la cara pulida) se montaron en portamuestras de aluminio o “stubs” con cinta de carbono de doble cara y se recubrieron de oro para SEM.

2.5 Aislamiento e identificación de las proteínas asociadas a los cristales de CaOx

Los cristales de CaOx de amaranto se aislaron en alta pureza como se describe en (Cerritos-Castro et al., 2022). Una vez obtenidos los cristales puros de CaOx, se extrajeron las proteínas unidas a ellos. Brevemente, las hojas de la planta se trituraron en una batidora, se filtraron a través de una gasa y se centrifugaron. El precipitado se lavó con agua, etanol, cloroformo y metanol para eliminar lípidos y clorofilas. Los restos celulares se eliminaron utilizando enzimas degradadoras de la pared celular (driselasa y macerozima), seguidas de la adición de Tritón X-100 para lavar las proteínas liberadas. La mezcla se centrifugó y el pellet, que contenía cristales, se lavó con tampón de extracción de proteínas (urea 7 M, tiourea 2 M, y Tritón X-100 2%) y se digirió de nuevo con macerozima, seguida de pancreatina (incluye proteasas, lipasas y amilasa). Después de la centrifugación y para aumentar la pureza de los cristales, el pellet se centrifugó en politungstato de sodio a 1.9 g/ml, y se filtró a través del filtro whatman #113 (tamaño de poro de 30 μ m) para separar los restos grandes y las diferentes formas de los cristales. Un conjunto de los cristales aislados se analizó mediante difracción de rayos X (DRX) y se comparó con cristales de CaOx sintético. Los cristales de amaranto y los cristales sintéticos de CaOx se cargaron en un sustrato de cuarzo y se analizaron por DRX D8 Advance (Bruker) a 35 kV y 25 mA.

Para aislar e identificar las proteínas unidas a los cristales, éstos se disolvieron en EDTA 125 mM y las proteínas liberadas se analizaron por SDS-PAGE. Las bandas de proteínas fueron extraídas del gel manualmente y se analizaron por LC-MS/MS (Joaquín-Ramos et al., 2014). Los conjuntos de datos m/z fueron analizados empleando el motor de búsqueda MASCOT v2.5 contra la base de datos de proteínas de amaranto depositada en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)(Clouse et al., 2016).

2.6 Tinción de cortes histológicos en resina

Los cortes en resina se sumergieron en safranina al 0,5% (en etanol al 50%) durante 10 s, se aclararon con agua, se sumergieron en azul brillante de Coomassie durante 10 s y se aclararon en solución disolvente (MeOH al 20% y ácido acético al 5%) durante 3 s.

2.7 Análisis inmunohistoquímico e inmunooro

Para el análisis inmunohistoquímico (IHC), los cortes en resina se sometieron a recuperación de antígeno con 50 mL/mL de solución de proteinasa k en PBS a 37 °C durante 30 min. A continuación, se inactivó la proteinasa calentándola a 95 °C durante 5 min y se enjuagaron tres veces con PBS, agua y, por último, en TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 1% pH 7,6). Los cortes se bloquearon con 200 µl de BSA al 1% en TBST (solución de bloqueo) a 37 °C durante 30 min, después se retiró la solución de bloqueo y se añadieron 200 µl de anticuerpo de conejo anti-Rbcl (anti-subunidad grande de RuBisCO) (Agrisera, Vännäs, Suecia) a una dilución 1:500 en la solución de bloqueo. Los cortes se incubaron a 37 °C durante 1 h y se lavaron dos veces con TBST durante 5 min cada una. A continuación, se añadieron 200 µl de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA diluido a 1:500 en solución de bloqueo y las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Las muestras se lavaron dos veces con TBST y el revelado del color se llevó a cabo con 500 µl de solución BCIP/NBT a 37 °C durante 2 h. Los cortes se lavaron dos veces con TBST, una con agua y se secaron al aire. Por último, los cortes se montaron con entellan y un cubreobjetos, y se tomaron micrografías ópticas.

Para el análisis de inmunooro, los cortes de resina colocados en rejilla se trataron con glicina 0.05M en TBST por 20 min para inactivar grupos aldehídos residuales, posteriormente se bloquearon con BSA 2.5% en TBST por 30 min. Se incubó con anticuerpo anti-Rbcl de conejo diluido 1:10 en TBST durante 2 h. A continuación, los

cortes se lavaron tres veces con TBST durante 5 min cada vez, y se añadió el anticuerpo secundario cabra anti-conejo marcado con partículas de oro de 18 nmCat. No. 111-215-144 (Jackson ImmunoResearch Inc., West Baltimore Pike, PA, EE.UU.) diluido 1:50 en solución de bloqueo y se incubó durante 30 min. A continuación, los cortes se lavaron dos veces con TBST y una vez con agua destilada. Por último, los cortes se contrastaron y observaron en el microscopio TEM como se ha descrito anteriormente.

3. RESULTADOS

3.1 Histología de la hoja de amaranto y distribución de sus idioblastos cristaleros

La hoja de amaranto está formada por venas y lámina de la hoja. La vena media es la más grande y de ella emergen venas primarias, seguidas de secundarias y consecutivamente terciarias, disminuyendo su calibre cada vez más. En una hoja fresca las venas grandes (media, primarias y secundarias) son visibles a simple vista por su protuberancia, mientras que las terciarias no lo son. Tomando como referencia el eje longitudinal de la vena media se pueden realizar cortes histológicos en tres planos diferentes: el transversal, longitudinal y paradermal (Figura 6).

En un corte transversal se observa la composición tisular global de la hoja; epidermis, células parenquimatosas, mesófilo, CVH, haces vasculares, y los idioblastos formadores de drusas y cristales de arena. Las células parenquimatosas están presentes alrededor de las venas grandes y son las responsables de su protuberancia. Mientras tanto, las venas terciarias carecen de este tejido a su alrededor y permanecen distribuidas justo en la mitad del espesor de la hoja (Figuras 7 y 8).

Todas las venas están flanqueadas por CVH, sin embargo, solo las venas terciarias muestran una anatomía de “Kranz perfecta”, ya que están completamente rodeadas por CVH formando anillos. A su vez, las CVH están rodeadas por las CM mostrando dos

morfologías: en empalizada y esponjoso. Las CVH y CM poseen cloroplastos, pero con diferente ubicación, tamaño y contenido de almidón (Figura 7).

Los idioblastos cristaleros formadores de cristales de arena (ICA) se encuentran distribuidos aleatoriamente entre las células parenquimatosas. Por su lado, los idioblastos cristaleros formadores de drusas (ICD) se encuentran distribuidos entre las CM, justo a la mitad del espesor de la hoja al igual que las venas terciarias. Un corte transversal muestra varios ICA, pero pocos ICD, mientras que uno paradermal muestra varios ICD pero muy pocos o nulos ICA, por lo que ambos cortes son complementarios para poder estudiar un mayor número de estos tipos celulares (Figuras 7 y 9).

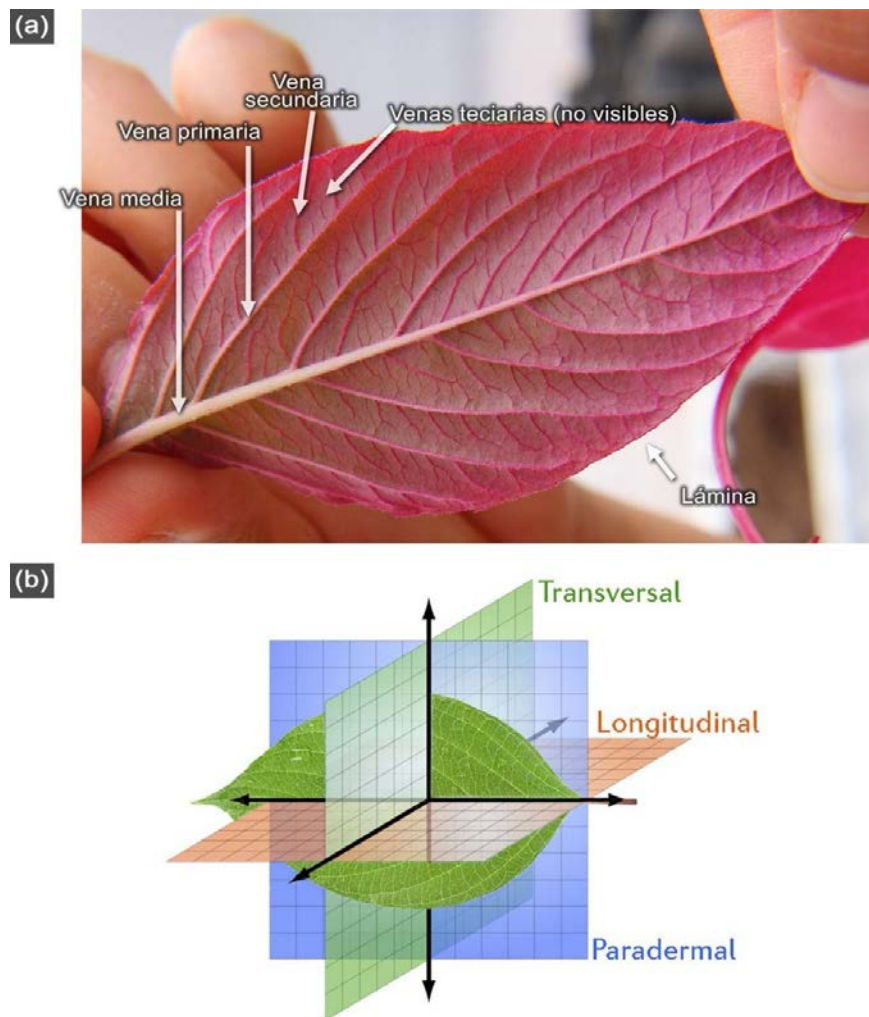


Figura 6. Anatomía de la hoja de amaranto y planos de corte. (a) La hoja consta de un entramado de venas de diferente tamaño rodeadas de la lámina de la hoja. (b) La hoja puede ser cortada en tres planos diferentes. Los planos longitudinal y transversal proveen un área de tejido limitada por el espesor de la hoja (del haz al envés). Por su lado, el plano paradermal puede proveer información de una gran extensión celular, limitado por área de la hoja.

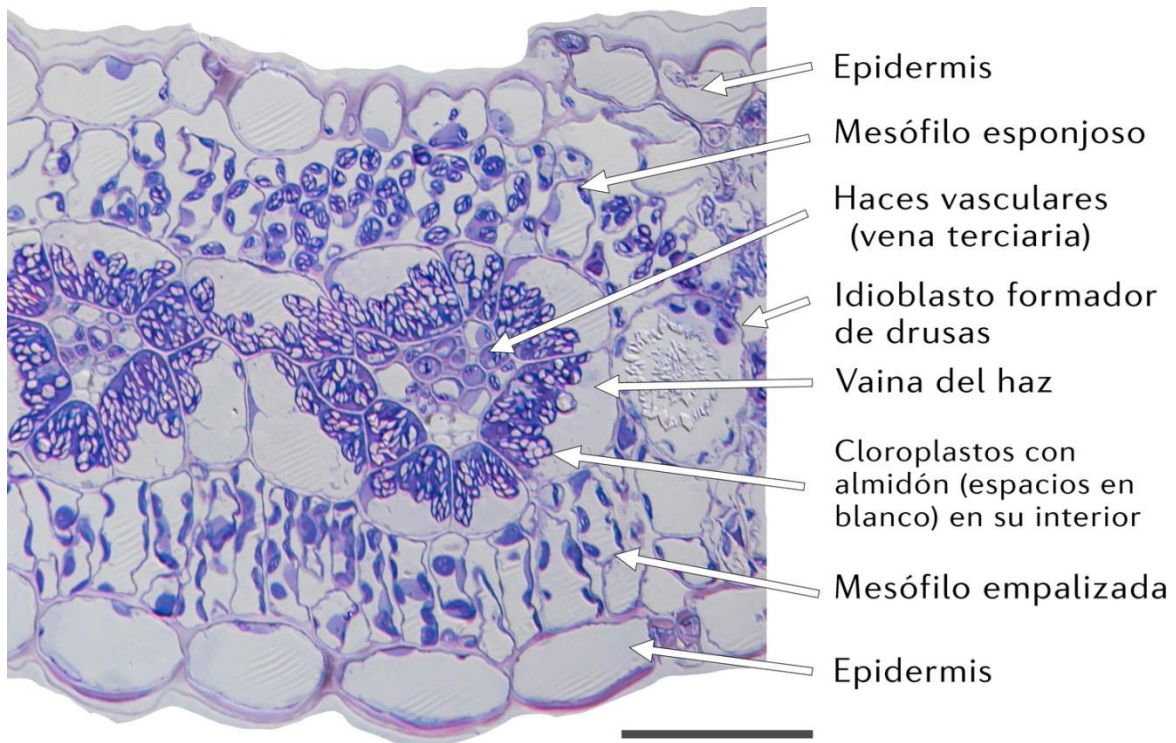


Figura 7. Arquitectura celular observada en un corte transversal de la lámina de la hoja.
Barra de escala: 50 μm .

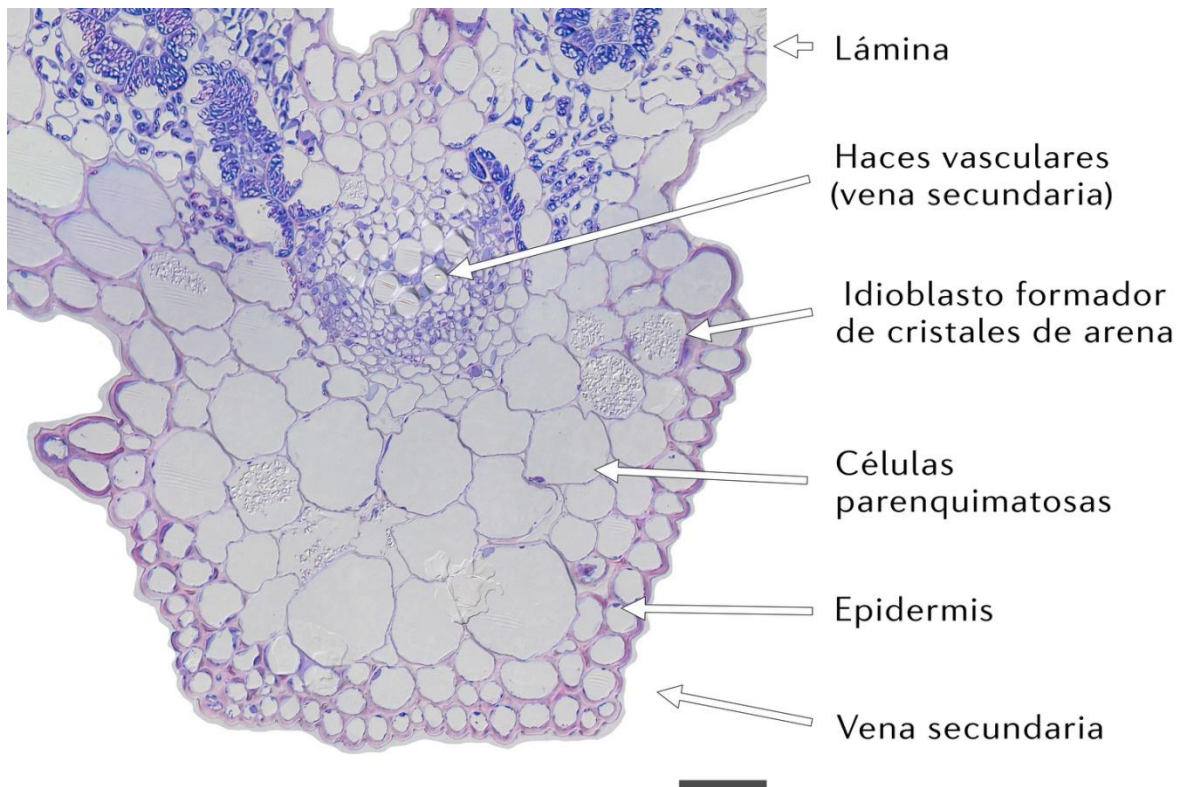


Figura 8. Arquitectura celular observada en un corte transversal de una vena secundaria.
Barra de escala: 50 μm .

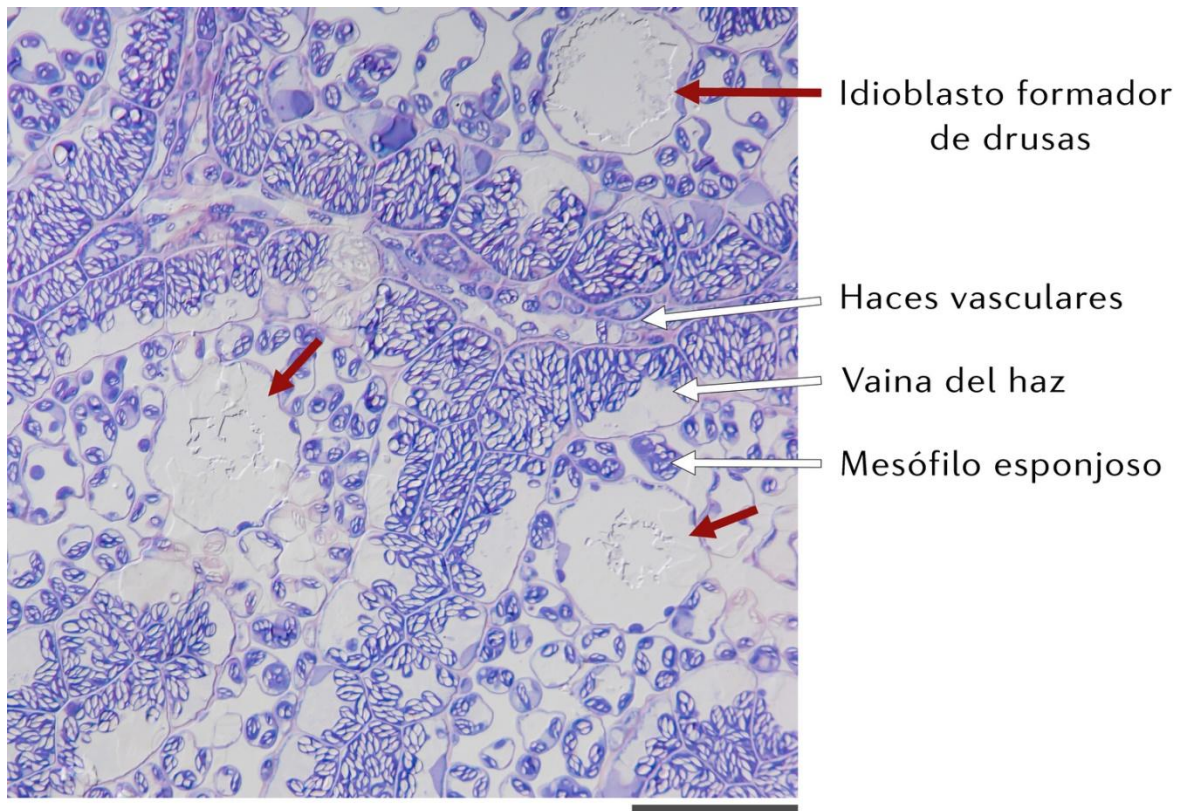


Figura 9. Arquitectura celular observada en un corte paradermal de hoja de amaranto. En un corte paradermal se pueden observar extensiones amplias de tejido, sin embargo no están presentes todos as diferentes morfologías celulares. Barra de escala: 50 μ m.

Los cristales de arena se observaron en el interior de todas las venas grandes (Figura 10a). Por su lado, las drusas se observaron solo en la lámina de la hoja, entre el mesófilo y las CVH, con tamaños de hasta 57 μm . Las drusas mostraban birrefringencia bajo microscopía DIC y sólo había una drusa por célula o idioblasto de drusa (Figura 10b). Las drusas no parecían un cuerpo sólido perfecto, sino un material esponjoso (Figura 10c). Dentro de las venas grandes, los cristales se acumulan a lo largo del eje de las venas formando líneas rectas discontinuas con tamaños de hasta 180 μm (Figura 10d). Estos cristales mostraron una forma de cristal-arena y se localizaron entre las células parenquimatosas de las venas grandes (Figura 10e). Los cristales de arena también mostraron birrefringencia en microscopía DIC y se acumula como múltiples cristales por idioblasto (Figura 10f).

Bajo microscopía de epifluorescencia, varios elementos celulares mostraron autofluorescencia azul, relacionada con las paredes celulares (Figura 11b,f), verde de las paredes lignificadas de los haces vasculares (Figura 11c,g), y roja de la clorofila de los cloroplastos (Figura 11d). Algunas drusas también mostraron un grado variable de autofluorescencia verde procedente de su núcleo (Figura 11 a-d). Por otro lado, los cristales de arena no mostraron autofluorescencia (Figura 11 e-h).

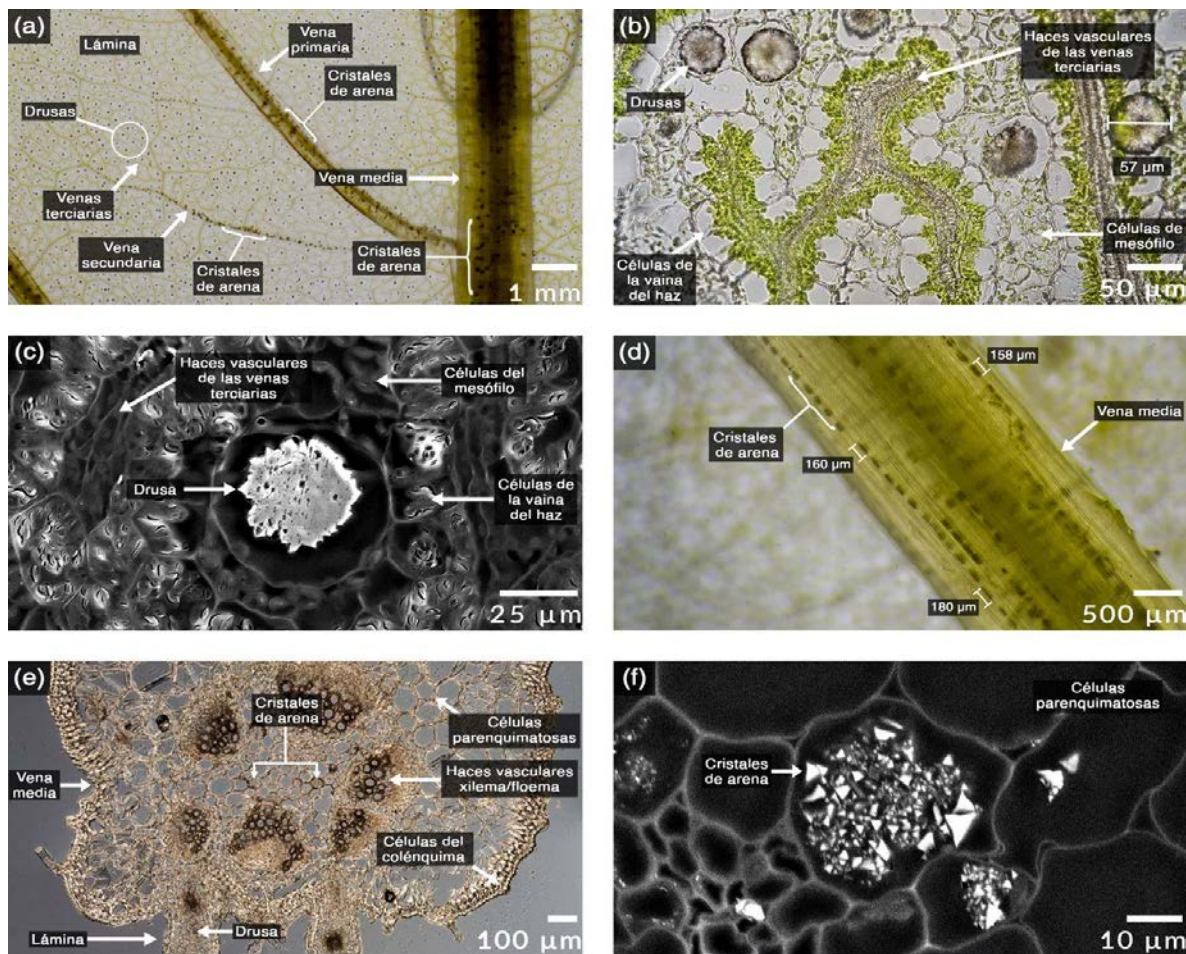


Figura 10. Distribución histológica de los cristales de CaOx en hoja de amaranto. (a) Micrografía de campo claro de una hoja aclarada donde se observan los cristales como puntos negros. (b) Microscopía DIC y (c) SEM de cortes paradermales de hoja. (d) Microscopía de campo claro de la vena media. (e) Microscopía DIC y (f) SEM de un corte trasversal de una vena media y vena secundaria respectivamente.

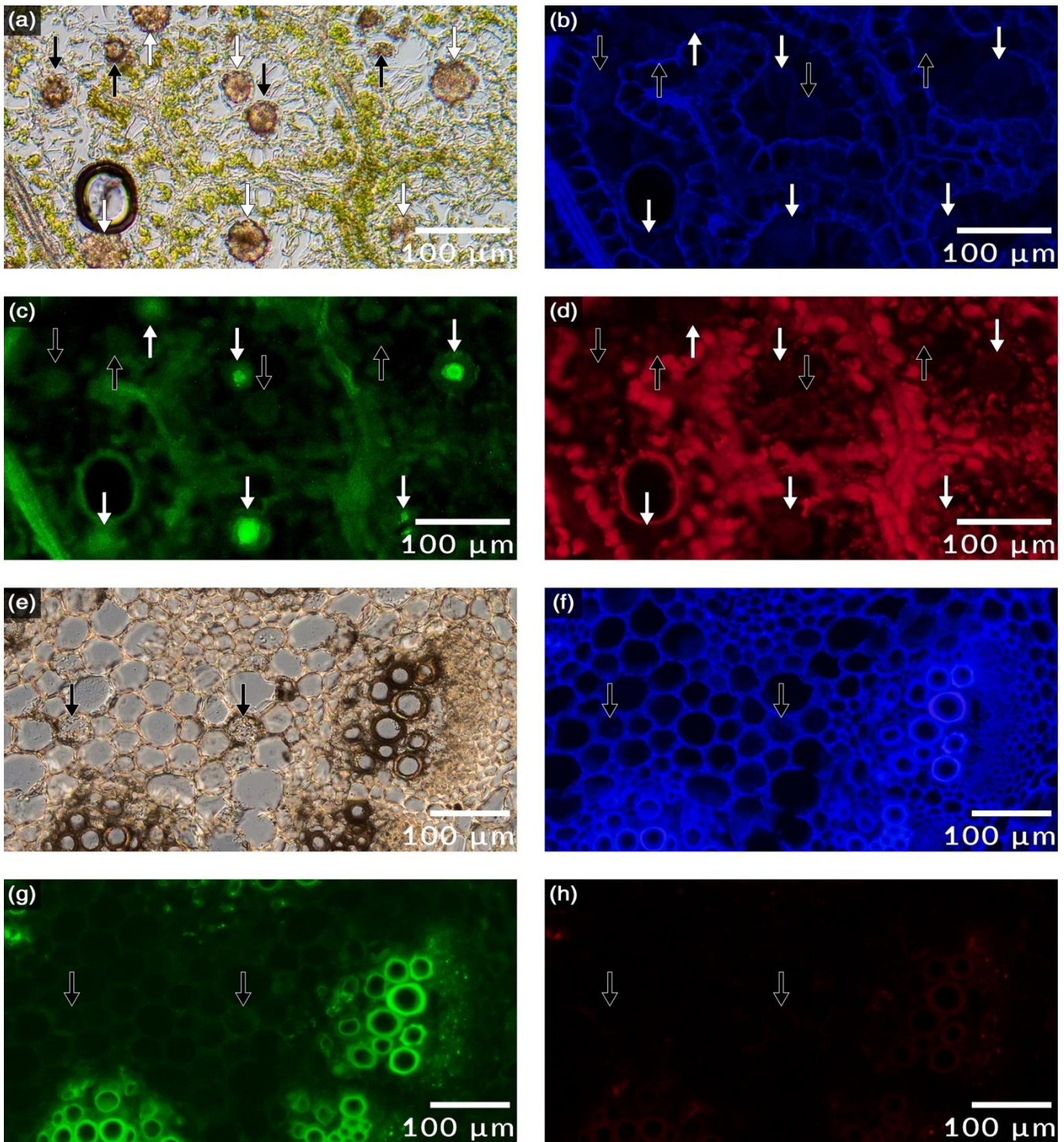


Figura 11. Propiedades autofluorescentes de los cristales de amaranto. Corte paradermal fresco de hoja de amaranto observado en microcopia DIC (a) y de epifluorescencia con una longitud de onda de excitación de 360 nm (b), 470 nm (c) y 560 nm (e). Algunas drusas muestras autofluorescencia verde a 470 nm (marcado con flechas blancas), mientras que otras no (marcadas con flechas negras). A 360 y 560 nm las drusas no mostraron autofluorescencia. Corte transversal de una vena media de amaranto observado en microscopía DIC (e) y de epifluorescencia con una longitud de onda de excitación de 360 nm (f), 470 nm (g) y 560 nm (h). Los cristales de arena no mostraron autofluorescencia a ninguna longitud de onda.

3.2 Estructura y composición de los cristales de hoja de amaranto

Las drusas son conglomerados semiesféricos de cristales polimórficos individuales con un diámetro medio de 50 μm , en consecuencia; no mostraban una textura superficial específica (Figura 12a,b). Las drusas tienen bordes afilados, pero en su interior son amorfas (Figura 13a,b). Además, las drusas aisladas también mostraban autofluorescencia verde como se observó *in situ*, sin embargo; el grado de autofluorescencia era variable, algunas drusas no la mostraban, otras tenían un núcleo altamente fluorescente, mientras que otras sólo tenían un borde fluorescente (Figura 13 c,d). Por el contrario, los cristales individuales de arena no mostraron autofluorescencia (Figura 13 e-h).

Alternativamente, los cristales de arena estaban formados por cristales individuales con una forma piramidal media, con tamaños de hasta 3 μm (Figura 12 c,d). Del mismo modo, los cristales de CaOx sintético no tenían una forma regular como los cristales de CaOx vegetal (Figura 12 e). Los cristales de amaranto estaban compuestos de oxalato de calcio (CaOx), como se evidenció al mostrar el mismo espectro de difracción de rayos X que el CaOx sintético (Figura 12 f).

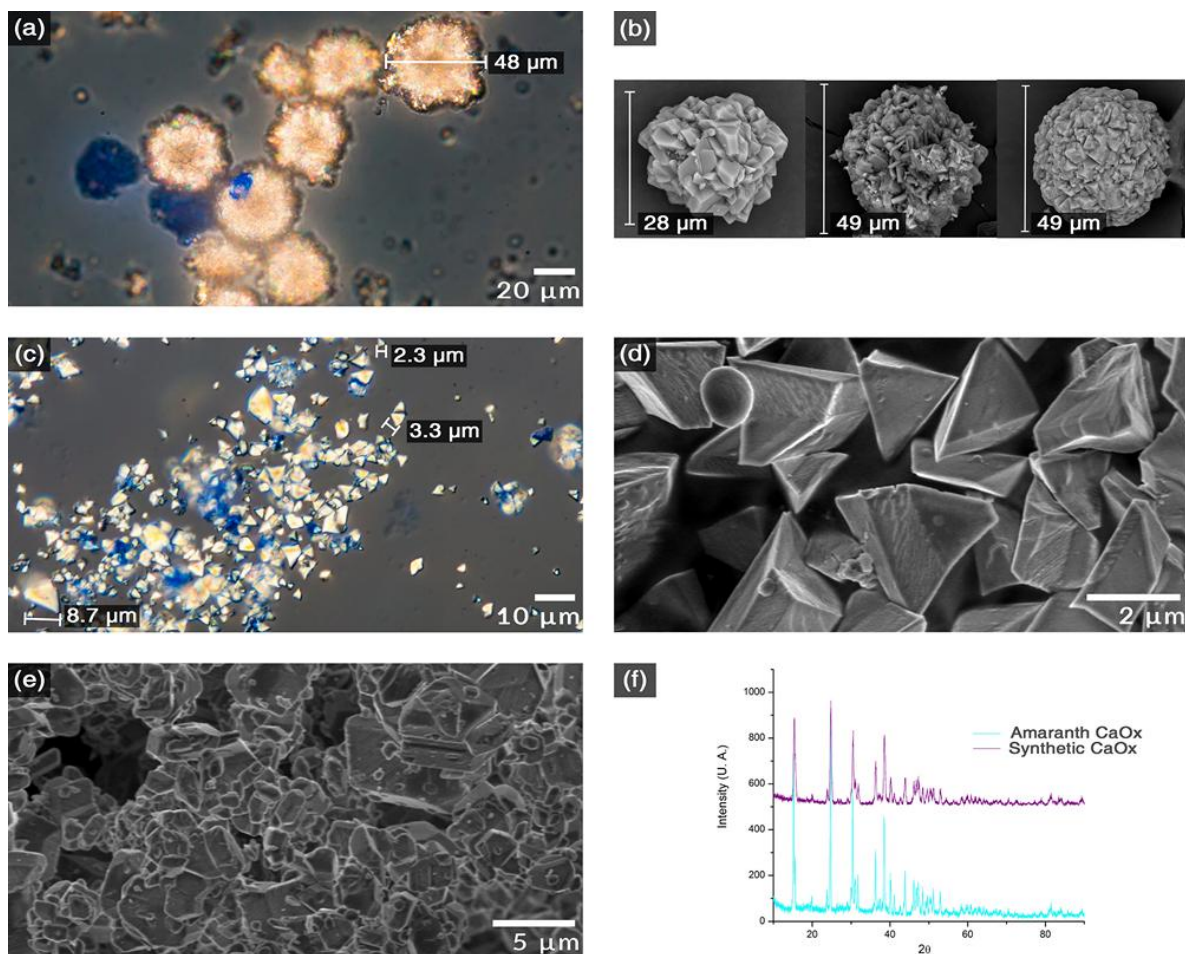


Figura 12. Morfología y composición de los cristales aislados de hoja de amaranto. Microscopía DIC (a) y SEM (b) de drusas aisladas. Microscopía DIC (c) y SEM (d) de cristales de arena aislados. (e) Microscopía SEM de cristales de COx sintéticos. (f) Análisis de difracción de rayos-X de cristales de CaOx sintéticos y los cristales aislados de hoja de amaranto.

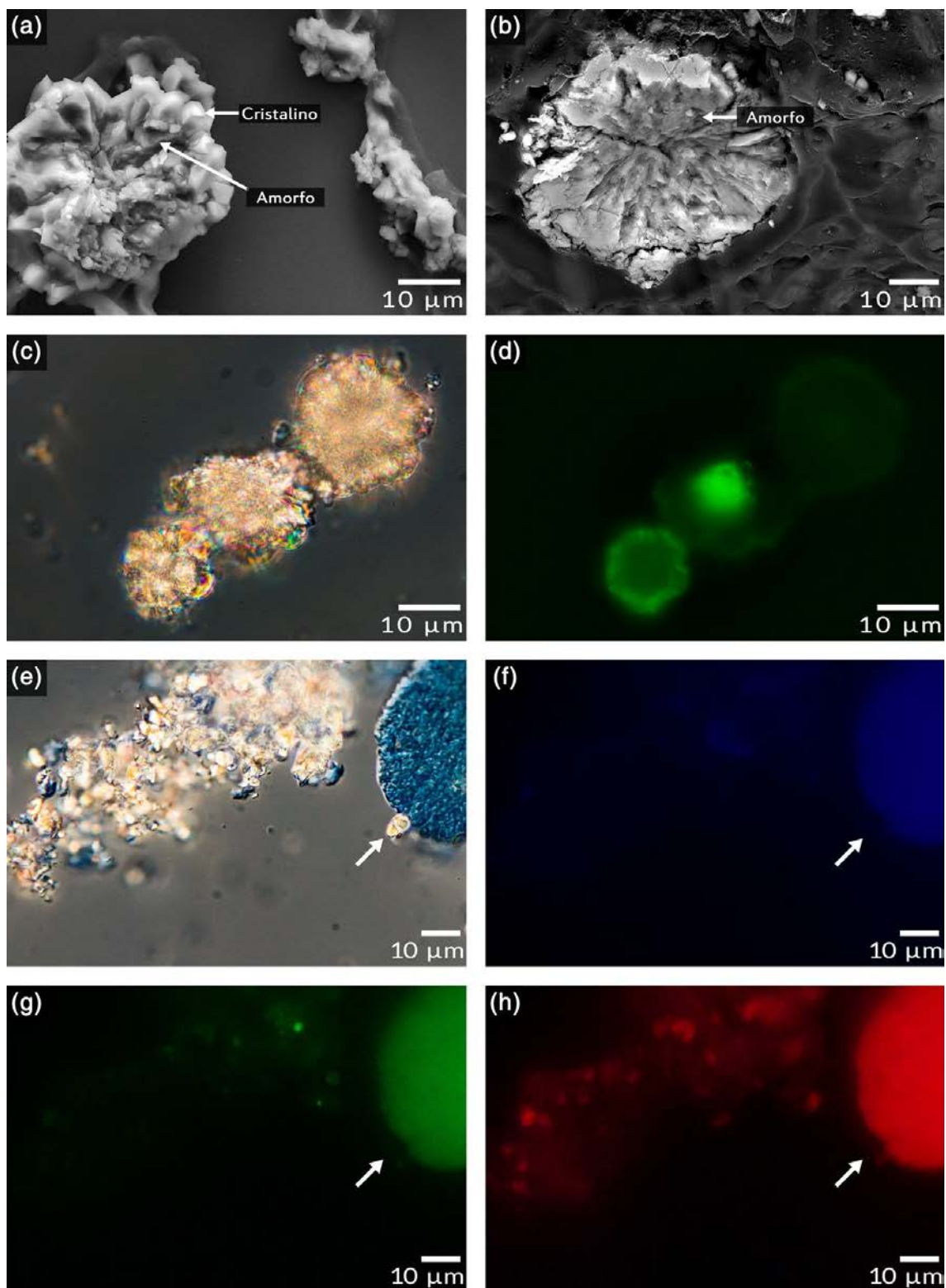


Figura 13. Estructuras de las drusas y su relación con la autofluorescencia. (a) Microscopía SEM de una criosección de hoja. (b) Micrografía SEM de una hoja incluida en un bloque de resina. (c) Tres drusas observadas en microscopía DIC (c) y a 470 nm (d). Cristales de arena observados en microscopía DIC (e) y a 360 nm (f), 470 nm (g) y 560 nm (h). La flecha apunta al mismo cristal en las cuatro imágenes.

3.3 Identificación de las proteínas asociadas a los cristales de CaOx de amaranto

Tras el aislamiento de los cristales de CaOx, se obtuvieron cuatro fracciones de cristales. La fracción 1 estaba compuesta principalmente por cristales de arena, la fracción 2 era similar a la fracción 1, pero con una menor concentración de cristales (Figura 14a,b). La fracción 3 tenía una alta concentración de cristales compuestos de cristales de arena y fragmentos de drusa (Figura 14 c), y la fracción 4 consistía casi totalmente en drusas (Figura 14d). Las proteínas de estas fracciones cristalinas se extrajeron utilizando EDTA (proteínas hidrófilas), y posteriormente agentes caotrópicos y detergentes (proteínas hidrófobas) y se analizaron mediante SDS-PAGE. Debido a la alta concentración de cristales en la fracción 3 (Figura 14 c,e), se detectaron proteínas hidrofóbicas (proteínas unidas a membranas). Se extrajeron bandas del gel y se analizaron mediante nano-LC-MS/MS. Las proteínas identificadas están relacionadas principalmente con los cloroplastos, incluyendo la subunidad "b" de la ATP sintasa cloroplástica (ATPb), proteínas de unión a la clorofila, proteínas de los fotosistemas I y II, y beta-amilasa. También se identificaron proteínas relacionadas con la pared celular y la proteína 4 similar a extensinas con repeticiones ricas en leucina (Tabla 2).

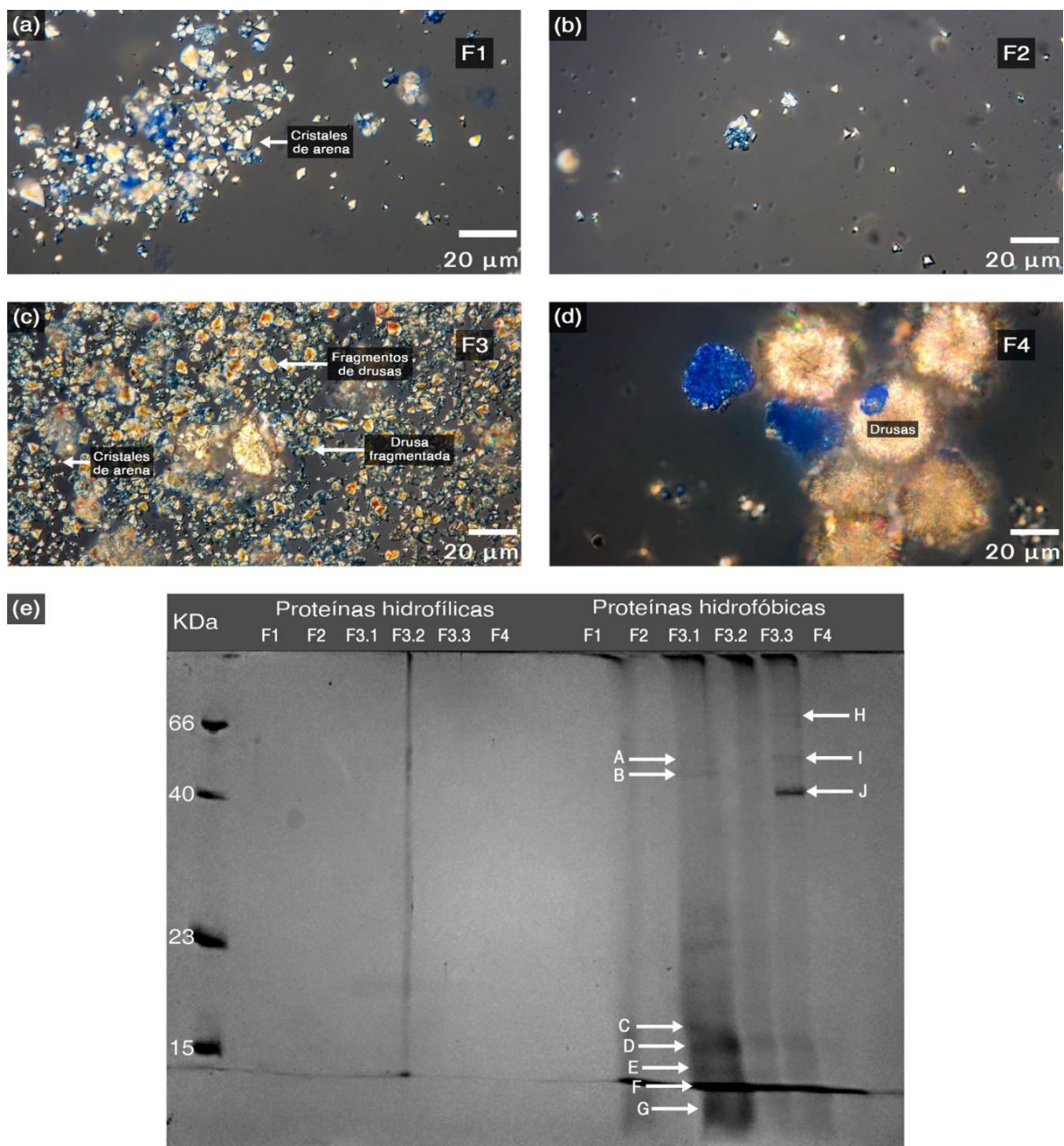


Figura 14. Proteínas asociadas a los cristales de CaOx. Micrografías DIC de cristales de CaOx fracción 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d). Los cristales de CaOx aislados presentaban una matriz orgánica fuertemente adherida en la que la tinción azul indicaba la presencia de proteínas. (e) SDS-Page de proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas extraídas de las fracciones cristalinas 1, 2 y 4, y de las subfracciones 3.1, 3.2 y 3.3, tras la disolución de los cristales con EDTA. Cada banda detectada fue etiquetada de la A a la J, cortada y analizada por LC-MS/MS.

Tabla 2. Proteínas asociadas a los cristales de CaOx de amaranto identificadas por LC-MS/MS								
Band a^a	Nombre de la proteína	#Acceso amaranto^b	Homólogo^c	# Acceso NCBI^d	PM/ SC^e	Theo r MW/p f^f	Mascot Score^g	emP AI^h
A	Beta-amylase	014762	<i>B. vulgaris</i>	XP_01068883 1	3/7	52.7/6. 81	106	0.24
	Leucin-rich repeat Extension-like protein 4	021135	<i>S. oleracea</i>	XP_02185342 1	2/3	63.7/8. 17	59	0.13
C	Hypothetical protein BVRB_2g029780	017871	<i>B. vulgaris</i>	KMT18875.1	2/20	20.4/1 0.0	185	0.44
	ATP synthase subunit "b" chloroplastic	007360	<i>C. quinoa</i>	XP_02176936 0	2/11	20.4/6. 21	121	0.36
	Photosystem I chlorophyll a/b- binding protein 3-1, chloroplastic	007233	<i>B. vulgaris</i>	XP_01069254 3	2/10	29.4/6. 85	104	0.29
	Photosystem I reaction center subIV, chloroplastic	001002	<i>C. quinoa</i>	XP_02172212 3	2/25	13.5/9. 92	104	0.72
	Photosystem II D1 chloroplastic	022952	<i>L. angolense</i>	AEI58755.1	2/16	21.7/5. 69	100	0.41
	PLAT domain- containing protein 3	021485	<i>B. vulgaris</i>	XP_01068056 9	3/16	20.8/4. 83	97	0.71
H	Agglutinin	007409	<i>A. hypochondriacu s</i>	AAD33922.1	2/9	30.1/6. 51	78	0.28
I	Leucin-rich repeat Extensin-like protein 4	021135	<i>S. oleracea</i>	XP_02185342 1	3/5	64.4/8. 17	100	0.19
	Chlorophyll a/b Binding protein	020491	<i>A. hypochondriacu s</i>	CAA52750.1	2/7	28.5/5. 68	72	0.30

^aLetra acorde a la Figura 14. ^bnúmero de acceso de acuerdo la base reportada por Clouse et al. (2016).

^cEspecies y ^dnúmero de acceso de la secuencia homóloga después de un análisis BLAST contra *Viridiplantae* de la base de datos de proteínas de NCBI. ^eCobertura del péptido identificado/secuencia (%). ^fPeso molecular teórico (kDa)/punto isoelectrico. ^gMASCOT score, el puntaje de iones individuales >38 indica identidad u homología extensa a un valor p<0.05. ^hÍndice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente.

3.4 Rasgos histológicos y ultraestructurales asociados a la acumulación de cristales de arena

Las secciones de resina de hoja de amaranto, recién obtenidas, todavía tenían cristales de arena, como lo demuestra la birrefringencia del CaOx (Figura 15a). Sin embargo, las secciones sometidas a un complejo proceso de tinción ya no mostraban cristales de CaOx, ya que se eliminaban durante el proceso de tinción dejando agujeros en la resina (Figura 15b). Los idioblastos cristaleros de arena se detectaron principalmente entre las células de parénquima de las venas grandes (Figura 15a-c), aunque también se observó acumulación de cristales de arena en las células de parénquima del xilema, en el elemento del tamiz e incluso en el elemento vaso (Figura 15 d-f). No obstante, la acumulación de cristales en estas células fue aberrante en comparación con las células de parénquima de las venas grandes, en particular, en el elemento de vaso.

Los cristales de arena en crecimiento estaban asociados a tres elementos ultraestructurales: cámaras del cristal, matriz orgánica y vesículas. Las cámaras de cristal se observaron vacías o rodeando los cristales de arena, las vesículas estaban dentro o fuera de las cámaras de cristal, y parte de la matriz orgánica estaba incrustada en los cristales. En algunos casos, estos elementos se observaron emergiendo de invaginaciones dentro de las vacuolas (Figura 15 g). Además, observamos que cuando las cámaras de cristal estaban vacías tendían a tener una forma redondeada, pero cuando un cristal comenzaba a crecer en su interior, empezaban a tener formas triangulares como los cristales de arena. También observamos que el crecimiento de los cristales se limitaba a la forma triangular de la cámara de cristal que los contenía (Figura 15 h y Figura 16).

Por otro lado, varios idioblastos cristaleros de arena tenían vestigios de cloroplastos degradados caracterizados por sus granos de almidón residuales y membranas laminadas (Figura 17a). Además, se observaron cloroplastos enteros y mitocondrias invaginadas en vacuolas de idioblastos cristaleros de arena cerca de cristales en crecimiento (Figura 17b,c). Finalmente, nuestra observación de la degradación de

cloroplastos dentro de una vacuola de idioblastos mostró cómo sus restos son aparentemente utilizados como cámaras de cristales (Figura 17 d,e).

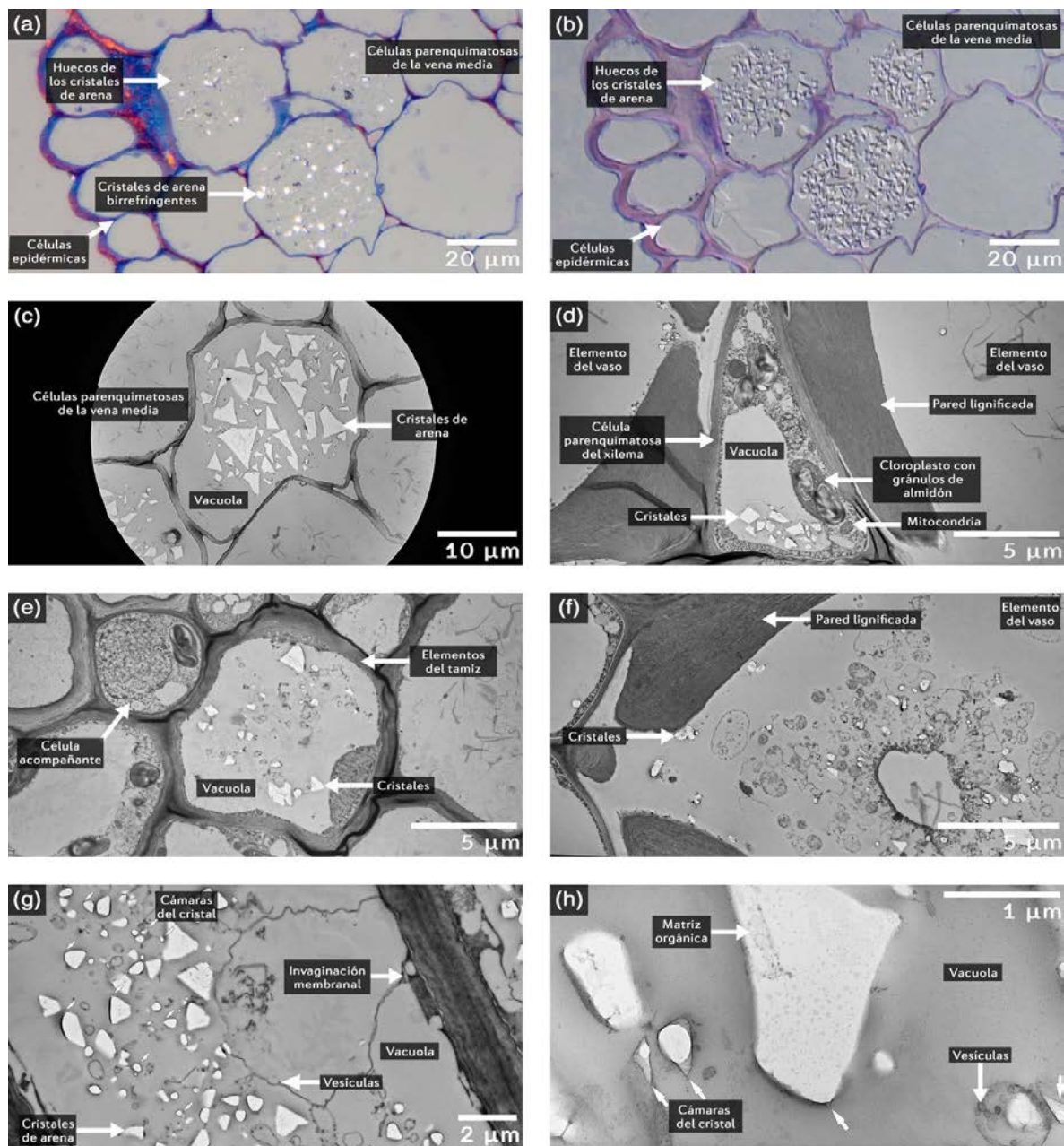


Figura 15. Características histológicas y ultraestructurales de la acumulación de cristales de arena. (a) Micrografía DIC de una sección transversal de vena media recién obtenida y teñida solamente con azul de metileno. (b) Micrografía DIC de una sección transversal de vena media sometida a una tinción de múltiples pasos con safranina y Coomassie. (c-f) Micrografías TEM de una sección transversal de una vena secundaria mostrando diferentes tipos de células que acumulan cristales. (g y h) Micrografías TEM de cortes longitudinales de una vena secundaria que muestran una célula de parénquima acumulando cristales de arena. Las flechas más pequeñas y afiladas señalan varios ejemplos de cámaras de cristales.

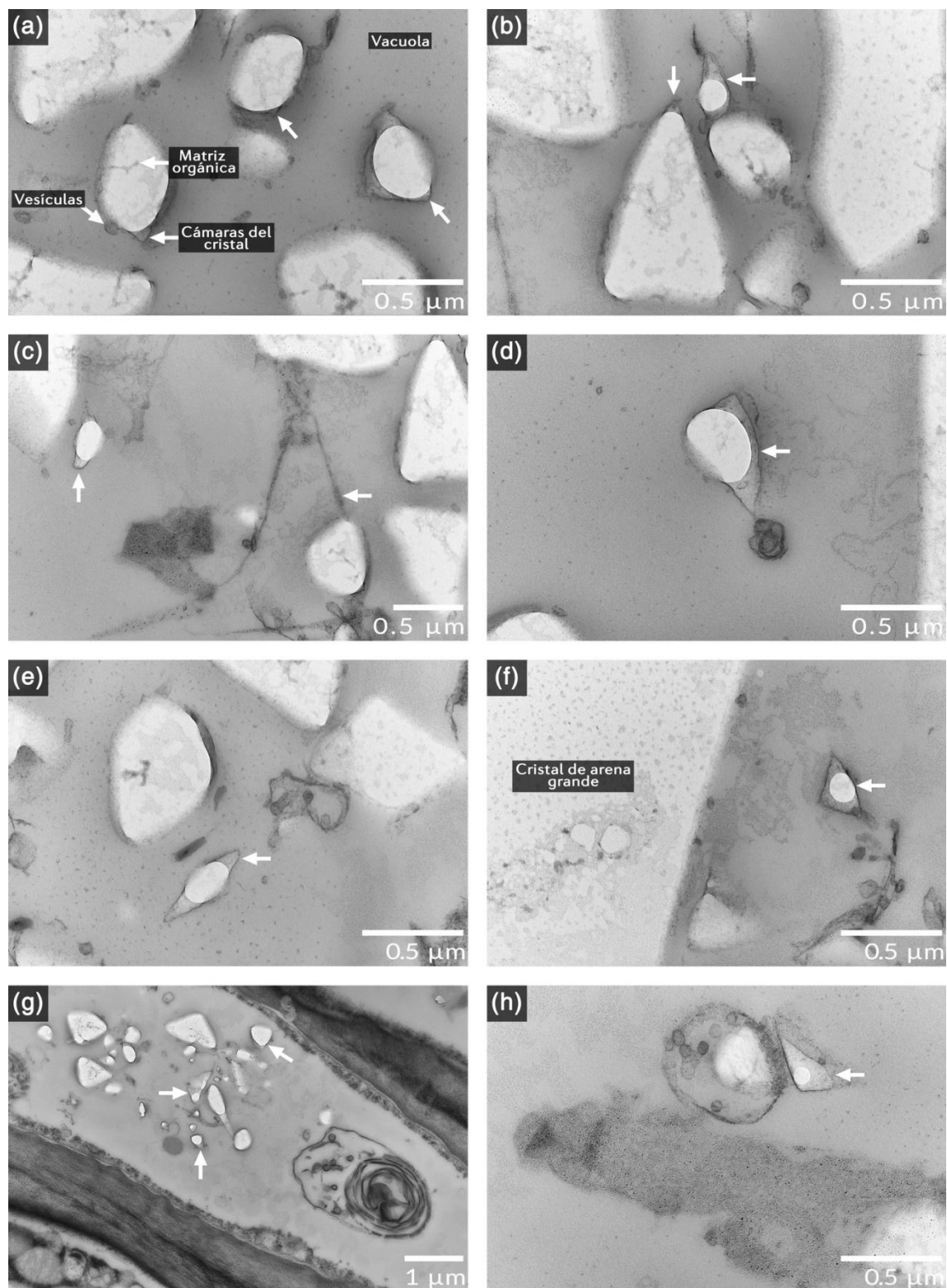


Figura 16. La cámara del cristal podría estar controlado físicamente la forma de los cristales. (a-h) Micrografías TEM de diferentes campos de una sección transversal de una vena secundaria que muestran la acumulación de cristales de arena.

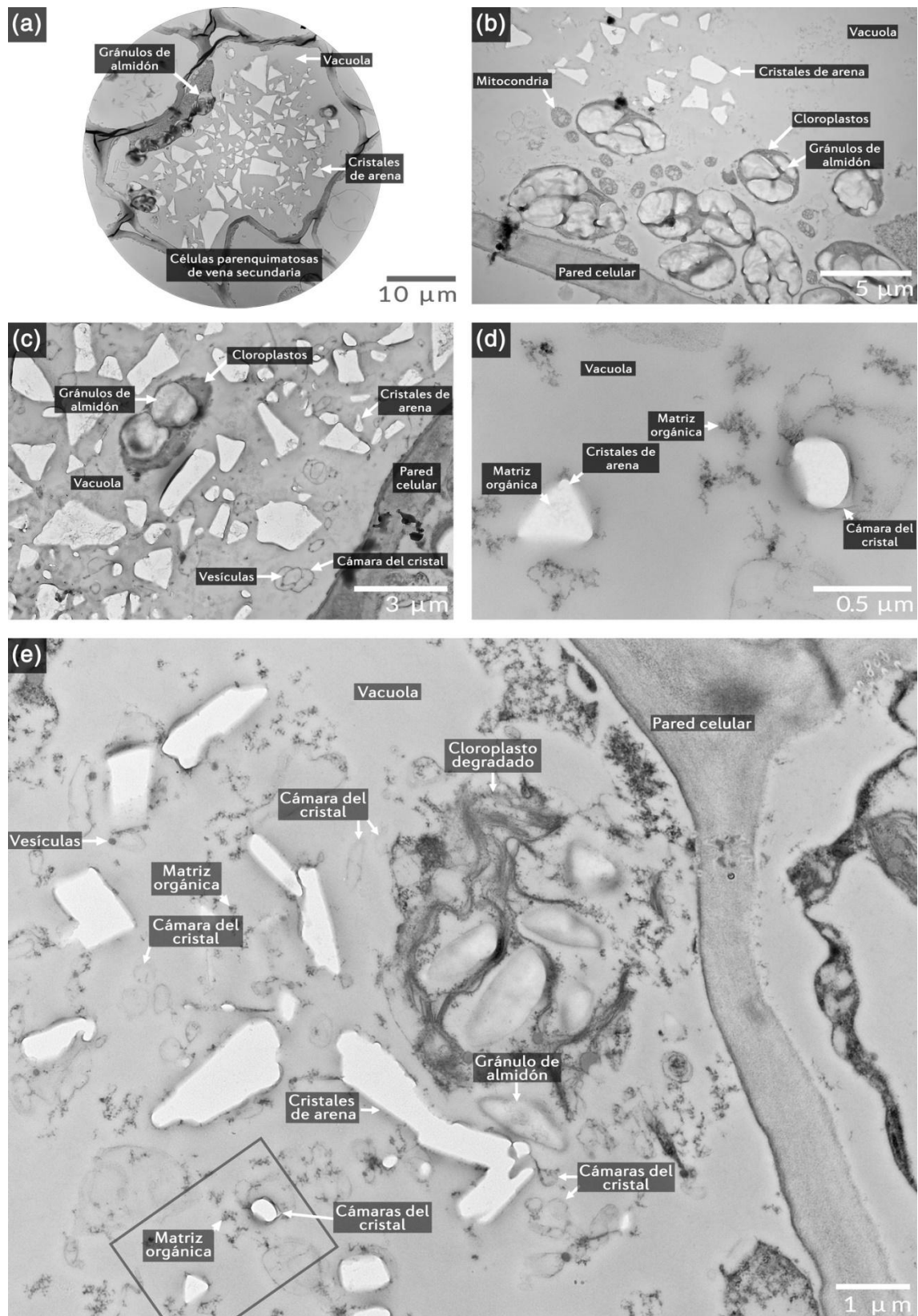


Figure 17. Correlación ultraestructural entre la degradación de cloroplastos y acumulación de cristales. (a-e) Micrografías TEM de diferentes campos de una sección transversal de una vena secundaria que muestran la acumulación de cristales de arena. El área del recuadro en (e) es el mismo campo observado en (d).

3.5 Rasgos histológicos y ultraestructurales asociados a la acumulación de drusas

Como se observó en los cristales de arena, una tinción elaborada arrastró las drusas dejando agujeros en la resina. En algunos casos, la resina pudo retener parte de la matriz orgánica de las drusas. A diferencia de la presencia de cristales de arena en células de idioblastos cristaleros no típicos (por ejemplo, células acompañantes y vasos del xilema), los idioblastos de drusa se encontraron sólo entre el mesófilo situado entre los haces vasculares (Figura 18a,b). Además, se observaron idioblastos con características subcelulares variables cuyos cambios se correlacionaban con el tamaño de la drusa (Figura 18c-f y Figura 19-21).

Las drusas también están asociadas con los mismos elementos ultraestructurales observados para los cristales de arena (cámaras del cristal, matriz orgánica y, en algunos casos, vesículas) (Figura 18g), pero había algunas diferencias. Por ejemplo, los cristales individuales de una drusa pueden estar rodeados por una cámara cristalina amorfa, que difiere de las cámaras en forma de triángulo de los cristales de arena. Sin embargo, toda la drusa estaba rodeada por una cámara cristalina con forma de drusa (Figura 18h y Figura 20a). Además, observamos que los cristales individuales de una drusa podían crecer dispersos o alrededor de un núcleo (Figura 20 a y b, respectivamente). Además, la matriz orgánica o las cámaras del cristal pueden estar incrustadas o confinadas dentro de un cristal de CaOx. La incrustación se produce cuando varios cristales se unen al cuerpo de la drusa y sus cámaras del cristal se fusionan con él. Alternativamente, el confinamiento se produce cuando las cámaras del cristal o la matriz orgánica quedan atrapadas entre los espacios dejados por los cristales (Figura 18g).

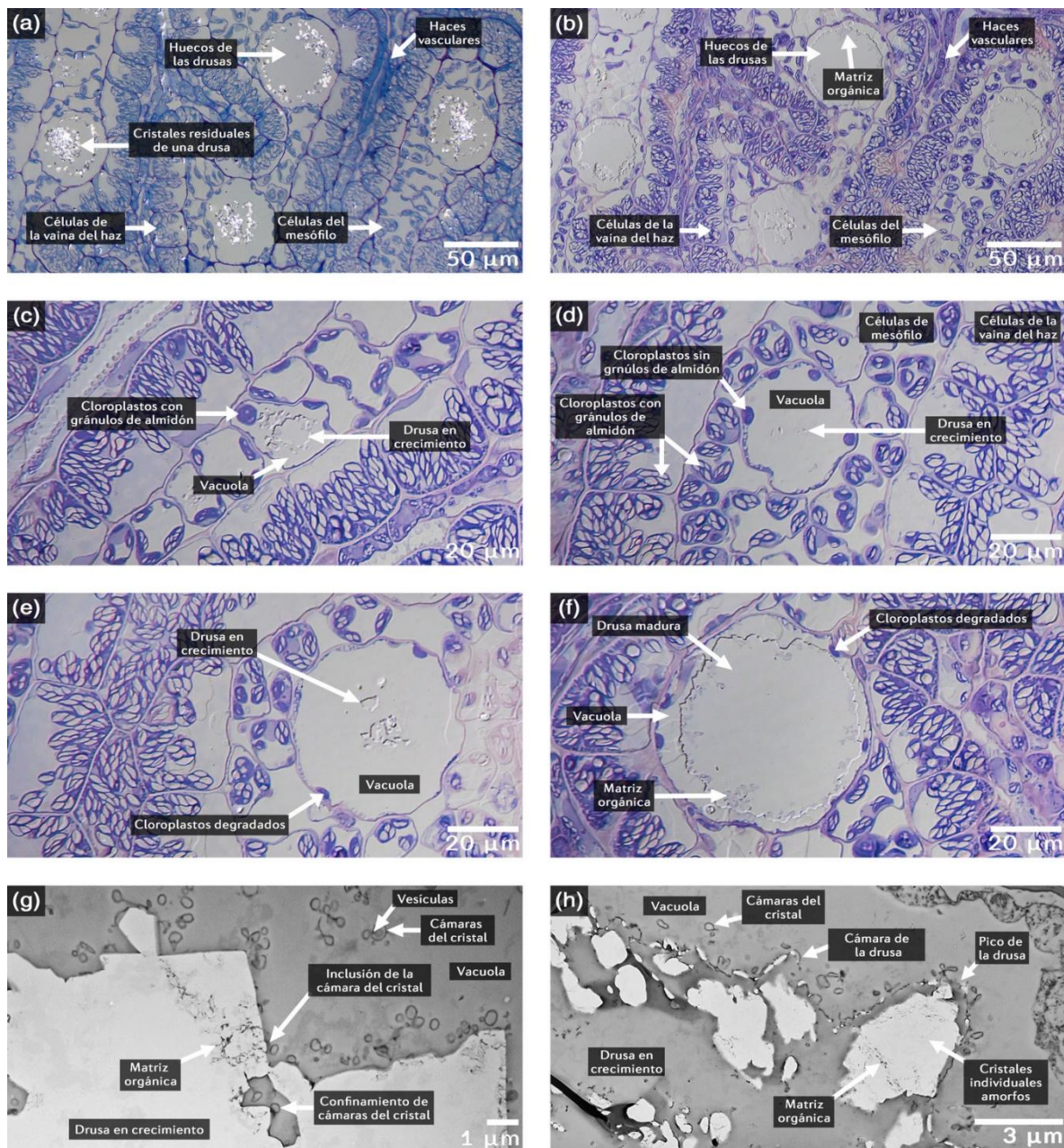


Figura 18. Características histológicas y ultraestructurales asociadas a la acumulación de drusas. (a) Micrografía DIC de una sección paradermal recién obtenida teñida solamente con azul de metileno. (b) Micrografía DIC de una sección paradermal sometida a tinción de múltiples pasos con safranina y Coomassie. (c-f) Micrografías DIC de secciones paradermales teñidas con safranina y Coomassie, mostrando diferentes pasos del proceso de crecimiento de la drusa. (g y h) Micrografías TEM mostrando dos células diferentes con una drusa en crecimiento.

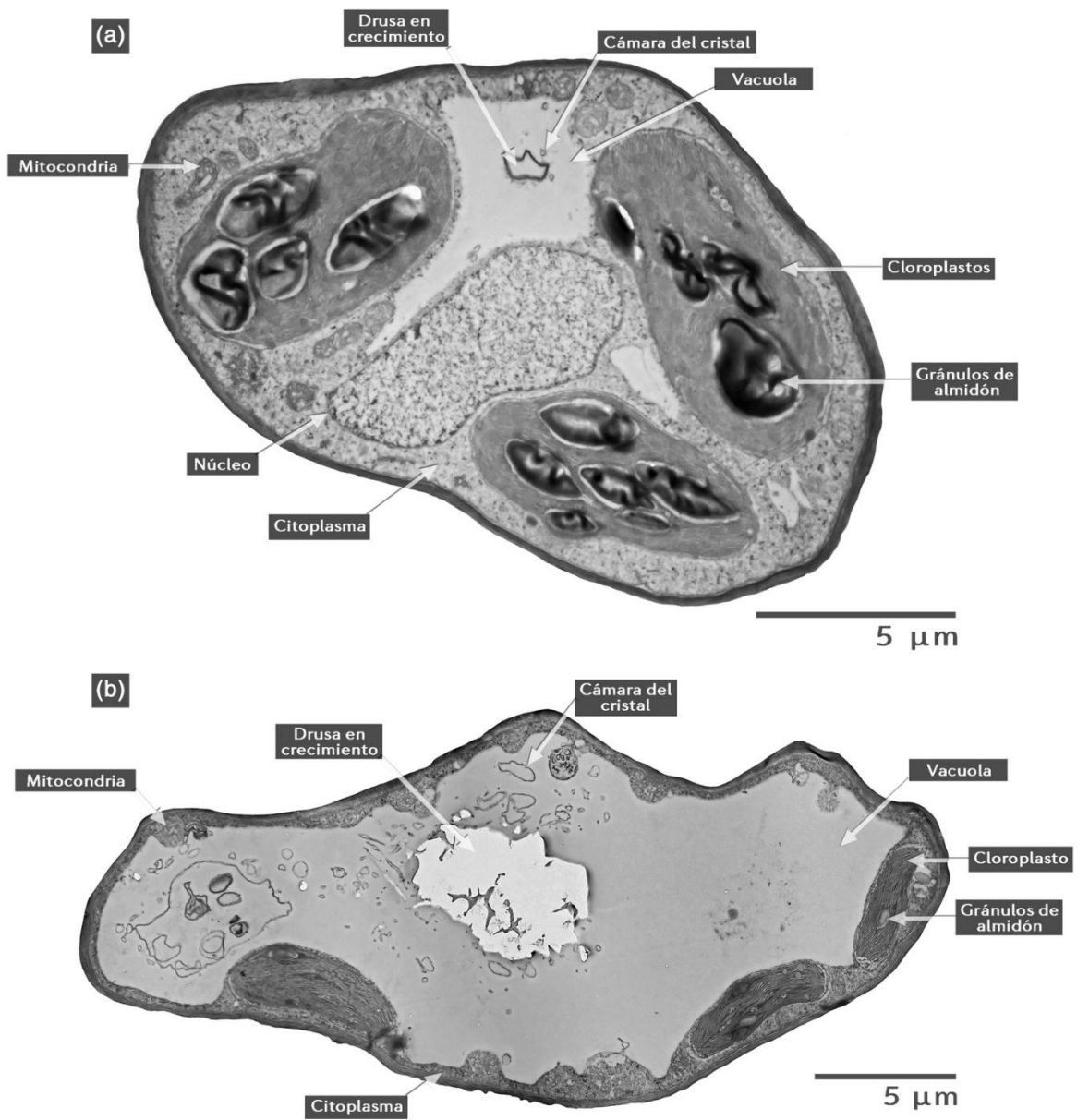


Figura 19. Células del mesófilo convirtiéndose en un joven idioblasto formador de drusa.
 (a-b) Micrografías TEM de dos células de mesófilo formando una drusa dentro de sus vacuolas.

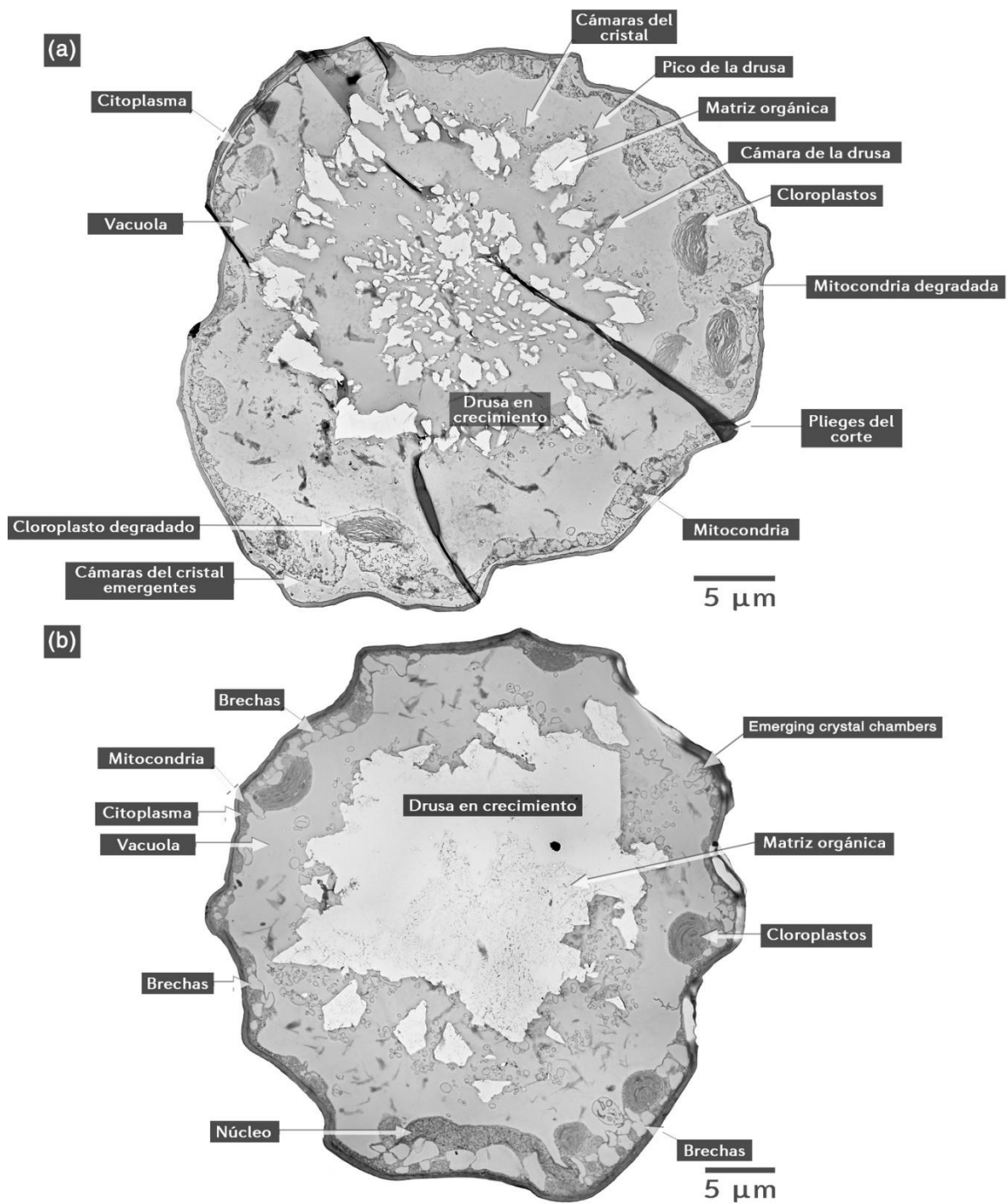


Figura 20. Idioblasto formador de drusas diferenciado. (a-b) Micrografías TEM de dos idioblastos formador de drusas con una drusa en crecimiento.

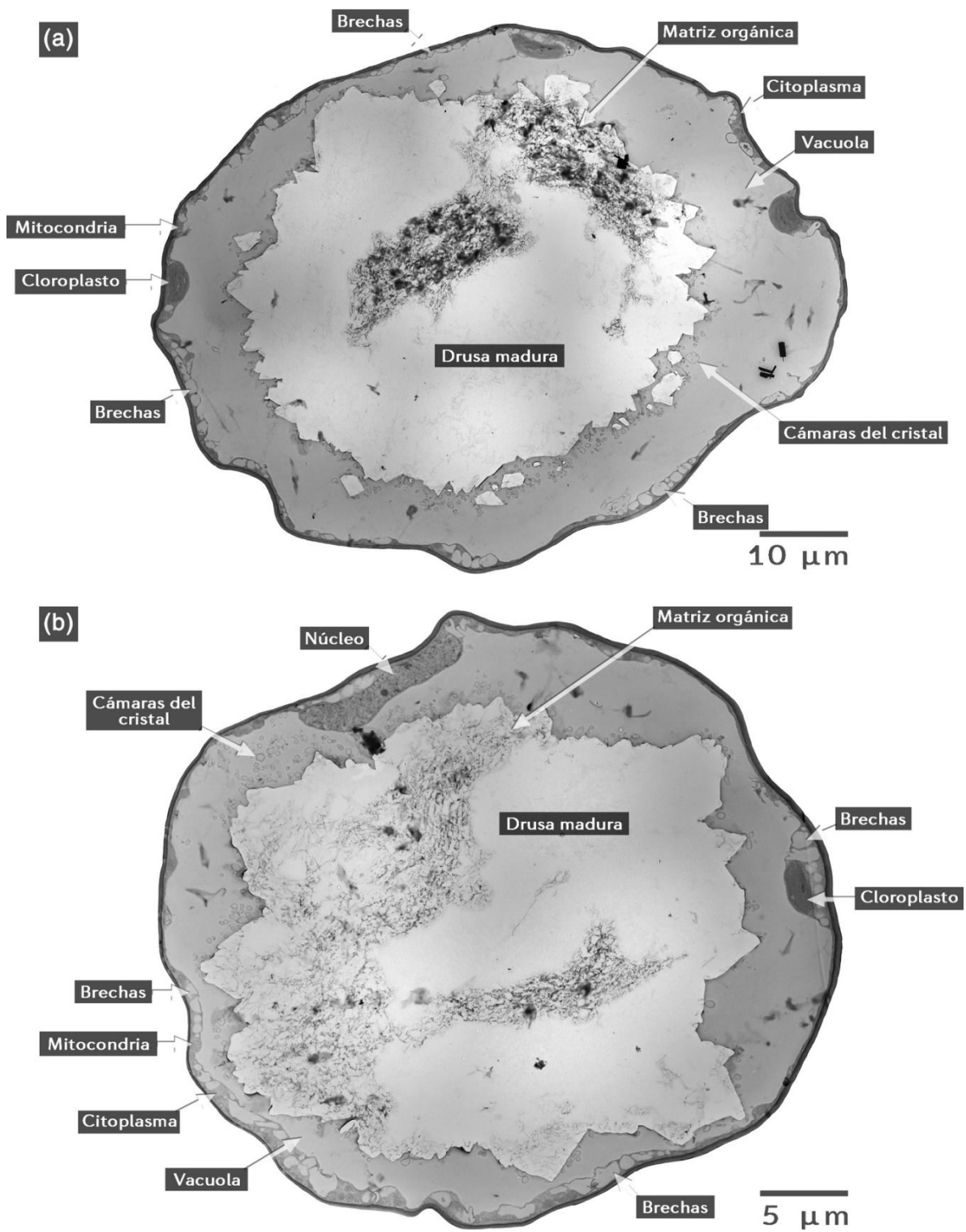


Figura 21. Idioblasto formador de drusa maduro. (a-b) Micrográficas TEM de dos idioblastos formadores de drusas con una drusa madura.

3.6 Localización ultraestructural de enzimas fotosintéticas en el idioblasto cristalero

Se detectó RbcL asociado a los cristales de CaOx mediante inmunohistoquímica (Figura 22 a-d) e inmunoro (Figura 22 e-j), confirmando la presencia de proteínas de cloroplastos asociadas a los cristales de CaOx. Además, RbcL se detectó abundantemente en las CVH como era esperado, pero también se detectó una pequeña señal en las CM (Figura 22 a). Por su lado, el inmunoro para ATPb mostró su presencia en cloroplastos, núcleos y mitocondrias (Figura 23).

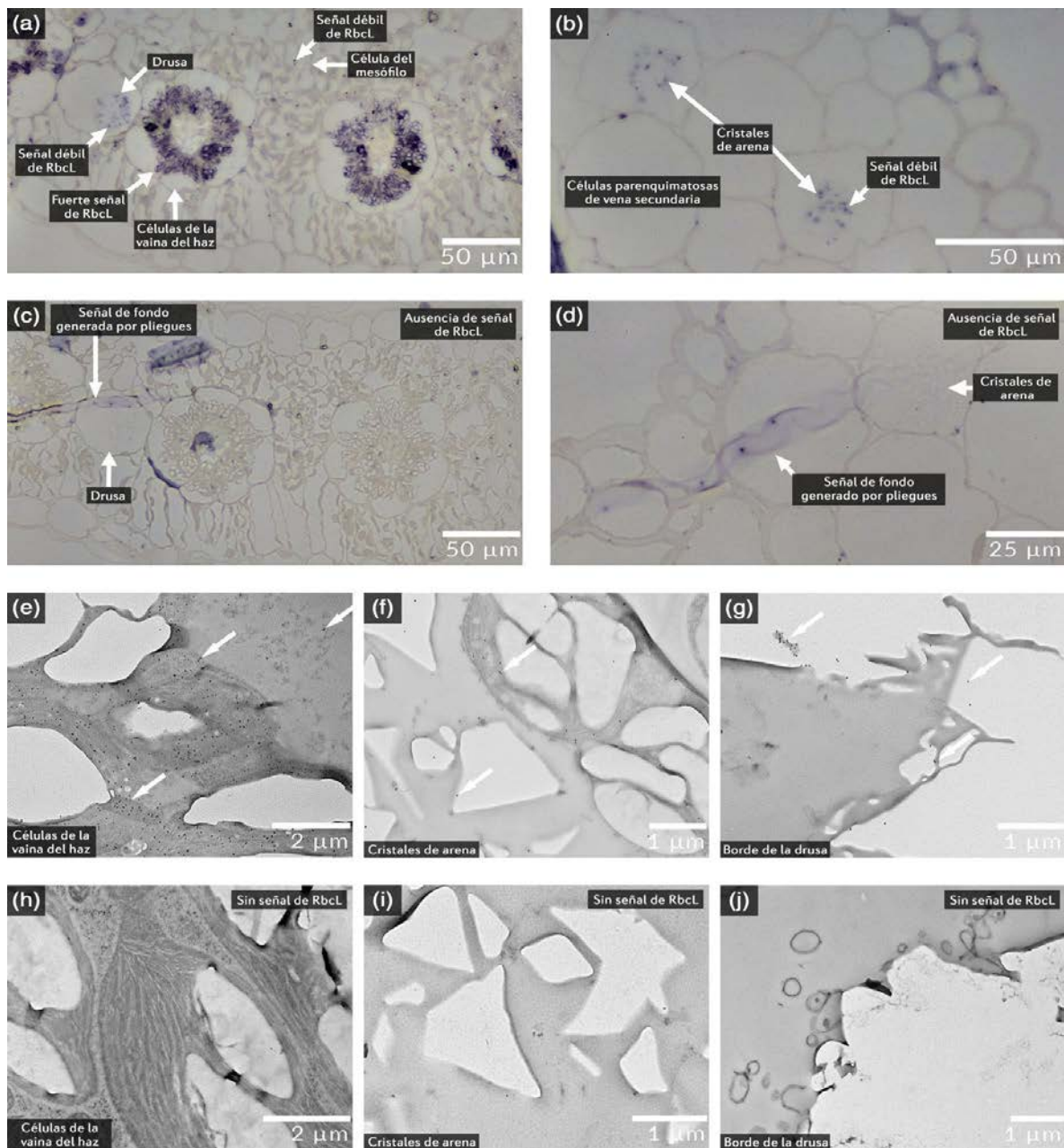


Figura 22. Patrón de acumulación de RbcL en hojas de amaranto. (a-b) Micrográficas de campo claro de una sección transversal de la lámina y de la vena secundaria de la hoja de amaranto, respectivamente, analizadas por IHC para detectar la presencia de la proteína RbcL. El precipitado púrpura indica la presencia de RbcL. (c-d) Controles negativos de (a) y (b), respectivamente. (e-g) Micrográficas TEM del análisis de inmunooro para RbcL en las mismas secciones. Los pequeños puntos circulares y oscuros son partículas de oro que indican la presencia de RbcL (flechas). (h-j) Controles negativos de (e-g) respectivamente.

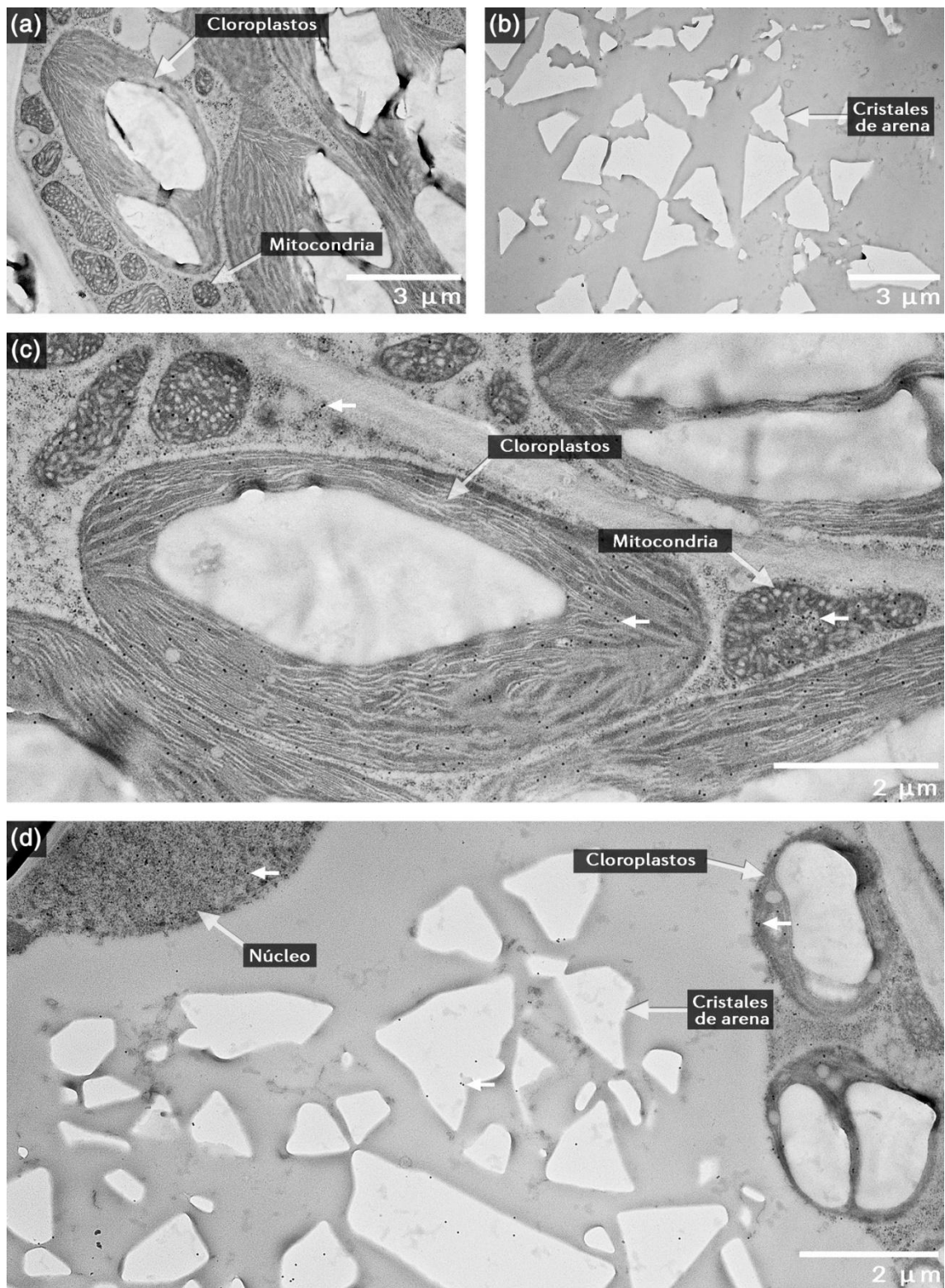


Figura 23. Patrón de acumulación de ATP sintasa subunidad b en hojas de amaranto. (a-d) Micrografías TEM de una sección transversal de una hoja de amaranto analizada mediante inmunoro para la subunidad b de la ATP sintasa. (a-b) Controles negativos; no se encontraron uniones inespecíficas. (c-d) Muestras positivas; pequeñas puntos circulares y negros son partículas de oro que indican la presencia de la subunidad b de la ATP sintasa (flechas).

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología y proteínas asociadas a las hojas de *A. cruentus*, a través de estudios de microscopía y proteómica. Se observaron las morfologías de cristales de arena y drusas, cuyas proteínas asociadas están relacionadas con la fotosíntesis y el endurecimiento de la pared celular.

A. cruentus, al igual que muchas otras especies vegetales, acumula cristales de CaOx de forma específica para cada tejido. Se observó que los cristales de arena se acumulan solamente entre las células del parénquima de las venas grandes (Figura 7 y Figura 10). A diferencia de los haces vasculares de las venas grandes, los haces vasculares de las venas más pequeñas o terciarias no tienen células de parénquima asociadas; están unidas solamente a las CVH (Figura 7-9 y Figura 10 b). Esta característica puede explicar por qué las venas terciarias no acumulan cristales de arena, y sugiere que el origen de los idioblastos cristaleros de arena pueden ser células de parénquima desdiferenciadas (Figura 15b,c). Los idioblastos de drusa sólo estaban presentes entre las CM (Figura 7,9 y Figura 10b) y presentaban características subcelulares particulares que cambiaban en función del tamaño de la drusa (Figura 19-21). Esta evidencia sugiere fuertemente que los idioblastos de drusa en hojas de amaranto pueden originarse a partir de células mesófilas desdiferenciadas. Además, las células indiferenciadas tempranas pueden convertirse en idioblastos cristalinos como propusieron Volk y colaboradores, 2002. Sin embargo, en algunos casos, el crecimiento de cristales de CaOx también podría ser el resultado de un evento errático en células atípicas (Figura 15 d-f).

La acumulación de cristales de CaOx parece estar controlada genéticamente (Franceschi y Nakata, 2005); sin embargo, existen dos propuestas sobre el control de la forma de los cristales. La primera indica que hay proteínas específicas en la matriz orgánica que dan al cristal su forma y, aunque los estudios anteriores no especificaron los mecanismos, es probable que este escenario se produzca a través de una interacción molecular física o química con la estructura cristalina del CaOx. De hecho, este proceso se

ha comprobado *in vitro* (Bouropoulos et al., 2001; Jáuregui-Zúñiga et al., 2005b). Sin embargo, los cristales de CaOx en el amaranto no parecen cristales sólidos, sino un sol sólido o una emulsión sólida coloidal compuesta de CaOx precipitado y materia orgánica (Figura 10c, Figura 13a,b). Además, observamos diferentes patrones de autofluorescencia en las drusas y diferentes patrones de incrustación de la matriz orgánica. Estas observaciones sugieren que la autofluorescencia procede de la matriz orgánica incrustada y que las drusas no tienen una composición homogénea (Figura 13 c,d y Figura 21), sino que se tratan de un coloide homogéneo.

La segunda propuesta está más relacionada con nuestras observaciones, en las que la matriz orgánica o las cámaras de cristal sirven como plantillas que controlan la forma y el crecimiento de los cristales de CaOx (Li et al., 2003; Webb, 1999). Observamos varias cámaras de cristal con la típica forma triangular de los cristales de arena, que están dando forma al crecimiento de los cristales (Figura 15h y Figura 16). El mismo fenómeno ocurre en el idioblasto drusa, una gran cámara de cristal en forma de drusa rodea la drusa en crecimiento (Figura 20a). Por lo tanto, parece que ambos idioblastos utilizan macromoléculas idénticas para fabricar cristales de diferentes formas y sólo varía la forma en que se disponen las membranas.

Aunque los cristales de arena parecen ser sólidos, nuestros resultados sugieren que puede contener material orgánico incrustado (Figura 15h y Figura 16). De hecho, mediante análisis de espectroscopia RAMAN se ha determinado que los rafidios contienen material orgánico en su interior (Weber et al., 2016). En las drusas, parece probable que las cámaras del cristal queden atrapadas en el cuerpo cristalino debido a su estructura natural. La incrustación es un mecanismo en el que los cristales individuales se unen para hacer crecer un cristal más grande y formar el cuerpo de la drusa mediante la fusión de sus cámaras del cristal (Figura 5 g). Como se reportó en estudios previos (Prychid et al., 2008; Volk et al., 2002) las drusas también pueden contener material orgánico a través del confinamiento (Figura 21). La incorporación de material orgánico mediante incrustación o confinamiento puede producir núcleos en la drusa (Figura 21a) con una matriz orgánica,

tal y como describieron previamente (Volk et al., 2002). Sin embargo, como hemos observado, los cristales de drusa pueden crecer de forma dispersa y no alrededor de un único centro de nucleación orgánico (Figura 20a). Esta incorporación aleatoria de material orgánico explicaría la aleatoriedad observada en la autofluorescencia de la drusa (Figura 13 c,d).

En estudios anteriores se han asociado el origen de la matriz orgánica y las cámaras de cristales con el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (Li et al., 2003; Nakata et al., 2003). Nosotros observamos la degradación de cloroplastos y mitocondrias en el interior de vacuolas (Figura 17 y Figura 19-21), y restos de tilacoides interactuando con cristales de CaOx en crecimiento (Figura 17e). Por lo tanto, la desdiferenciación celular puede dar lugar a un idioblasto cristalero y en el proceso los tilacoides ser reciclados como cámaras del cristal. El reciclaje de cloroplastos es un proceso conocido que implica el transporte de sus componentes o incluso de todo el cloroplasto a la vacuola (Zhuang y Jiang, 2019), así la formación de una cámara de cristal a partir de los tilacoides podría ser una nueva vía para el reciclaje de cloroplastos. Las proteínas identificadas y el etiquetado con inmunoro también apoyan esta hipótesis, ya que se encontraron proteínas de los tilacoides en los cristales de CaOx (Tabla 1 y Figura 23). En la planta de sombra *Peperomia glabella*, se ha reportado que la posición de sus drusas cambia dependiendo de la intensidad de la luz, lo que sirve para cosechar o reflejar la luz (Kuo-Huang et al., 2007). Basándonos en estos hallazgos y en nuestros resultados, el contenido interno de tilacoides en los cristales de CaOx podría actuar como elementos fotosensibles para generar esta respuesta a la luz. Además de las proteínas de los tilacoides, detectamos RbcL en los cristales mediante inmunohistoquímica e inmunoro (Figura 22). Este hallazgo apoya la hipótesis de que los cristales de CaOx podrían ser degradados a CO₂, que posteriormente es refijado por RuBisCO (Tooulakou et al., 2016a). Además, el oxalato surge de la oxidación del glicolato por la glicolato oxidasa (reacción lateral) o de la conversión del ascorbato por una vía de múltiples pasos. Simultáneamente, la oxidación del glicolato también produce glioxilato (Igamberdiev y Eprintsev, 2016). El glicolato es un producto de la fotorrespiración, que se produce en células expuestas al oxígeno (por ejemplo, CM)

pero se evita en células aisladas de oxígeno (por ejemplo, CVH de plantas C4 como el amaranto, Joaquín-Ramos et al., 2014). Las drusas y los cristales de arena se acumulan en las células expuestas al oxígeno, por lo que si RuBisCO está activa en estas células, se esperaría que el glicolato estuviera presente como producto de la fotorrespiración. Por lo tanto, RuBisCO podría tener una doble función en los idioblastos cristalinos: producir un precursor del oxalato (glicolato) y volver a fijar el CO₂ liberado cuando se degrada el oxalato.

Por otro lado, en este trabajo identificamos proteínas PHF-Ox pero no detectamos PHI-Ox. Esto concuerda con los hallazgos de Li et al., 2003 pero no con los de Bouropoulos et al., 2001; Jáuregui-Zúñiga et al., 2005b. Las proteínas identificadas incluyen una proteína similar a la extensina, con repeticiones ricas en leucina, a partir de cristales de CaOx. Las extensinas y las proteínas arabinogalactanas (AGP) son proteínas de la pared celular que mantienen la integridad de la membrana plasmática cuando la pared celular está ausente, como en la elongación celular (Tan et al., 2018). Estas proteínas también mantienen la forma final de la célula cuando cesa el crecimiento (Showalter, 1993). Las extensinas y las AGP se han detectado previamente mediante inmunofluorescencia e inmunoro, respectivamente, en los bordes de los cristales de CaOx en *Fragaria ananassa* y *Taraxacum officinale* (Leszczuk et al., 2019; Płachno et al., 2020). Además, entre las plantas que no acumulan cristales de CaOx frente a las plantas que los acumulan, los genes expresados diferencialmente están relacionados principalmente con la pared celular (Nakata y McConn, 2002). Los hallazgos anteriores y los resultados actuales apuntan a la participación de este grupo de proteínas de la pared celular en la formación de cristales de CaOx. En consecuencia, dado que las extensinas participan en la rigidización de las membranas, es posible que mantengan la forma triangular de las cámaras del cristal para moldear los cristales en crecimiento. Otras proteínas que moldean las membranas, como las tetraspaninas, Exo70 o incluso la actina, también podrían influir en la forma de las cámaras de los cristales y podrían representar proteínas diana para la localización por inmunoro (Rossy et al., 2014).

5. CONCLUSIONES

Este estudio presenta una caracterización exhaustiva de los cristales de CaOx de *A. cruentus* en la que se identificaron dos tipos de idioblastos: idioblastos cristaleros de arena entre las células del parénquima de las grandes venas e idioblastos cristaleros de drusas entre las CM del limbo foliar. Nuestros resultados también sugieren que ambos idioblastos cristaleros pueden proceder de la dediferenciación de sus células vecinas y sus formas parecen estar controladas físicamente por las cámaras del cristal. Presentamos características novedosas de los cristales de CaOx de amaranto, incluyendo autofluorescencia y micrografías de alta calidad que muestran rasgos histológicos y ultraestructurales y estados de transición mesófilo-cristal idioblasto. También se presentan pruebas sólidas, validadas por LC/MS-MS e inmunohistoquímica, que apoyan la formación de cámaras de cristales a partir de tilacoides de cloroplastos degradados. Además, nuestros resultados confirman que los cristales de oxalato contienen proteínas relacionadas con la pared celular y la fotosíntesis. Deberán realizarse más estudios para confirmar la hipótesis de la función de los cristales de CaOx como fuente de carbono.

6. PRODUCTOS ACADÉMICOS OBTENIDOS:

ARTÍCULO PRINCIPAL:

Cerritos-Castro, I.T., Patrón-Soberano, A., Bojórquez-Velázquez, E., González-Escobar, J.L., Vargas-Ortiz, E., Muñoz-Sandoval, E., Barba de la Rosa, A.P., 2022. Amaranth calcium oxalate crystals are associated with chloroplast structures and proteins. *Microsc. Res. Tech.* 85, 3694–3706.

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.24221>

ARTÍCULO SECUNDARIO

Cerritos-Castro, I.T., Patrón-Soberano, A., Barba de la Rosa, A.P., 2022. Method for CaOx crystals isolation from plant leaves. *MethodsX* 9, 101798.

[https://methods-x.com/article/S2215-0161\(22\)00178-9/fulltext](https://methods-x.com/article/S2215-0161(22)00178-9/fulltext)

COAUTORÍA EN EL CAPÍTULO DE UN LIBRO

Bojórquez-Velázquez, E., Talamantes-Herrera, F.A., Valles, S., Cerritos-Castro, I.T., de la Rosa, A.P.B., 2021. Molecular Characterisation of Seed Storage Proteins (SSPs) in Grain Amaranth. pp. 55–79.

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-72365-1_5

PREMIO INTERNACIONAL “AGRISERA BEST POSTER PRIZE” 2021

Otorgado por la empresa de anticuerpos “Agrisera”, al obtener el segundo lugar en el concurso de póster científico del cuarto congreso internacional del “International Plant Proteomics Organization (INPPO)”. Llevado a cabo del 9 al 11 de Marzo del 2021 en línea.

<https://www.agrisera.com/en/blogg/agrisera-blog/2021/03/13/agrisera-best-poster-prize-awarded-during-4th-international-plant-proteomics-organization-online-con.html>

CAPÍTULO II: EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LOS CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO E HISTOLOGÍA DE LA HOJA DE AMARANTO

7. INTRODUCCIÓN

A pesar de la amplia y abundante presencia de los cristales de CaOx en plantas, la función exacta de los cristales de CaOx aún no se entiende por completo. Se cree que están involucrados en el endurecimiento de tejidos, detoxificación de oxalato y metales pesados, captura y reflexión de la luz, protección contra herbívoros masticadores y la homeóstasis de calcio (Franceschi y Nakata, 2005a; Franceschi y Schueren, 1986; Jáuregui-Zúñiga et al., 2005a; Korth et al., 2006; Kuo-Huang et al., 2007; Mazen y El Maghraby, 1997; van Balen et al., 1980). La homeóstasis de calcio es hasta ahora la función más aceptada.

Recientemente se ha propuesto que el oxalato de los cristales podría funcionar como una reserva de carbono para la fotosíntesis en condiciones de estrés hídrico durante el cual se induce el cierre de los estomas, limitando así el ingreso de CO₂ atmosférico (Foster et al., 2016; Garvie, 2006; Tooulakou et al., 2016b). Una preocupación respecto a esta hipótesis es el destino del calcio liberado tras degradarse el oxalato, ya que se sabe que en altas concentraciones puede causar daño celular (Nakata, 2003). Sin embargo, en estudios previos se demostró que al quitar la capacidad de formar cristales de oxalato de calcio a *Medicago truncatula* no se observaron efectos deletéreos en su crecimiento (Nakata y McConn, 2000). Así, los cristales de CaOx podrían ser una herramienta útil para mantener la homeostasis del calcio, pero no la única. Esto da pauta a pensar que es posible que los cristales de oxalato de calcio se degraden, sin que esto represente un riesgo homeostático para la planta.

El oxalato en plantas puede ser sintetizado por dos vías metabólicas, la del glicolato y la del ascorbato. El glicolato es un producto tóxico de la fotorrespiración, proceso en el cual RuBisCO fija O_2 en lugar de CO_2 . El glicolato puede ser convertido a glioxilato y posteriormente a oxalato con ayuda de la glicolato oxidasa. Por otro lado, el ascorbato, a través de la ruta del ascorbato puede ser convertido en oxalato (Igamberdiev y Eprintsev, 2016). Posteriormente, el oxalato puede ser degradado a CO_2 de forma directa por medio de la oxalato oxidasa (*OxO*), o en dos pasos con ayuda de la oxalil-coA ligasa (*OxCoA*) y oxalil-coA descarboxilasa (Foster et al., 2016). El CO_2 liberado en las reacciones de degradación del oxalato podría ser refijado por RuBisCO como reciclaje de carbono (Figura 24). De hecho, algo similar ocurre después de la fotorrespiración. El 2-fosfoglicolato es convertido a glicina por los peroxisomas. Luego, la glicina viaja a las CVH y es descarboxilada por las mitocondrias que están detrás de los cloroplastos para que estos asimilen el CO_2 liberado y así resarcir la pérdida de carbono generada por la fotorrespiración (Figura 25).

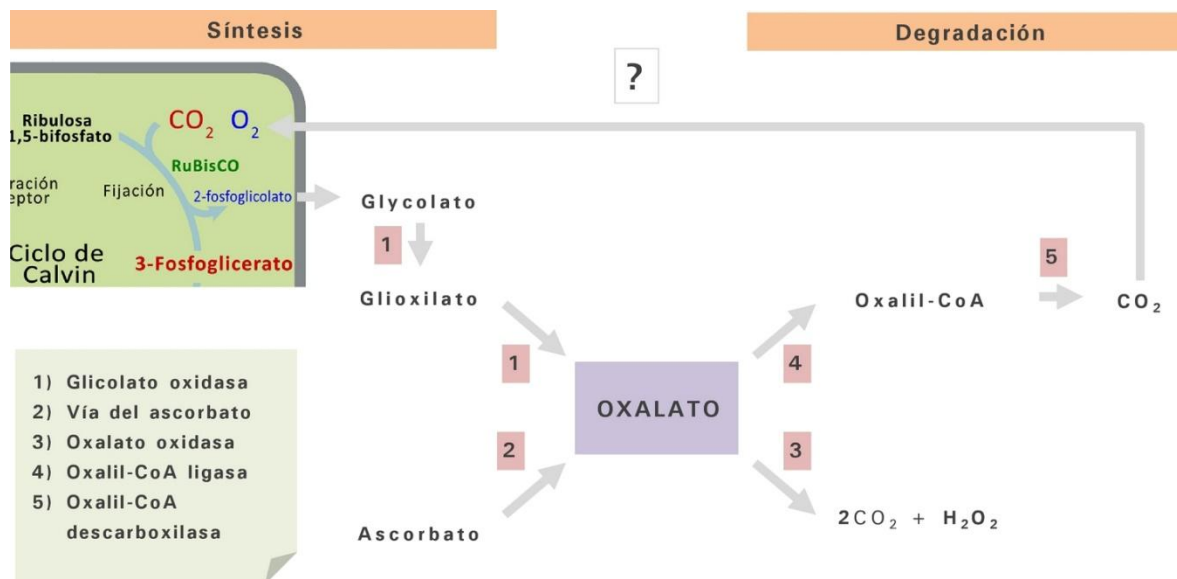


Figura 24. Rutas metabólicas en plantas relacionadas con la síntesis y degradación del oxalato. El oxalato puede ser sintetizado a partir del ascorbato a través de la vía del ascorbato o del glicolato con ayuda de la glicolato oxidasa. El oxalato posteriormente puede ser degradado por la oxalato oxidasa u oxalil-CoA ligasa y descarboxilasa generando CO_2 . El CO_2 liberado podría ser refijado por RuBisCO.

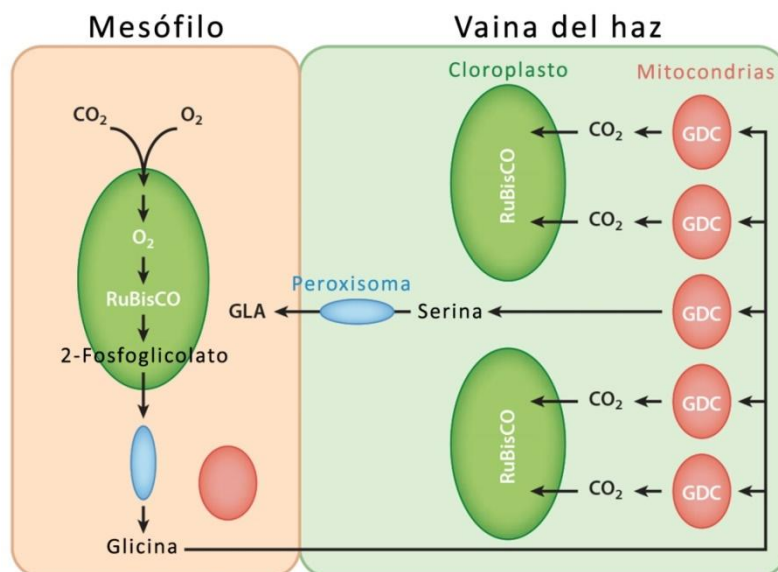


Figura 25. Ruta del glicolato para la recuperación de CO₂. El 2-fosfoglicolato producido en la fotorrespiración es convertido en glicina por el peroxisoma, después viaja a la CVH donde es descarboxilado por la glicina descarboxilasa (GDC) de las mitocondrias ubicadas detrás de los cloroplastos. El CO₂ es liberado por RuBisCO y la serina es convertida e glicerato en el peroxisoma para ser incorporado nuevamente al ciclo de Calvin. Esta ruta evita que se pierda CO₂ por la fotorrespiración, pero implica un gasto energético adicional para la célula, por lo que mejor es evitar la fotorrespiración como lo hacen las plantas C₄.

El género *Amaranthus* incluye varias especies cultivadas comercialmente que son reconocidas por su tolerancia a estrés ambiental como sequía, calor y salinidad (Joaquín-Ramos et al., 2014; Radek y Savage, 2008; Seguin et al., 2013). En un estudio reciente, se observó que la expresión del gen *OxCoA* aumentó como consecuencia del estrés hídrico en la planta de amaranto, al tiempo que la biomasa no mostró cambios respecto al grupo control (Vargas-Ortiz et al., 2021). Así, la degradación de los cristales de CaOx en amaranto podría estar generando CO₂ que sustente la fotosíntesis mientras los estomas se encuentran cerrados a causa del estrés hídrico.

La evidencia obtenida en estudios previos sugiere que la planta de amaranto podría estar usando los cristales de CaOx como fuente de carbono en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, en los estudios mencionados se ha empleado el ácido abscísico para promover la condición fisiológica de estrés en lugar de someter la planta directamente a la falta de agua (Tooulakou et al., 2016b). Por otro lado, la evidencia

presentada en estudios previos es aún insuficiente para demostrar esta teoría. En el presente capítulo se muestran resultados derivados del estudio de los efectos del estrés hídrico en la cantidad de cristales, fotosíntesis, histología y acumulación de *RbcL* y *Oxo* en hoja de amaranto. Se realizaron observaciones de los cristales en diferentes grados de estrés hídrico y diferentes tiempos a fin de abarcar un amplio conjunto de condiciones.

7.1 Objetivo

Analizar los cambios en el contenido de cristales de CaOx, en la histología y fotosíntesis de hojas de amaranto sometidas a estrés hídrico severo, mediante microscopía, histología, análisis de la fotosíntesis y acumulación de *RbcL* y *OxO* para discernir posibles correlaciones entre sus comportamientos.

7.2 Hipótesis

La planta de amaranto utiliza cristales de oxalato de calcio como fuente de carbono en condiciones de estrés hídrico. Así, si sometemos a una planta a estrés hídrico, el tamaño y la cantidad de sus cristales de CaOx disminuirán o incluso desaparecerán.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Crecimiento de plantas y diseño experimental

Se germinaron semillas de *A. cruentus* L. cv. Amaranteca en mezcla de sustrato BM2 para germinación de semillas (Berger, Saint-Modeste, Quebec, CA). A los 20 días se trasplantaron a 2 kg del mismo sustrato y se transfirieron a un invernadero con control de temperatura entre 15 y 35 °C. Se monitoreó la temperatura, humedad e intensidad de luz en el invernadero durante el periodo del experimento con registros cada cinco min. Las plantas se regaron con agua y fertilizaron continuamente con solución nutritiva para hortalizas a 1,5 g/L (Hydro-Environment, México).

Para caracterizar la tolerancia al estrés de la planta de amaranto, se realizó un ensayo preliminar con cuatro plantas de 21 días de edad. Se suspendió por completo el riego durante 20 días (estrés ligero) y 26 días (estrés moderado), dos plantas por condición. Al día 20 y 26 respectivamente se reanudó el riego. Se tomaron fotografías del comportamiento de las plantas y se midió la humedad del suelo durante este periodo con ayuda del medidor “hydrosense soil water measurement system” (Logan, Utah, USA). Se realizaron tres mediciones en cada evento por cada planta (Figura 26).

Posteriormente se realizó el ensayo definitivo en el que las plantas (entonces de 39 días de edad) se separaron en tres grupos: control, estrés y recuperación. En todas las plantas se etiquetaron la cuarta (H1), sexta (H2), octava (H3) y décima (H4) hoja verdadera totalmente expandida con ayuda de rótulos de papel. Al grupo estrés y recuperación se les suspendió el riego (Día 0) hasta observar un daño severo (aún mayor al observado en el ensayo preliminar), lo cual ocurrió en el día 20. Al día 20 se reanudó el riego en las plantas del grupo recuperación mientras que el grupo estrés continuó sin riego. En el grupo control se mantuvo el régimen de riego normal, pero se omitió el fertilizante durante los 20 días que el grupo recuperación no recibió riego, al día 20 se reanudó la fertilización normal en ambos grupos. Se tomaron fotografías y se realizaron muestreos por triplicado de las hojas (H1, H2, H3 y H4) de cada grupo en los días 13, 17, 21 (un día después de la reanudación del riego) y 36. En el grupo estrés no se realizó muestreo en el día 36 (Figura 27).

Un triplicado de plantas del grupo control y recuperación, junto con las plantas del grupo estrés ligero y moderado (ensayo preliminar) se mantuvieron con riego y fertilización continua hasta que las plantas echaron panoja y sus semillas maduraron por completo. Estas plantas recibieron la misma cantidad de fertilizante a lo largo de todo el experimento. Al día 87 (plantas de 126 días de edad) se cosecharon las semillas de estas plantas, se midió el peso total y el peso de 100 semillas para comparar el rendimiento y peso promedio por semilla.

Se realizaron mediciones de fotosíntesis con el fluorómetro de cámara foliar (LI-COR 6400-40 Leaf Chamber Fluorometer, Bioscience Inc., Lincoln, NE, USA) instalado en el sistema portátil de fotosíntesis LI-6400XT (Bioscience Inc.) La parte central de las hojas etiquetadas (cuarta, sexta, octava y décima) se sujetaron dentro de la cámara foliar para hacer las mediciones.

8.2 Observación de los cambios en los cristales de CaOx

Se obtuvo un fragmento lineal de la zona media de las hojas muestreadas, haciendo un par de cortes transversales en la mitad de la hoja y fueron fijadas inmediatamente en una mezcla de formaldehído 2%, glutaraldehído 3% en PBS a 4°C durante una noche. Adicionalmente se cosechó una hoja verdadera en una plántula de 10 días de edad y una hoja madura totalmente expandida de una planta de 20 días de edad para observar en qué momento aparecían los cristales en las hojas. Posteriormente las muestras fueron enjuagadas con PBS durante 1h a 4°C dos veces, y después fueron transferidas a etanol 30%. Se tomaron micrografías de polarización de todas las muestras y se cortaron fragmentos más pequeños (alrededor de 5 x 5 mm) de cada muestra para ser incluidas en resina. El resto del tejido fue sometido a proceso de aclarado óptico siguiendo el método reportado por Warner et al. (2014) para medir el tamaño de los cristales.

Los fragmentos de 5 x 5 mm se sometieron a deshidratación en series de etanol 50, 70, 96 % y absoluto, durante 1 h en cada paso. Posteriormente se pasaron a un mezcla etanol absoluto:resina LR White 1:1 y se mantuvieron en agitación toda la noche. Al día siguiente se transfirieron a resina pura y se agitaron nuevamente durante toda la noche. Finalmente, los fragmentos fueron transferidos a cápsulas de gelatina con resina pura fresca, se taparon y polimerizaron a 50°C durante dos días. Se obtuvieron cortes semifinos en ultramicrotomo (RMC, Boeckeler Instruments, Inc., Tucson, AZ, USA) y se tiñeron con safranina y verde rápido. Se obtuvieron micrografías con la técnica microscopía Nomarsky

en un microscopio Zeiss Imager M2 (Carl-Zeiss, Oberkochen, GE). Se realizaron ajustes de exposición, contraste y color en las micrografías obtenidas.

8.3 Análisis de la acumulación de *Rbcl* y *Oxo*

Los cortes en resina se sometieron a análisis inmunohistoquímico como se indica a continuación. Los cortes fueron sometidos a recuperación de antígeno con proteinasa K a 50 µg/mL en PBS a 37 °C por 30 min. Posteriormente la proteinasa k fue inactivada calentando a 95°C por 5 min y fue enjuagada tres veces con PBS, agua y finalmente TBST (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 1% pH 7.6). Después, se llevó a cabo el bloqueo con 200 µL de solución de bloqueo (BSA 1% en TBST) por 30 min. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron 200 µL de anticuerpo de conejo anti-Rbcl o anti-OxO según corresponda (Agrisera, Vännäs, Sweden) diluido 1:500 en solución de bloqueo y se incubó 1 h a 37 °C. Después, se enjuagó dos veces con TBST y se agregaron 200 µL de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA) diluido 1:500 en solución de bloqueo y se incubó por 30 min a 37°C. Se enjuagó con TBST dos veces y se desarrolló el color con 500 µL de BCIP/NBT a 37°C durante 2 h. Finalmente los cortes se lavaron con TBST dos veces, se secaron al aire y se montaron con entellan y un cubreobjetos. Se obtuvieron micrografías con la técnica microscopía Nomarsky en un microscopio Zeiss Imager M2 (Carl-Zeiss, Oberkochen, GE). Se realizaron ajustes de exposición, contraste y color en las micrografías obtenidas.

9. RESULTADOS

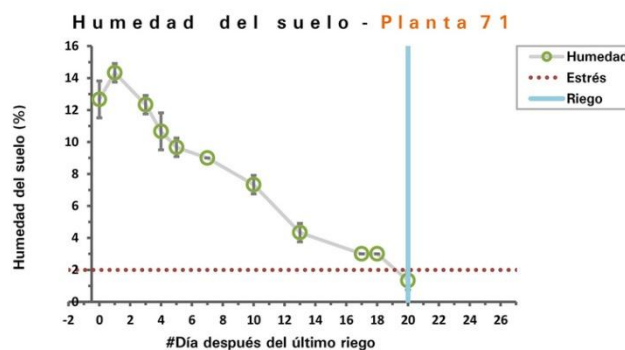
9.1 Ensayo preliminar de tolerancia al estrés hídrico

Con el objetivo de tener una idea *a priori* de la tolerancia al estrés hídrico de la planta de amaranto, se realizó un ensayo preliminar en el que plantas de 21 días de edad se sometieron a dos niveles de estrés. El primero se clasificó como “ligero” (20 días sin riego) y el segundo como “moderado” (26 días sin riego). Tras el último riego, la humedad del suelo disminuyó progresivamente de un 12% a alrededor del 2% en el día 18. En este momento se comenzó a notar ligeramente la pérdida de turgencia. Al día 20, la pérdida de turgencia era evidente y aparecieron más signos del estrés hídrico como clorosis y el contraste de las venas terciarias que normalmente no se ven. Al día 26 sin riego, los signos de estrés hídrico fueron más graves, con una pérdida de turgencia mayor, enrollamiento de las hojas, mayor clorosis incluso en los peciolo y un mayor contraste de las venas terciarias. En ambos grupos se observó una recuperación casi total de la turgencia 2.5 horas después del riego. Sin embargo, la clorosis y contraste de las venas tardó más en desaparecer, siendo más acentuado en el grupo estrés moderado (Figura 26). Una vez que el suelo alcanzó la humedad del 2% se suspendieron las mediciones de humedad para evitar estresar la raíz con la sonda de medición.

ENSAYO PRELIMINAR DE TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO

(a) Día 18 Día 20 Día 21

ESTRÉS LIGERO



(b) Día 18 Día 26 Día 27

ESTRÉS MODERADO

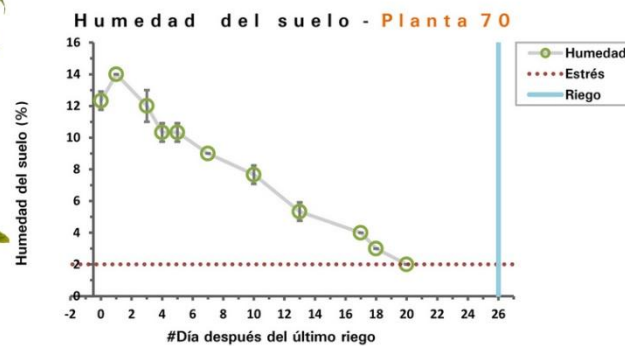


Figura 26. Ensayo preliminar de tolerancia al estrés hídrico en la planta de amaranto. Se muestran las fotografías de las plantas del grupo estrés ligero y moderado, los días 18, 20 y 26 después del último riego, y al día siguiente de haber reanudado el mismo. Las gráficas muestran los cambios en la humedad del suelo y el día en que se reanudó el riego. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

9.2 Experimento definitivo – estrés hídrico severo

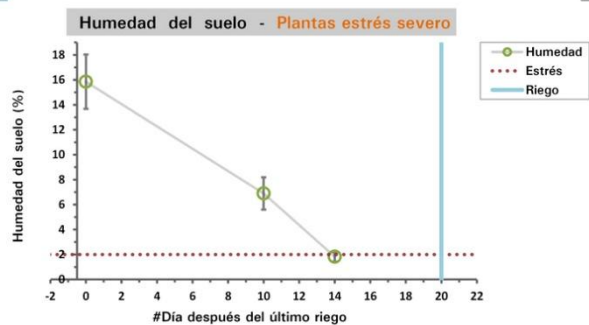
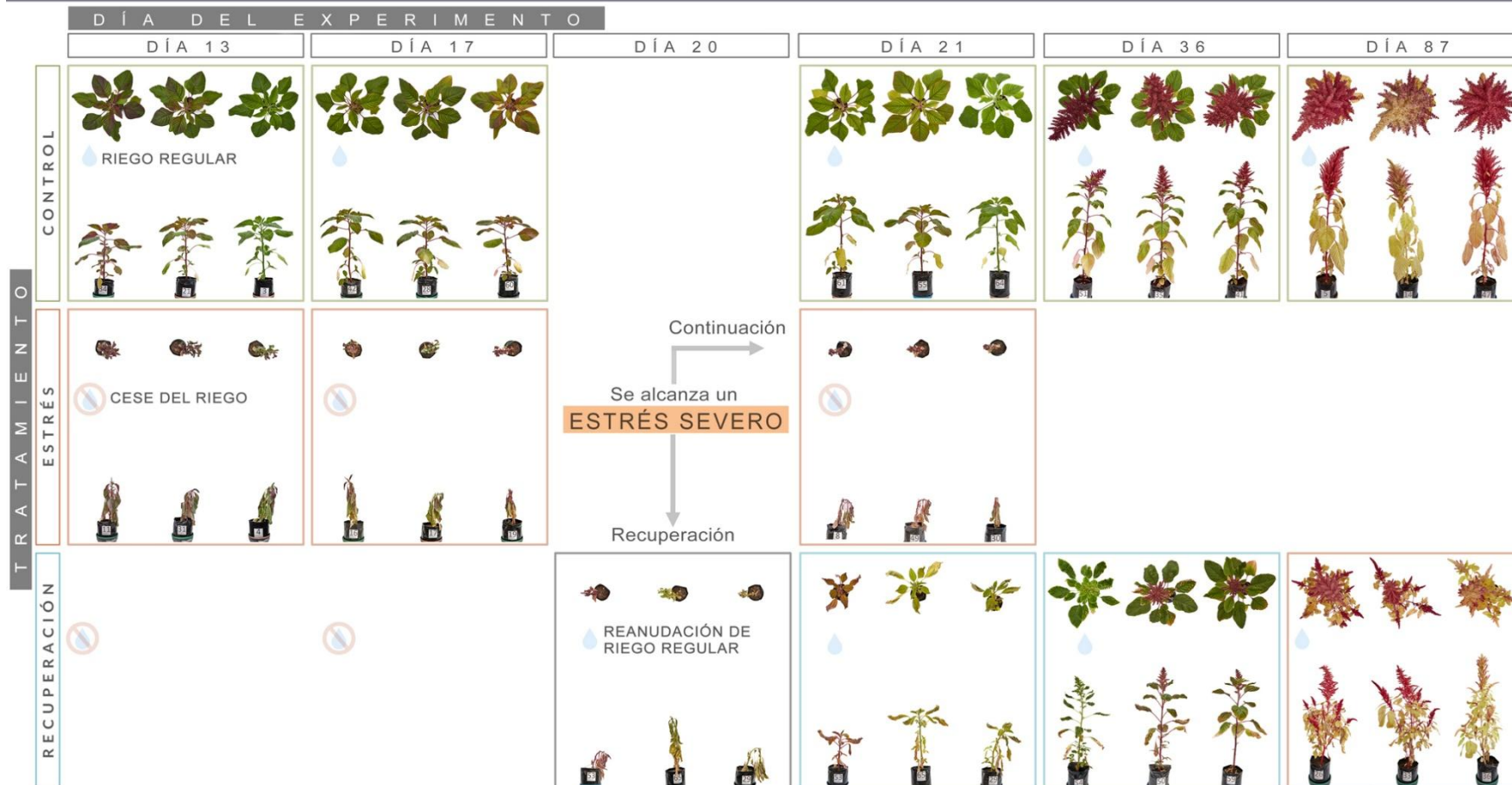
En los experimentos previos de estrés hídrico en plantas de amaranto realizados en nuestro grupo de investigación, las plantas se han llevado a “estrés ligero” (Huerta-Ocampo, 2008). En estas condiciones observamos de forma preliminar por microscopía que no había un cambio evidente en la acumulación de cristales. Por esto, a fin de asegurar una amplia observación de los cambios en el contenido de los cristales de CaOx en función del estrés hídrico, así como la capacidad de la planta de amaranto de tolerar condiciones drásticas de estrés hídrico, en el experimento definitivo se llevaron las plantas a un grado de estrés severo, alcanzando el umbral entre la muerte-supervivencia de la planta.

En la Figura 27 se muestra el diseño experimental con fotografías de las plantas que fueron muestreadas durante el experimento. Para entonces, las plantas tenían una edad de 39 días, la demanda de agua era mayor, y alcanzaron una humedad del suelo del 2% en el día 14 después del último riego. Sin embargo, para el día 13 la mayoría de las plantas había alcanzado una condición cercana al estrés ligero, para el día 17 cercana al moderado y para el día 20 una condición grave. En esta condición se observaron los signos de estrés hídrico previamente descritos: pérdida de turgencia, enrollamiento de hojas, clorosis y contraste de venas terciarias, además de una rigidez en las hojas al grado de poder fracturarse al ser presionadas manualmente (crujientes).

Cabe resaltar que en el diseño experimental hay dos variables independientes: el estrés hídrico y la senescencia. Debido a que transcurrieron 23 días entre el primer y último muestreo de hojas (entre el día 13 y 36), el comportamiento de los cristales de CaOx puede ser afectado por la senescencia en el caso del grupo control, y por el estrés hídrico y la senescencia en los casos del grupo estrés y recuperación.

Durante el transcurso del experimento se mantuvo un monitoreo constante (cada 5 min) de la temperatura, humedad e intensidad de luz en el invernadero donde se llevó a cabo el experimento. La temperatura osciló entre los 15 y 35 °C, sin embargo, pese al sistema de refrigeración del invernadero (por evaporación), después del mediodía la temperatura llegó a subir en algunas ocasiones hasta los 45°C. Sin embargo, en nuestra experiencia, la planta de amaranto tolera bien las altas temperatura más no el frío. Por lo que el invernadero contó con un sistema de calefacción (quemador de gas) para que la temperatura no descendiera por la madrugada por debajo de los 15°C. La humedad relativa tuvo variaciones entre 40 y 85%, y la intensidad de luz entre 0 y 20 000 lux, con picos de hasta 50 000 lux en las horas más soleadas del día. Estas variaciones atendían naturalmente a la hora del día y fueron homogéneas a lo largo del experimento (Figura 28).

DISEÑO EXPERIMENTAL DEFINITIVO - ESTRÉS SEVERO



Il
S
o
y
i.
a

REGISTRO DE LAS VARIABLES AMBIENTALES EN EL INVERNADERO

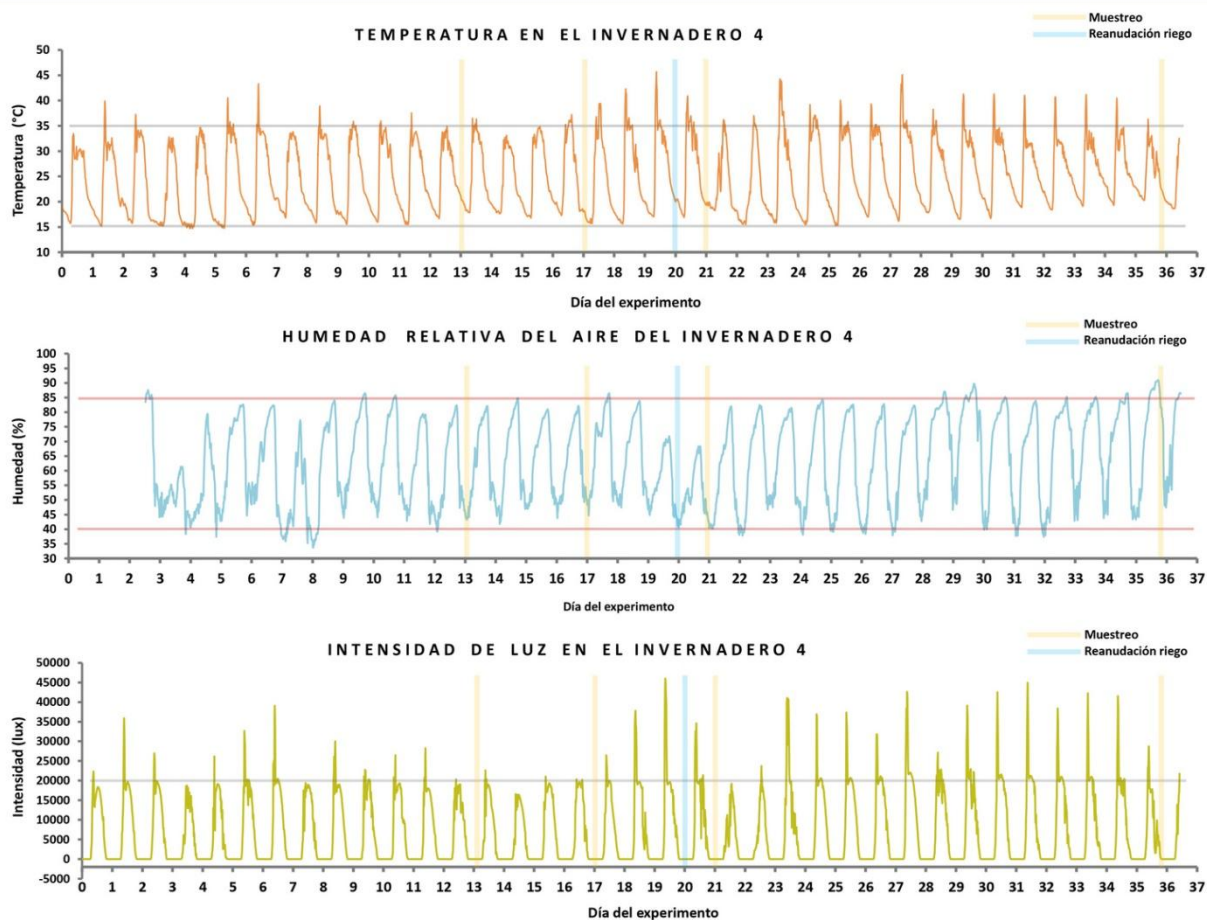


Figura 28. Invernadero experimental y registro de sus variables. El invernadero donde se llevó a cabo el experimento cuenta con control de temperatura asistida con un quemador de gas LP y un humidificador. La temperatura y humedad estuvieron influenciadas por estos elementos y la luz que recibieron las plantas fue natural. Las mediciones de humedad del suelo, captura fotográfica, medición de fotosíntesis y muestreos se llevaron a cabo dentro del invernadero para evitarla variabilidad que pudiera ocasionar el mover las plantas al laboratorio.

9.3 Producción de semilla

Tras la reanudación del riego, la mayoría de las plantas logró sobrevivir y dar panoja. Se seleccionaron tres plantas de las que mostraron mejor recuperación y se cosecharon sus semillas. Las plantas que fueron sometidas a un estrés ligero y moderado continuaron su desarrollo en forma de hierba, generando solo una panoja principal en el ápice de la planta. Sin embargo, las plantas sometidas a estrés severo continuaron su desarrollo tendiente a una forma de arbusto, generando varias panojas en el ápice de cada una de sus ramificaciones (Figura 29).

Visualmente las semillas producidas entre los cuatro grupos de plantas no parecen diferentes (Figura 28). Tras un test de Kruskal-Wallis no hay diferencia significativa en el peso unitario de las semillas, pero sí se encontró diferencia para el rendimiento en la producción de las plantas. Tras un análisis de Dunn, en la que se compararon todas las condiciones de estrés vs el control, se observó que solamente la muestra "estrés ligero" produjo significativamente menos semillas que el control (Figura 30).

PRODUCCIÓN DE SEMILLA TRAS RECUPERACIÓN DEL ESTRÉS

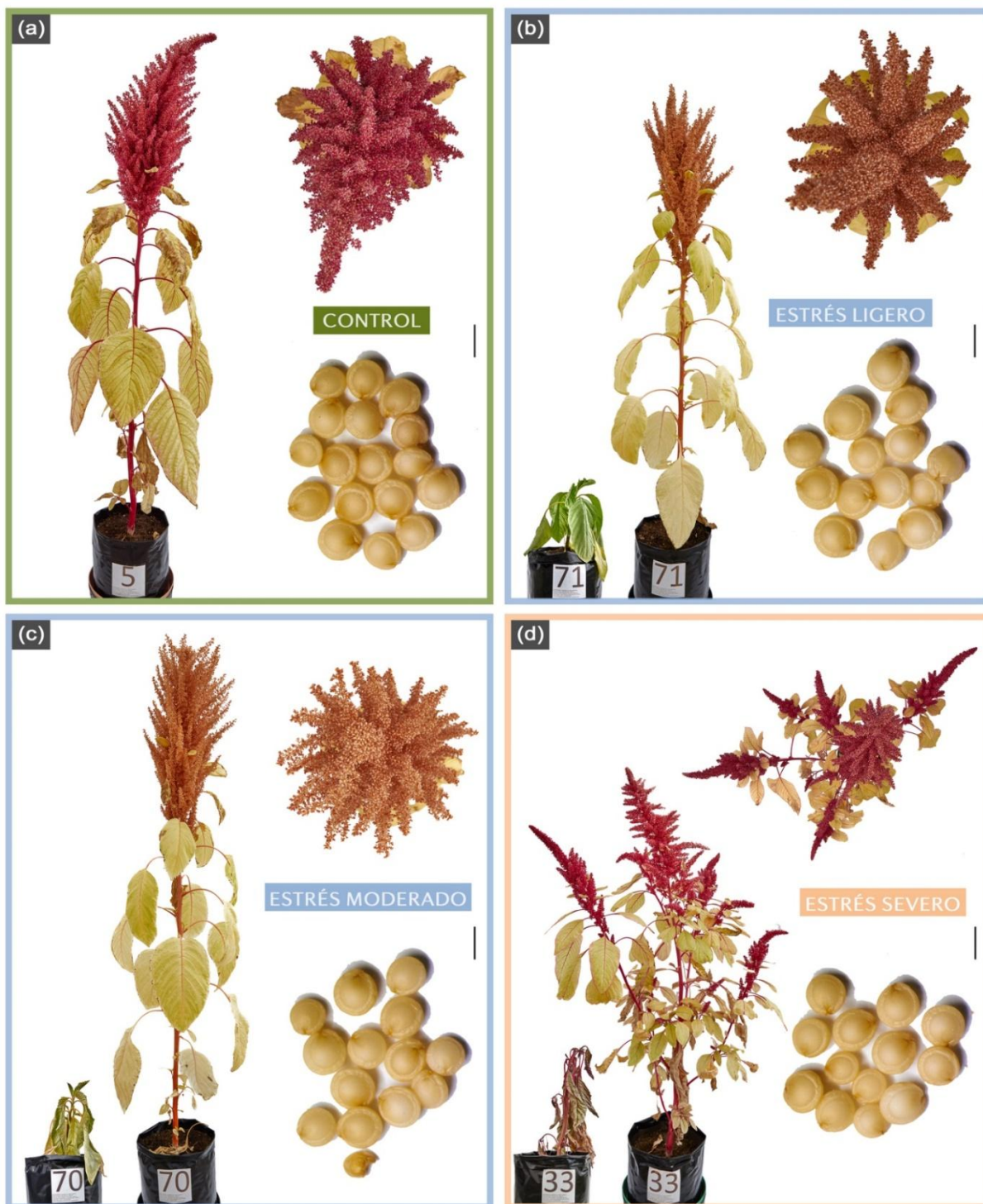


Figura 29. Desarrollo y producción de semillas plantas sometidas a diferentes niveles de estrés hídrico. En cada recuadro se muestra una fotografía de la condición más grave de estrés hídrico que sufrió la planta y a la derecha su desarrollo final tras recuperarse. Se muestra una vista frontal y en picada para observar la morfología de la panoja. Se acompañan de una micrografía óptica de las semillas que produjeron (barra de escala: 1 mm). La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

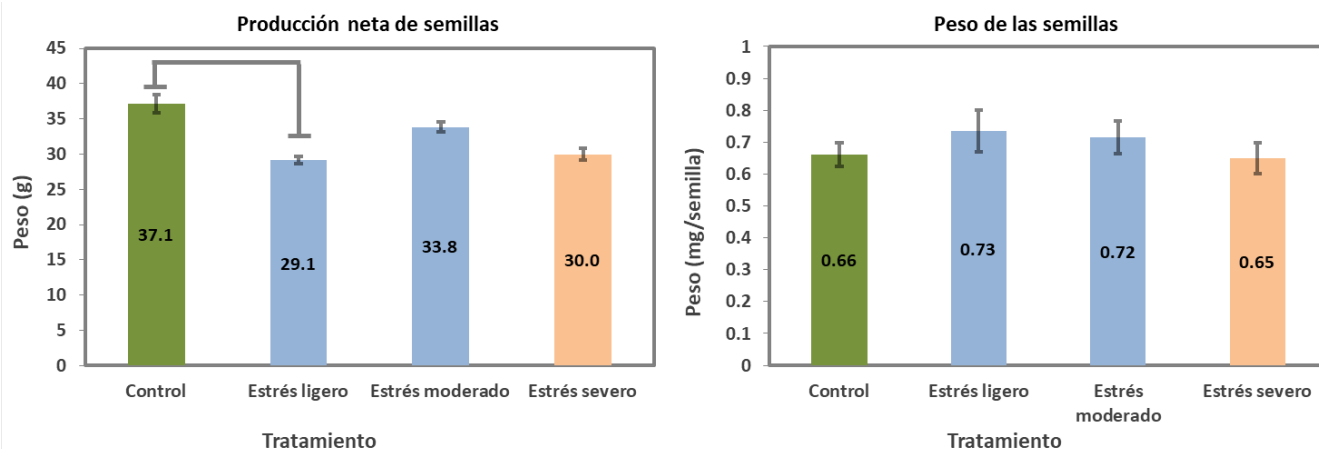


Figura 30. Producción y peso unitario de las semillas producidas. Se realizó un ANOVA de Kruskal-Wallis y después una prueba de Dunn $p < 0.05$. En la producción de semillas se compararon los tratamientos de estrés hídrico vs el control, encontrando diferencia significativa solamente en el grupo estrés ligero vs control. En el peso de las semillas no se encontraron diferencias significativas. Control $n=3$, estrés ligero $n=2$, estrés moderado $n=2$, estrés severo $n=3$.

9.4 Desarrollo de las plantas y niveles de recuperación del estrés hídrico

Con ayuda de etiqueta de papel, se rotularon de forma no invasiva la cuarta, sexta, octava y décima hoja verdadera totalmente expandida de todas las plantas al inicio del experimento (día 0). El conteo se realizó en dirección del ápice hacia la raíz y se omitieron las hojas cuya lámina estaba unida muy de cerca al ápice (peciolo corto o nulo). Estas hojas fueron las que se muestrearon a lo largo de todo el experimento y se llevó un registro fotográfico de sus cambios, así como de las plantas.

La planta control y sus hojas continuaron su curso normal de desarrollo y senescencia. En algunos casos, para el día del muestreo la planta ya había desechado (de forma natural) su décima u octava hoja, por lo que, aunque se dispusieron triplicados, la *n* en estas muestras fue variable (Figura 31).

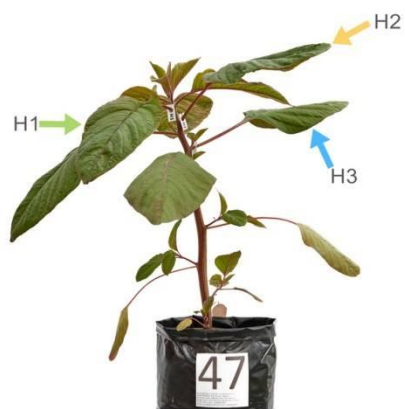
En el día 20 las plantas estresadas alcanzaron una condición muy grave, caracterizada por una pérdida de turgencia generalizada (hojas, peciolo y tallos), una drástica disminución en su tamaño y una sensación quebradiza en sus hojas, particularmente las más viejas (octava y décima). La deshidratación del follaje era tal que al moverse producía un sonido de cascabel. Tras la reanudación del riego de este grupo de plantas el grado y velocidad de recuperación fue muy variable. En general, la recuperación de la turgencia se dio entre 5 a 20 h después del riego, la recuperación de clorofila se dio en algunos días, no hubo una recuperación total de la planta y debido a ello generaron nuevos brotes de hoja (Figura 32). El resultado fue un grupo de plantas con morfología muy variada tanto en sus hojas (forma de corazón) y follaje en general (Figura 33).

ETIQUETADO NO INVASIVO DE HOJAS



H1-Hoja 4
H2 - Hoja 6
H3 - Hoja 8
H4 - Hoja 10

DESAROLLO DE PLANTA CONTROL



Día 9



Día 24



Día 42



Día 87

Figura 31. Desarrollo de las plantas del grupo control. Se etiquetaron la cuarta (H1), sexta (H2), octava (H3) y décima (H4) hojas totalmente expandidas. A estas hojas se les dio seguimiento a lo largo de todo el experimento a fin de seguir la evolución del mismo grupo de hojas para que fuera metabólicamente comparables a lo largo del tiempo. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

DESARROLLO DE PLANTA RECUPERACIÓN

H1-Hoja 4
H2 - Hoja 6
H3 - Hoja 8
H4 - Hoja 10



Figura 32. Desarrollo de las plantas recuperación. Tras 20 días sin riego las plantas nivel de estrés severo caracterizado por una pérdida de turgencia generalizada. Tras la reanudación del riego la recuperación fue lenta y no total como sucedió en los grupos de estrés ligero y moderado. Debido a ello las plantas dieron nuevos brotes para compensar los muertos, deformando el crecimiento herbáceo característico del amaranto. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

MORFOLOGÍAS DE LAS PLANTAS RECUPERACIÓN

Día 42



Figura 33. Morfologías de las plantas recuperadas del estrés hídrico severo. En un intento de supervivencia, la morfología de la planta de amaranto cambió drásticamente de la forma clásica de hierba a un aspecto más cercano al arbusto. Hubo algunas plantas que no pudieron sobrevivir. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

Observamos que las plantas se recuperaron del estrés hídrico severo en diferentes niveles, los cuales clasificamos como “no sobrevive”, “hasta el tallo”, “hasta el ápice” y “hasta las hojas”. En “no sobrevive” la planta no recuperó su follaje ni generó nuevos brotes. De 30 plantas sometidas a estrés hídrico severo, solo dos no sobrevivieron (Figura 34 A y B). Una de ellas permaneció seca y la segunda rehidrató su tallo, pero no logró generar brotes nuevos. Esta segunda planta, con el tiempo su tallo comenzó a pudrirse (no mostrado).

En el grupo “hasta el tallo” se ubicaron 12 de las 30 plantas. Estas se caracterizaron por un tallo rehidratado (turgente) y la generación de nuevos brotes laterales. En este grupo, el ápice y las hojas que la planta tenía antes del estrés hídrico (hojas originales) no sobrevivieron. Hubo diferentes gradaciones en este grupo, desde las plantas que solo produjeron unas cuantas hojas nuevas hasta las que generaron un vasto follaje (Figura 34 A y B).

El grupo “hasta el ápice” se ubicó solamente una planta. Este nivel se caracterizó por las características del grupo previo, más la supervivencia del ápice. La supervivencia del ápice se evidencia por la eventual aparición de la panoja (Figura 34 A y B). Para esta clasificación se tomó en cuenta el “ápice original”, ya que los brotes nuevos generaron también panojas secundarias a los costados del tallo.

Finalmente, en el grupo “hasta las hojas” se ubicaron 15 de las 30 plantas. Este grupo además de presentar las características de los grupos previos, sus “hojas originales” se rehidrataron y sobrevivieron en diferentes grados (Figura 34 A y B).

Estos niveles de supervivencia tienen un patrón, en el que lo primero en sobrevivir es el tallo, seguido de peciolos, ápice, nervaduras de las hojas y por último la porción de lámina unida directamente a las nervaduras.

NIVELES DE RECUPERACIÓN DEL ESTRÉS



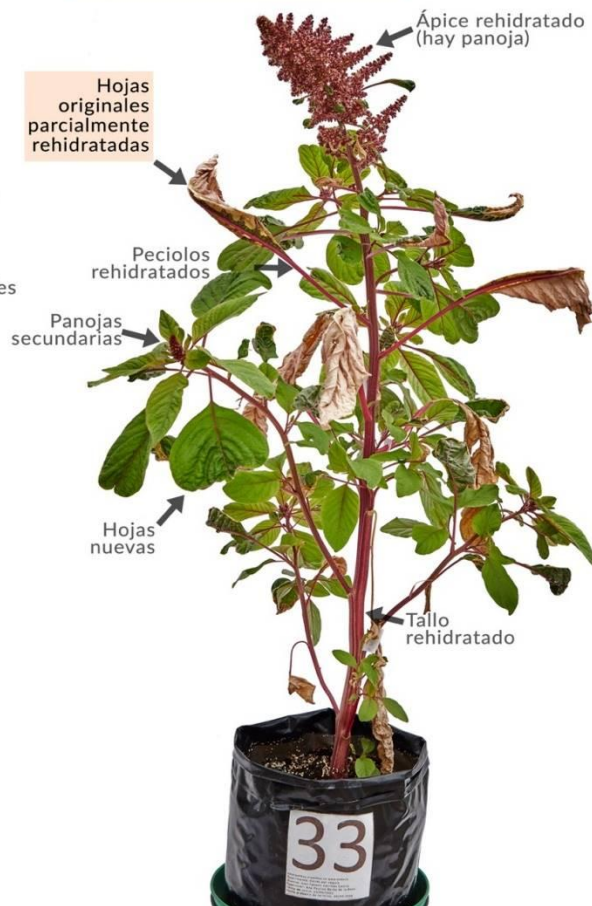
Figura 34A. Niveles de recuperación del estrés hídrico severo. Las plantas del grupo recuperación sobrevivieron en diferente medida. Las que no sobrevivieron se mantuvieron secas o fueron incapaces de generar hojas nuevas. En algunas solamente sobrevivió el tallo y en ocasiones los peciolos, pero las hojas originales y el ápice no. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

NIVELES DE RECUPERACIÓN DEL ESTRÉS

HASTA EL ÁPICE



HASTA LAS HOJAS



Hojas originales
parcialmente rehidratadas
(Vista en picada)



Día 42

RESULTADOS GLOBALES

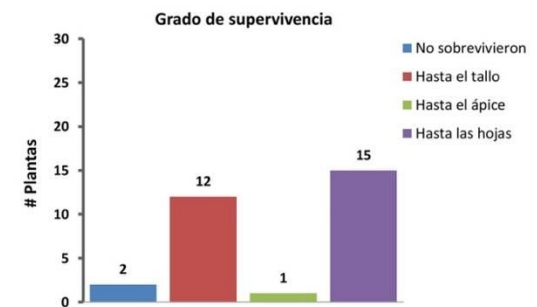


Figura 34B. Niveles de recuperación del estrés hídrico severo. El ápice de algunas plantas sobrevivió generando eventualmente panoja. Las plantas que generaron hojas nuevas lo hicieron a través de la generación de “nuevos tallos” al final del cual también de generaron panojas (secundarias). En algunas plantas sobrevivieron parcialmente las hojas originales, particularmente el pecíolo, vena media y lámina que se encuentra alrededor de estas estructuras. La etiqueta de la bolsa mide 6.8 x 6.8 cm.

9.5 Efecto del estrés hídrico y senescencia en el desarrollo y recuperación de las hojas

Se cosecharon por triplicado la cuarta, sexta, octava y décima hoja verdadera totalmente expandidas. Como se mencionó, estas hojas se rotularon al inicio del experimento, por lo que reflejan tanto el efecto de la senescencia durante 23 días (día 13 a 36) y el efecto del estrés hídrico severo en el grupo estrés y recuperación (Figura 35A a 35D).

En el grupo control, en todas las hojas se observa un cambio de color, del verde vivo a un tono amarillento. Este cambio se acentúa en las hojas más viejas (octava y décima), mientras que en las más jóvenes aún predomina el color verde (cuarta y sexta). En el grupo de estrés este cambio de color también sucede, pero con mayor rapidez y acompañado de la pérdida de turgencia. Para el día 21 la cuarta y sexta hoja, aunque estaban muy deshidratadas, aún pudieron extenderse para tomarles fotografía sin que se fracturaran. Esta operación no fue posible con la octava y décima hoja, que ya eran más friables (Figura 35A a 35D).

En cuanto al grupo recuperación, como se mencionó previamente hubo diferentes niveles de recuperación. Se seleccionaron las plantas que mostraron el mayor nivel. Un día después del riego, las hojas cuartas y algunas sextas mostraron signos de recuperación, mientras que la mayoría de las hojas octavas y décimas no. Un fenómeno interesante en estas hojas fue que en la mayoría de casos de hojas rehidratadas, solamente se recuperó la turgencia en la vena media, venas primarias y la lámina que rodeaba a las mismas. Mientras tanto, la lámina que se localizaba entre las venas primarias se secó. Fueron pocos los casos en los que la hoja completa recuperó su turgencia. La fracción de tejido que se recuperó un día después de la reanudación del riego estaba clorótica, sin embargo, para el día 36 había recuperado un color verde intenso cercano al del grupo control, pero del día 13 (Figura 35A a 35D). Es decir, a nivel cromático la hoja se recuperó al estado en que se encontraba al inicio del estrés.

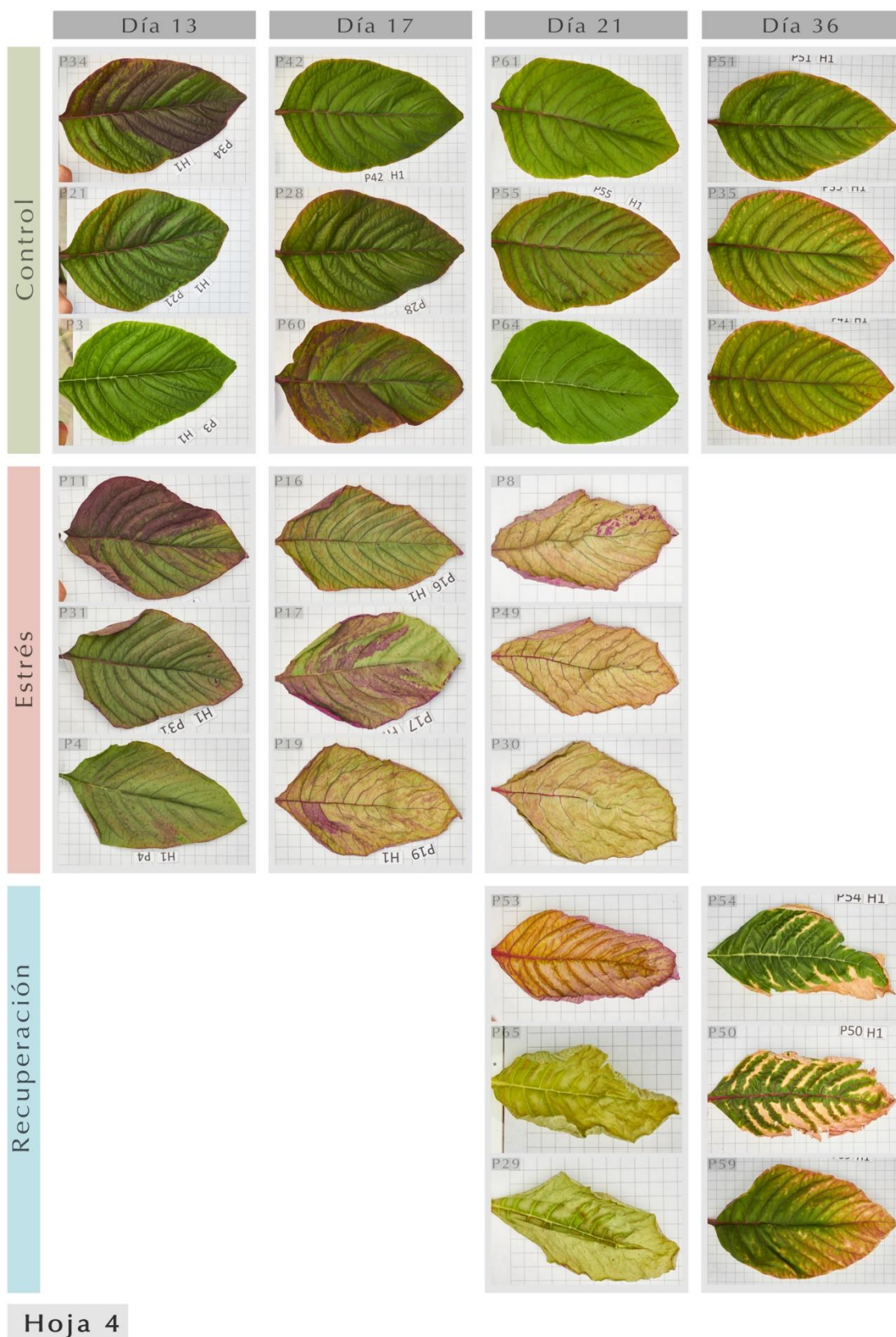


Figura 35A. Muestreo de la cuarta hoja verdadera. Los cuadrados miden 1x1 cm.

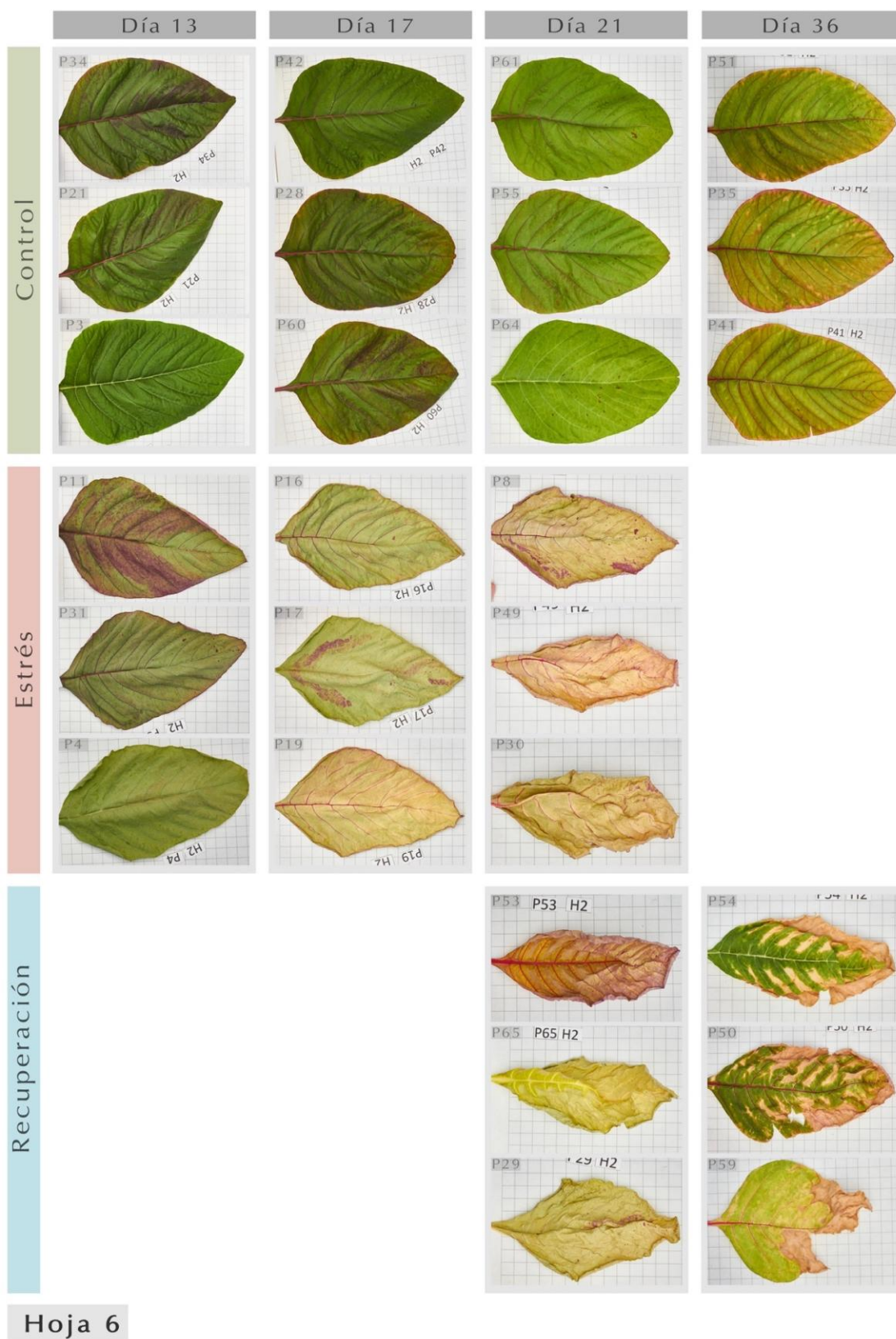


Figura 35B. Muestreo de la sexta hoja verdadera. Los cuadrados miden 1x1 cm.

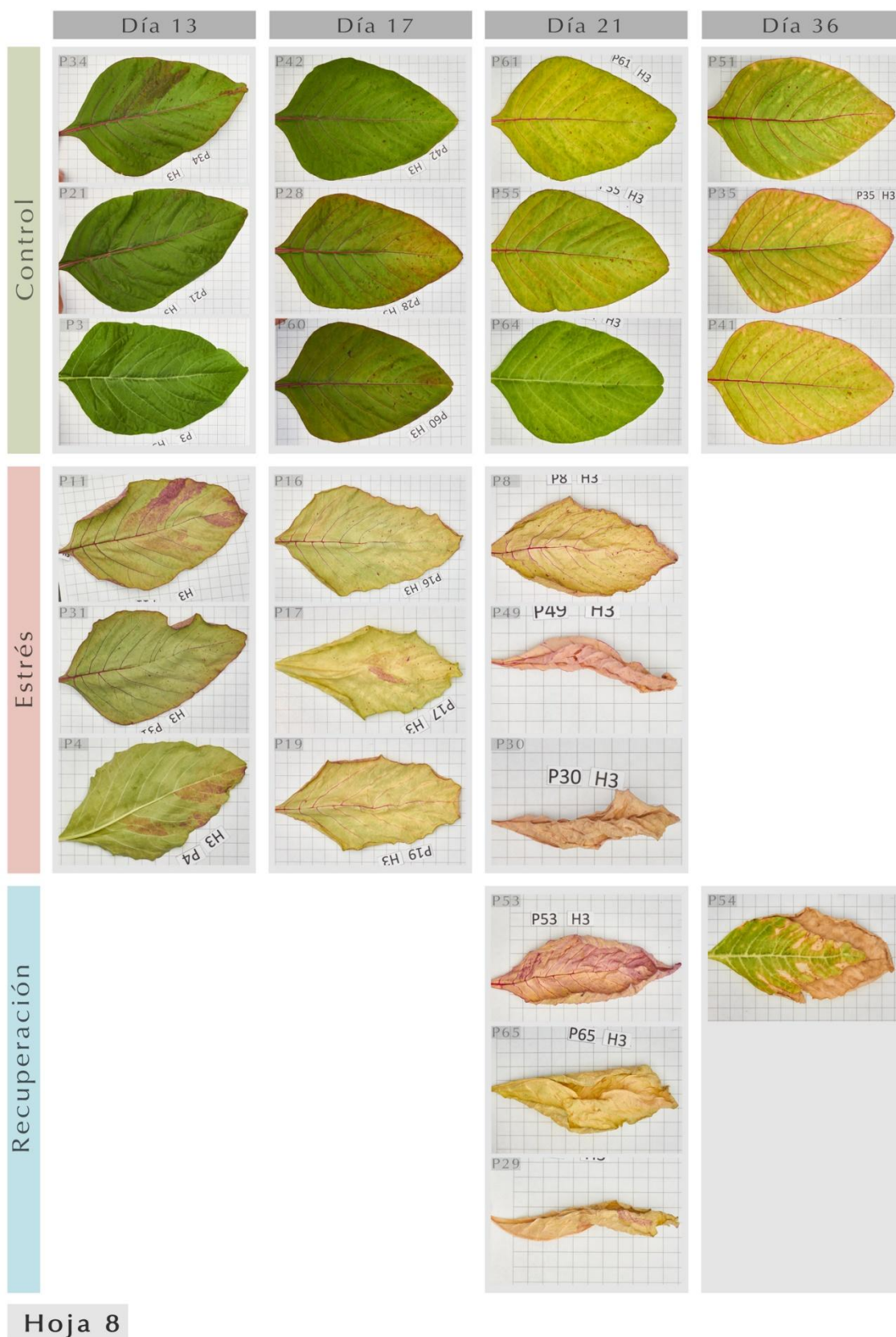


Figura 35C. Muestreo de la octava hoja verdadera. Los cuadrados miden 1x1 cm.

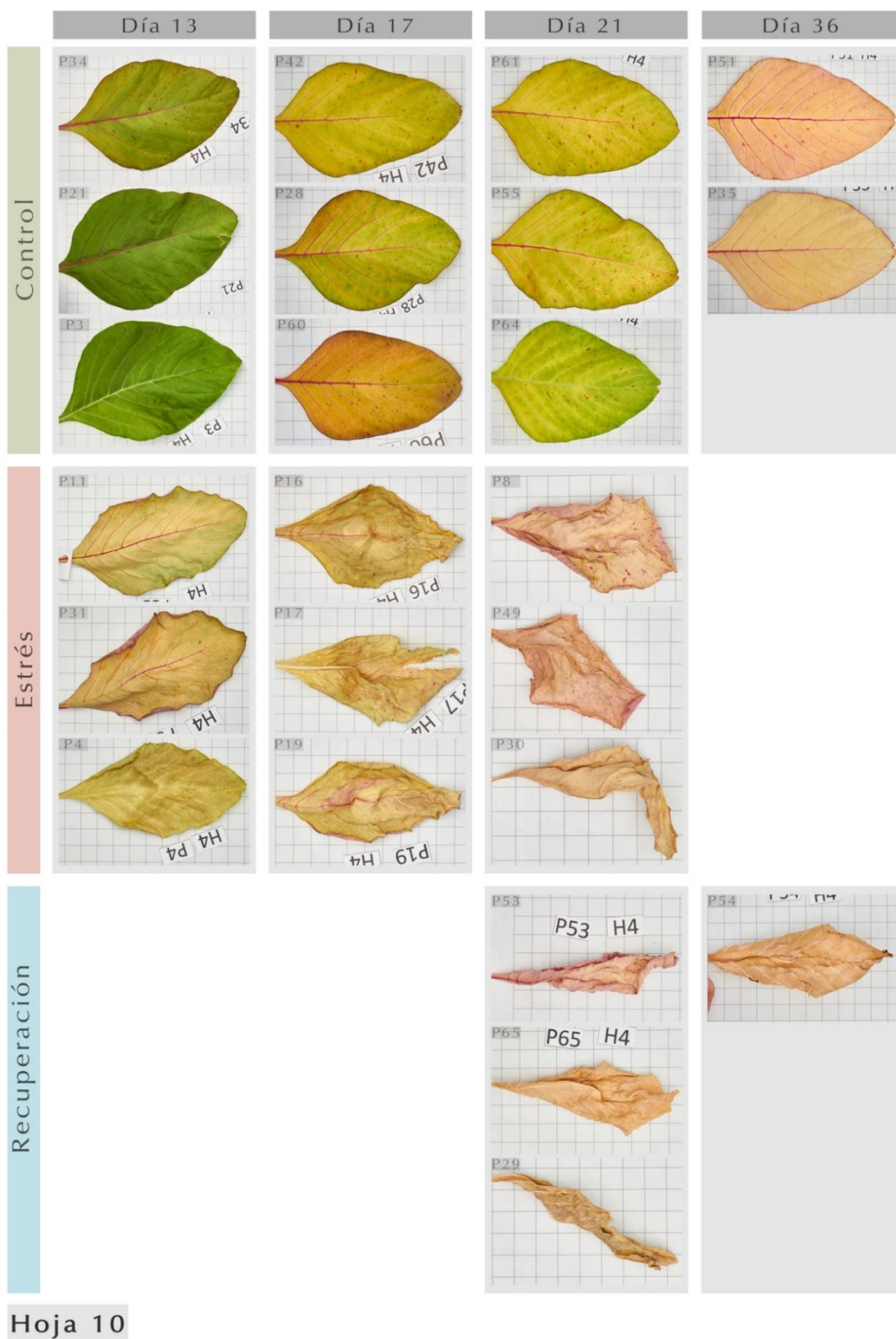


Figura 35D. Muestreo de la décima hoja verdadera. Los cuadrados miden 1x1 cm.

9.6 Efecto del estrés hídrico en la fotosíntesis

La eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) es una medida general del desempeño de la fotosíntesis (fase lumínica). Para el día 22 (dos días después de la reanudación del riego) las hojas estresadas mostraron valores cercanos a cero, mientras que las hojas recuperadas del estrés hídrico (hojas 4 y 6) mostraron valores idénticos al control (alrededor de 0.2). Para el día 35 (15 días después de la reanudación del riego) la media de las hojas recuperación superó a la media del grupo control (0.5 vs 0.4). Por su lado, las hojas 6 aunque mostraron una recuperación, sus valores no alcanzaron al control. El mismo comportamiento, pero en menor escala sucedió para las hojas 10 (Figura 36A).

La eficiencia cuántica de los centros abiertos del fotosistema II (F_v/F_m) posee un valor óptimo alrededor de 0.83 para la mayoría de las plantas. Valores inferiores se pueden observar cuando la planta sufre estrés (Maxwell and Johnson, 2000). Para el día 22 las hojas estresadas mostraron valores muy cercanos a cero; alrededor de 0.05 respecto al 0.6 del control (para las hojas 4, 6 y 8, y 0.25 para la hoja 10). Por otro lado, las hojas recuperación mostraron valores ascendentes en función del número de hoja, pero aún sin alcanzar a su respectivo control. No obstante, para el día 35 las hojas recuperación 4 y 6 habían recuperado un valor idéntico o ligeramente superior al control (Figura 36A).

El apagado fotoquímico (qP) es una medida de los centros de reacción abiertos (que pueden aceptar electrones) del fotosistema II (PSII). Para el día 22 las hojas estresadas mostraron valores negativos, mientras que las hojas control y recuperación (4 y 6) mostraron un valor cercano a 0.6. Para el día 35 esta tendencia se mantuvo, pero con valores más altos (alrededor de 0.8). Las hojas 8 y 10 mostraron mucha variabilidad en el día 22, de tal suerte que no se pueden hacer señalamientos con certeza. Para el día 35, estas hojas mostraron un incremento en su valor y menor variabilidad, alcanzando las hojas 8 valores similares entre el control y estrés (Figura 36B).

El apagado no fotoquímico (NPQ) es una medida del proceso en que el exceso de luz absorbida es disipado como calor a fin de evitar la fotoinhibición (Ruban, 2016). Para el día 22 las plantas estresadas mostraron valores cercanos a cero, mientras que las hojas 4 alcanzaron valores similares al control. Sin embargo, las demás hojas no alcanzaron el valor del control, e incluso la hoja 4 para el día 35 su valor había disminuido respecto a su control (Figura 36B).

La conductancia estomática (g_s) es una medida del grado de apertura de las estomas. En condiciones de estrés hídrico se espera que los estomas estén cerrados para evitar la pérdida de agua por evaporación, dando valores de g_s más bajos que una planta no sometida a estrés hídrico. Para el día 21 (un día después de la reanudación del riego), la conductancia estomática de las plantas estrés y recuperación de las hojas 4, 6 y 8 fue similar e inferior al control. Sin embargo, para el día 35 las hojas recuperación mostraron un valor cuya media fue incluso superior al control (Figura 37A).

La tasa de transpiración (E) es una medida de la pérdida de agua por evaporación en la hoja, y está relacionada directamente con la apertura de los estomas (g_s). Por ello, su comportamiento es muy parecido a g_s pero con una escala diferente (Figura 37A).

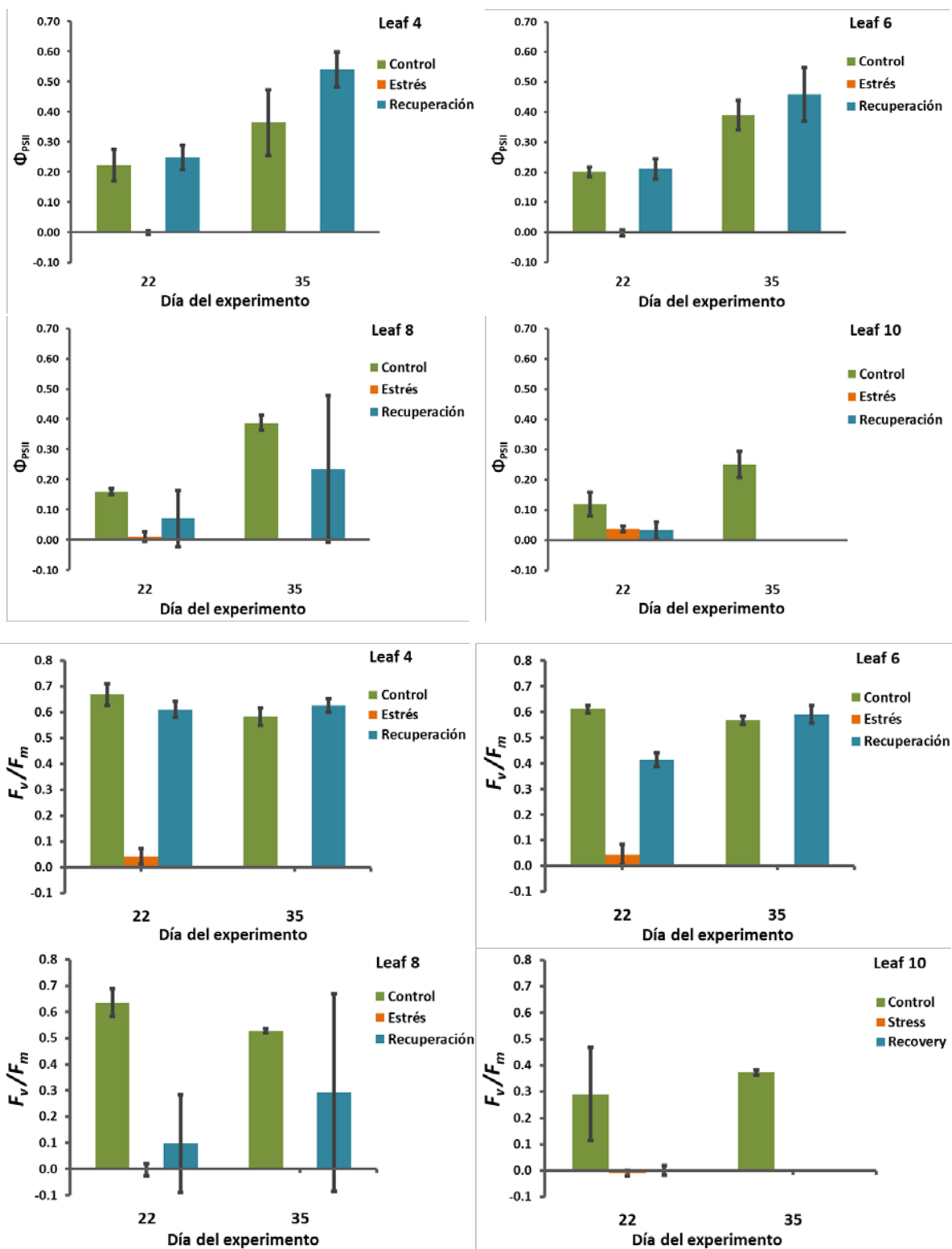


Figura 36A. Mediciones de fotosíntesis – procesos lumínicos. Φ_{PSII} – Eficiencia cuántica del fotosistema II. F_v/F_m – Eficiencia cuántica de los centros abiertos del fotosistema II. El día 35 no se analizaron plantas estrés y las hojas 10 de algunas plantas control y recuperación ya se habían desprendido de la planta.

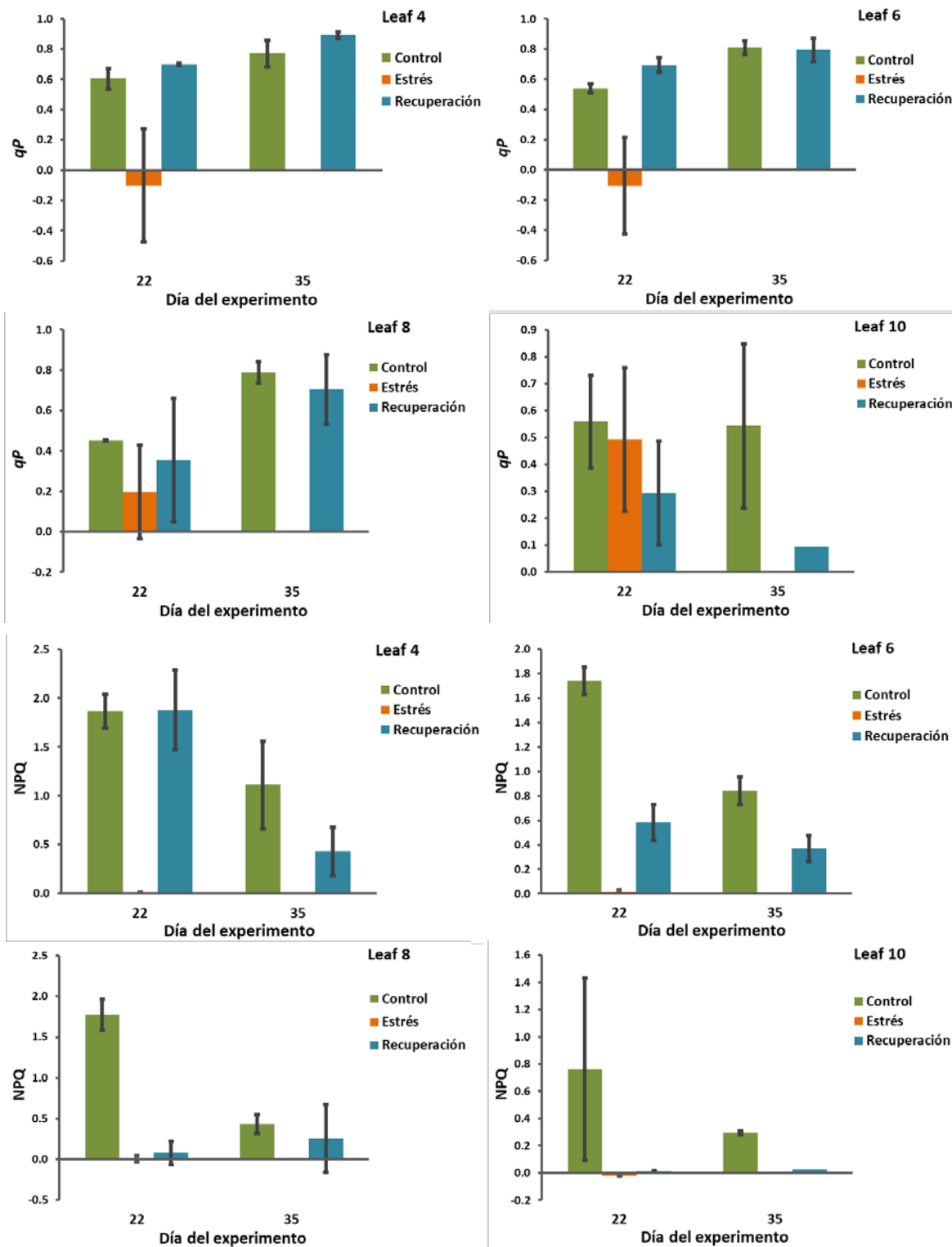


Figura 36B. Mediciones de fotosíntesis – procesos lumínicos. qP – Apagado fotoquímico. NPQ – apagado no fotoquímico. El día 35 no se analizaron plantas estrés y las hojas 10 de algunas plantas control y recuperación ya se habían desprendido de la planta.

La tasa de asimilación neta (A) es una medida de la capacidad de fijar CO_2 de la hoja a una concentración de CO_2 cercana a la atmosférica (alrededor de 400 ppm). El equipo suministra esta concentración de CO_2 y mide la diferencia una vez expuesto en la cámara con la hoja. Si la concentración medida por el equipo es menor arroja un valor positivo, si es mayor arroja un valor negativo. El flujo de carbono en la hoja está en un equilibrio entre la fijación (fotosíntesis) y emisión (respiración celular); un proceso fija carbono mientras el otro emite carbono. Cuando el equipo detecta una concentración mayor a la que suministró significa que las reacciones de respiración predominan sobre la fijación, y cuando detecta una menor significa que la reacción de fijación predomina sobre la respiración. Para el día 21 todas las hojas del grupo estrés y recuperación mostraron valores negativos (predominaba la respiración celular), mientras que el control un valor positivo (predominaba la fijación). Sin embargo, en las hojas 4 y 6 del grupo recuperación, este valor fue menor. Para el día 34, las hojas recuperación pasaron de la predominancia de la respiración celular a la de fijación (Figura 37B).

La concentración intercelular de CO_2 (C_i) es una medida de la concentración de CO_2 que se encuentra entre las células de la lámina de la hoja. Este valor tiene un comportamiento inverso a la tasa de asimilación neta de CO_2 , ya que, si se asimila más CO_2 , hay menos disponible entre los espacios celulares (Figura 37B).

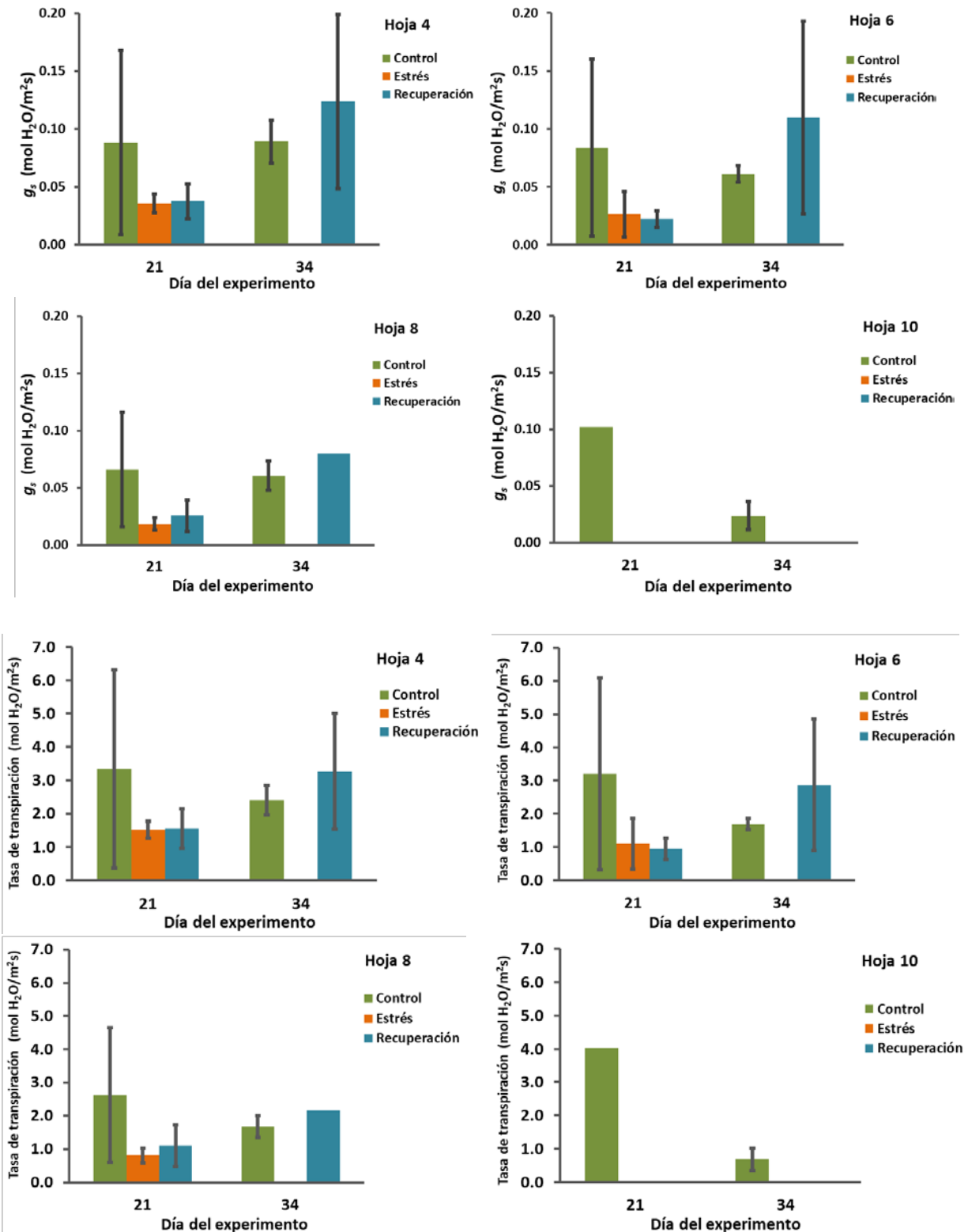


Figura 37A. Mediciones de fotosíntesis – procesos de intercambio de gases. g_s – conductancia estomática. El día 34 no se analizaron plantas estrés y las hojas 10 de algunas plantas control y recuperación ya se habían desprendido de la planta.

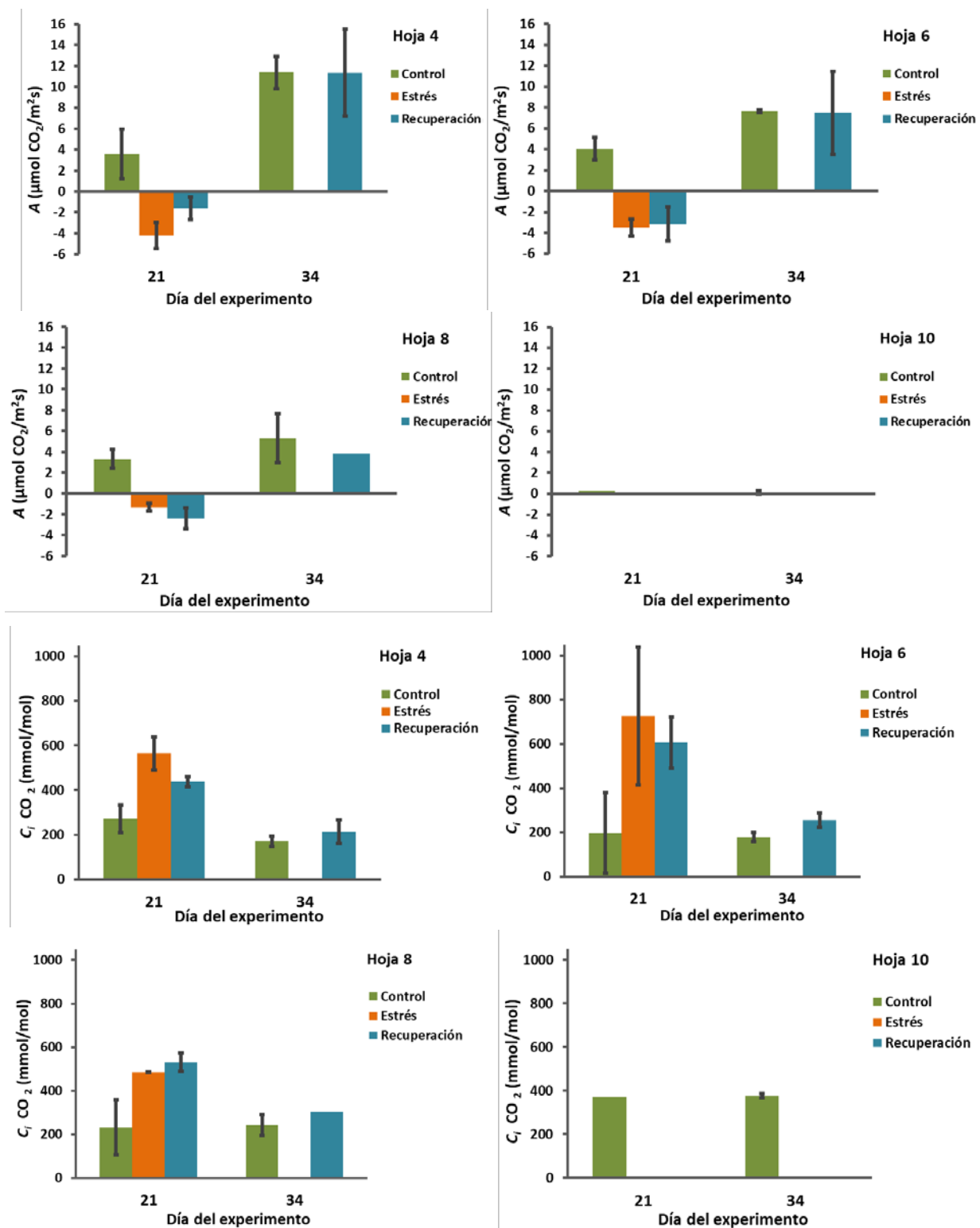
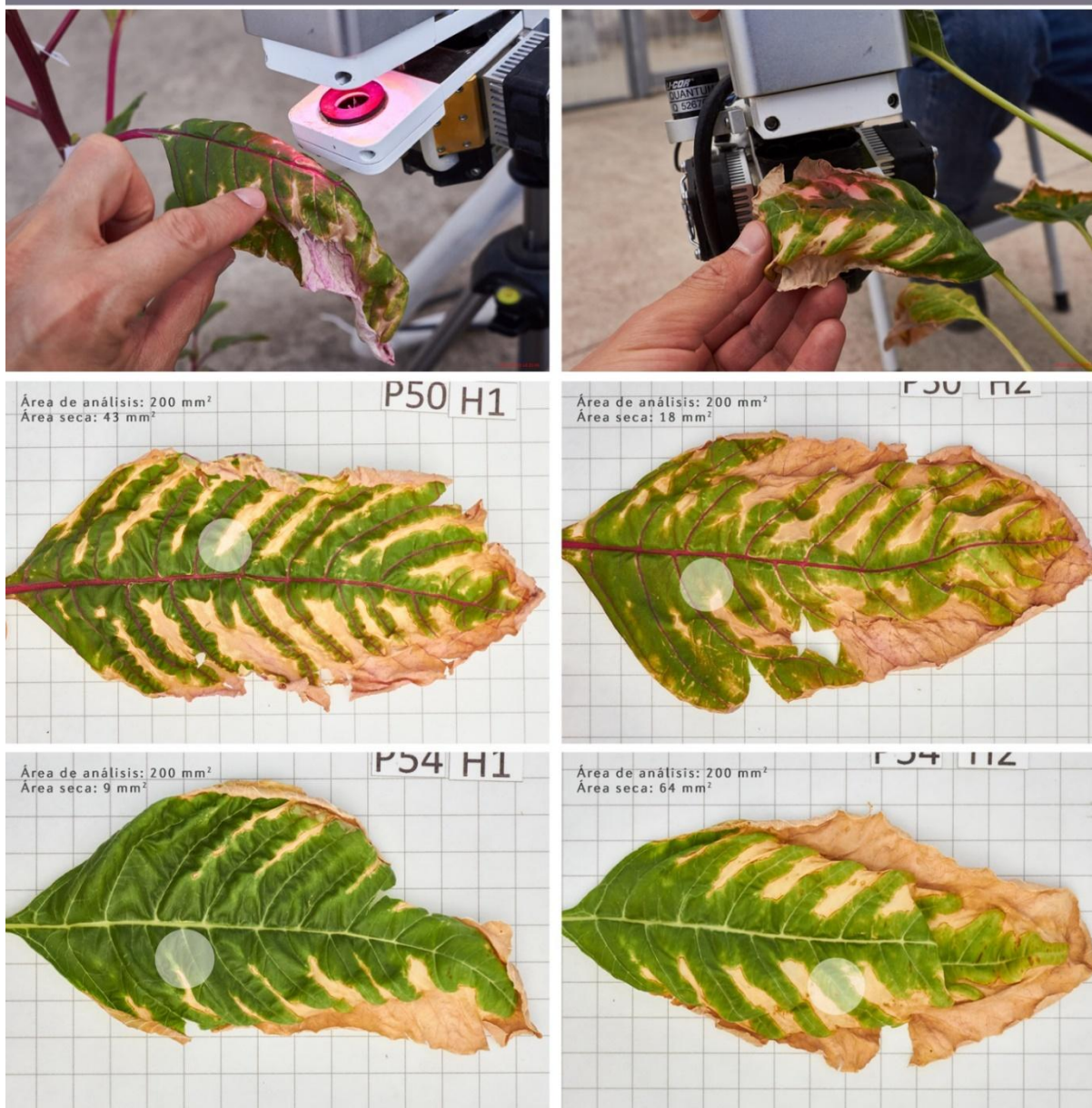


Figura 37B. Mediciones de fotosíntesis – procesos de intercambio de gases. A – Tasa de asimilación neta de CO₂. C_i – concentración intercelular de CO₂. El día 34 no se analizaron plantas estrés y las hojas 10 de algunas plantas control y recuperación ya se habían desprendido de la planta.

Por último, para una medida más dinámica del desempeño de la hoja en cuanto a la fijación de carbono se refiere, se emplean las curvas de respuesta a la asimilación de CO_2 . En este análisis, la hoja se introduce a la cámara y se genera artificialmente una concentración variable de CO_2 que va desde los 0 hasta alrededor de 800 ppm en diferentes intervalos, y se mide la tasa de asimilación neta de CO_2 en cada punto (Figura 38A). Una hoja C_4 sana tendrá la capacidad de asimilar más CO_2 conforme más haya disponible, generando una curva asintótica típica de las plantas C_4 . Debido a que las hojas recuperación se recuperaron parcialmente, y que esta medida es una función del área, se midió el área viva y muerta de las hojas analizadas para obtener un factor de corrección que extrapolara el resultado considerando un área de análisis completamente viva (Figura 38A). Esto no fue necesario en el grupo control, ya que toda el área de sus hojas se encontraba viva. Para el día 34 (13 días después de la reanudación del riego), las hojas 4 recuperadas mostraron, en general, curvas de asimilación superiores al grupo control. Sin embargo, las hojas 6 recuperadas mostraron, en general, curvas de asimilación inferiores y más variables que el grupo control (Figura 38B).

AJUSTE DE MEDICIONES POR ZONAS MUERTAS



Ajuste por área viva/muerta				
Planta	H1		H2	
	Área seca	Factor de ajuste	Área seca	Factor de ajuste
P50	43	1.27	18	1.10
P54	9	1.05	64	1.47
P59	0	1.00	0	1.00

Figura 38A. Mediciones de fotosíntesis – curvas de respuesta a la asimilación de CO₂. La medición de las curvas se realiza con base en un área de 2 cm². La medición se realiza en la mitad de la hoja, sobre la lámina evitando en la medida de lo posible las venas medias y primarias. En las hojas recuperación esta zona incluía parte de tejido muerto, por lo que se calculó el área viva vs muerta para calcular un factor de ajuste, por el cual se multiplicaron los resultados obtenidos por el equipo.

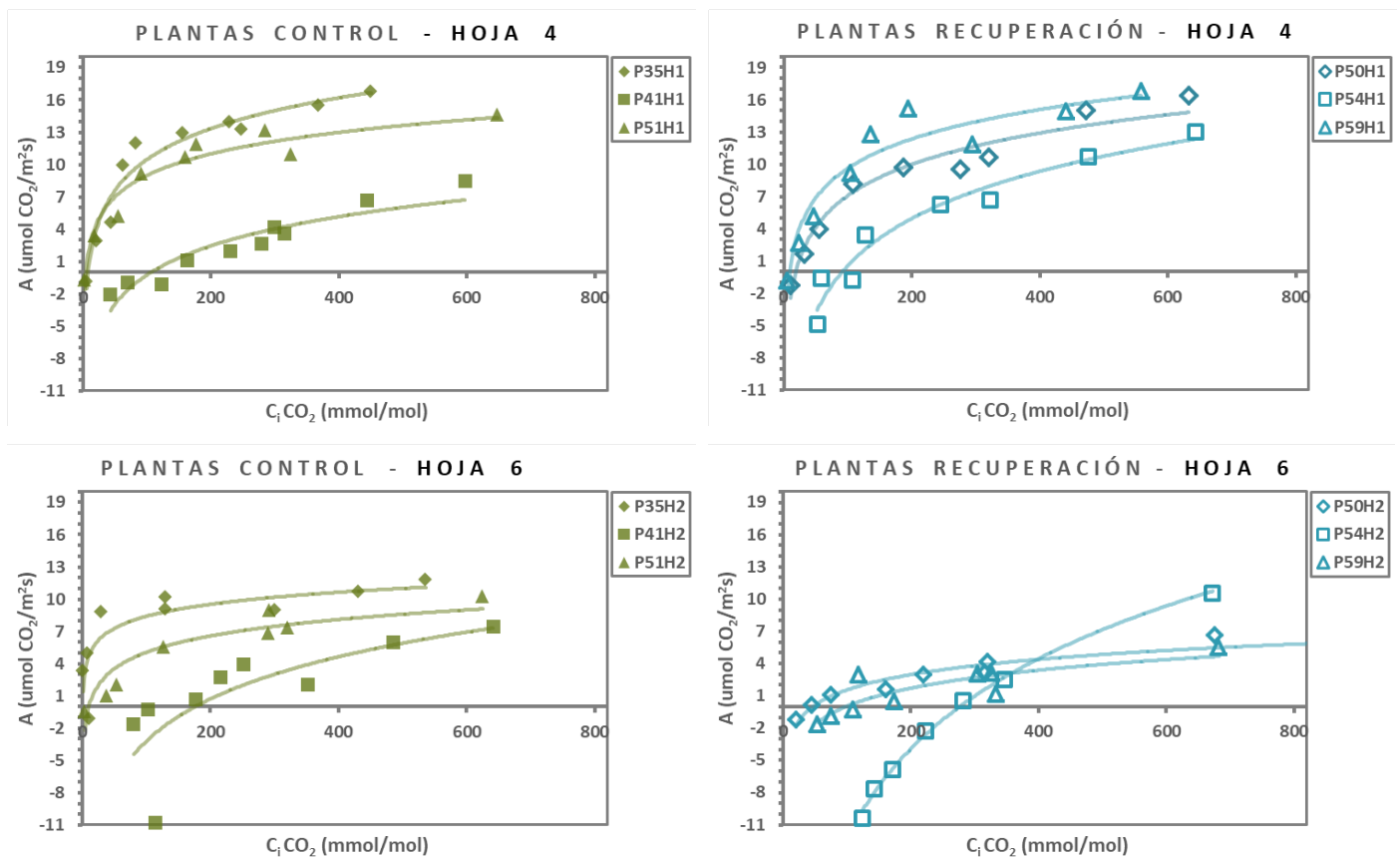


Figura 38B. Mediciones de fotosíntesis – curvas de respuesta a la asimilación de CO₂. Estas mediciones se realizaron el día 34, 13 días después de la reanudación del riego en las plantas recuperación. Para las zonas de las hojas que sobrevivieron ya se encontraban en buen estado. En las gráficas se muestran por separado la curva de cada una de las tres plantas para las hojas 4 y 6. Las hojas 8 y 10 no sobrevivieron. La curva de asimilación de CO₂ mide la capacidad de la hoja de asimilar la mayor cantidad posible de CO₂ conforme se aumenta su concentración intercelular. Las hojas 4 tienen respuestas similares, aunque destacan las hojas recuperadas del estrés hídrico severo. En cuanto a las hojas 6, el comportamiento de las hojas recuperadas es errático e inferior al de las hojas del grupo control.

9.7. Origen del idioblasto cristalero

La planta de amaranto acumula cristales desde etapas embrionarias. Una plántula de 10 días se satura de cristales en todos sus órganos: tallo, cotiledones, primordios foliares y hojas verdaderas en formación (Figura 39 a,b). El primordio foliar acumula una gran cantidad de cristales en lo que será una vena media, en algunos pocos en lo que será la lámina de la hoja. La hoja verdadera en formación comienza a acumular cristales de un gradiente ascendente de acumulación, que avanza en diagonal desde la base de la hoja hasta el ápice (Figura 39c). Los cristales que se acumulan en la lámina son drusas, y en la vena media cristales de arena. Las drusas se ubican en la posición observada en el capítulo anterior en hojas maduras, justo en la mitad del espesor de la hoja, entre las venas terciarias (Figura 39d). Una vez que la hoja verdadera ha madurado y se ha expandido por completo, se encuentra saturada de cristales en toda su extensión, distribuidos de forma homogénea (Figura 40).

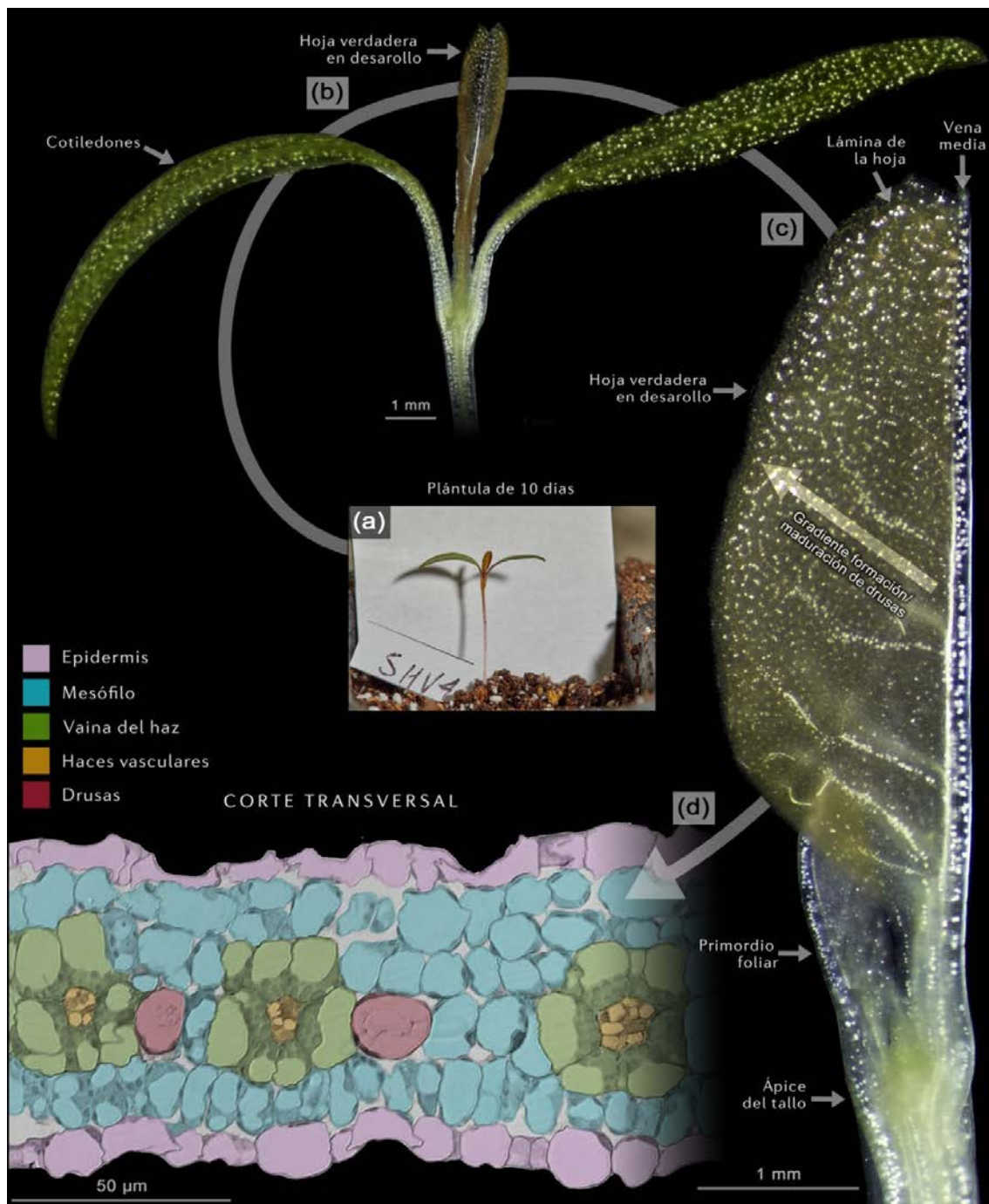


Figura 39. Acumulación de cristales de CaOx en etapas embrionarias de la hoja. (a) plántula de *A. cruentus* de 10 días de edad. (b) Microscopía de polarización de la misma plántula. Tanto cotiledones como la primera hoja verdadera en formación están saturados de cristales. (c) magnificación de ápice de la plántula. La hoja verdadera y el primordio foliar cuentan ya con una gran cantidad de cristales, y estos se acumulan den un gradiente de concentración que se dirige de la base de la vena media hacia los bordes. (d) Corte histológico transversal de la hoja verdadera. La acumulación de drusas sigue el patrón observado en el capítulo anterior: justo en la mitad del grosor dela hoja entre las células del mesófilo. Los cloroplastos de las CVH y del mesófilo se observan aún inmaduros, pero ya en su posición centrípeta y en los bordes de la célula respectivamente.



Figura 40. Acumulación de cristales de CaOx en una hoja madura. Microscopía de polarización de una hoja madura aclarada. Los cristales de CaOx brillan como puntos blancos en la lámina y venas. Como se predecía desde su formación, la hoja madura está saturada por completo de cristales de CaOx, desde su base hasta su ápice.

9.8. Efecto del estrés hídrico y la senescencia en la acumulación de cristales de CaOx

Todas las hojas mostraron siempre una gran acumulación de cristales, y no se observó una disminución de estos en ningún caso. Por el contrario, se observó una tendencia a incrementar el contenido de cristales en función del número de hoja y día de muestreo. Dos variables de tiempo, que, al transcurrir más, se acumularon más cristales (Figuras 41A-D). Así mismo, el estrés hídrico propició una mayor acumulación de cristales respecto al control en el mismo tiempo y número de hoja. Particularmente el triplicado de hojas número 10 de las plantas estrés, en el día 13, mostraron una acumulación exacerbada de cristales, en la que no existían espacios entre ellos como en el resto de las hojas, y que pareciera estar incluso fuera de control de la planta (Figura 41D). A esta acumulación le denominamos “aberrante”.

En una observación ampliada, es notorio que efectivamente con el tiempo la cantidad de drusas aumentó, y aparecieron drusas más pequeñas (10 a 20 μm) que las estándar (50 μm). Estas drusas pequeñas aparecieron en la misma ubicación que las estándar: entre las venas terciarias, justo a la mitad del espesor de la hoja (Figura 42). El estrés hídrico genera el mismo fenómeno en las hojas (Figura 43). Las drusas con las que contaban las hojas al inicio del experimento (día 13) les denominamos “drusas tempranas”, mientras que a las que se formaron para el día 36 de menor tamaño, les denominamos “drusas tardías”.

Las drusas tardías se encontraron bien distribuidas entre las células del mesófilo, y de hecho, estas células serían sus generadoras. En contraparte, la acumulación aberrante ocurrida en las hojas 10 el día 13, tiene un aspecto de ser el resultado de una precipitación rápida, fuera de todo control celular (Figura 44). Algo muy interesante fue que este fenómeno se observó en las tres muestras de hoja 10 del día 13, pero en los días subsecuentes no se observó, o muy poco. Es decir, estos resultados sugieren que la planta estaría revirtiendo esta precipitación aberrante unos días después, a pesar de estar en estrés hídrico. Sin embargo, como se trata de muestras de plantas diferentes, no se tiene la certeza de que así sea. Pero, insistimos, en que llama la atención poderosamente que este comportamiento se repita en los triplicados (Figura 41D).

Por último, la recuperación parcial en las hojas rehidratadas generó tres zonas histológica y seguramente metabólicamente diferentes: zona recuperada, zona en recuperación o muerta y zona de transición. La zona recuperada es aquella que recuperó su color y turgencia. La zona en recuperación es aquella que podría estar en proceso de recuperación celular (muestras del día 21) o que no se recuperó y murió (muestras del día 36). Finalmente, la zona de transición es la que une estas dos zonas descritas. No se observó una diferencia en la acumulación de cristales en estas zonas (Figura 45). Estas muestras son literalmente, el umbral entre la vida y la muerte.



Figura 41A. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 4. Microscopías de polarización de hojas en etanol 30%. En las hojas recuperación se muestra el área de transición entre la zona que se recuperó y la que está en proceso de o no lo logró.

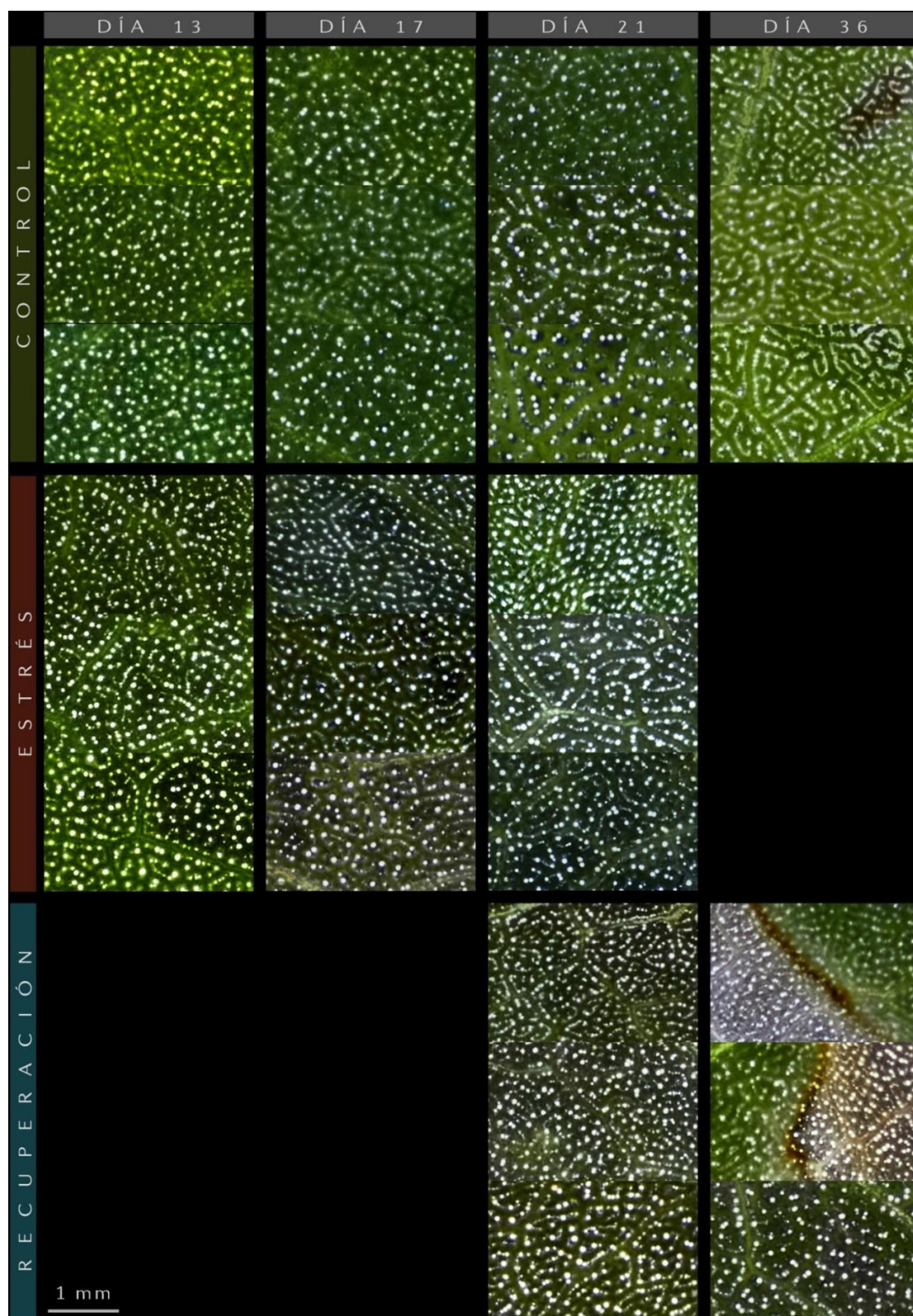


Figura 41B. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 6. Microscopías de polarización de hojas en etanol 30%. En las hojas recuperación se muestra el área de transición entre la zona que se recuperó y la que está en proceso de o no lo logró. Nótese que se presentan los triplicados de cada hoja por columna.

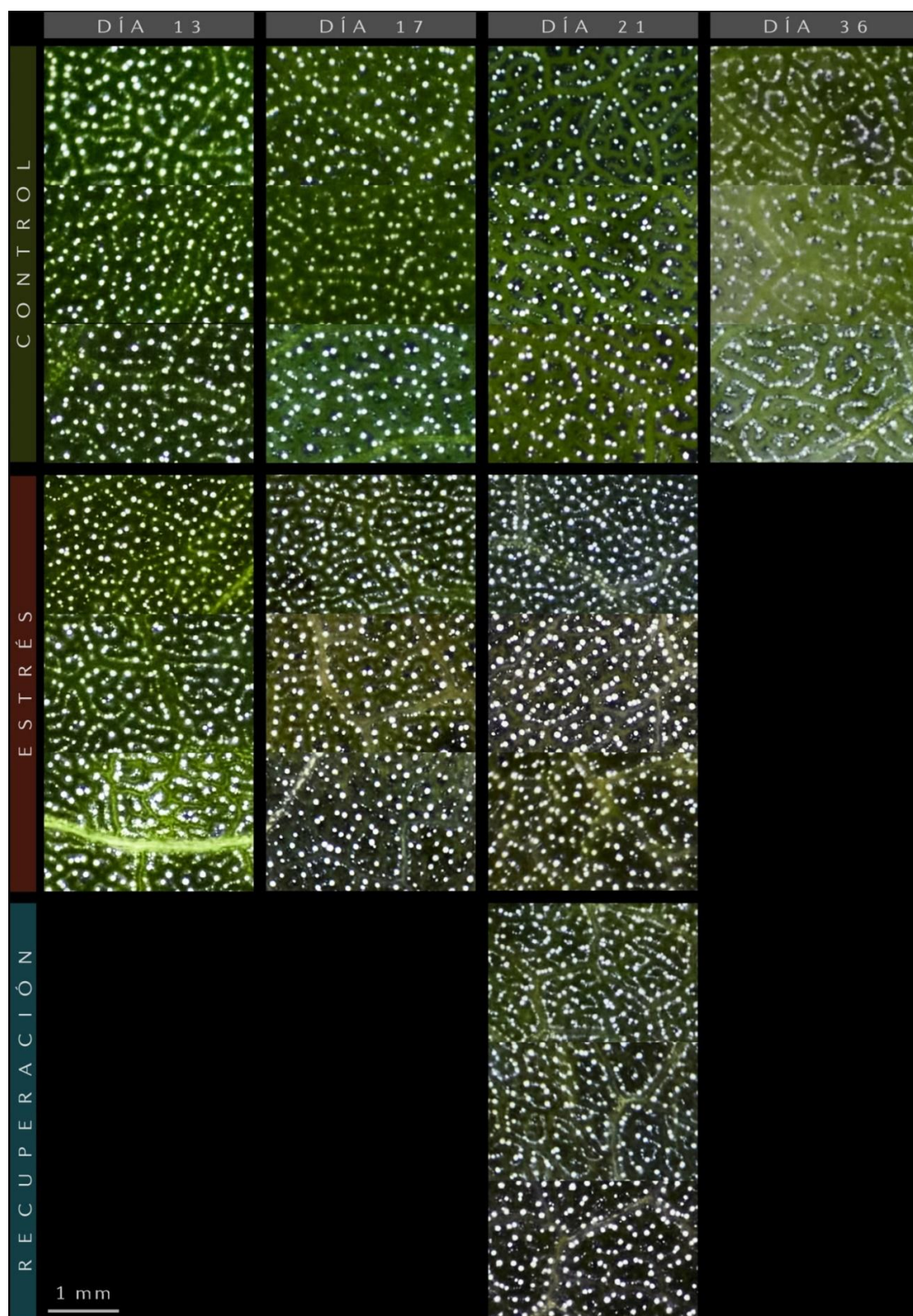


Figura 41C. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 8. Microscopías de polarización de hojas en etanol 30%. En las hojas recuperación se muestra el área de transición entre la zona que se recuperó y la que está en proceso de o no lo logró. Nótese que se presentan los triplicados de cada hoja por columna.

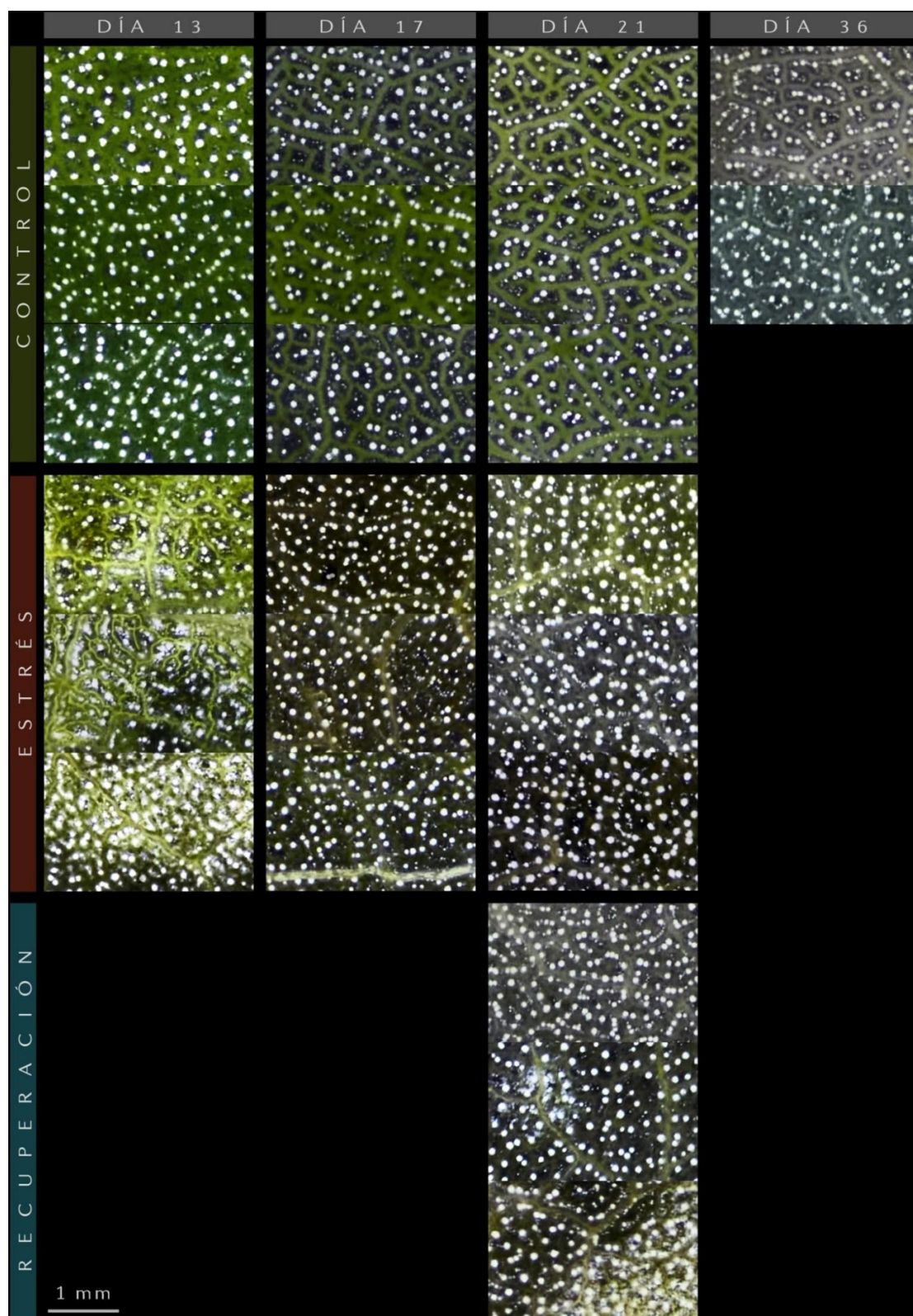


Figura 41D. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx – Hoja 10. Microscopías de polarización de hojas en etanol 30%. En las hojas recuperación se muestra el área de transición entre la zona que se recuperó y la que está en proceso de o no lo logró. Nótese que se presentan los triplicados de cada hoja por columna.

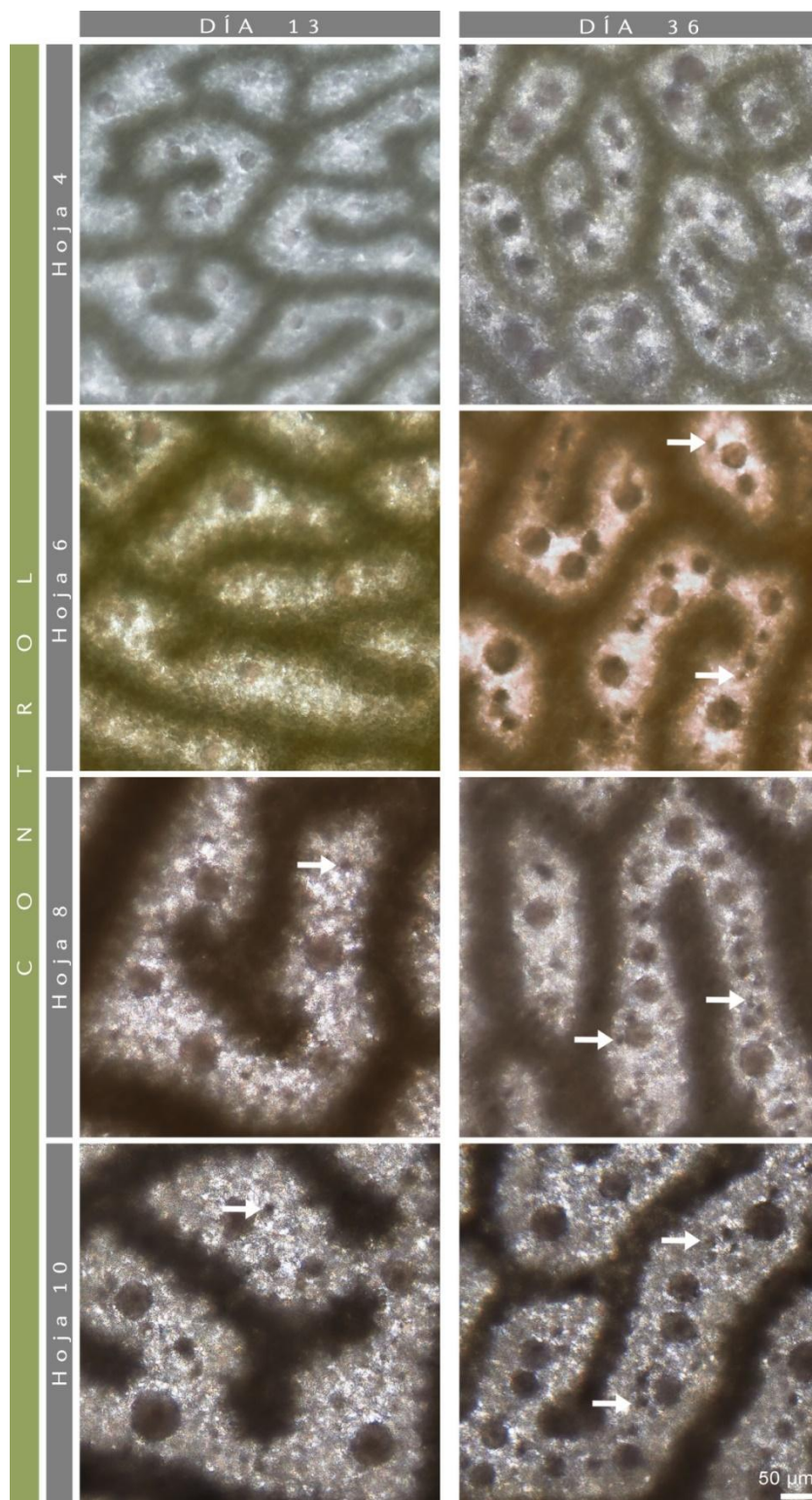


Figura 42. Efecto de la senescencia en la acumulación de cristales de CaOx. Microscopías de campo claro de hojas en etanol al 30%. La hoja madura tiene un alto contenido en drusas con un tamaño promedio de 50 μm . Sin embargo, conforme la hoja envejece aparecen nuevas drusas de un menor tamaño (alrededor de 10 a 20 μm , marcadas con flechas). Nótese que por cada día se presentan las hojas cuarta, sexta, octava y décima por columna en lugar de los triplicados.

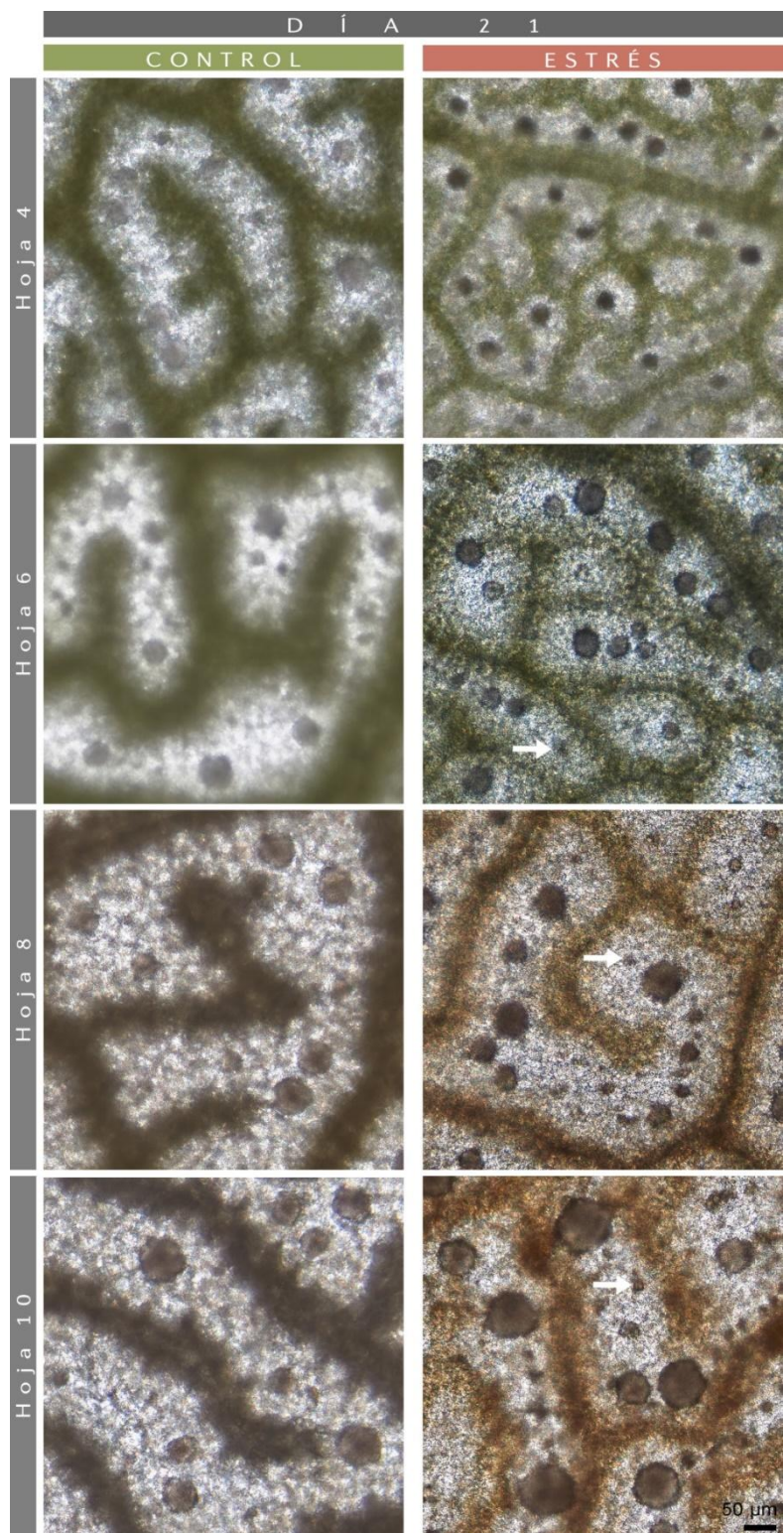


Figura 43. Efecto del estrés hídrico en la acumulación de cristales de CaOx. Microscopías de campo claro de hojas en etanol al 30%. El estrés hídrico tiene un efecto similar a la senescencia en cuanto a la acumulación de cristales de CaOx. Aparecen nuevos cristales y de menor tamaño. Nótese que por cada condición se presentan las hojas cuarta, sexta, octava y décima por columna en lugar de los triplicados.

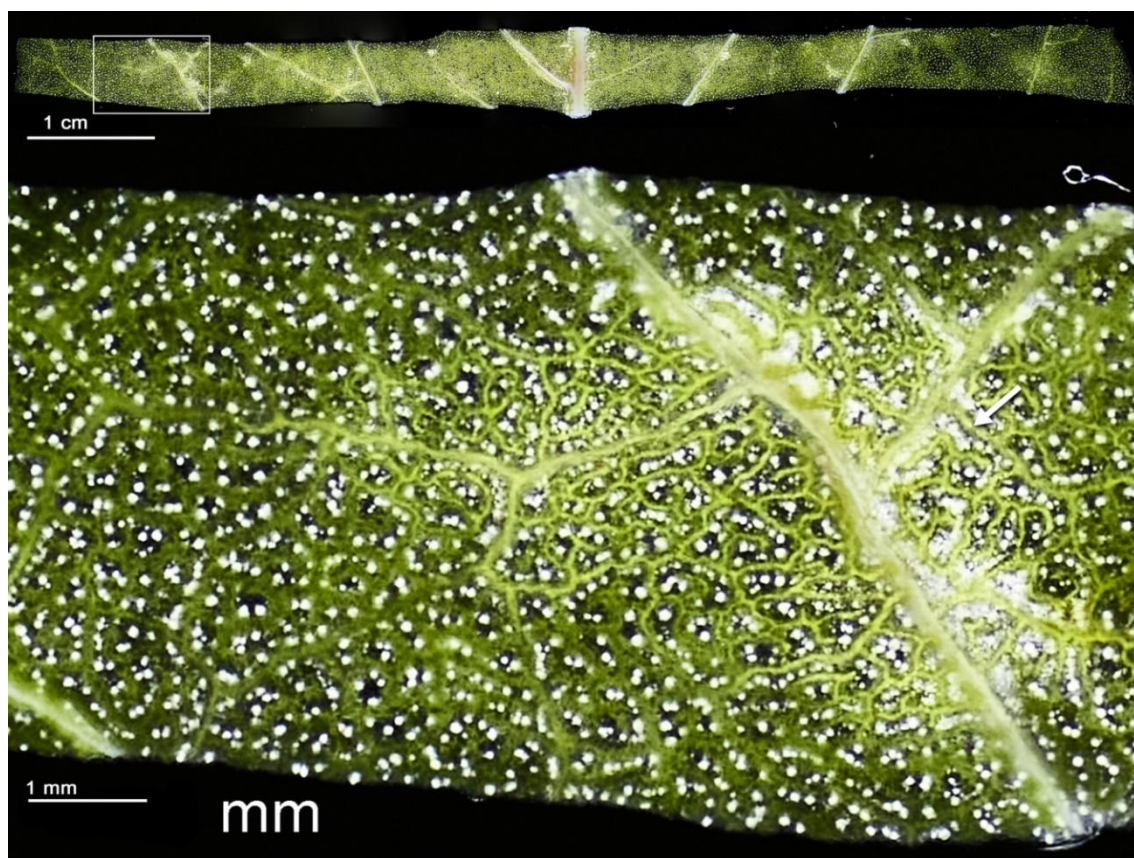


Figura 44. Acumulación aberrante de cristales a causa del estrés hídrico. Microscopía de polarización de hoja en etanol 30%. Las tres hojas número 10 muestreadas el día 13 en el grupo estrés mostraron una gran acumulación de cristales particularmente alrededor de las venas. Este comportamiento se observó solamente en las hojas 10 del día 13 y 21, siendo varias veces más acentuado el día 13.

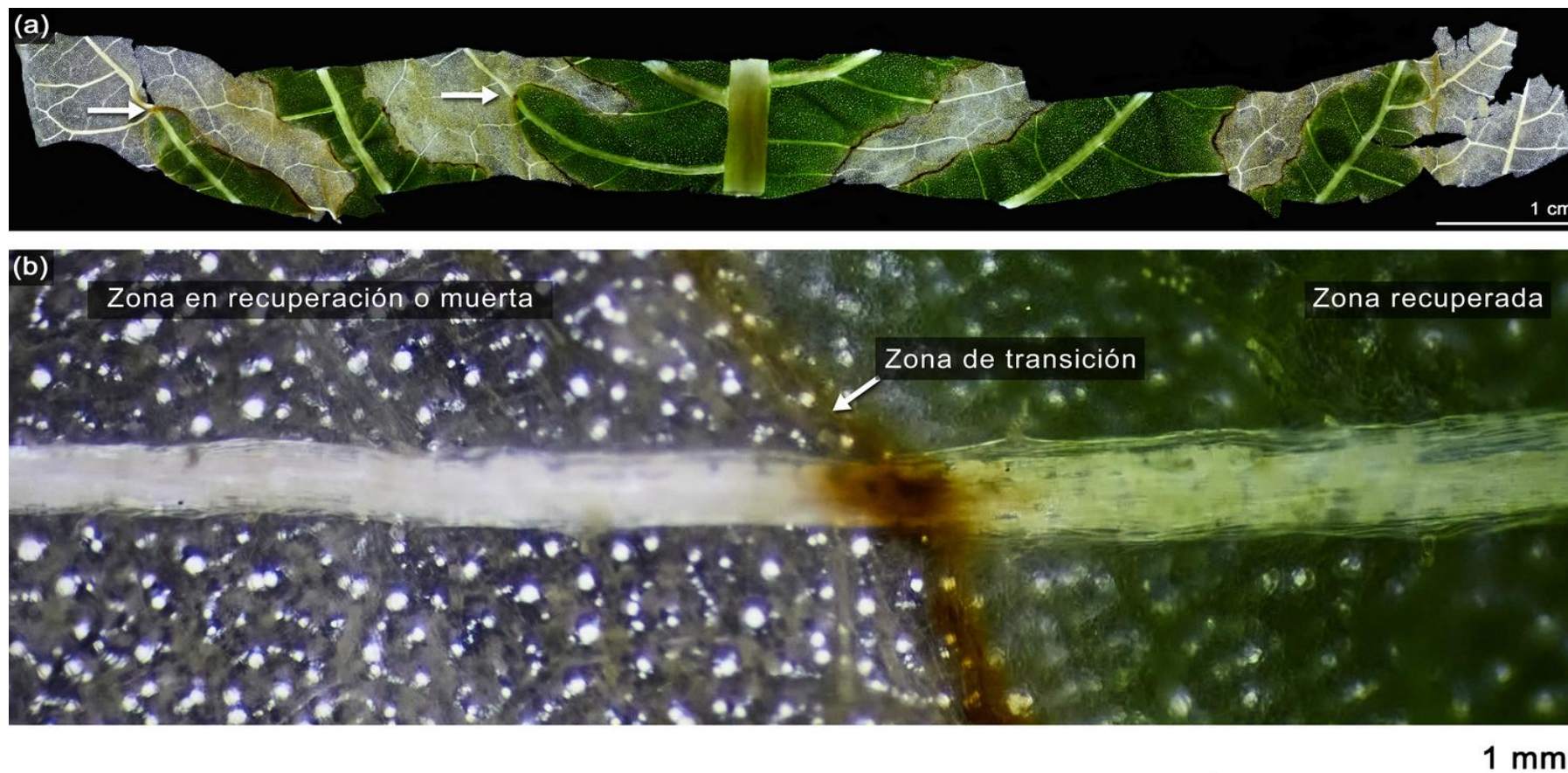


Figura 45. Efecto de la recuperación del estrés hídrico en los cristales de CaOx. (a) Microscopía de polarización de la cuarta hoja de una planta recuperación en el día 36. (b) Ampliación de (a). A nivel de hoja, a recuperación también mostró una dirección de la vena media hacia los bordes de la hoja (flechas en A). La recuperación parcial de la hoja dejó zonas recuperadas y zonas en recuperación (día 21) o muertas (día 36). En medio de estas zonas hay una zona de transición que mostró un color marrón. En la zona muerta se observa una sobreacumulación de cristales mientras que en la zona recuperada al parecer hay menos.

9.9 Efecto del estrés hídrico y la senescencia en la solubilidad de los cristales de CaOx

Las micrografías de cristales del numeral anterior (7.8) fueron hechas en muestras conservadas en etanol 30%. Sin embargo, en estas muestras, particularmente en las hojas 4, el contenido celular de las capas superiores impide ver nítidamente los cristales. Es importante tener micrografías nítidas de los cristales para hacer estimaciones de la distribución de sus tamaños. Por ello las muestras fueron sometidas a un proceso de aclarado óptico basado en el método de (Warner et al., 2014). Este método consiste en tratar los tejidos por 8 h en una solución de KOH al 10% (m/v), seguido de un tratamiento en solución de aclarado (Urea 6M, glicerol 30%, Tritón X-100 0.1%) por un lapso de al menos 48 h hasta varios días. El autor del método comenta que estos tiempos se pueden ajustar en función de la muestra; nosotros identificamos como condiciones óptimas 21 h en KOH y 19 días en solución de aclarado. Sin embargo, al someter las muestras del experimento al proceso se atravesó un problema derivado de la pandemia por COVID-19 y las muestras permanecieron 39 días en solución de aclarado.

Tras el proceso de aclarado observamos que en algunas hojas los cristales se habían disuelto, en otras no y en otras de forma parcial. Al ordenar las micrografías, observamos una correlación entre el grado de disolución y la edad y número de hoja (factor tiempo). En el día 13 por ejemplo, los cristales de las hojas más jóvenes control (4, 6 y 8) se disolvieron mientras que los de la hoja 10 no. Así mismo, los cristales de la hoja 4 del día 13 se disolvieron, mientras que los de la misma hoja el día 36 no. Esto se repite en diferentes gradientes en las hojas restantes del grupo control. Es decir, los cristales disminuyen su solubilidad conforme las hojas envejecen (Figura 46 y 47). Por otro lado, el estrés hídrico aceleró el proceso de insolubilización en las hojas 6, 8 y 10. Finalmente, las hojas recuperación 4 y 6 al día 36, tenían cristales aún solubles, como la hoja control en el día 13 o 17. Es decir, la solubilidad de los cristales de las plantas recuperación, se mantuvo igual que en el día que comenzó el estrés; un patrón que observamos en resultados previo como el color de la hoja y, probablemente la asimilación neta de CO₂ (Figura 35B, 38B, 46 y 47).

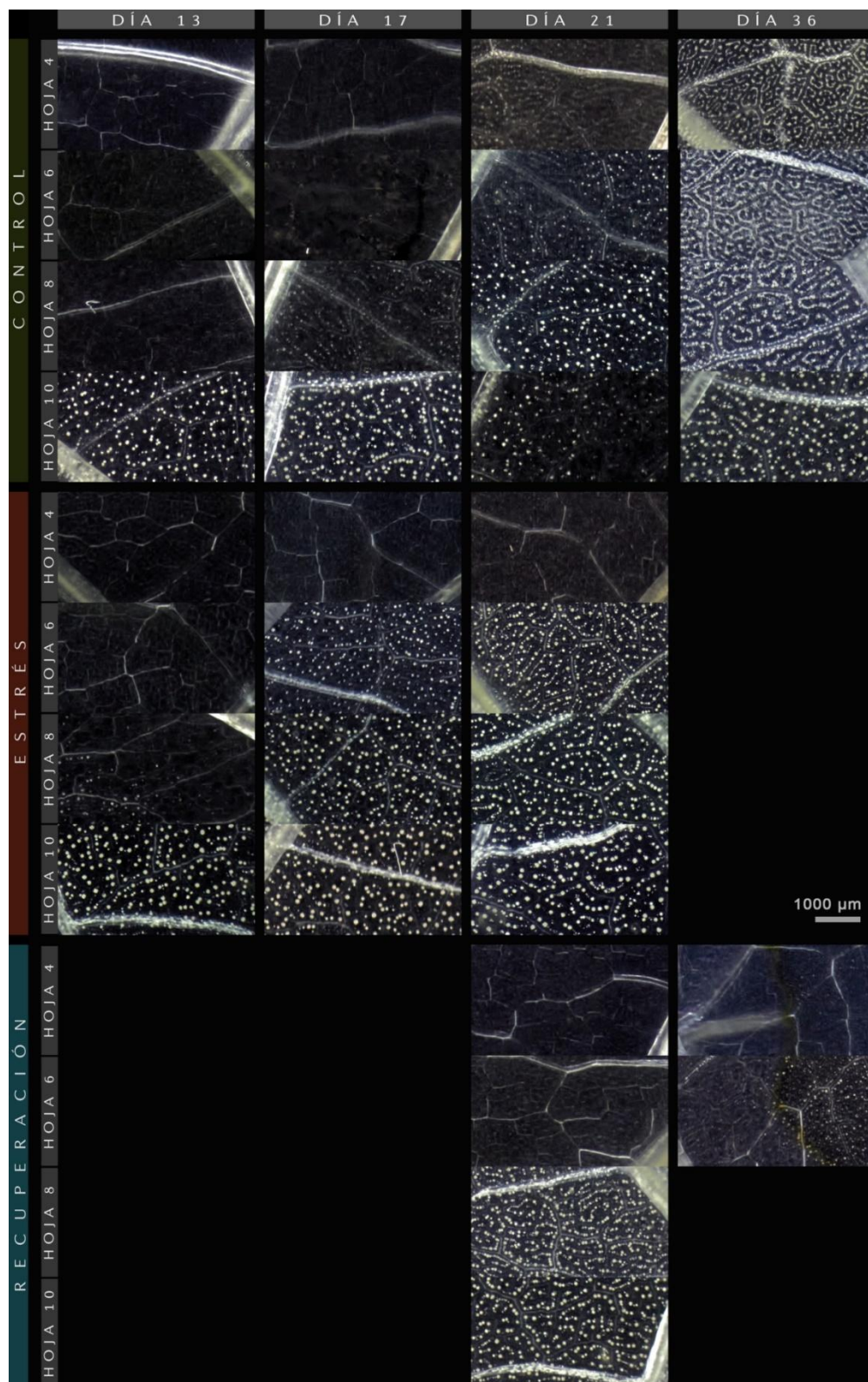


Figura 46. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la solubilidad de los cristales de CaOx – microscopía de polarización. Microscopía de polarización de hojas sometidas a un proceso intensivo de aclarado. Los cristales se disolvieron durante el proceso de forma diferencial, siendo más solubles los cristales de hojas jóvenes y más insolubles los de hojas viejas. Nótese que por cada día y condición se presentan las hojas cuarta, sexta, octava y décima por columna en lugar de los triplicados.

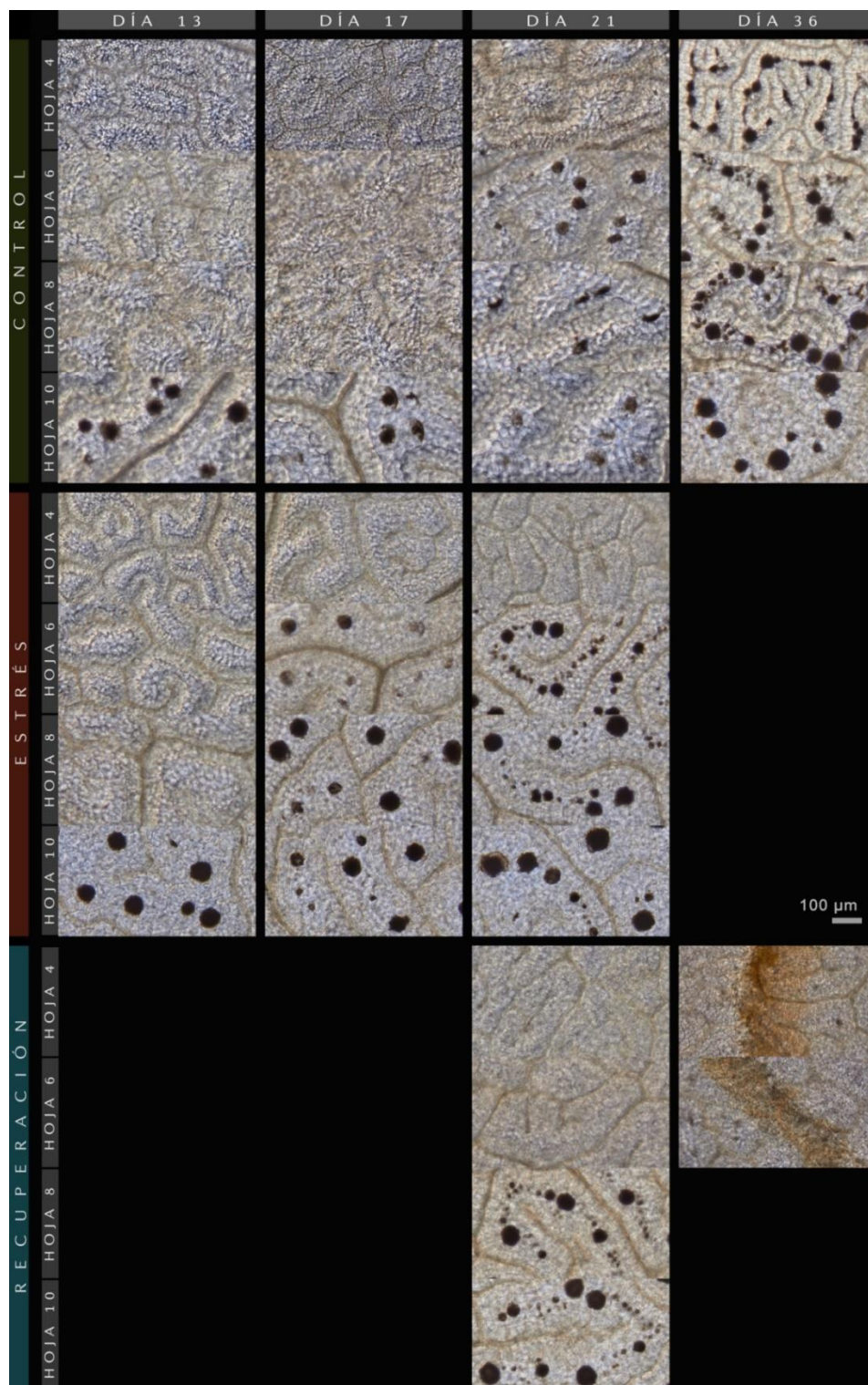


Figura 47. Efecto de la senescencia y estrés hídrico en la solubilidad de los cristales de CaOx. – Microscopía de campo claro. Microscopía de campo claro de hojas sometidas a un proceso intensivo de aclarado. Estas imágenes muestran un mayor detalle de lo que ocurrió tras el proceso de aclarado, en el que los cristales se disolvieron de forma gradual en función de la edad de la planta y número de hoja. Nótese que por cada día y condición se presentan las hojas cuarta, sexta, octava y décima por columna en lugar de los triplicados.

9.10 Efecto del estrés hídrico y recuperación en la histología y acumulación de *Rbcl* y *OxO* en la hoja

El estrés hídrico ocasionó a nivel celular una pérdida de turgencia, degradación de almidón y degradación del contenido celular de las CVH y CM. En estrés hídrico severo, el contenido celular de las CVH y CM se retrajo y posicionó al centro de las células (probablemente una plasmólisis). Así mismo, las CM, particularmente la última capa del mesófilo en esponjoso, tiende a aumentar el grosor de su pared celular (Figura 48). La degradación del contenido celular se revirtió gradualmente cuando la célula fue rehidratada (Figura 49a), sin embargo, hay un umbral en el que la célula ya no fue capaz de recuperar su turgencia y eventualmente murió (Figura 49b).

Por otro lado, en condiciones normales la *Rbcl* estuvo presente en las CVH, CM e ICD como se había observado previamente. Sin embargo, en condiciones de estrés su presencia disminuyó en todas estas células (Figura 50). Una vez que la hoja fue rehidratada, *Rbcl* se acumuló nuevamente en las células mencionadas (Figura 51).

Finalmente, en condiciones normales la enzima oxalato oxidasa no estuvo significativamente presente en la hoja. Sin embargo, en estrés hídrico observamos su acumulación en CM esponjoso, CVH y algunas células de los haces vasculares (Figura 50). La acumulación de *OxO* en estas células se intensificó cuando las mismas fueron rehidratadas (Figura 51). Particularmente, observamos que *OxO* se acumuló en la zona más centripeta del contenido celular plasmolizado de las CVH (zona en recuperación), y una vez recuperada la arquitectura celular (zona recuperada) su presencia disminuyó significativamente (Figura 52). No observamos un patrón de acumulación específica de *OxO* con los cristales de CaOx.

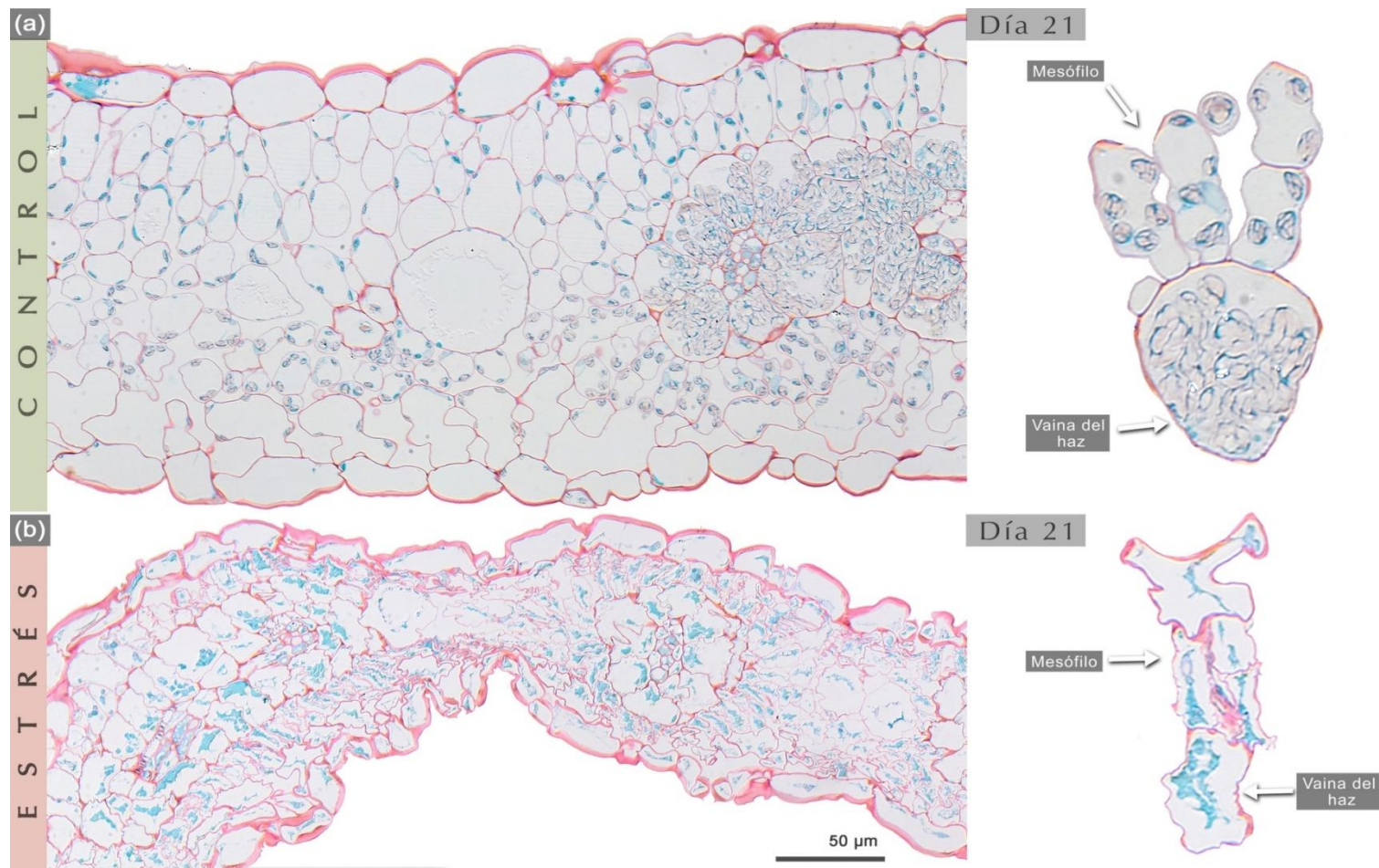


Figura 48. Efecto del estrés hídrico en la histología de la hoja. Microscopía DIC de la cuarta hoja verdadera en el día 21 de una planta control (a) y estrés (b). Los cortes (izquierda) se encuentran en la misma escala. A la derecha se han aislado de forma digital un conjunto formado por una CVH y varias CM para apreciar los cambios a nivel celular con mayor detalle.

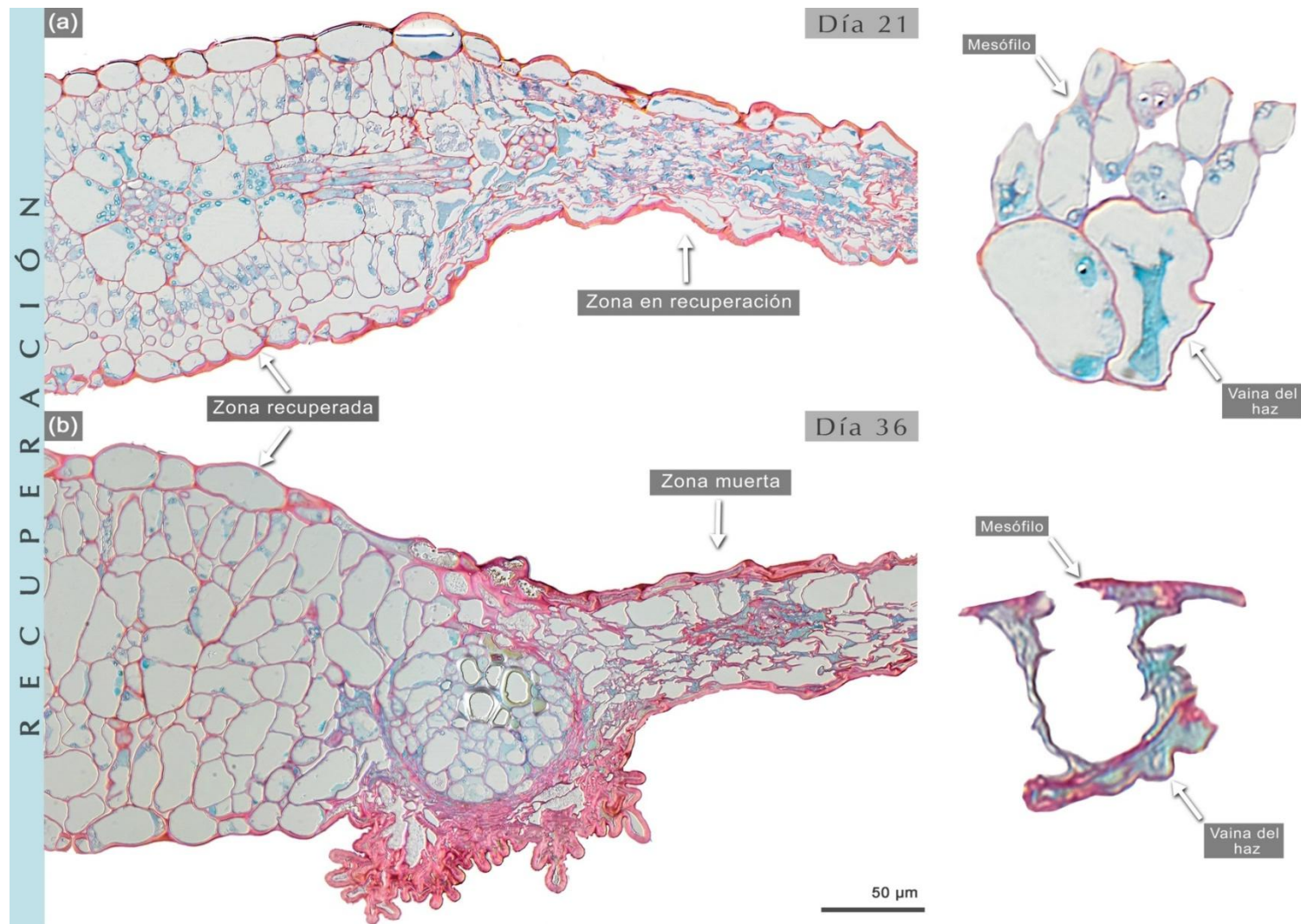


Figura 49. Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la histología de la hoja. Microscopía DIC de la cuarta hoja verdadera de un par de plantas del grupo recuperación un día después de la reanudación del riego (a) y 16 días después (b). Los cortes (izquierda) se encuentran en la misma escala. A la derecha se han aislado de forma digital un conjunto formado por una CVH y varias CM para apreciar los cambios a nivel celular con mayor detalle.

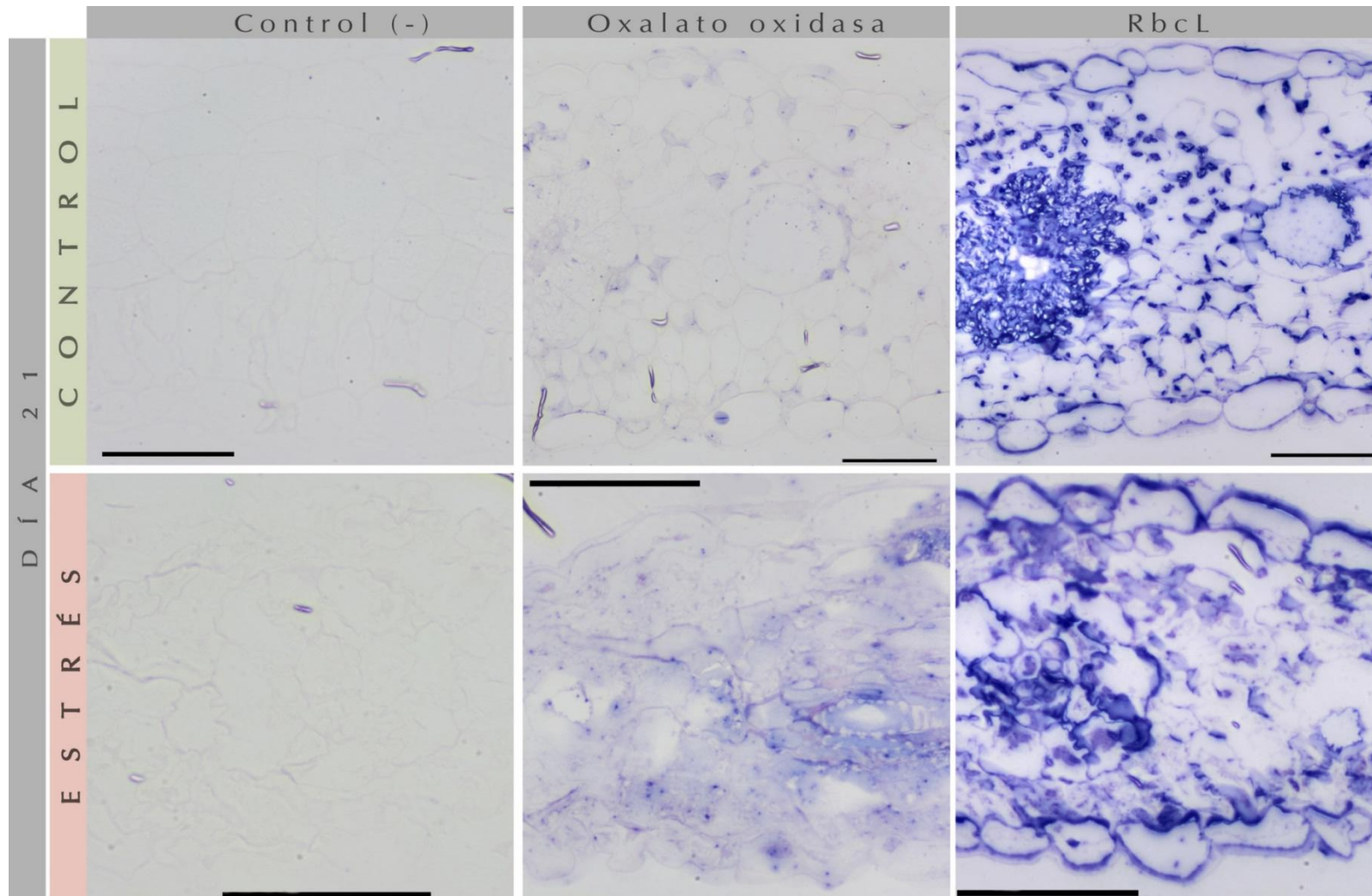


Figura 50. Efecto del estrés hídrico en la acumulación de *RbcL* y *OxO* en la hoja. Microscopía DIC de la cuarta hoja verdadera en el día 21 de una planta control y estrés tras análisis inmunohistoquímica. La oxalato oxidasa mostro una acumulación muy baja en la planta control, y una concentración un poco superior en la planta sometida a estrés. Este incremento en la acumulación se observó en CVH, CM esponjoso, ICA y haces vasculares. Por su lado, el análisis de *RbcL* generó mucha señal de fondo, pero en el control se puede discernir la presencia de esta proteína en prácticamente todos los cloroplastos de CVH, CM y alrededor de las drusas. Por otro lado, en la hoja sometida a estrés se observó una disminución en su acumulación, llegando al umbral de la señal de fondo. Barra de escala: 50µm.

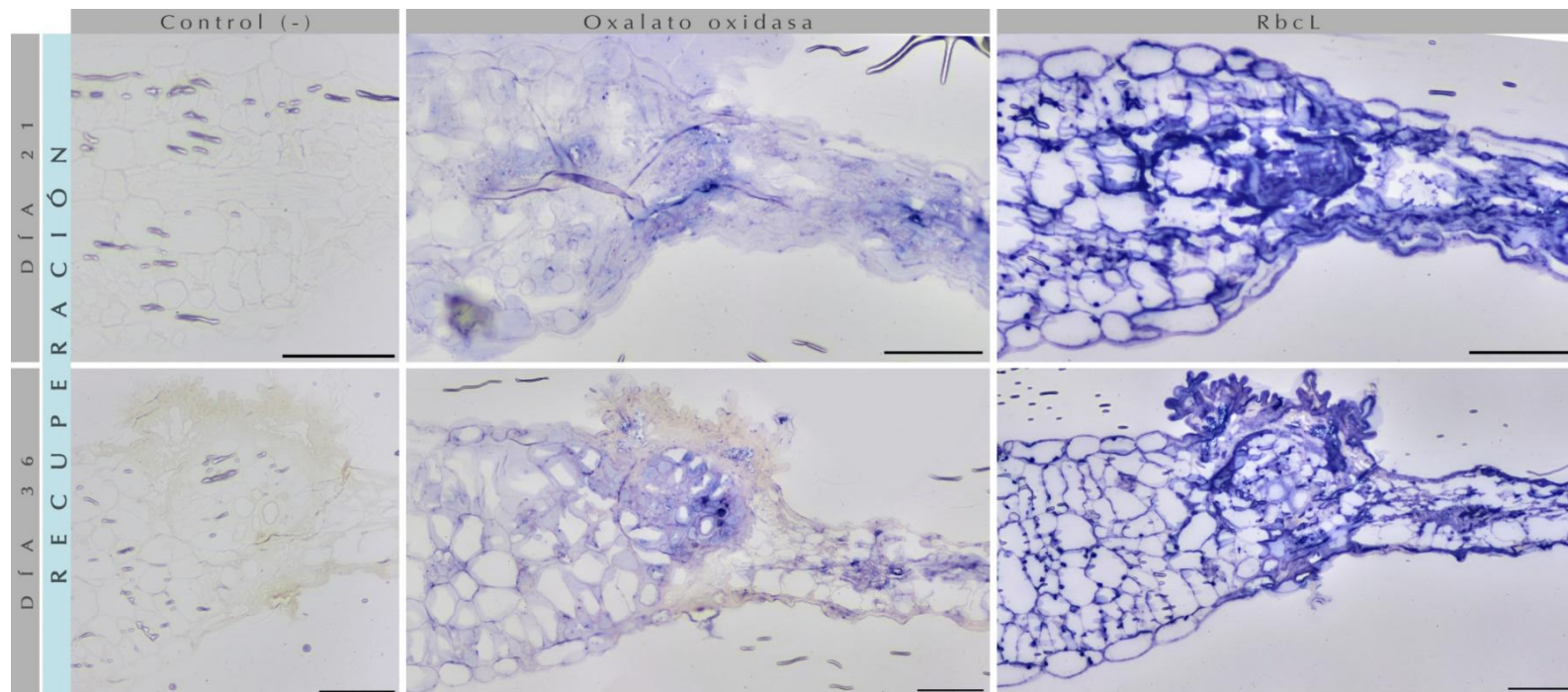


Figura 51. Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la acumulación de *RbcL* y *Oxo* de la hoja. Microscopía DIC de la cuarta hoja verdadera de un par de plantas del grupo recuperación un día después de la reanudación del riego (días 21) y 16 días después (día 36). El lado izquierdo de los cortes corresponde a la zona recuperada y el derecho a la zona en recuperación (día 21) o muerta (día 36). Entre ellas dos se encuentra la zona de transición. La oxalato oxidasas mostró una acumulación baja en la zona recuperada y alta en la zona en recuperación o muerta y en la zona de transición. Por su lado, *RbcL* mostró una acumulación importante en todo el tejido. Barra de escala: 50 μ m.

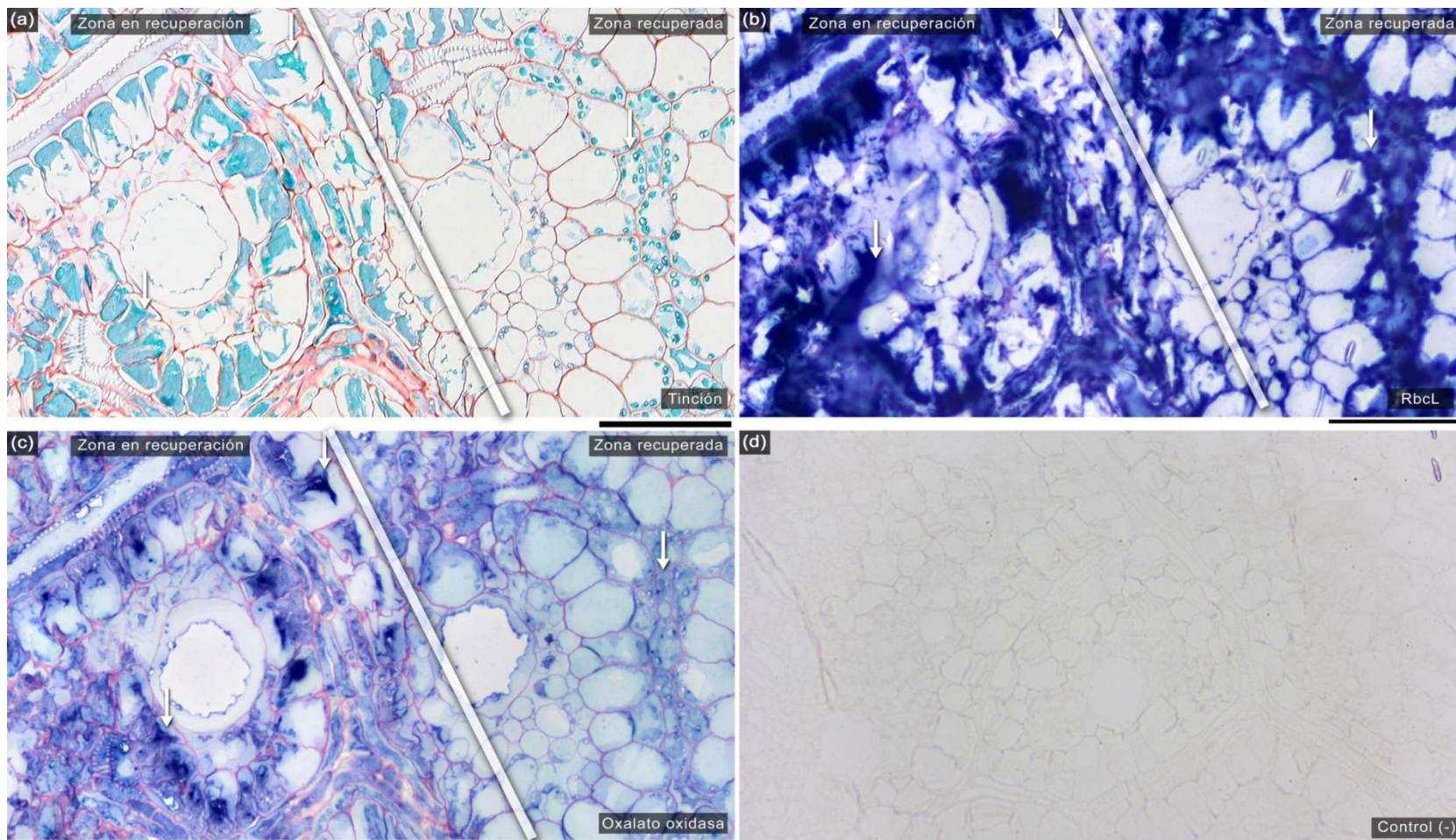


Figura 52. Efecto de la recuperación del estrés hídrico en la acumulación de *Oxo* y *RbcL* – vista paradermal. Microscopía DIC de la cuarta hoja verdadera de una planta recuperación un día después de haber reanudado el riego (día 21). Se muestra la misma zona de la hoja (excepto el control (-)) teñida y analizada por inmunohistoquímica. La línea blanca es la zona de transición que separa el tejido recuperado del que está en proceso de recuperación. Se confirma la amplia acumulación de *RbcL* en los cloroplastos de las CVH y CM. Así mismo se confirma que *Oxo* está presente sólo en las células que están en proceso de recuperación, y muy poco en las células que ya se han recuperado del estrés hídrico (flechas). Barra de escala: 50 μm .

9.11 Efecto de la acumulación aberrante de cristales en la histología de la hoja

En el fenómeno que describimos como acumulación aberrante, una gran cantidad de cristales se acumuló en la periferia de las venas primarias y secundarias (Figura 53a). Esta acumulación tiene un patrón muy desordenado en comparación de la acumulación normal de drusas. Al analizar un corte histológico de esta zona, observamos que a acumulación de cristales en estas zonas ocurrió en espacios extracelulares, algo que no observamos en condiciones normales (Figura 53b).

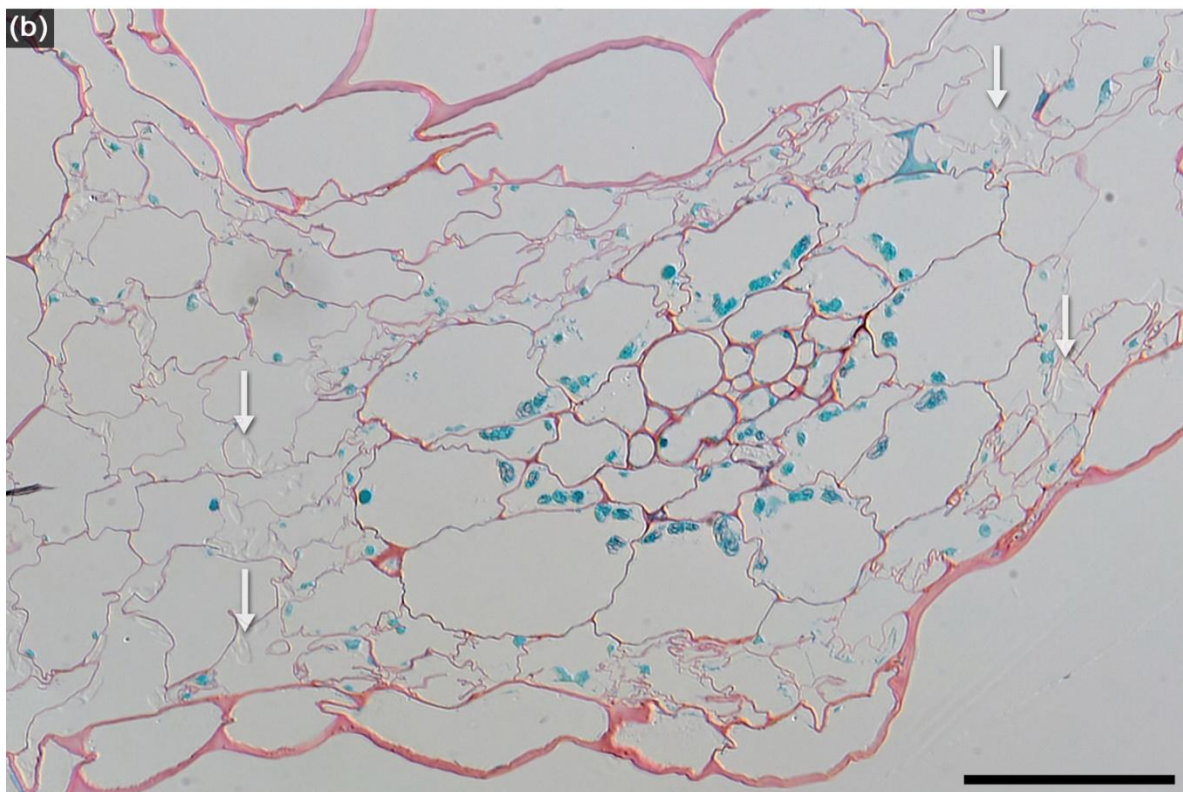
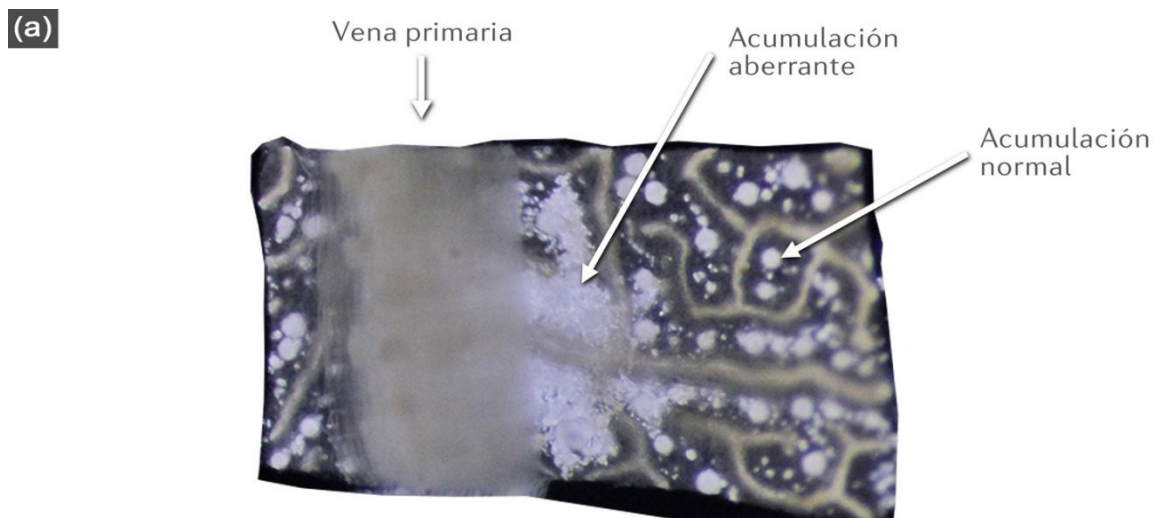


Figura 53. Efecto de la acumulación aberrante de cristales en la histología de la hoja. (a) Microscopía DIC de la décima hoja de una planta del grupo estrés en el día 13. (b) Corte histológico transversal de la zona de acumulación aberrante. Los lugares donde se acumulan los cristales se distinguen en el corte histológico por los huecos que dejan en la resina tras el proceso de tinción. Hasta el esta observación, habíamos observado la acumulación de cristales de forma intracelular, pero en la acumulación aberrante los cristales se depositan también de forma extracelular (flechas).

10. DISCUSIÓN

Amaranthus Cruentus mostró una gran capacidad para tolerar el estrés hídrico ligero y moderado, además de un estrés hídrico severo que la llevó literalmente al borde de la muerte (Figura 34A y 34B). La planta de amaranto tiene un rango de tolerancia al estrés hídrico muy amplio (Figura 29). En estudios previos incluidos los de nuestro grupo de investigación (Huerta-Ocampo, 2008), se ha considerado como estrés hídrico lo que en este estudio denominamos estrés hídrico ligero. Es decir, se ha explorado la respuesta fisiológica de la planta solamente en los comienzos de ese amplio rango de tolerancia.

En este trabajo, se obtuvieron muestras por triplicado de los días 13, 17, 21 y 36 de los 3 esquemas experimentales (Figura 27). Tras hacer el análisis histológico, una réplica de cada condición fue conservada a -80 °C para posteriores estudios de metabolómica, transcriptómica y proteómica. El futuro estudio de estas muestras dará una perspectiva novedosa de los cambios fisiológicos en la planta bajo los diferentes niveles de estrés hídrico que puede experimentar la planta antes de morir.

Por otro lado, el estudio preliminar de tolerancia al estrés hídrico se realizó con el objetivo de conocer de antemano hasta qué punto podríamos estresar a la planta sin que muriera. Por ello, el número de plantas (2) y edad (21 días) es diferente a las del experimento definitivo (n=3, edad 39 días). Debido a estas diferencias no podemos hacer conclusiones definitivas, pero vale la pena observar los resultados a fin de incentivar un estudio más amplio que corrobore las observaciones hechas. A saber: aunque solamente el estrés ligero generó significativamente menos semillas que el control, la tendencia de los resultados sugieren que en general cualquier nivel de estrés hídrico disminuye la producción de semilla alrededor de un 16 % vs el control (Figura 30). Este resultado es fisiológicamente y agropecuariamente relevante, ya que apunta a que, tras una sequía en campo, si la planta se encuentra en condiciones de recuperarse, la producción caería solo alrededor de un 16 %. Sin embargo, insistimos en que son resultados preliminares.

En los experimentos de estrés hídrico, se suele muestrear solamente la cuarta hoja verdadera tras un determinado tiempo de estrés. Siguiendo esta idea, si en nuestro diseño experimental sólo se hubiera muestreado la cuarta hoja verdadera totalmente expandida en cada día, esto habría hecho que los resultados no fueran comparables, ya que debido a que la planta control continúa creciendo, la hoja 4 del día 13 podría ser la hoja 6 del día 36, mientras la hoja 4 del día 13 de la planta en recuperación continúa siendo la hoja 4 al día 36 (Figura 31 y 32). Este enfoque nos permitió explorar lo que sucede en la misma hoja (de diferentes plantas claro está) a consecuencia del estrés hídrico y la inevitable senescencia.

La forma en que las plantas en recuperación se recuperaron, valga la redundancia, y la propia física (por el grosor de los tejidos), sugieren que tras la ausencia de agua primero se secan las hojas, después el ápice, peciolo, tallo y finalmente la raíz que se encuentra “protegida” por la tierra (Figura 34A y 34B). Mientras el tallo sobreviva, la planta es capaz de generar nuevos brotes, sin embargo, su productividad de semilla puede ser muy baja o incluso nula. Hay que recordar que las plantas recuperadas que se cosecharon para producción de semilla fueron las que mejor pudieron recuperarse. El patrón de desecación antes mencionado puede ser el origen de la recuperación parcial de las hojas, que da lugar a zonas vivas aledañas a zonas en recuperación o muertas (Figura 45).

Los procesos lumínicos de la fotosíntesis se recuperaron rápidamente tras la reanudación del riego de las plantas (Figura 36A y 36B), mientras que los procesos de intercambio de gases les tomaron más tiempo (Figura 37A y 37B). Esto se explica por la naturaleza de los procesos, mientras que en los lumínicos requieren “solamente” el restablecimiento de los fotosistemas. Los de intercambios de gases requieren procesos celulares más complejos como la recuperación de la turgencia y probablemente la arquitectura celular. Tanto la medición de los procesos lumínicos como de intercambio de gases evidenciaron el estrés severo que sufrieron las plantas del grupo estrés, y la formidable recuperación de las plantas del grupo recuperación a niveles muy similares al

control y en ocasiones superior. Particularmente, se observó que la eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) en el día 35 fue superior a la del control (Figura 36A). Aquí insistimos en un par de cuestiones. La primera es la ventaja que el etiquetado inicial de las hojas, para hacer comparaciones consecuentes. Probablemente la cuarta hoja verdadera de la planta control del día 35, fuera superior en Φ_{PSII} que la hoja recuperada. Sin embargo, esta hoja era más joven que la hoja recuperada. La segunda, es que la hoja recuperada tomó un color verde intenso (Figura 35A), un Φ_{PSII} (Figura 36A) y curvas de asimilación neta de CO_2 (Figura 38B) atribuibles a una hoja “más joven” que su respectiva hoja control. Esto, junto con la solubilidad de sus cristales atribuibles también a una hoja más joven (Figura 47) nos hace pensar que una vez iniciado el estrés hídrico “el tiempo fisiológico” de la planta se detiene, y una vez rehidratada vuelve al estado fisiológico del que partió el estrés, a pesar del tiempo transcurrido.

La hipótesis de trabajo fue incorrecta, los cristales de las plantas sometidas a estrés hídrico no disminuyeron su tamaño ni desaparecieron. Por el contrario, la senescencia y el estrés hídrico generan dos fenómenos que no conocíamos entorno a los cristales. La primera es que conforme las hojas envejecen, las drusas que poseen aumentan su tamaño y aparecen nuevas drusas de menor tamaño al estándar (Figura 42 y 43). Y la segunda es que, a medida que envejecen, sus cristales se vuelven más insolubles, tanto los que ya tenía como los nuevos. A propósito de este fenómeno, hemos acuñado el término drusa temprana para describir a aquellas que se forman desde la etapa embrionaria y crecen hasta llegar a un tamaño estándar de alrededor de 50 μm (Figura 39 y Figura 40). Por otro lado, acuñamos el término “drusa tardía” para aquellas que se forman en la hoja madura totalmente expandida como producto de la senescencia y/o estrés hídrico cuyos tamaños oscilan los 10 a 20 μm . Esos hallazgos nos hacen repensar la forma en que se deben analizar estos cristales en futuros estudios, ya que probablemente se traten de cristales con propiedades y composición diferente, de tal suerte que los resultados que obtuvimos en el capítulo I de este trabajo, podrían ser un resultado promedio de drusas tempranas y tardías.

La solubilidad de los cristales no fue algo que nos hayamos cuestionado al inicio de este estudio, como se mencionó su hallazgo fue fortuito. El pH de la solución de aclarado fue de 9.02. Por otro lado, el CaOx es menos soluble a pH básicos (Ibáñez et al., 2020), por lo que la disolución de los cristales es poco probable que haya sido por efecto del pH. En un estudio previo se monitoreó la solubilización de CaOx en soluciones de urea vs agua pura por periodos de 2, 4 y 6 h de agitación a 25°C. Al final de este observaron que la solubilidad del CaOx aumenta en función de la concentración de urea y del tiempo de agitación. Encontraron un incremento en la solubilidad del CaOx de alrededor del 8% en la máxima concentración de urea utilizada (2 M) al mayor tiempo (6 h) de agitación empleado (Pedersen, 1939). Las hojas aclaradas (Figura 46 y 47) estuvieron 39 días a temperatura ambiente en solución de aclarado, la cual contiene urea 6 M. Así, la urea y el prolongado tiempo pudieron ser los responsables de la disolución de los cristales de CaOx en las hojas, probablemente a través de la formación de complejos. Sin embargo, algunos cristales soportaron el procedimiento de aclarado sin disolverse, por lo que la naturaleza química del CaOx no es el único factor que afecta la solubilidad de los cristales de la hoja. Con ello, especulamos que existe también un factor biológico en juego que modifica la solubilidad de los cristales de CaOx en hojas. Esta idea toma fuerza al observar que los cristales de las hojas recuperadas se disolvieron mientras que los de su respectivo control no al día 23 y 36 (Figura 47). Como mencionamos antes, el estrés hídrico podría generar un paro en el “tiempo fisiológico” de la planta y con ello evitar los hipotéticos procesos metabólicos o celulares que insolubilizan los cristales. Sin embargo, hace falta más investigación para elucidar dicho factor biológico.

El estrés hídrico genera un cambio drástico en la arquitectura celular y ultraestructural, caracterizada por la pérdida de turgencia y lisis del contenido celular. La lisis generalizada lleva a que no sean reconocibles algunos organelos, particularmente los cloroplastos que son los más prominentes en condiciones normales (Figura 48). Sin embargo, con la reanudación del riego, el contenido celular lisado comienza a reestructurarse para dar lugar nuevamente a los organelos, aunque, en algunos casos esto ya no fue posible y la célula colapsa totalmente comprimiendo todo su contenido celular

lisado (Figura 49). Este proceso de restructuración citoplasmática resulta muy interesante y podría ser la base de la formidable tolerancia al estrés de la planta de amaranto. Es decir ¿qué sucede en esa Pangea celular?, ¿Los organelos se lisan o solamente se repliegan?, ¿Cómo se protege el ADN?, ¿Qué proteínas o metabolitos coadyuvan a este proceso?. Hasta donde llegamos en este estudio, *RbcL* no parece tener una participación destacable, pero si la oxalato oxidasa. Observamos la acumulación de esta enzima en las zonas más centrípetas del contenido celular lisado cuando la célula se encuentra en proceso de recuperación, y casi ausente una vez la célula se había recuperado (Figura 52). Por otro lado, la oxalato oxidasa sí se observó asociada a algunos cristales de CaOx, particularmente a los más pequeños, pero no fue un hallazgo recurrente. Esto nos podría hacer pensar que el cristal pequeño está en degradación y OxO está ahí para coadyuvar, pero tenemos que analizar más la información y reflexionar al respecto. Ya que la casi nula desaparición de cristales en cualquier condición de la planta, y el hallazgo de drusas tempranas y tardías, nos hacen dudar de la dirección que puede estar tomando un cristal en particular, es decir, degradación o formación.

Finalmente, otro hallazgo interesante fue la acumulación aberrante de cristales en las hojas 10 de las plantas estrés (Figura 41D). No podemos asegurar que la naturaleza de esos cristales que se precipitan de forma extracelular (Figura 53) sea de CaOx y que la planta pueda redissolverlos aun estando en estrés hídrico (Figura 41D). Esto es un fenómeno nuevo a considerar para estudios futuros.

11. CONCLUSIONES

- La planta de *A. cruentus* puede sobrevivir a un estrés hídrico que la lleve a una situación grave de pérdida de turgencia.
- La planta de *A. cruentus* comienza a perder turgencia cuando la humedad del suelo alcanza un 2%.
- El estrés hídrico desde un nivel ligero hasta uno relativamente grave genera una disminución en la producción de semilla de alrededor del 16%.
- La hipótesis planteada no es correcta, el estrés hídrico no hace que los cristales de la hoja disminuyan su tamaño o desaparezcan.
- Nuestros resultados no apoyan la hipótesis de que el CaOx puede ser usado como fuente de carbono en condiciones de estrés hídrico.
- Nuestros resultados sugieren que el estrés hídrico detiene el “tiempo fisiológico de la planta” de *A. cruentus*.
- La solubilidad de los cristales de CaOx en hoja de *A. cruentus* disminuye en función de la edad de la hoja.
- La hoja de *A. cruentus* genera drusas tempranas desde su etapa embrionaria, y conforme avanza su senescencia genera drusas tardías más pequeñas.
- El estrés hídrico genera una lisis celular en las CVH y CM de la hoja de *A. cruentus*, misma que se puede revertir una vez rehidratada la células.
- Nuestros resultados sugieren que la oxalato oxidasa juega un papel importante en la recuperación de la lisis celular causada por estrés hídrico.

12. PRODUCTOS ACADÉMICOS Y CULTURALES

Manuscrito (en proceso)

El trabajo del capítulo II está en proceso de edición para ser publicado.

Divulgación

Durante el desarrollo del trabajo del capítulo II realicé grabaciones en video del proceso experimental, análisis de resultados y algunas entrevistas a compañeros e investigadores que participaron en el proceso. Con este material edité un largometraje documental con fines de divulgación científica que fue publicado en YouTube.

<https://youtu.be/y9rB0RHZGsE>

13. REFERENCIAS

- Bouropoulos, N., Weiner, S., Addadi, L., 2001. Calcium Oxalate Crystals in Tomato and Tobacco Plants: Morphology and in Vitro Interactions of Crystal-Associated Macromolecules. *Chemistry* 7, 1881–1888. [https://doi.org/10.1002/1521-3765\(20010504\)7:9<1881::AID-CHEM1881>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1521-3765(20010504)7:9<1881::AID-CHEM1881>3.0.CO;2-I)
- Cerritos-Castro, I.T., Patrón-Soberano, A., Barba de la Rosa, A.P., 2022. Method for CaOx crystals isolation from plant leaves. *MethodsX* 9, 101798. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101798>
- Clouse, J.W., Adhikary, D., Page, J.T., Ramaraj, T., Deyholos, M.K., Udall, J.A., Fairbanks, D.J., Jellen, E.N., Maughan, P.J., 2016. The Amaranth Genome: Genome, Transcriptome, and Physical Map Assembly. *Plant Genome* 9, 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.07.0062>
- Foster, J., Luo, B., Nakata, P.A., 2016. 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* 11, e0149850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149850>
- Franceschi, V.R., Nakata, P.A., 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 41–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106>
- Franceschi, V.R., Schueren, A.M., 1986. Incorporation of strontium into plant calcium oxalate crystals. *Protoplasma* 130, 199–205. <https://doi.org/10.1007/BF01276601>
- Frank, E., Jensen, W.A., 1970. On the formation of the pattern of crystal idioblasts-in *Canavalia ensiformis* DC. *Planta* 95, 202–217. <https://doi.org/10.1007/BF00385088>
- Garvie, L.A.J., 2006. Decay of cacti and carbon cycling. *Naturwissenschaften* 93, 114–118. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0069-7>
- Huerta-Ocampo, J. A. 2008. Análisis proteómico de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) bajo estrés por sequía. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológico, A.C. <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1010/706>

- Ibis, F., Dhand, P., Suleymanli, S., van der Heijden, A.E.D.M., Kramer, H.J.M., Eral, H.B., 2020. A Combined Experimental and Modelling Study on Solubility of Calcium Oxalate Monohydrate at Physiologically Relevant pH and Temperatures. *Crystals* 10, 924. <https://doi.org/10.3390/cryst10100924>
- Igamberdiev, A.U., Eprintsev, A.T., 2016. Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01042>
- Jáuregui-Zúñiga, D., Ferrer, M.A., Calderón, A.A., Muñoz, R., Moreno, A., 2005a. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 162, 1183–1187. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.03.002>
- Jáuregui-Zúñiga, David, Reyes-Grajeda, J.P., Moreno, A., 2005b. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Sci.* 168, 1163–1169. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.12.013>
- Joaquín-Ramos, A., Huerta-Ocampo, J.Á., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., Baginsky, S., Barba de la Rosa, A.P., 2014a. Comparative proteomic analysis of amaranth mesophyll and bundle sheath chloroplasts and their adaptation to salt stress. *J. Plant Physiol.* 171, 1423–1435. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.006>
- Korth, K.L., Doege, S.J., Park, S.-H., Goggin, F.L., Wang, Q., Gomez, S.K., Liu, G., Jia, L., Nakata, P.A., 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant physiol.* 141, 188–195. <https://doi.org/10.1104/pp.106.076737>
- Kostman, T.A., Franceschi, V.R., 2000. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma* 214, 166–179. <https://doi.org/10.1007/BF01279061>
- Kuo-Huang, L.-L., Ku, M.S.B., Franceschi, V.R., 2007a. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shade-adapted *Peperomia glabella*. *Bot. Stud.* 48, 155–164.
- Leszczuk, A., Wydrych, J., Szczuka, E., 2019. The occurrence of calcium oxalate crystals and

- distribution of arabinogalactan proteins (agps) in ovary cells during fragaria x ananassa (duch). Development. J. Plant Growth Regul. 38, 1028–1036.
<https://doi.org/10.1007/s00344-018-09912-7>
- Li, X., Zhang, D., Lynch-Holm, V.J., Okita, T.W., Franceschi, V.R., 2003. Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells. Plant Physiol. 133, 549–559.
<https://doi.org/10.1104/pp.103.023556>
- Li, X, Zhang, W., Lu, J., Huang, L., Nan, D., Webb, M.A., Hillion, F., Wang, L., 2014. Templated biomineralization on self-assembled protein nanofibers buried in calcium oxalate raphides of musa spp. Chem. Mater. 26, 3862–3869.
<https://doi.org/10.1021/cm501613w>
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. J. Exp. Bot. 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Mazen, A.M.A., El Maghraby, O.M.O., 1997. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. Biol. Plant. <https://doi.org/10.1023/A:1001174132428>
- Nakata, P.A., 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. Plant Sci. 164, 901–909. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00120-1)
- Nakata, P.A., Kostman, T.A., Franceschi, V.R., 2003. Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of Pistia stratiotes. Plant Physiol. Biochem. 41, 425–430.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00049-4)
- Nakata, P.A., McConn, M.M., 2002. Sequential subtractive approach facilitates identification of differentially expressed genes. Plant Physiol. Biochem. 40, 307–312.
[https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01380-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01380-3)
- Nakata, P.A., McConn, M.M., 2000. Isolation of Medicago truncatula Mutants Defective in Calcium Oxalate Crystal Formation. Plant Physiol. 124, 1097–1104.
<https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1097>
- Paull, R.E., Zerpa-Catanho, D., Chen, N.J., Uruu, G., Wai, C.M.J., Kantar, M., 2022. Taro raphide-associated proteins: Allergens and crystal growth. Plant Direct 6(9).

<https://doi.org/10.1002/pld3.443>

- Pedersen, K.J., 1939. The solubility of calcium oxalate in aqueous solutions of urea. J. Am. Chem. Soc. 61, 334–336. <https://doi.org/10.1021/ja01871a028>
- Płachno, B.J., Kapusta, M., Świątek, P., Stolarczyk, P., Kocki, J., 2020. Immunodetection of pectic epitopes, arabinogalactan proteins, and extensins in mucilage cells from the ovules of *Pilosella officinarum* vaill. And *Taraxacum officinale* agg. (Asteraceae). Int. J. Mol. Sci. 21, 9642. <https://doi.org/10.3390/ijms21249642>
- Prychid, C.J., Jabaily, R.S., Rudall, P.J., 2008. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). Ann. Bot. 101, 983–995. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn022>
- Prychid, C.J., Rudall, P.J., 1999. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. Ann. Bot. 84, 725–739. <https://doi.org/10.1006/ANBO.1999.0975>
- Radek, M., Savage, G.P., 2008. Oxalates in some Indian green leafy vegetables. Int. J. Food Sci. Nutr. 59, 246–260. <https://doi.org/10.1080/09637480701791176>
- Rossy, J., Ma, Y., Gaus, K., 2014. The organization of the cell membrane: do proteins rule lipids? Curr. Opin. Chem. Biol. 20, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.04.009>
- Ruban, A. V., 2016. Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. Plant Physiol. 170, 1903–1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>
- Seguin, P., Mustafa, A.F., Donnelly, D.J., Gélinas, B., 2013. Chemical composition and ruminal nutrient degradability of fresh and ensiled amaranth forage. J. Sci. Food Agric. 93, 3730–3736. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6218>
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. Plant Cell 5, 9–23. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>
- Tan, L., Tees, D., Qian, J., Kareem, S., Kieliszewski, M.J., 2018. Intermolecular interactions between glycomodules of plant cell wall arabinogalactan-proteins and extensins. Cell Surf. 1, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.03.001>
- Tooulakou, G., Giannopoulos, A., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Dotsika, E., Orkoula, M.G., Kontoyannis, C.G., Fasseas, C., Liakopoulos, G., Klapa, M.I., Karabourniotis, G., 2016a.

- Reevaluation of the plant “gemstones”: Calcium oxalate crystals sustain photosynthesis under drought conditions. *Plant Signal. Behav.* 11, e1215793. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1215793>
- Tooulakou, G., Giannopoulos, A., Nikolopoulos, D., Bresta, P., Dotsika, E., Orkoula, M.G., Kontoyannis, C.G., Fasseas, C., Liakopoulos, G., Klapa, M.I., Karabourniotis, G., 2016b. Alarm photosynthesis: Calcium oxalate crystals as an internal CO₂ source in plants. *Plant Physiol.* 171, 2577–2585. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00111>
- Tooulakou, G., Nikolopoulos, D., Dotsika, E., Orkoula, M.G., Kontoyannis, C.G., Liakopoulos, G., Klapa, M.I., Karabourniotis, G., 2018. Changes in size and composition of pigweed (*Amaranthus hybridus* L.) calcium oxalate crystals under CO₂ starvation conditions. *Physiol. Plant.* <https://doi.org/10.1111/ppl.12843>
- Van Balen, E., van de Geijn, S.C., Desmet, G.M., 1980. Autoradiographic Evidence for the Incorporation of Cadmium into Calcium Oxalate Crystals. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 97, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(80\)80026-2](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(80)80026-2)
- Vargas-Ortiz, E., Ramírez-Tobias, H.M., González-Escobar, J.L., Gutiérrez-García, A.K., Bojórquez-Velázquez, E., Espitia-Rangel, E., Barba de la Rosa, A.P., 2021. Biomass, chlorophyll fluorescence, and osmoregulation traits let differentiation of wild and cultivated *Amaranthus* under water stress. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 220, 112210. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112210>
- Volk, G.M., Lynch-Holm, V.J., Kostman, T.A., Goss, L.J., Franceschi, V.R., 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in pistia stratiotes leaves. *Plant Biol.* 4, 34–45. <https://doi.org/10.1055/s-2002-20434>
- Warner, C.A., Biedrzycki, M.L., Jacobs, S.S., Wisser, R.J., Caplan, J.L., Sherrier, D.J., 2014. An optical clearing technique for plant tissues allowing deep imaging and compatible with fluorescence microscopy. *Plant Physiol.* 166, 1684–1687. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244673>
- Webb, M.A., 1999. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell* 11, 751–761. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.751>
- Webb, Mary Alice, Cavaletto, J.M., Carpita, N.C., Lopez, L.E., Arnott, H.J., 1995. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of

- Vitis. Plant J. 7, 633–648. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.7040633.x>
- Weber, E., Verch, A., Levy, D., Fitch, A.N., Pokroy, B., 2016. Amorphous biogenic calcium oxalate. Chemistry Select 1, 132–135. <https://doi.org/10.1002/slct.201600039>
- Zhuang, X., Jiang, L., 2019. Chloroplast degradation: multiple routes into the vacuole. Front. Plant Sci. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00359>