

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL IMPACTO
DE PESTICIDAS CONVENCIONALES,
BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN EL
GRANO DE POLEN DE TOMATE DE ÁRBOL
*Solanum betaceum***

**PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O
TÍTULO DE:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

ELABORADO POR:

ANA GABRIELA DEL HIERRO CALVACHI

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE 2013

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:



Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

COORDINADORA DE LA CARRERA

Dra. María Augusta Chávez

Sangolquí, septiembre 2013


CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ANA GABRIELA DEL HIERRO CALVACHI como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, septiembre 2013



Dr. Alexis Debut, Ph.D



Ing. Flavio Padilla Badillo

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

Declaro que:

El proyecto de grado denominado: “ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL IMPACTO DE PESTICIDAS CONVENCIONALES, BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN DE TOMATE DEÁRBOL “*Solanum betaceum*”” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan introducidas en el texto, y cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, septiembre 2013

AUTORIZACIÓN

Yo, Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE la publicación de presente trabajo “ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL IMPACTO DE PESTICIDAS CONVENCIONALES, BIOLÓGICOS Y ECOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLEN DE TOMATE DE ÁRBOL “*Solanum betaceum*”” en la biblioteca virtual de la Institución.

Sangolquí, septiembre 2013



Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme y guiarme en todo sendero de mi vida. A mis padres Jeannette y Pablo y mis hermanos Pablo y Verónica por el amor y apoyo que siempre me han brindado ya que sin ustedes no sería la persona que soy. A mi tribu Del Hierro por preocuparse por mí y ayudarme en cada momento. A Pato, el amor de mi vida que ha sido mi apoyo incondicional. A mis angelitos de la guarda que desde el cielo yo sé que me cuidan Papá Guillo y Papá Jaime.

Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

AGRADECIMIENTOS

A mi papi, quien siempre ha confiado en mí y me ha apoyado en todas las decisiones de mi vida. A mi mami por su sacrificio y ejemplo que me ha dado, el cual valoro y lo tengo presente.

A mi familia que son pilar fundamental en mi vida. Pablo por su genial aporte ingenieril en los equipos del laboratorio. Verito por sus regaños y apoyo. A mi ñaña Isabel por ser mi segunda mamá. A Ñaño Gustavo y Silvana por sus consejos y preocupación. A Vivi por ser mi hermana menor compañera de travesuras y sueños. Andrés por su ayuda creativa. Alejito por ser la alegría de todos y sobre todo la distracción durante la tesis.

Al Dr Alexis Debut por brindarme la oportunidad de realizar la primera investigación de mi vida y por motivarme por la ciencia.

Al Ing. Flavio Padilla por compartir su experiencia de campo y conocimiento para la realización de este proyecto.

A Jaime Gía por su guía en la parte estadística que ayudaron a emprender el análisis de los resultados.

A Sarita Guerra por compartir su experiencia de Microscopía conmigo y por todo el aprendizaje del día a día en el laboratorio, lugar que voy a extrañar.

A Pato por su amor, compañía y cuidado durante toda mi carrera universitaria, gracias mi amor te amo.

A mi llavesita, Feli por ser un amigo incondicional a quien he llegado a querer como mi hermano. A mis delis, Giany, Silvi, Carlita y Pancho por haber compartido juntos lindos momentos que quedarán guardados en mi corazón.

A George y Andy por ser mis mejores amigos desde hace mucho tiempo y con quienes sé que voy a contar toda la vida.

Ana Gabriela Del Hierro Calvachi

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1

1.1. Formulación del problema	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Generalidades	3
1.3.1 Tomate de árbol.....	5
1.3.2. Ciclo de reproducción de la planta.....	8
1.4. Desarrollo del grano de polen	10
1.4.1. Microesporogénesis	10
1.4.2. Microgametogénesis	13
1.4.3. Polinización y fertilización	15
1.5. El polen	17
1.5.1 Morfología del polen.....	18
1.5.2. Características del polen de la familia Solanaceae.....	22
1.6. Microscopio electrónico de transmisión	23
1.7 Preparación de muestras para observar cortes ultrafinos en el TEM.	29
1.8. Ultramicrotomía	35
1.8.1 Partes del ultramicrotomo	37
1.8.1. Formación de secciones	41
1.8.2. Espesor de las secciones.....	44
1.8.3 El Ultramicrotomo en la historia.....	48
1.8.5. Desarrollo de la cuchilla de vidrio	51
1.8.6. Evaluación de las cuchillas de vidrio	52
1.8.7. Cuchilla de diamante.....	54
1.8.8. Tallado de la resina	56
1.8.9. Alineación de la cuchilla de vidrio con la resina.....	58
1.9. Daños comunes en las secciones	61

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA.....	64
2.1. Muestreo y extracción de polen	64
2.2. Germinación	66
2.3. Acondicionamiento químico	67
2.4. Elaboración de resinas	68
2.5. Infiltración de muestras y polimerización	70
2.6. Obtención de cuchillas.....	71
2.7. Tallado de la resina	73
2.8. Alineación de la cuchilla de vidrio con la resina	74
2.9. Obtención de cortes	76
2.9.1. Semifinos	76
2.9.2. Cortes ultrafinos	77
2.10. Tinción.....	78
2.10.1. Tinción específica para polen	78
2.10.2. Tinción doble	78
2.11. Observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión	80

CAPÍTULO III

RESULTADOS.....	81
3.1. Cortes ultrafinos de polen no germinado	87
3.2. Cortes ultrafinos de polen germinado	88
3.3. Cortes ultrafinos de pesticidas biológicos	89
3.4. Cortes ultrafinos de pesticidas ecológicos	92
3.5. Cortes ultrafinos de pesticidas químicos.....	94

CAPITULO IV	
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	97
<i>Análisis de resultados</i>	103
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN	105
CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONES	120
CAPÍTULO VII	
RECOMENDACIONES	122
CAPÍTULO VIII	
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica del tomate de árbol	7
Tabla 1.2: Índice de interferencia de color continuo. Escala de visualización de grosor de secciones (Moddla, 2012).	47
Tabla 2.1: Dosificación de las tres clases de pesticidas con sus representantes comerciales	66
Tabla 2.2: Concentraciones para la elaboración de resina epon suave, media y dura	69
Tabla 4.1: Resultados del análisis de daños en el polen de toma de árbol. ...	97
Tabla 4.2: Representación de la distribución binomial para muestras de polen de tomate de árbol sometidas a tres grupos de pesticidas: convencionales, químicos, biológicos y un control sin pesticida	98
Tabla 4.3: Tabla de cálculo para el uso de la ecuación de Odd Ratio.	99
Tabla 4.4: Tabla de contingencia 2x2 de representación de los posibles escenarios que podría ocurrir ante la presencia de daño en la exposición a pesticidas 1 y ausencia de la misma 0 en el estudio de la morfología del polen de tomate de árbol. InfoStat.	102
Tabla 4.6: Resultados del análisis estadístico del daño en el polen relacionado con el uso de pesticidas. InfoStat	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Planta de tomate de árbol	5
Figura 1.2: a) Partes de la flor, androceo	6
Figura 1.3: Procesos de formación de los gametos masculinos	9
Figura 1.4: Corte transversal de una antera en desarrollo,	11
Figura 1.5: Representación del proceso de formación del polen	12
Figura 1.6: Representación de todo el proceso de desarrollo del polen	14
Figura 1.7: Polinización y la fecundación en las plantas angiospermas	16
Figura 1.8: Representación de la estructura de un grano de polen.....	17
Figura 1.9: Tipos de granos de polen.....	19
Figura 1.10: Representación de los componentes del esporoderma,	21
Figura 1.11: Polaridad de granos de polen	22
Figura 1.12: Visualización de la estructura del polen de <i>Solanum betaceum</i>	23
Figura 1.13: Interacción de los electrones con la materia	24
Figura 1.14: Componentes del TEM.....	26

Figura 1.15: Trayectoria de los rayos del TEM	27
Figura 1.16: Representación de la reacción química durante el proceso	31
Figura 1.17: Componentes del ultramicrotomo Power Tome XL	36
Figura 1.18: Partes del porta muestras y sistema de control de avance.....	38
Figura 1.19: Soporte posterior. Tornillo grueso y fino	39
Figura 1.20: Componentes de la consola electrónica	41
Figura 1.21: Ilustración de la formación de la cinta de secciones	43
Figura 1.22: Relación entre el espesor y la coloración de secciones.....	46
Figura 1.23: Ultramicrotomo Cambridge Huxley Mark 2	49
Figura 1.24: RMC cortadora de cuchillas	52
Figura 1.25: Representación del borde de una cuchilla de vidrio	53
Figura 1.26: Representación de las cuchilla de diamante	55
Figura 1.27: a) Representación de los pasos del tallado	57
Figura 1.28: Ángulo de inclinación npara la alineación de la cuchilla	59
Figura 1.29: Importantes consideraciones en el proceso de alineación.....	61
Figura 1.30: Representación de los problemas durante el seccionamiento.....	62
Figura 2.1: Extracción de polen a partir de las flores de tomate de árbol.	65

Figura 2.2: Polen suspendido en medio de germinación y pesticida.	67
Figura 2.3: Componentes de la resina Epon:.....	68
Figura 2.4: Proceso de infiltración del polen en resina epoxy.	70
Figura 2.5: Obtención de cuchillas a partir de una barra de vidrio	72
Figura 2.6: Procedimiento para la incorporación del bote a la cuchilla.	73
Figura 2.7: Observación de la punta de la resina-tallado.	74
Figura 2.8: Proceso de alineamiento de la cuchilla de vidrio con la resina formando una línea paralela en la cara frontal del bloque con la muestra.	75
Figura 2.9: Observación de un corte semifino, teñido con aceto carmín, microscopio óptico (40X).	76
Figura 2.10: Obtención de cortes ultrafinos para la observación en el TEM.....	77
Figura 2.11: Tinción de polen con acetocarmín.	78
Figura 2.12: Tinción doble con acetato de uranilo y citrato de plomo.	79
Figura 3.1: Observación de un error en el proceso de infiltración de la muestra, TEM (3000X).....	82
Figura 3.2: Errores de seccionamiento. A, B cuchilla mal alineada y sin filo. C, D, muestras quebradas durante el seccionamiento TEM (2500X).....	82
Figura 3.3: Error producido en la tinción, formación de residuos de colorante. A. Acetato de Uranilo. B.Citrato de plomo (TEM). ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 3.4: Polen de Solanum betaceum, observado bajo el microscopio óptico (100X).....	84

Figura 3.5: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , la imagen muestra pólenes de distinto tamaño, barra de escala 5 mm (TEM 2800X).	85
Figura 3.6: Polen de <i>Solanum betaceum</i> . A. Vista polar de un polen sin germinación muestra la presencia de un polen de un tamaño de 25 nm (barra indicadora de la escala 5 mm) y presencia de tres poros (SEM). B. Corte ultrafino de 90 nm visualizado a 2500X, muestra una exina gruesa, una intina fina, tres aperturas, la presencia de un núcleo vegetativo prominente situado cerca a una apertura y un núcleo generativo junto a la intina (TEM).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3.7: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 100nm, control sin germinación. Presencia de pólenes con morfología similar, observación de tres aperturas y núcleos internos	88
Figura 3.8: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , muestra control sin germinación, cortes ultrafinos de 90-100 nm.	89
Figura 3.9: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 90 -100nm, pesticida biológico.	90
Figura 3.10: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 90-100, pesticida biológico. .	91
Figura 3.11: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 90-100 nm, pesticida ecológico.	93
Figura 3.12: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes ultrafinos de 90 nm, pesticida ecológico.	94
Figura 3.13: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 90-100 nm, pesticida químico.	95
Figura 3.14: Polen de <i>Solanum betaceum</i> , cortes de 90-100 nm, pesticida químico F	96

LISTADO DE ANEXOS

Anexo A: Superficie producción y ventas por cultivos permanentes **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo B: Sintomatología presentada en tomate de árbol ocasionada por hongos, bacterias e insectos..... **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo C: Información de los tres tipos de pesticidas usados en el estudio y su modo de acción para el control de plagas **¡Error! Marcador no definido.**

Anexo D: Preparación de soluciones..... **¡Error! Marcador no definido.**

RESUMEN

El tomate de árbol es uno de los diez cultivos de mayor importancia económica en Ecuador. Es susceptible a diversas patologías ocasionadas por bacterias, hongos, insectos y nematodos y es tratado con pesticidas de todo tipo. El uso prolongado de pesticidas y en dosis inadecuadas desencadena cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos como la inhibición de la germinación del polen y del tubo polínico que afectan a la producción del fruto. Ante esta problemática, el presente estudio tiene como objetivo observar en el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) cortes ultrafinos de polen de *Solanum betaceum* que evidencien el efecto que causan los pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos en la morfología del grano de polen de tomate de árbol. Se recolectaron flores maduras de Selva Alegre, Pichincha y se extrajo polen de las anteras para la germinación in vitro. Se realizó el acondicionamiento químico de las muestras para poder ser observadas en el TEM que consta de: fijación con glutaraldehído 2 %, tetraóxido de osmio 1% y deshidratación con series graduadas de alcohol. La muestra fue infiltrada con acetonitrilo y fue polimerizada en resina media epoxy. Para obtener cortes los bloques con las muestras fueron seccionados con un espesor de 90 nm en el ultramicrotomo. Finalmente, se realizó la tinción de las secciones con acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 2% previa a la observación en el TEM. El total de pesticidas visualizado fue seis, dos por cada tipo de pesticida más dos controles con y sin germinación. En el TEM se pudo apreciar la morfología del grano de polen germinado caracterizado por presentar una forma tricolporada. De los 140 pólenes observados los pesticidas químicos ocasionaron daño en el 80% de las muestras, los de tipo ecológico modificaron al 50% y los de tipo biológico generaron una variación en el 10% de las muestras. Por lo tanto, se logró evidenciar los daños generados en el polen de tomate de árbol mediante la observación en el TEM.

ABSTRACT

Tomato tree is one of the ten fields of major economic importance in Ecuador even though is susceptible to diverse pathologies caused by bacteria, fungi, insects and nematodes. This field is threaded with several pesticide's types, which extended use and in inadequate doses cause morphologic, anatomical and physiological disruption such as the inhibition of the pollen grain and the pollinic tube that affect the fruit production. Due to this problematic issue, the current research aims to observe under the Transmission Electron Microscope (TEM) pollen's ultrathin sections of *Solanum betaceum* exposed to three pesticides' types: chemical, biological and ecological. The observation should demonstrate the effect caused by the pesticides in the tomato tree pollen grain morphology. With this purpose, there were collected mature tomato tree flowers from Selva Alegre and La Hacienda el Prado (Pichincha) and Patate (Tungurahua). The pollen grain was extracted from the anthers to generate the in vitro germination. In order to observe the samples under the TEM it was necessary to apply a chemical process composed of fixation with 2% glutaraldehyde, 1% osmium tetroxide and a deshidratation process with gradual series of etanol. Then, the specimen was embedded with nitrile acetate and was polymerized in medium epoxy resin. The specimen block was sectioned getting sections of 90nm of thickness in the ultramicrotome. Finally, the staining procedure was applied to the collected sections with 1% uranile acetate and 2% lead citrate before starting the observation under the TEM. There were used six pesticides, two for each pesticide group and two control samples with and without germination. The TEM results showed the normal morphology of a control pollen germinated, which is characterized for a tricolporated shape. According to this parameter, from a 140 pollen grains evaluated, the chemical pesticides showed an 80% variation in the pollen morphology, the ecological pesticides showed a 50% morphological change and the biological pesticides had a 10% morphological variance. Therefore, it was possible to observe the alterations caused by the pesticide's exposure in tomato tree pollen and it was proved the damage generated in the morphology.

CAPÍTULO 1

Estudio morfológico del impacto de pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos en el grano de polen de tomate de árbol *Solanum betaceum*

1.1. Formulación del problema

El tomate de árbol es un cultivo tradicional de los Andes, el cual con el paso del tiempo ha desarrollado importancia económica al extender sus cultivos desde México hasta Argentina (Porter, 1964). En Ecuador, las plantaciones de esta especie, se las localiza mayoritariamente en las provincias de: Imbabura, Tungurahua, Chimborazo y Azuay ocupando de acuerdo a los datos publicados por el Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, en el año 2011 un total de 2308 hectáreas cosechadas (Ministerio de Agricultura, 2011) . Sin embargo Lucio et al (1997), han reportado enfermedades relacionadas con el desarrollo de plagas de insectos, nematodos, afíidos y hongos que afectan al cultivo.

La enfermedad más frecuente en el Ecuador presenta manchas en el fruto o comúnmente denominada ojo de pollo causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria sp* y *Cercospora sp.*; Pudrición del fruto o antracnosis producido por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum*, la lancha o tizón tardía y temprana causada por *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* respectivamente, Oidio o Ceniza por *Oidium sp.*, bacteriosis por *Clavibacter sp.* y la muerte de los

cultivos asociada a *Pythium sp.* y *Phytophthora sp.* También la presencia de plagas afecta al cultivo y en especial al desarrollo del fruto, como es el caso de la presencia de ácaros *Tetranychus urticae*, áfidos o pulgones *Myzus persicae* y arañas rojas *Tetranychus cinabarinus* (Lucio, Espín, & Soria, 1997). Esta es la mayor razón por la que el sector agrícola se ha visto obligado al uso de pesticidas que pueden generar daños en la fertilidad de la planta. De hecho, investigaciones realizadas en frutos de interés en otros países, han comprobado que el uso prolongado de pesticidas en el control de plagas, junto con las malas técnicas agrícolas ha ocasionado serios problemas ambientales y de biomagnificación de sustancias tóxicas en las cadenas de los organismos vivos. Las plantas no son la excepción pues los pesticidas han causado daños en las funciones de fotosíntesis y transpiración de la planta. Fallas que han desencadenado cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos importantes como la inhibición de la germinación del polen y del tubo polínico que afectan a la producción del fruto (De Lacerda, Gomes, Cruz, & De Oliveira, 1994).

Para la comprobación de las afecciones causadas por los pesticidas, en el presente estudio se pretende aprovechar la gran resolución del TEM para observar muestras de polen de tomate de árbol expuestas in vitro a pesticidas y muestras sin pesticidas para realizar una comparación. Mediante el seccionamiento de la muestra en el ultramicrotomo, se obtendrán cortes ultrafinos que evidenciarán los cambios en la estructura interna del polen debido a los cambios generados ante la exposición de pesticidas ecológicos, biológicos y químicos. Cabe recalcar que, a nuestro conocimiento, no se han reportado estudios similares en el Ecuador que realicen cortes ultra finos en polen para la visualización de daños en el Microscopio Electrónico en una especie endémica.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Observar en el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) cortes ultra finos de polen que evidencien el efecto que causan los pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos en la morfología del grano de polen tomate de árbol "*Solanum betaceum*".

1.2.2. Objetivos Específicos

- Establecer protocolos de: preparación de muestras, elaboración de resina Epoxy, infiltración y tinción de cortes ultrafinos.
- Embeber las muestras de polen de tomate de árbol y realizar el tallado requerido para la obtención de secciones.
- Realizar cortes finos mediante el ultramicrotomo Power Tome XL y observarlos en el microscopio óptico.
- Observar las secciones ultrafinas de polen de "*Solanum betaceum*" en el TEM.
- Definir el tipo de pesticida que genera daño en el desarrollo del tubo polínico mediante la observación en el TEM.
-

1.3 Generalidades

Los avances tecnológicos han contribuido al conocimiento científico y al entendimiento sobre la naturaleza de los organismos vivos e inclusive de compuestos

inertes. Específicamente, en el área de la microscopia se ha superado la barrera de la limitación de resolución del ojo humano de 0,1 mm mediante la implementación de Microscopios Electrónicos; los cuales como en el caso del Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) permiten observar, analizar y explicar fenómenos que ocurren en escala nanométrica (nm) (Egerton, 2005). De tal manera, el TEM permite la observación de muestras de tejidos animales, vegetales, humanos, además de virus, bacterias y materiales inertes como metales, plásticos, fibras sintéticas, nanopartículas entre otras, con una magnificación de hasta 1'000.000 de veces. Sin embargo, la mayoría de muestras biológicas por su naturaleza son demasiado gruesas para ser examinadas directamente al Microscopio Electrónico debido a la limitada penetración de la fuente de electrones.

La solución a esta problemática se ha desarrollado a partir del uso de la ultramicrotomía con un dispositivo que permite cortar muestras con mayor precisión (hasta 1 nm), controlando automáticamente el sistema de avance por una consola electrónica para realizar cortes ultra finos de espesores de 10 a 70 nm. Es importante enfatizar que sólo en secciones con este grosor es posible obtener imágenes enfocadas a una alta magnificación, las cuales deben ser embebidas en un material duro o resina para posibilitar la obtención de cortes (Reid, 1977).

Aprovechando, la gran resolución del TEM, la presente investigación está centrada al estudio de la morfología del polen de tomate de árbol, "*Solanum betaceum*" planta susceptible a enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos que es controlada mediante el uso de plaguicidas de todo tipo. Así, la observación de

la estructura interna en cortes ultranos permitirá analizar los efectos que causa la aplicación plaguicidas químicos, ecológicos y biológicos en la viabilidad del polen.

1.3.1 Tomate de árbol

Es una planta endémica de los Andes al crecer entre los 1700 a 3300 m sobre el nivel del mar en climas medios y fríos, se lo conoce también como tamarillo, tuncatomate y sachatomate.

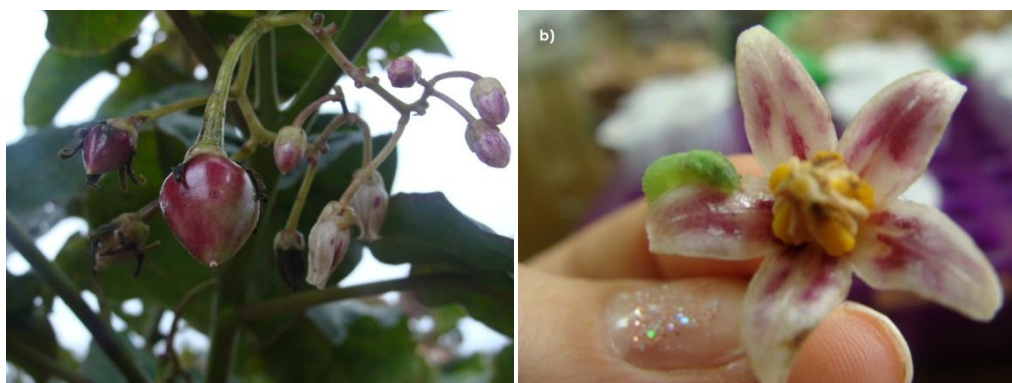


Figura 1.1: Planta de tomate de árbol. B. Flor campanulada de tomate de árbol

Es una planta angiosperma de ciclo vegetativo perenne con una brote de hojas continuo, presenta una vida fértil de aproximadamente cuatro años. Una vez alcanzada la madurez de la planta, puede tener una altura de dos a tres metros con un tallo monopodial¹ semi leñoso y con ramificaciones secundarias a partir de 1 a 1,5 m. La floración inicia de ocho a diez meses a partir de haber sido sembrada la planta y el

¹ Monopodial: Es la planta que posee un eje principal, cuya zona apical se caracteriza por el crecimiento vegetativo rodeado de ramas secundarias.

número de inflorescencias está relacionado directamente con la ramificación de la planta. Las hojas son cordiformes², subcarnosas y miden a lo largo de 17 a 30 cm y a lo ancho 12 a 19 cm. Las flores de *Solanum betaceum* son bisexuales, con una parte masculina, androceo, y una parte femenina, gineceo; usualmente son flores actinomorfas³ y en contadas ocasiones son zigomorfas.

El androceo abarca 5 estambres conniventes⁴ más cortos que la corola, los cuales son coronados por las anteras, lugar en donde se almacena el polen. El gineceo está formado por el estigma, receptor del polen, el estilo o tubo conductor y el ovario, matriz para la fecundación; los cuales a su vez conforman el pistilo. La forma de la flor es campanulada⁵, compuesta por un cáliz de cinco sépalos y una corola de cinco pétalos tubulares, su longitud aproximada es de 1,5 cm (Figura 1.2) (González A., 2008).

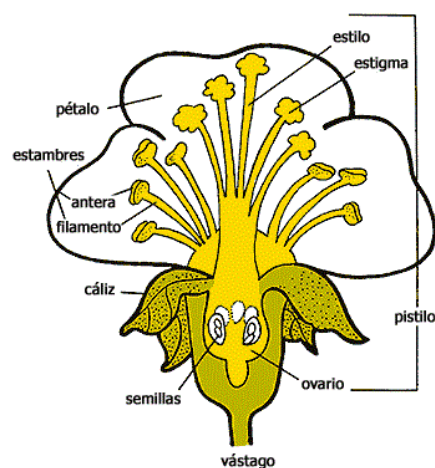


Figura 1.2: a) Partes de la flor, androceo formado por: estambres y anteras y gineceo constituido por los pistilos, el estilo y el ovario. Los componentes externos de la flor son el cáliz, en donde se encuentran los sépalos y la corola, formada por los pétalos. b) Flor campanulada de tomate de árbol, presencia de cinco pétalos tubulares que forman parte de la corola (Andalucía, 2012).

² Cordiforme corresponde a la hoja que presenta forma de corazón.

³ Actinomorfas son flores capaces de dividirse en dos partes iguales (simetría bilateral). Zigomorfas o zigomorfas: Un lado siempre es diferente del otro (sin simetría bilateral).

⁴ Estambres separados por sus bases pero unidos por sus ápices sin llegar a soldarse.

⁵ Campanulado, es la flor que presenta forma de campana (Yepez, 2012).

El fruto es el tomate de fruto árbol, el cual presenta un color naranja rojizo, su forma es ovoide y mide de cinco a siete cm de largo como se muestra en la figura 1.1. El tiempo de producción es de 17 a 44 meses de acuerdo a los cuidados dados a la planta y a las condiciones ambientales (FAO, 2013).

Existen alrededor de 50 especies cultivadas desde el sur de México hasta Argentina de las cuales cuatro pertenecen al género *Cyphomandra* y son afines con el tamarillo: *C. bolivariensis* y *C. hartwegii* y *C. cajanumensis*, o *casana* (Solagro, 2006). En cuanto a la clasificación taxonómica, pertenece a la familia Solanaceae, la cual abarca alrededor de 94 géneros y 2.950 especies localizadas mayoritariamente en América del Sur (Perveen & Qaiser, 2007). La tabla a continuación detalla el reino, la división, clase, subclase, familia, género y especie del tomate de árbol:

Tabla 1.1: Clasificación taxonómica del tomate de árbol (FAO, 2013)

Nombre científico	<i>Solanum betaceum</i>
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>

Especie	<i>betaceum</i>
----------------	-----------------

1.3.2. Ciclo de reproducción de la planta

Los procesos de reproducción sexual cuentan con cuatro pasos marcados: empezando con la meiosis, la diferenciación de los gametos, el transporte de gametos masculinos hacia los femeninos por medio de la polinización y finalmente la fusión para dar lugar a un cigoto. El tomate de árbol al pertenecer a las plantas angiospermas, cumple con el rol biológico de reproducción sexual entre el polen, el gameto masculino, y la oosfera, el gameto femenino que forman la semilla y posteriormente el fruto. Los dos gametos presentan un proceso de desarrollo especializado para cada uno: la microesporogénesis que ocurre en las anteras para la formación del gameto masculino y la macroesporogénesis que se origina en el tejido placentario de la pared del ovario para formar el gameto femenino. El proceso de macroesporogénesis comienza en la nucela, la cual representa una masa de células que crece rápidamente y rodea la célula madre de la megáspora. La placenta se encuentra unida por un tallo corto, llamado funículo, que al alargarse ocasiona que una o más capas de células envuelvan la célula madre de la megáspora dejando una apertura denominada micrópilo. Posteriormente, la célula madre se divide dos veces por medio de meiosis para originar cuatro megásporas haploides (1N), de las cuales sólo una es viable para la fecundación. Esta megáspora sufre tres divisiones por mitosis para dar origen al saco embrionario compuesto por ocho núcleos idénticos. Una vez maduro el saco embrionario, se sitúan tres células cerca del micrópilo; las dos pequeñas corresponden a las sinérgidas y la más grande a la ovo célula. Otras dos células cerca al centro son los núcleos polares y las tres células restantes en el extremo son las antípodas. De tal

manera que, un óvulo maduro no fecundado se compone de un saco embrionario con seis células y dos núcleos polares; rodeados por la nucela y esta por los tegumentos que a su vez son unidos a la pared del ovario por el funículo (figura 1.3) (Potts, 1983).

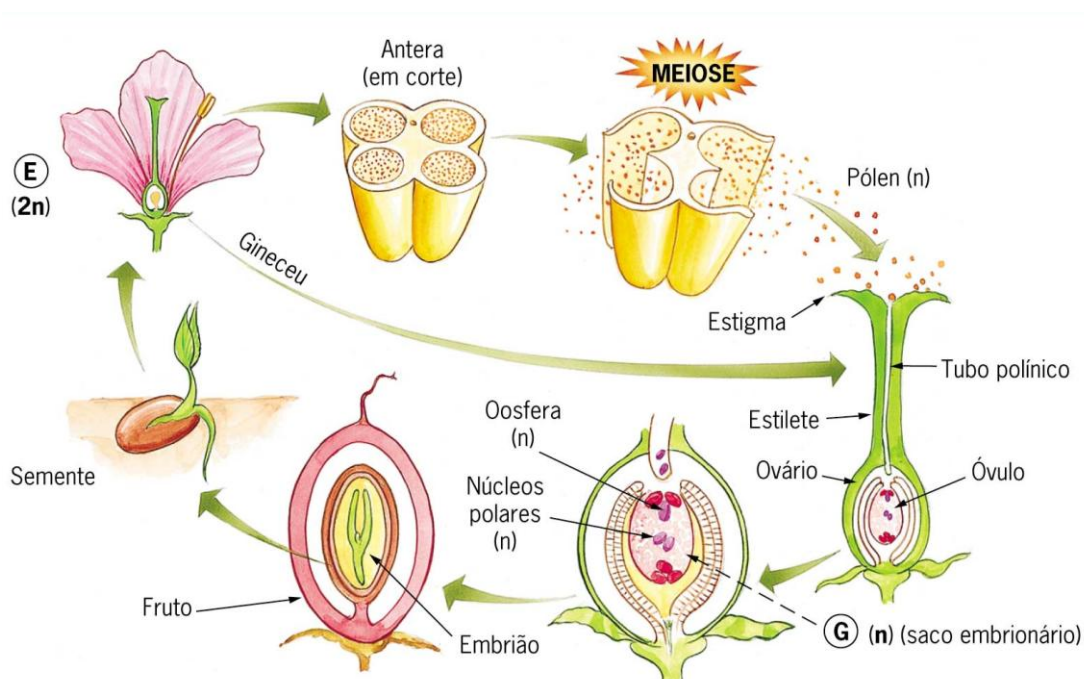


Figura 1.3: Procesos de formación de los gametos masculinos (E) y de los gametos femeninos (G) (Silva & da Sasson, 1998).

Por su parte, la microesporogénesis, es llevada a cabo a partir de cuatro sacos polínicos que contienen las células madres de cada microspora, las cuales se dividen por meiosis para reducir el número de cromosomas. Cada célula madre de la microspora sufre una doble división para formar cuatro microsporas con el número de cromosomas de acuerdo a cada especie (1N) y se desarrollan hasta convertirse en un grano de polen. Cuando las anteras han alcanzado su madurez, el núcleo del grano de polen se divide por mitosis para formar dos núcleos: un vegetativo y un generativo. Simultáneamente, el núcleo generativo se divide para dar origen a dos gametos masculinos o denominados también núcleos espermáticos (figura 1.3).

1.4. Desarrollo del grano de polen

El centro de estudio de la presente investigación es el grano de polen, razón por la cual se pondrá énfasis en el desarrollo del grano de polen previo a la fecundación con el óvulo. Para empezar, el grano de polen unicelular representa a la microespora de las plantas con semillas y el grano de polen multicelular es el gametófito, el cual es la unidad de transporte de los gametos masculinos. Los pasos fundamentales en el desarrollo del grano de polen son: la microesporogénesis y la microgametogénesis (Hesse, y otros, 2009).

1.4.1. Microesporogénesis

Las anteras contienen sacos polínicos, lugar donde se alojan los microsporocitos o células madres del polen. En la figura 1.4 se puede divisar un corte transversal de una antera en desarrollo, los cuatro lóbulos son los sacos polínicos ocupados por las células madres de la microspora.

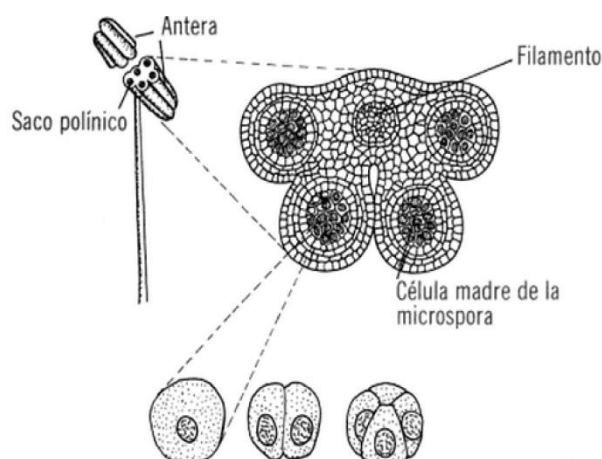


Figura 1.4: Corte transversal de una antera en desarrollo, presenta a los sacos polínicos ocupados por las células madres de la microspora (González A. , Botánica morfológica, morfología de plantas vasculares, 2008).

Para darse la mitosis, existe un proceso previo que ocurre, el cual corresponde a la expansión de los plasmodesmos con el fin de unir y conectar a los microsporocitos que constituyan una masa denominada cenocito, localizada en el micro esporangio. Posteriormente, las células diploides son rodeadas por una pared gruesa o calosa que motiva al comienzo de la meiosis. La meiosis I es reduccional y consta de cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. Seguida, de la meiosis II, la cual ayuda a la diferenciación de las células madre formando una tétrada de cuatro microsporas haploides que son aisladas unas de otras por una pared calosa constituida por b-1,3-glucano. Al terminar la meiosis, cada microspora es rodeada por la pared de calosa, dada las circunstancias de división, ya no presentan plasmodesmos como unión entremicrosporas. El retículo endoplasmático forma una estructura como cisterna para formar eventualmente las aperturas, y en los lugares carentes del mismo se forma una pared de celulosa denominada primexina. Una vez terminada la meiosis, se lleva a cabo la división del citoplasma o citocinesis, la cual en el caso de plantas dicotiledoneas crean una pared que dispone a las microscoporas en varios planos contando con un eje polar, un polo proximal dirigido hacia el centro y hacia la periferia un polo distal (Esau, 1982).

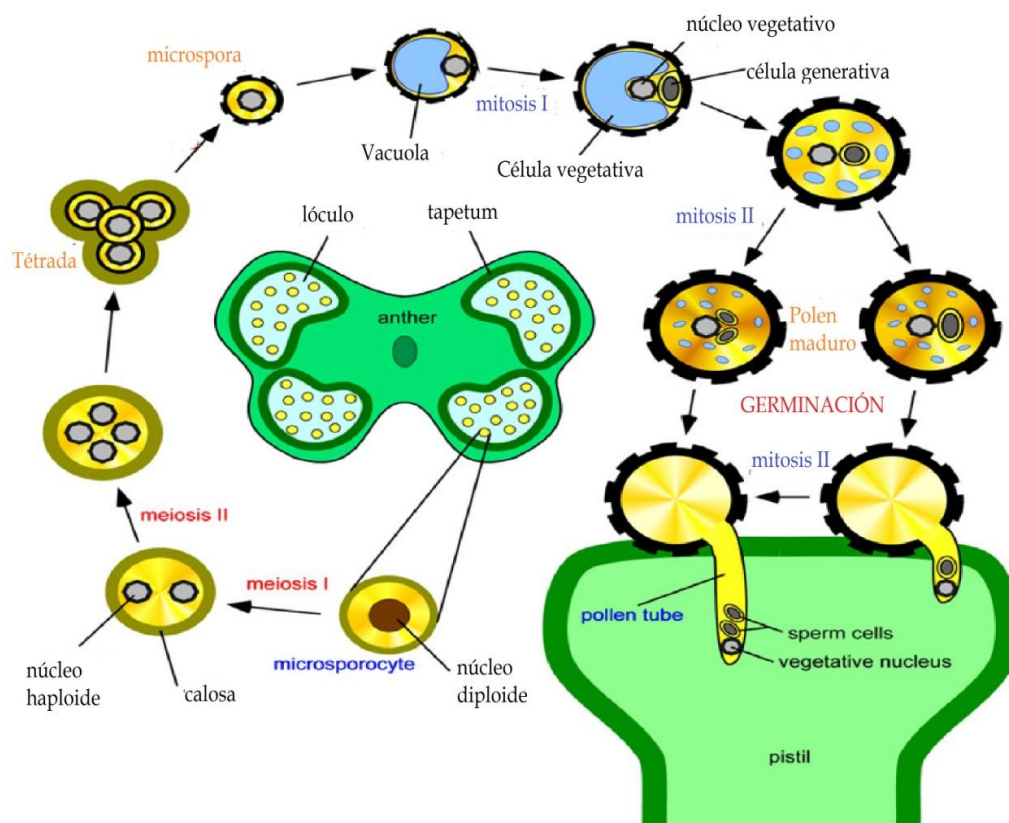


Figura 1.5: Representación del proceso de formación del polen desde las anteras hasta la formación de las tétradas (Hony, Reòák, & Twell, 2006).

Durante el desarrollo de estos granos de polen, el tapete o tapetum proporciona de los nutrientes necesarios para la formación paulatina de la exina y la liberación de sustancias que formarán la trifina y el semen polínico. De hecho, la acción de un complejo enzimático (calasa) secretado por el tapete ocasiona la degradación de la capa de protección de las microsporas cuando estas se encuentran maduras y al deshidratarse las anteras, permitiendo la separación de las cuatro tétradas en microsporas individuales. El crecimiento de la microspora y el desarrollo conlleva a un ciclo progresivo de biogénesis de la vacuola y eventos de fusión y fisión. El rol de la vacuola en la expansión de la microspora se encuentra asociado con la polarización extrema del núcleo en contra de la pared, señal de comienzo para la mitosis del polen (Hony, Reòák, & Twell, 2006).

1.4.2. Microgametogénesis

La microgametogénesis o formación de gametos masculinos, ocurre mientras el polen todavía se encuentra dentro de los sacos polínicos por medio de dos mitosis. La primera mitosis (PMI) genera dos células hijas con estructuras y destinos completamente diferentes. La una es la célula vegetativa, la cual tiene una cromatina nuclear dispersa y constituye la mayor parte del citoplasma del polen. En contraste, la otra célula representa la célula generativa o célula gametogénica, la cual presenta un tamaño más pequeño pero cuenta con una cromatina nuclear condensada, algunos organelos y un depósito de metabolitos. Aquí, se separan completamente las funciones de estas dos células pues mientras la célula vegetativa abandona el ciclo celular en la fase G1, la célula generativa permanece en división competente y completa la mitosis II del polen (PMII) para formar dos células espermáticas. La razón por la que la célula vegetativa no completa el ciclo celular se explica como un error en la expresión génica celular, resultado de la acumulación de una serie de factores gametofíticos que proveen de un mecanismo alternativo a las dos células por represión de ciertos genes (Hony, Reoák, & Twell, 2006).

Después de la PMI, sigue un proceso de citoquinesis asimétrica con dos características especiales pues el citoesqueleto de los gametos masculinos no contiene microfilamentos sino microtúbulos colocado en una estructura en forma de canasta o plato celular. Los microtúbulos son conectados entre sí por medio de proyecciones laterales parecidos flagelos celulares, facilitando la modificación de forma de los gametos durante el desplazamiento a lo largo del tubo polínico (González A. , Botánica morfológica, morfología de plantas vasculares, 2008).

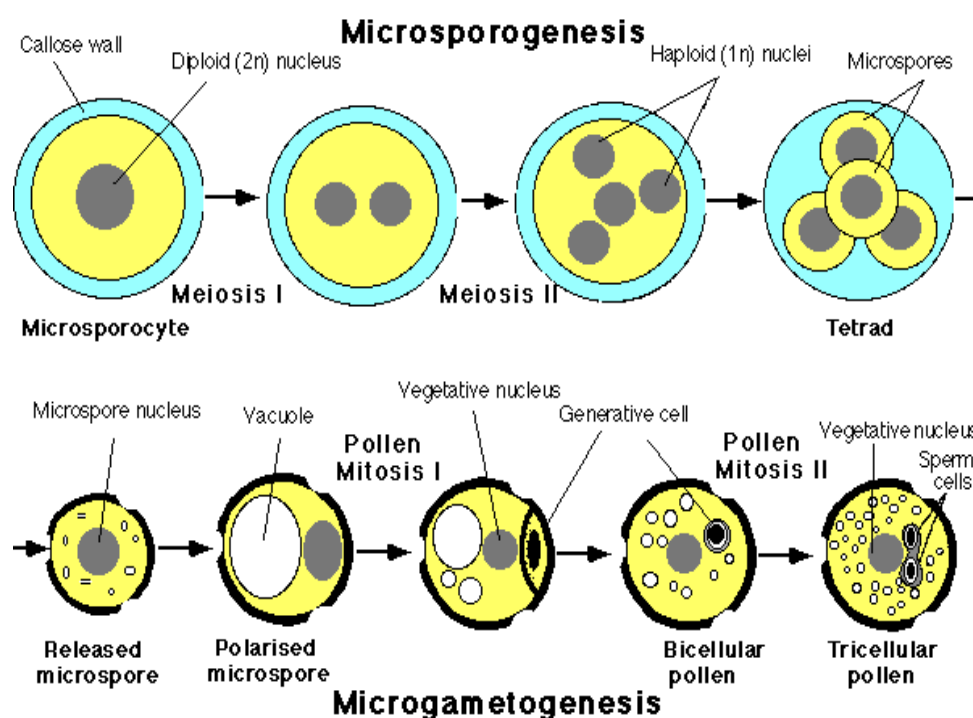


Figura 1.6: Representación de todo el proceso de desarrollo del polen comenzando con la microesporogénesis del polen hasta la macrogametogénesis (Tewell, 2013).

Una vez ocurrida la mitosis I, la célula germinativa (CG) migra, resultando una célula sin estructuracelular definida como para darse el transporte del gametófito por el tubo polínico. Para remediar este hecho, la CG forma una estructura alargada como forma de huso que es mantenida para contener a los microtúbulos; de tal forma que la célula generativa sufre futuras divisiones mitóticas dentro de la mitosis II del polen (PMII) para producir las dos células espermáticas. La mitosis II del polen ocurre dentro del compartimiento del citoplasma de la célula vegetativa, la cual une a los gametos germinativos y al núcleo vegetativo, termino conocido como unidad de germinación masculina (MGU). Durante la maduración del polen, la célula vegetativa

acumula ácido ribonucleico (RNA), proteínas, carbohidratos y reservas de lípidos, los cuales son requeridos por la membrana plasmática, para la síntesis de la formación de la pared del tubo polínico y para el crecimiento del tubo polínico después de la polinización (González A. , Botánica morfológica, morfología de plantas vasculares, 2008).

1.4.3. Polinización y fertilización

El grano de polen maduro de una planta es transportado por medio de los insectos, la gravedad y el viento para que se de la fecundación en otra planta, proceso denominado polinización cruzada. Sin embargo, existen otras plantas en las que el polen es transferido por contacto directo de la antera y el estigma dentro de la misma flor, realizando una autopolinización. Generalmente, el proceso empieza cuando el polen se pone en contacto con el estigma, donde desarrolla el tubo polínico a través del estilo y de las paredes del ovario hasta encontrarse con el óvulo. Luego, el polen atraviesa el micrópilo y llega hasta el saco embrionario para liberar todo su contenido formado por los núcleos generativo y vegetativo. Para darse la fecundación, el núcleo generativo o espermático, se fusiona con el núcleo de la célula y forma el primer cigoto con un número normal de cromosomas $2N$ (Purves & Sadava, 2009).

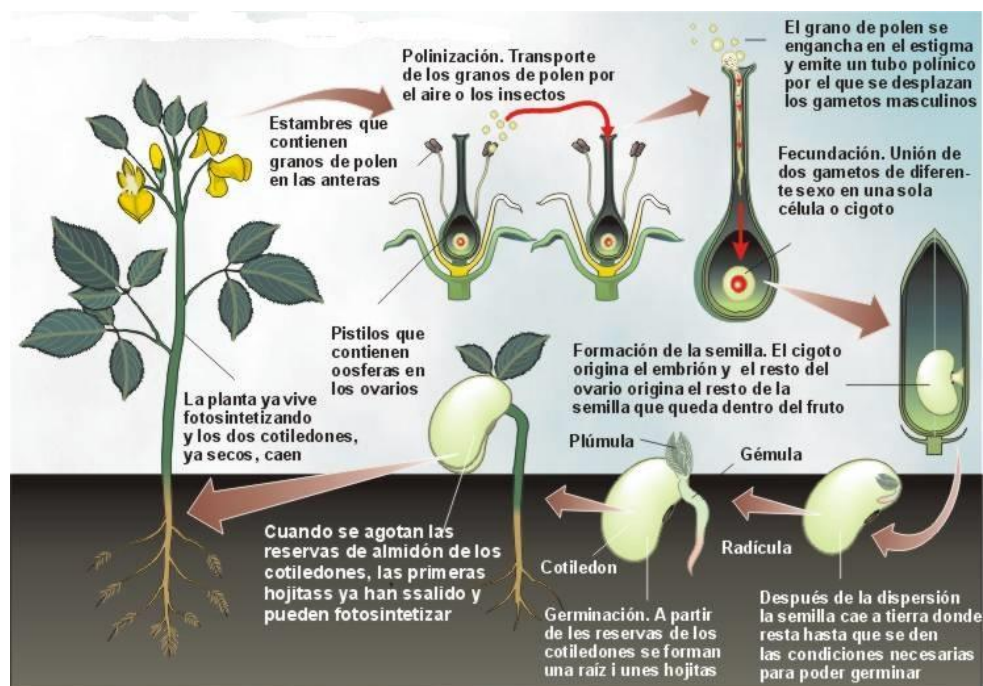


Figura 1.7: Representación de la polinización y la fecundación en las plantas angiospermas. El proceso inicia a partir del transporte del polen hacia el estigma para que se de la fecundación entre el gameto masculino y el femenino (Blasco & Jimeno, 2013).

El núcleo generativo sobrante, se une a los dos núcleos polares para dar a cabo al endospermo primario y en caso de existir todavía el núcleo vegetativo este se degenera (Potts, 1983). A partir de este proceso la flor cambia de si misma todas aquellas partes que ya no son funcionales al marchitar los pétalos y el estigma; y engrosar los estambres y el ovario. Después de algunas multiplicaciones del cigoto se forma el embrión que se transforma en la semilla; y por su parte las paredes del ovario van formando las diferentes capas del fruto. El fruto encierra a la semilla, la cual es dispersada y sembrada en la tierra para formar nuevamente la planta que continuará con el proceso para continuar con la reproducción (Purves & Sadava, 2009).

1.5. El polen

La palinología es el término dado por Hyde & Williams (1994), refiriendo al estudio del polen, las esporas y los materiales biológicos que los componen, a partir de los cuales se ha reconocido el origen y las características de diferentes plantas. El polen es el vehículo natural para la transferencia de caracteres genéticos de la planta al contener en una estructura simple a los gametos masculinos. Los granos de polen tienen tres capas: ectoexina, exina e intina; las cuales engloban a las células germinativas, los núcleos generativos y vegetativos que se encuentran suspendidos en el citoplasma. La protección de todo este contenido está asegurada por la presencia de una pared muy resistente, también llamada esporodermis. Esta pared contiene proteínas y enzimas, responsables de las reacciones de incompatibilidad que ocurren entre el polen y el estigma (Punt, Hoen, Blackmore, Nilsson, & Le Thomas, 2007). En la figura 1.8 se puede distinguir desde el exterior la exina y la interior intina.

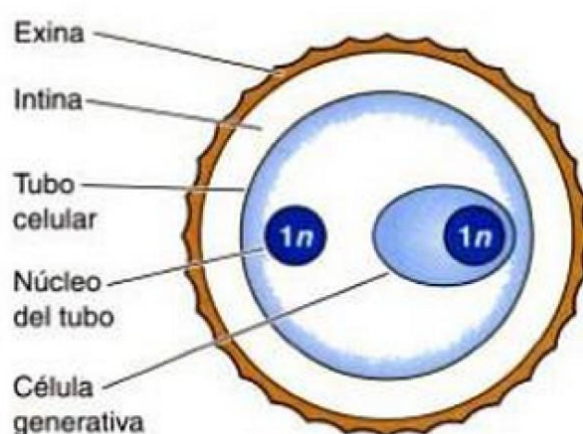


Figura 1.8: Representación de la estructura de un grano de polen (Gilbert, 2005).

La capa externa es la ectoexina, contiene una sustancia química llamada esporopolenina, encargada de proteger al polen de la exposición ambiental. Esta capa se encuentra cubierta por prominencias, poros, arrugas y espinas. La capa intermedia, exina, contiene las enzimas de las plantas usadas en la polinización. Finalmente, la intina es la capa interior del grano de polen que envuelve al protoplasma, la cual es delicada y poco resistente. Se encuentra constituida por celulosa y pectina y sólo cerca de las aperturas es una capa un poco más gruesa (Punt, Hoen, Blackmore, Nilsson, & Le Thomas, 2007).

El núcleo vegetativo se encuentra situado en el centro del polen, mientras que el núcleo generativo está junto a la pared, pues según Huynh (1976) en su "ley de la distancia máxima", la célula generativa se localiza en el punto más lejano de la apertura germinativa. Finalmente, la apertura corresponde a una región diferenciada de la pared, por donde emerge el tubo polínico (Carretero, 1992).

1.5.1 Morfología del polen

Cuando el polen ha madurado presenta una morfología totalmente definida de acuerdo a la planta a la que pertenece. Para estudios de la morfología del polen, Sánchez (2009), establece que se deben tomar en cuenta mediciones de los caracteres morfológicos del polen, entre ellos:

- Tipo polínico: número y tipos de abertura.
- Aperturas: forma, estructura, tamaño y posición.
- Ornamentación: tipo, forma y distribución de los elementos.
- Exina: estructura y grosor de las capas.
- Forma: vista polar y vista ecuatorial.

- Tamaño: del eje polar y del ecuatorial.

a) El tipo polínico y las aperturas: Las aperturas corresponden a cualquier tipo de modificación de la pared del polen o de las esporas. Tienen como función la salida del tubo polínico y la regulación del volumen hídrico para la adaptación del polen a distintos grados de humedad (harmomegata). Existen dos tipos: los poros y las prominencias, pero pueden existir tipos de polen que no contengan ninguna de las dos o una combinación de ambas. Estas características, son un criterio fundamental para identificar las clases de polen de acuerdo a cada familia (Esau, 1982).

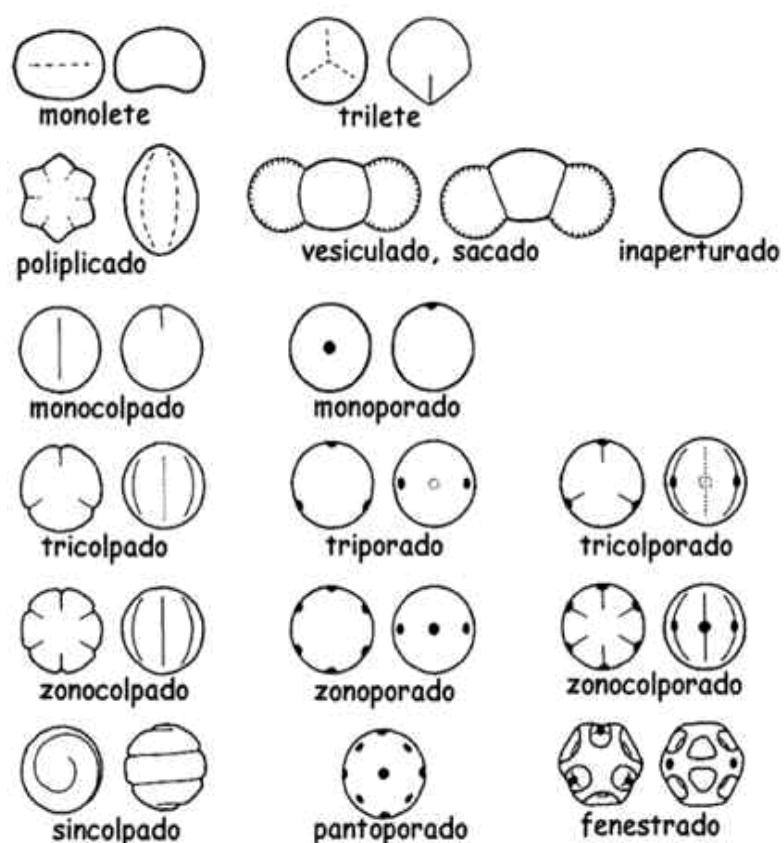


Figura 1.9: Tipos de granos de polen según el tipo y la posición de las aperturas (Esau, 1982).

Se denominan poros a las aperturas circulares de la exina, las cuales pueden existir hasta más de cien por grano de polen. Aquellos granos que presentan tres o más poros se disponen equidistantes en el ecuador. Por otro parte, las aperturas largas al eje polar o colpi se encuentran comúnmente recubiertas por una capa de exina elástica y una denominada membrana del colpus. El número, tipo y posición de las aperturas son características genéticas fijas dentro de una misma especie; sin embargo en ocasiones pueden ser variables (Hesse, y otros, 2009).

b) La ornamentación y pared celular: La pared del polen o esporodermo, es la capa que rodea los granos de polen y se encuentra formada por dos sub capas: la exterior o exina y la interior o intina. La exina está constituida por esporopoleninas que son biopolímeros que dan resistencia al polen a la acetólisis y son degradables sólo por oxidación. Además, esta capa contiene otras capas: una más interna llamada endexina y otra más externa llamada ectexina. En el proceso de formación de la exina, primero se desarrolla la endexina es la capa más interna de la exina, suele ser más o menos lisa u homogénea, engrosándose alrededor de las aperturas. En el proceso de formación de la exina, primero se desarrolla la ectexina seguida por la endexina. La ectexina está constituida por una capa basal, un intratectum y un tectum. Sobre el tectum se origina la ornamentación del polen con elementos esculturales o relieves y poros o canales atravesados. La ornamentación se dispone en una estructura laminar y presenta diferente morfología cerca de las aperturas. A su vez, la intina contiene principalmente celulosa, pectina y glucoproteínas. Habitualmente, la exina tiene un espesor entre 7.31 a 10.40 μm , sin embargo existen regiones de la apertura donde la exina es delgada o en algunos casos es inexistente. En este caso, suele haber una doble capa de intina para reforzar la protección del contenido celular. La estructura del polen puede ser: tectada, cuando los granos de polen cuentan con un tectum sobre la mayor

parte de la superficie. Intectada cuando no existe el tectum y semitectada al estar el tectum desarrollado parcialmente (Hesse, y otros, 2009).

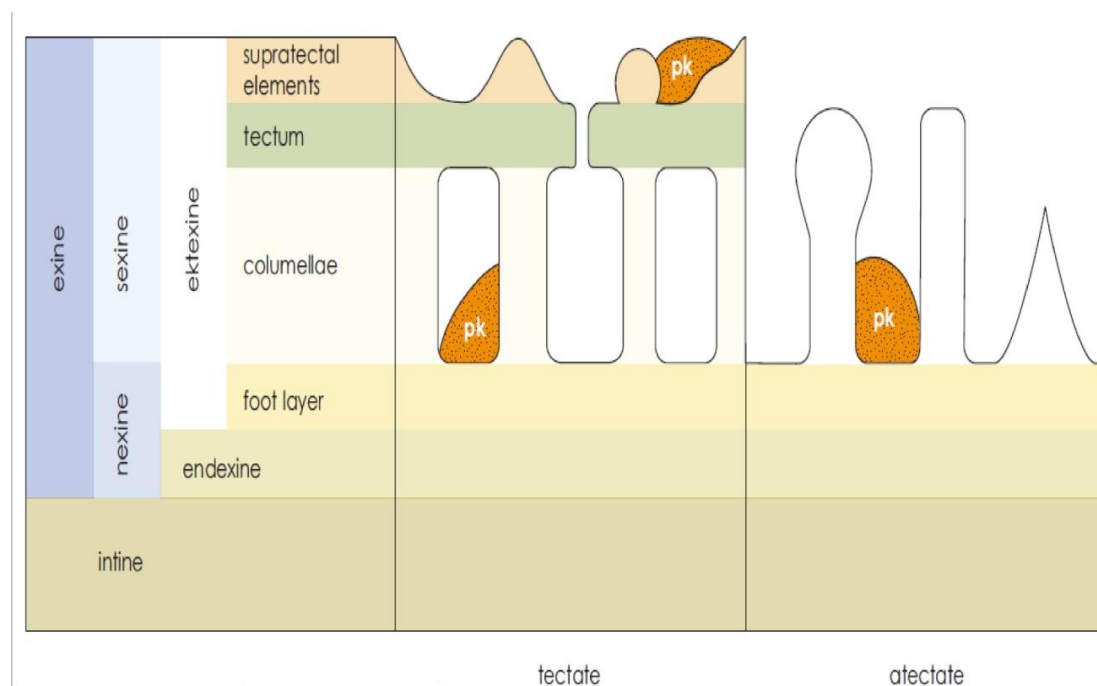


Figura 1.10: Esquema de representación de los componentes de la pared del polen o esporodermo, formada por dos subcapas: la exterior o exina y la interior o intina esporodermos (Hesse, y otros, 2009).

c) **Simetría, forma y tamaño:** La forma de polen y la ubicación de las aperturas se encuentran relacionadas directamente con la polaridad del polen. La polaridad es determinada a partir de la orientación espacial de las microsporas en la tétrada meiótica. El eje polar de cada microspora cruza desde el polo proximal con dirección al centro de la tétrada y hasta alcanzar el polo distal en el lado exterior de la misma (Figura 1.11). El plano ecuatorial divide el grano de polen en una mitad proximal y una mitad distal; se ubica perpendicularmente al eje polar en el centro de la microspora (Hesse, y otros, 2009).

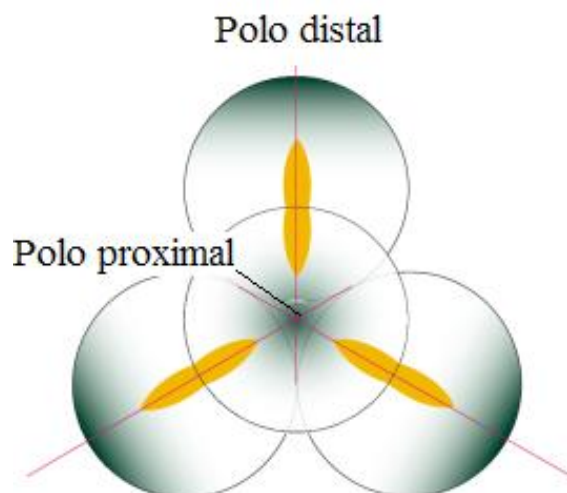


Figura 1.11: Polaridad de granos de polen (Hesse, y otros, 2009).

1.5.2. Características del polen de la familia Solanaceae

En el caso de la familia Solanaceae, los granos de polen presentan generalmente una simetría radial, isopolar, prolato⁶ esferoidal, o subprolato. La abertura es a menudo tri-colporada⁷, la sexina es igual de gruesa que la nexina y la superficie del tectum presenta irregularidades o verrugas. Generalmente, se han reportado variaciones en los tipos de aberturas y la superficie del tectum (Perveen & Qaiser, 2007).

⁶ Prolato: Describe la forma del polen que presenta un eje polar mayor que el diámetro ecuatorial

⁷ Colporado, es la característica del polen de presentar aberturas enlogadas y redondas (Punt, Hoen, Blackmore, Nilsson, & Le Thomas, 2007)

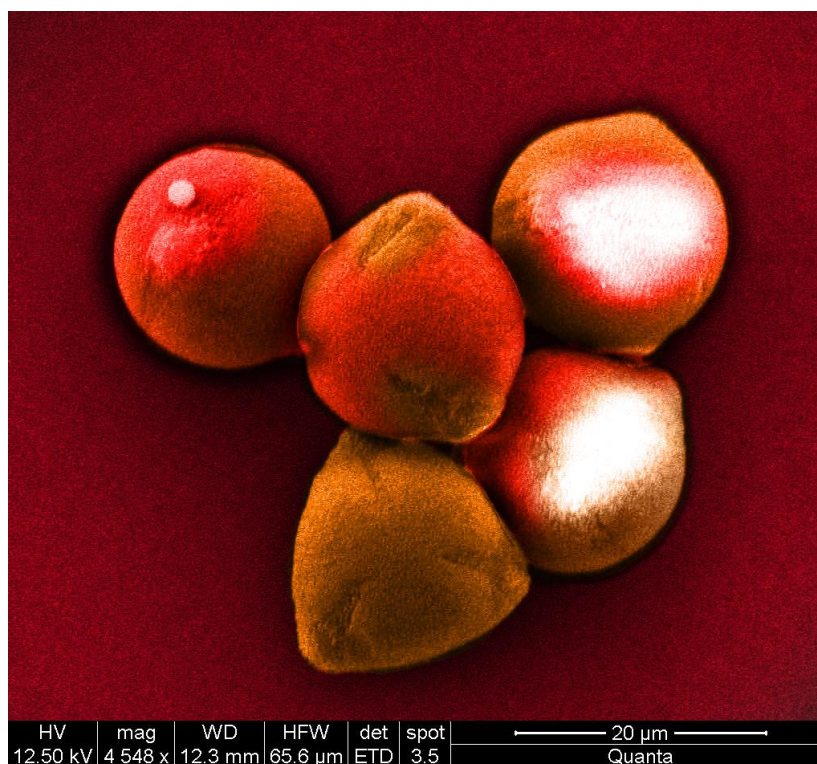


Figura 1.12: Visualización de la estructura del grano de polen de tomate de árbol. Se puede observar la estructura tricolporada con sus polos distales. Imagen capturada en el Microscopio Electrónico de Barrido. Tamaño aproximado 20 μm de largo. Fotografía original Blanco y negro.

1.6. Microscopio electrónico de transmisión

El Microscopio Electrónico de Transmisión por sus siglas en inglés TEM, surge a principios del siglo XIV, cuando se descubrió que las partículas de los materiales como los electrones poseen tanto características de onda como de partícula (Egerton, 2005). El principio de funcionamiento radica en el uso de un haz de electrones altamente energéticos a partir de un filamento de tungsteno (cátodo). Para formar una imagen casi monocromática los electrones necesitan de un alto voltaje de aceleración del ánodo con el fin de formar una onda que atraviese el campo magnético (Amano, 2004).

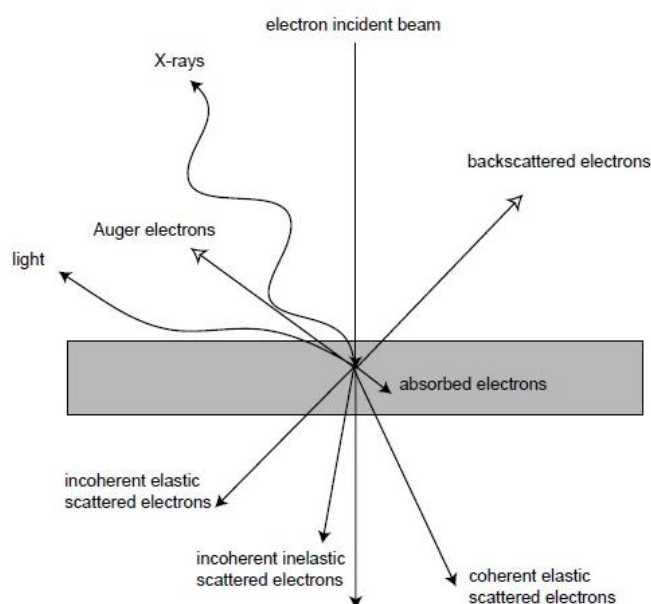


Figura 1.13: Interacción de los electrones con la materia (Voutou & Chrysanthi, 2008).

Actualmente, existen TEM que usan un voltaje de aceleración de electrones hasta 3 MV (Egerton, 2005). Gracias a la capacidad de penetración y al potente haz de electrones, la examinación de materiales en el TEM brinda información a una escala fina sobre topografía (superficie), morfología (forma, tamaño, estructura), composición (elementos y compuestos) y cristalografía de los objetos (arreglos de los átomos) con una magnificación de 1'000.000 de veces (Voutou & Chrysanthi, 2008). Por otro lado, en el campo biológico, permite revelar con detalle a superficies, organelos y estructuras de tejidos vegetales, humanos y animales debido a su elevada resolución espacial. Una limitación del TEM es el espesor de la muestra a ser observada pues debe ser lo suficientemente fina para permitir que una fracción del haz incidente de electrones la atraviese y se forme una variedad de interacciones entre los electrones y el material a ser analizados. La versatilidad de la microscopia electrónica se deriva de esta variedad de interacciones que incluyen la transmisión de electrones, los electrones retro dispersados, electrones secundarios, electrones elásticos

coherentes dispersados, electrones elásticos refractados, rayos X o fotones ópticos, electrones inelásticos dispersados, electrones inelásticos coherentes, entre otros (Egerton, 2005).

Elementos del TEM: Consisten en un sistema de iluminación formado por el cañón y los condensadores y el sistema de lentes y formación de imagen. La imagen final es observada por medio de una pantalla fluorescente y es archivada en los dispositivos de detección visual (Urbina, Rodríguez, Finol, Mérida, & Ogura). El componente característico del TEM es el cañón o fuente de electrones y los lentes condensadores. La función del cañón es emitir electrones al calentar el filamento de tungsteno por un efecto termo iónico para atravesar la muestra. Este haz es acelerado en la fuente hasta un rango de energía entre 20-1000 keV, posteriormente atraviesa el set de lentes condensadores para producir un haz de electrones con un diámetro regulable para la observación que puede ser operado en dos modos: haz paralelo y haz convergente. Para minimizar las aberraciones cromáticas se precisa de sistemas de abastecimiento de alta tensión estables para acelerar los electrones. Por otra parte, el sistema del TEM también cuenta con un sistema libre de vibraciones y de limpieza con el propósito de proveer de estabilidad al equipo y evitar la contaminación proveniente de las muestras. Otra estrategia de prevención de contaminantes presente en el sistema de la mayoría de los microscopios de transmisión es contar con dispositivos de enfriamiento o trampa fría. Este dispositivo consiste de filamentos metálicos que rodean la muestra y la enfrían a la temperatura del nitrógeno líquido y la mantienen durante la observación. El enfriamiento se realiza en un contenedor que contiene el nitrógeno líquido y lo pone en contacto con el metal. Así, los gases en el

vacio se condensan en la superficie dentro del TEM y por ende las presiones parciales son reducidas. (Williams & Carter, 2009).

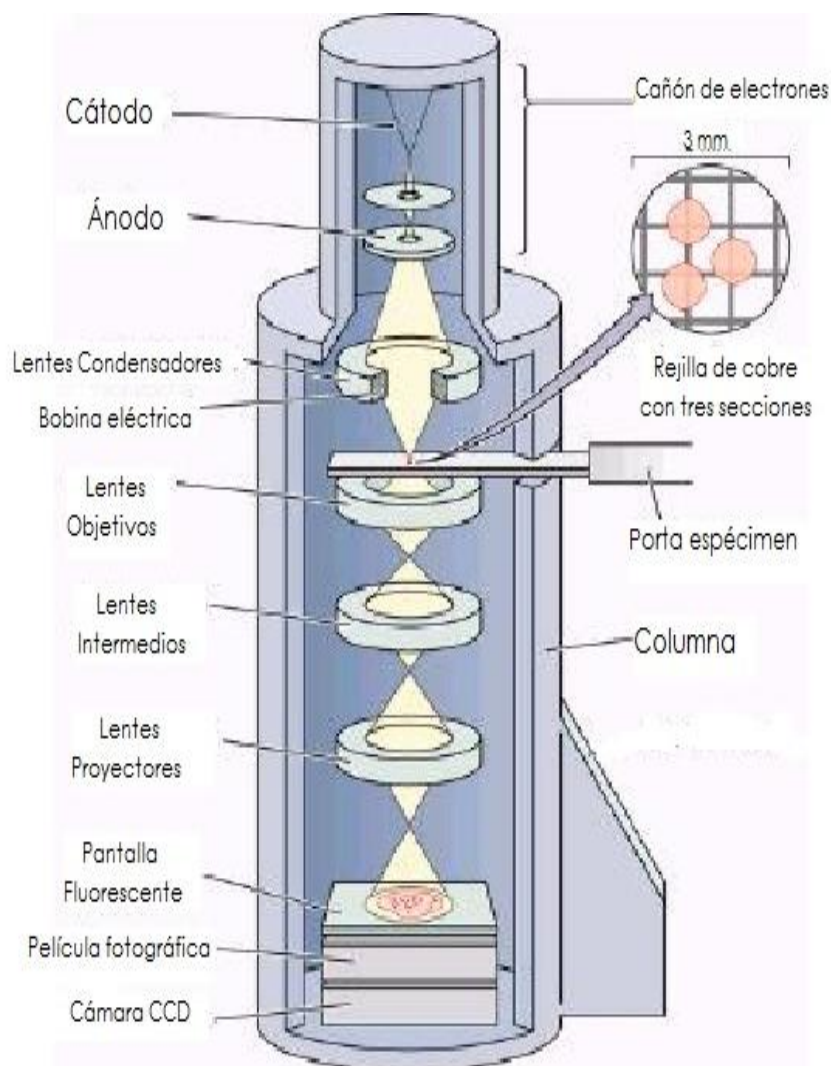


Figura 1.14: Componentes del TEM. De arriba abajo, el cátodo es el filamento de tungsteno a partir del cual se emiten los electrones acelerados por el voltaje del ánodo, el haz de electrones formado atraviesa la muestra colocada en un porta muestras o rejilla metálica mesh, pasando por el sistema de lentes para finalmente observarse en la pantalla fluorescente al final de la columna (Focosi, 2013).

El sistema de lentes cuenta con tres lentes compuestas: los objetivos, los intermedios y los proyectores; son usados para magnificar la imagen o para enfocarla en la pantalla de observación (Williams & Carter, 2009). Los lentes intermedio y proyector, proveen la magnificación de interés. Por su parte, el porta muestra junto con los lentes objetivos forman el corazón del TEM pues es aquí donde ocurren las interacciones del haz de electrones con la muestra y se dan las dos operaciones fundamentales del TEM: la creación de la imagen y el patrón de difracción (PD). De hecho, la resolución de la imagen del sistema está determinada en gran medida por las características de los lentes objetivos, particularmente por la aberración esférica (Amelinckx, Dyck, Landuyt, & Tendeloo, 1997).

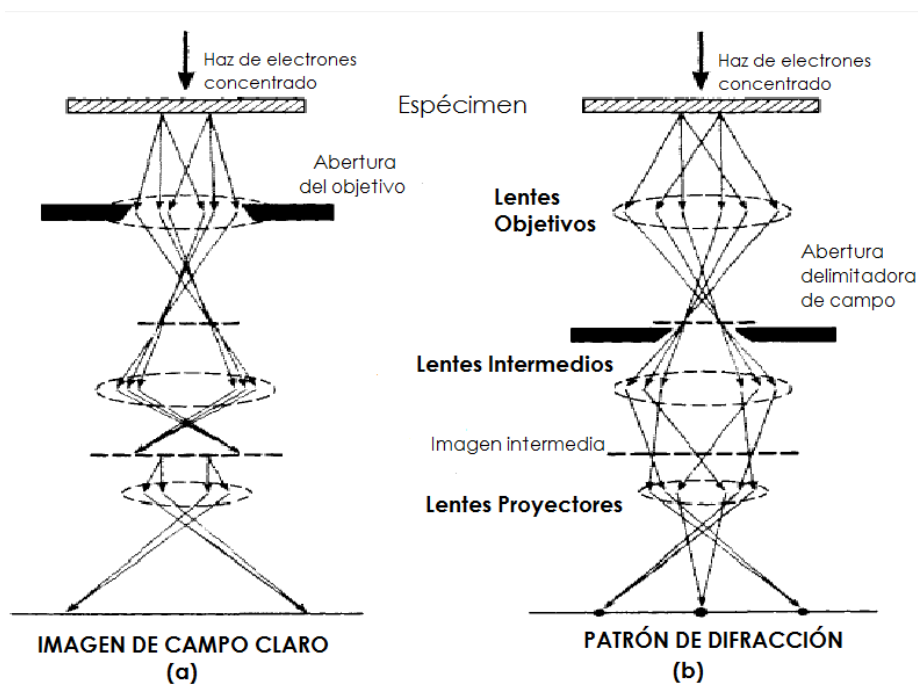


Figura 1.15: Trayectoria de los rayos del TEM a) Modo de alta magnificación y alta resolución de formación de imagen, b) Modo de Difracción del área seleccionada (Amelinckx, Dyck, Landuyt, & Tendeloo, 1997).

Consecuentemente, la estructura del TEM está ideada para que el espécimen sea colocado al centro de los lentes objetivos debido a los múltiples defectos relacionados con los lentes magnéticos que afectan en la habilidad para manipular la muestra, pero ganando acceso a las señales generadas dentro de la columna (Williams & Carter, 2009).

El sistema de lentes también permite cambiar del modo de imagen de alta magnificación al modo de difracción del área seleccionada por medio de dos aperturas móviles, una situada en el plano de la imagen de los lentes objetivos y otra cerca del plano focal posterior. La apertura frontal es usada para elegir un área pequeña del espécimen ($\leq 1\text{mm}$), mientras está siendo observado. La otra apertura posibilita la selección de sólo un haz de electrones o bien de un número de haces difractados que formen la imagen. En la figura 1.15 se muestra el patrón de rayos al modificar los dos modos con los que cuenta el TEM. En la figura 1.15a se aprecia el modo de alta definición y alta resolución para la formación de la imagen. El funcionamiento consiste en un haz de electrones producido por la fuente de electrones que es dirigido por el sistema de lentes condensadores y es dispersado por el espécimen, de tal manera que se forma una imagen en el plano de imagen de los lentes objetivos. La apertura, mencionada anteriormente para este modo, permite seleccionar un área de la imagen, la cual es posteriormente magnificada por los lentes intermedios. Los lentes intermedios se encuentran enfocados en el plano de imagen de los lentes objetivos para formar una imagen intermedia en el plano de imagen correspondiente. Luego, la imagen pasa a los lentes proyectores y finalmente es observada en la pantalla fluorescente o en la entrada del sistema de datos. La figura 1.15b, esquematiza el modo de difracción del área seleccionada, el cual a diferencia del modo de campo

claro, cuenta con lentes intermedios debilitados para que la longitud focal aumente. Así el plano focal posterior del lente objetivo es capaz de coincidir con el plano del objeto del lente proyector. Como consecuencia, se produce una representación magnificada del patrón de difracción del área seleccionada en la pantalla fluorescente, área que no es cambiada en toda la observación debido a que sólo se modifica la fuerza del lente intermedio. Por último, una vez que se haya dado cualquiera de estos modos, la imagen es captada por una cámara fotográfica incorporada bajo la pantalla (en modelos modernos de TEM), haciendo posible la manipulación electrónica de la imagen captada (Amelinckx, Dyck, Landuyt, & Tendeloo, 1997).

1.7 Preparación de muestras para observar cortes ultrafinos en el TEM

Para lograr observar la ultraestructura de la sección, Kaech (2012) considera que se deben considerar los siguientes requerimientos:

- Las muestras deben ser transferidas a un estado sólido que preserve la estructura de la muestra viva.
- El espécimen no debe contener agua a condiciones de alto vacío y al haz de electrones.
- La muestra debe ser lo suficientemente fina para que sea permeable para los electrones.
- Debe darse un contraste específico que permita reconocer estructuras durante la observación en el TEM.

Por lo tanto, las muestras requieren de un acondicionamiento químico comprendido por cuatro pasos: fijación, deshidratación, infiltración e inclusión o embebimiento para continuar con el proceso de seccionamiento. Finalmente, se realiza

la tinción de las secciones con el fin de dar contraste a la muestra antes de observarse al TEM (Urbina, Rodríguez, Finol, Mérida, & Ogura, Introducción a la microscopía electrónica- guía teórico práctica., 1997).

Fijación y posfijación: La fijación es el proceso de estabilización del material biológico para detener la actividad celular sin alterar la estructura interna y externa de la muestra. El proceso de fijación consiste de un amplio rango de componentes químicos como: glutaraldehído ($\text{CHO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$), paraformaldehído (HCHO), acroleína ($\text{CH}_2 = \text{CHCHO}$), tetra-óxido de osmio, acetato de uranilo, etc; los cuales pueden ser usados combinados, en proporciones diferentes o por separado. Individualmente, los fijadores son disueltos en un buffer, cuya función es actuar como vehículo, fijativo y factor de combinación con los componentes internos de la célula para suspender sus procesos internos. Existen diferentes sistemas para efectuar la fijación: perfusión, inmersión, evaporación, etc; el uso de cada una de estas alternativas depende de factores como: el tipo de muestra, el tamaño y la naturaleza de la misma (Ríos, 2010). La función principal de los fijadores es penetrar rápidamente al espécimen ocasionando que las proteínas se humedezcan y se detenga la dinámica de la célula viviente. Comúnmente, se usa soluciones de glutaraldehído debido por ser un compuesto doble reactivo que permite incrementar la estabilidad de la matriz celular proteica que detiene la motilidad y la mayoría de procesos celulares dejando a la célula fija o muerta (Kaech, 2012). Además, el aldehído preserva a las proteínas, el glicógeno y a las macromoléculas asociadas a las mismas, tales como lipoproteínas e histoproteínas relacionadas con el ácido desoxirribonucleico (ADN). Los grupos carbonilos de los aldehídos reaccionan con cualquier grupo “R” de los amino ácidos, resultando la relacional ($-\text{CH}_3$) de las proteínas moleculares como se aprecia en la

figura 1.16. Debido a que este tipo de fijadores no desnaturalizan a las proteínas, los sitios activos de las mismas permanecen intactos por lo que puede acontecer todavía la localización histoquímica e inmunoquímica de las proteínas con las enzimas (Kuo, 2007). Este hecho hace que los aldehídos sean utilizados como fijadores primarios para muestras biológicas visualizadas en el TEM (Beck, 2010).

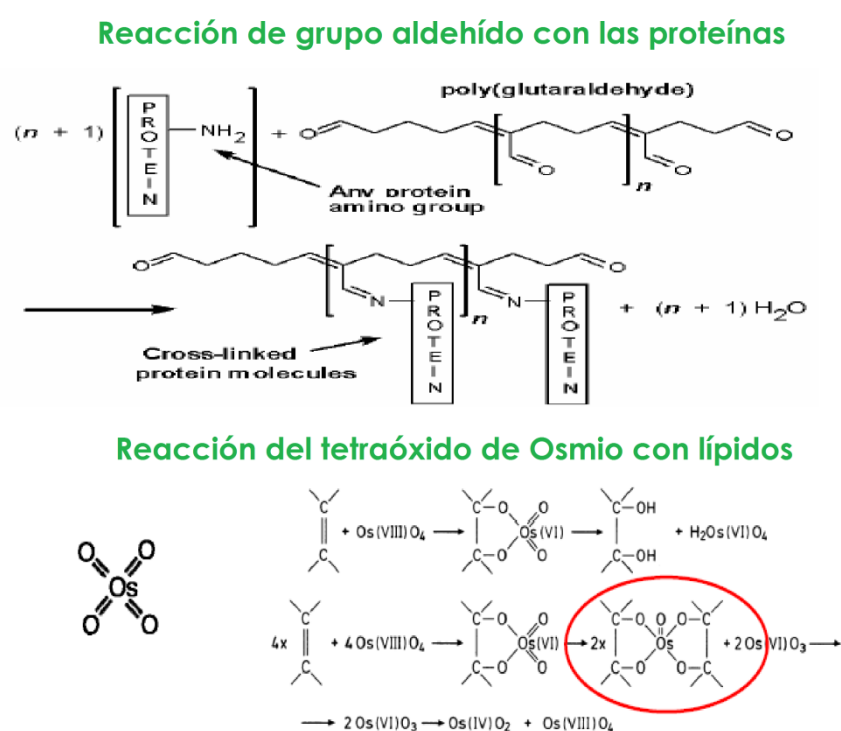


Figura 1.16: Representación de la reacción química durante el proceso de fijación con glutaraldehído y posfijación con Tetra óxido de Osmio (TOO) para la preparación de muestras (Kaech, 2012).

Con el objetivo de aumentar la efectividad de la fijación, se realiza la posfijación con Tetraóxido de Osmio (TOO). El TOO es un fuerte oxidante que penetra la muestra más lentamente que los aldehídos, pero por su naturaleza química reacciona con los dobles enlaces de los lípidos insaturados localizados en abundancia

en la membrana fosfolipídica de la célula y destruye la actividad enzimática e inmunológica. Por otro lado, el TOO también reacciona muy lento con las proteínas ayudando a preservar el ADN y al reducirse el metal pesado a una macromolécula ejerce contraste que ayuda a la observación (Kuo, 2007).

Deshidratación: Es el proceso de sustitución graduada del agua presente en la muestra biológica con un solvente compatible con la resina, generalmente acetona o alcohol. Los efectos ocasionados en la preparación de la muestra pueden ser: encogimiento, cambios conformacionales de las proteínas y pérdida de lípidos. Para evitar esta clase de problemas se prolongan los tiempos de infiltración y se realizan diluciones graduadas de alcohol. (Kuo, 2007).

Infiltración y embebimiento: La infiltración es el proceso de infusión de un material duro en la muestra a ser seccionada para brindar de un soporte duro y transparente que permita cortar en el ultramicrotomo y observar al TEM. Existen distintas técnicas de infiltración de acuerdo a la naturaleza del tipo de material y del tipo de resina. Generalmente, el material duro es un polímero que a su vez se encuentra formado por dos monómeros específicos, un endurecedor y un acelerador. Los cuatro compuestos se mezclan uniformemente, se colocan en moldes junto con la muestra y se polimerizan para obtener el soporte duro. El resultado de este procedimiento ayuda a la elaboración de cortes histológicos que proporcionan dureza y resistencia a las muestras para tolerar el corte (Beck, 2010).

Un medio de infiltración adecuado para muestras observadas en el TEM, de acuerdo a Beck (2010) debe contar con ciertos requerimientos:

Consistencia: la formulación de la resina debe presentar el mismo rendimiento en cada preparación.

1. Viabilidad: los componentes deben mantener condiciones óptimas para la preparación.
2. Pureza: los componentes deben ser identificados y caracterizados para evitar errores.
3. Solubilidad: se debe tomar en cuenta solventes relacionados con el tipo de resina que sea utilizado.
4. Miscibilidad: todos los reactivos que sean utilizados durante la intracción deben ser miscibles unos con otros.
5. Viscosidad: mientras menos viscosos sean los componentes del medio, más fácil resulta la preparación.
6. Polimerización: debe ser controlable, uniforme y debe ocurrir en un tiempo razonable.
7. Transparencia: el medio debe permitir el paso de la luz y de electrones.
8. Estabilidad: la resina preparada debe ser estable bajo el haz de electrones.
9. Sublimación: es importante para evitar la interferencia de líquidos que ayude a las fuerzas de tensión en la superficie.
10. Entrecruzamiento entre polímeros: los componentes deben preservarse en buenas condiciones manteniendo intactos a los tejidos embebidos.
11. Capacidad para tinción: la muestra debe permitir la tinción con metales pesados, pigmentos y tinturas histoquímicas necesarias para la visualización bajo los microscopios.
12. Encogimiento: durante la polimerización el volumen de la muestra no debe cambiar.

13. Almacenamiento: el medio duro debe permitir la preservación de la muestra por largos periodos de tiempo.

Tinción doble: Provee de densidad electrónica o contraste a la muestra por medio de la interacción de dos metales pesados: citrato de plomo y acetato de uranilo. Primero, el acetato de uranilo es una de las moléculas más fuertes empleadas para la tinción que interactúa con compuestos aniónicos al unirse fuertemente a grupos fosfato asociados con ácidos nucleicos y fosfolípidos. A su vez, también es capaz de reaccionar con grupos carboxílicos es decir varios aminoácidos y proteínas para efectuar contraste. El pH de las tinturas de uranilo usualmente oscilan entre 3.5 a 4 para teñir fuertemente a las proteínas; caso contrario el ADN puede resultar teñido demasiado. Otro hecho importante relacionado al uranilo es que sirve como mordente para las tinturas de plomo, es decir cuando ocurre la tinción con este compuesto las estructuras interaccionan más fuerte con los tejidos previamente expuestos al uranilo. El mecanismo empleado para la tinción se inicia cuando los iones de uranio forman sales simples con los grupos fosfatos del ADN, logrando reducir su carga y así unirse a la cadena. De igual manera, las proteínas como histonas, proteínas ribonucleicas y fosfoproteínas son teñidas por la densidad de la tintura. La mitad de las proteínas en la membrana parecen ser las responsables en gran medida de la coloración de la cito membrana. Existe una gran variedad de tinturas de uranilo tales como: acetato de uranilo, formato de uranilo, aceto magnesio de aluminio y nitrato de uranilo, pero la más usada es el acetato de uranilo (Dykastra & Reuss, 2003).

Por su parte, el citrato de plomo es usado para la tinción después del acetato de uranilo debido a que dispersa los electrones con efectividad. Las sales de plomo

producidas en la tinción incrementan el contraste con mayor intensidad en presencia de enlaces reducidos de osmio en el tejido que con sales de uranilo. Sin embargo, esta tinción tiende a generar rápidamente precipitados con el dióxido de carbono y el oxígeno del aire para formar carbonato de plomo, el cual aparece como agregados granulares en la muestra o en algunos casos como depósitos globulares (Dykastra & Reuss, 2003).

1.8. Ultramicrotomía

La ultramicrotomía es la técnica especializada para la obtención de cortes ultrafinos por medio de un dispositivo de corte denominado ultramicrotomo. Las secciones obtenidas son requeridas para la visualización bajo el TEM al precisarse secciones delgadas para ser penetradas por el haz de electrones. Los elementos que forman parte del ultra microtomo son: un sistema de iluminación múltiple, un avance térmico o mecánico a pasos de 1nm, un porta cuchillas regulable para vidrio y diamante, un sistema óptico con microscopio estereoscópico de visión tridimensional, una rueda de movimiento del brazo regulable por motor, una consola electrónica y un sistema de regulación de la amplitud y velocidad de movimiento del brazo [57]. El mecanismo de funcionamiento ultramicrotomo consta de un brazo encargado de sostener el bloque de resina con el espécimen que produce movimientos ligeros. Cada movimiento representa el avance del porta muestra hacia la cuchilla de vidrio o diamante generando secciones delgadas o ultra delgadas a partir de la cara frontal del bloque (Reid, 1977).

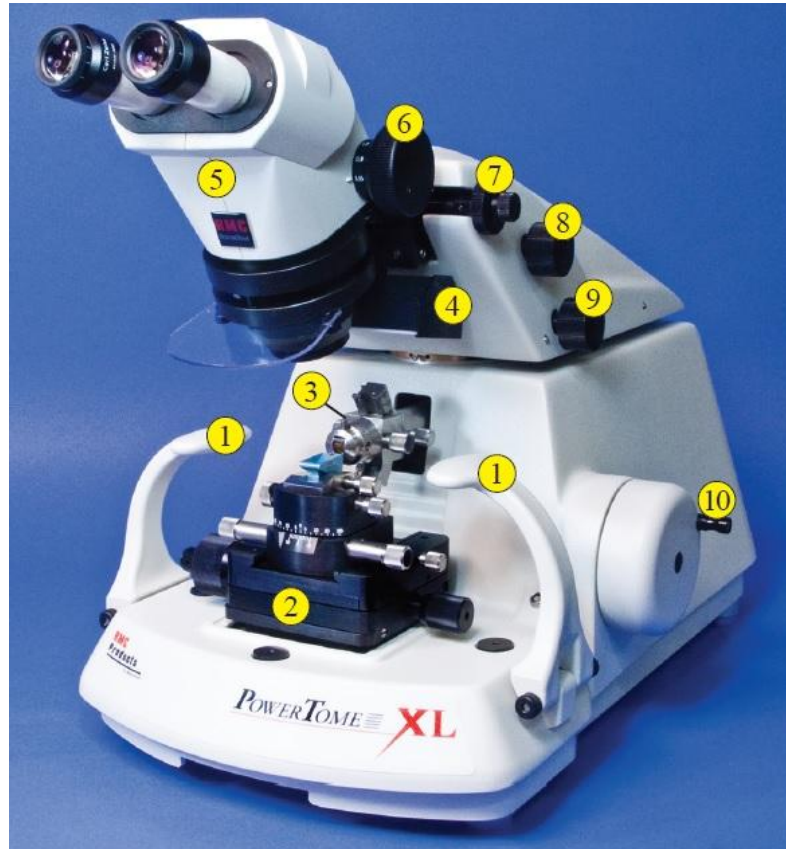


Figura 1.17: Componentes del ultramicrotomo Power Tome XL. 1. Descanso de brazo, 2. Porta cuchilla, 3. Montura de la muestra, 4. Sistema de iluminación superior, 5. Estereomicroscopio, 6. Tornillo de zoom, 7. Tornillo de enfoque, 8. Tornillo de ajuste de distancia. 9. Tornillo de movimiento del vehículo, 10. Rueda de corte (Products).

Las principales características con las que todos los dispositivos cuentan son:

Un brazo porta bloques cuya función corresponde a la aproximación sucesiva hacia el borde de la cuchilla. Un sistema de avance del brazo, que se mueve en el intervalo de producción de cortes. Un contenedor lleno con agua para recolectar las secciones, el cual se encuentra pegado a la cuchilla de vidrio. Un estereomicroscopio binocular con luz fluorescente (Dykastra & Reuss, 2003).

1.8.1 Partes del ultramicrotomo

Rueda de corte: Es la encargada de hacer girar al brazo con un movimiento de arriba abajo en cada rotación, ocasionando un avance paulatino del brazo hacia la muestra. El movimiento hacia arriba corresponde a la mitad de la retracción del brazo. Generalmente, los brazos se retraen una mínima de 80 mm durante esta parte del movimiento. En el caso de que se deje colocada la rueda en cualquier parte del movimiento hacia arriba, el dispositivo advertirá al usuario por medio de dos bips cada diez segundos para recordar que la rueda se encuentra en una posición retractada y por lo tanto, no se debe mover por ninguna razón la cuchilla hacia el espécimen. La amplia retracción del brazo asegura que no se tome agua del bote en el movimiento hacia arriba aunque se estén realizando cortes finos. El movimiento de la rueda hacia abajo el brazo se extiende hacia afuera para realizar el corte que es depositado en el bote (Products).

Soporte superior: Otro elemento es el soporte superior o vehículo, el cual se desliza de adelante hacia atrás directamente sobre el soporte posterior y es sujetado firmemente en su posición por medio del tornillo de ajuste lateral. Esta característica del vehículo permite acercar la cuchilla de uno a dos mm hacia el espécimen antes de empezar el acercamiento final. Además, el soporte superior puede rotar 360° mientras se encuentre sujetado al porta vehículo permitiendo al usuario ajustar el soporte a cualquier posición y observar el filo posterior de la cuchilla. Existen dos tornillos de rotación localizados en cualquiera de los extremos del vehículo permitiendo un ajuste rotacional preciso de la cuchilla con el espécimen. El tornillo pequeño en el lado izquierdo del soporte superior es el tornillo de ajuste del ángulo de la cuchilla, el cual debe ser ajustado de acuerdo al tipo de cuchilla a usarse. En caso de ser una cuchilla

de vidrio el ángulo seleccionado deberá ser 4° y para la cuchilla de diamante el ángulo se encuentra escrito en la caja de almacenamiento, comúnmente oscila de 4° a 6° (Products).

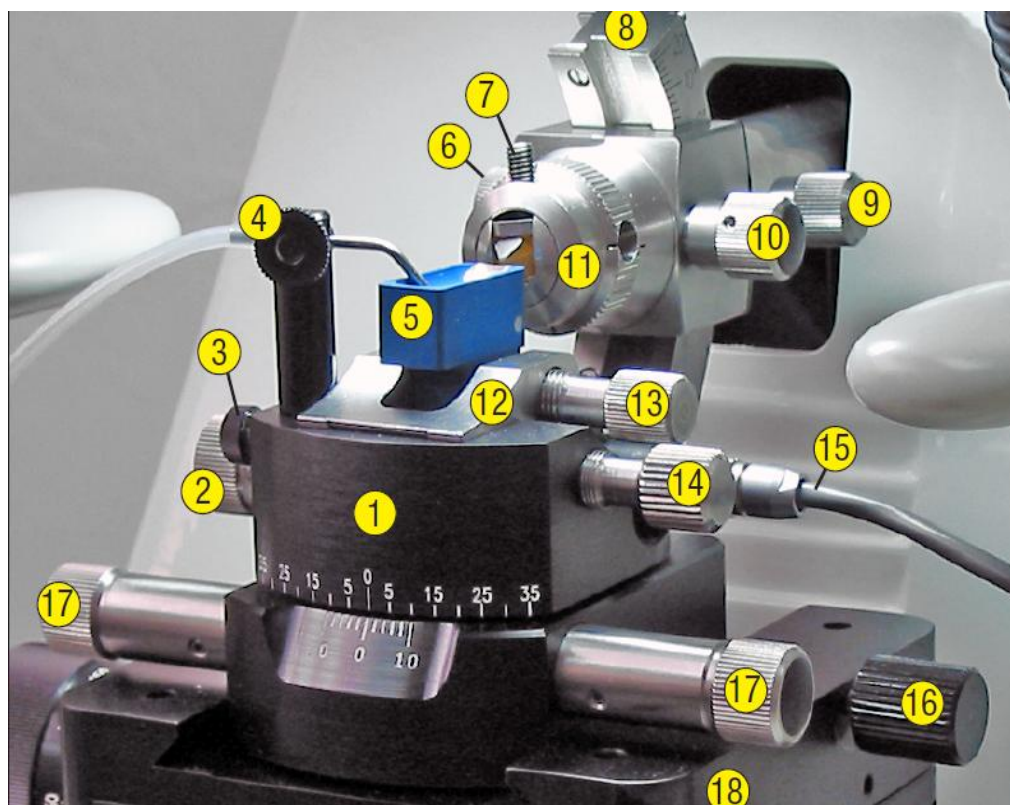


Figura 1.18: Partes del porta muestras y sistema de control de avance. 1. Vehículo. 2. Tornillo de ajuste del ángulo de la cuchilla. 3. Tornillo de presión del bote. 4. Dispositivo para llenar el bote (móvil). 5. Cuchilla de diamante. 6. Tornillo de control de inclinación de la montura del espécimen. 7. Tornillo de ajuste del espécimen. 8. Arco de montura segmentado. 9. Tornillo de ajuste de la montura. 10. Tornillo de rotación del arco. 11. Soporte del espécimen. 12. Soporte de la cuchilla. 13. Tornillo de presión de la cuchilla. 14. Tornillo de presión del soporte de cuchilla. 15. Cable de luz posterior. 16. Tornillo de ajuste del vehículo. 17. Tornillo lateral de control de inclinación del vehículo. 18. Porta vehículo o soporte posterior (Products).

Soporte posterior: El soporte posterior o porta vehículo tiene incorporado un sistema especial de rodillos para maximizar la estabilidad y precisión de avance hacia adelante y atrás por medio del movimiento de los tornillos fino y grueso que acercan la cuchilla hacia la muestra. Todos los ultramicrotomos cuentan con tres rangos de control de avance: un control grueso de ajuste para la alineación inicial, un control

fino de avance para obtener secciones para ser visualizadas en el microscopio óptico y un control ultrafino de avance para secciones ultra delgadas (Reid, 1977). El control grueso de avance es usado para mover la cuchilla hacia el brazo con el espécimen, pero para lograr cortes ultrafinos usualmente es el brazo el que avanza hacia la cuchilla por medio de un sistema mecánico o térmico. El tornillo de control de avance grueso es el más grande de los dos tornillos y presenta marcas graduadas que son medidas en micrómetros (μm). La rotación en sentido horario ocasiona que la cuchilla se aleje de la muestra en caso de que se quiera retirarla. Mientras que la rotación antihoraria acerca a la muestra para efectuar la alineación de la cuchilla previa al corte. Una rotación completa del tornillo de avance grueso equivale a 270 μm de viaje y el avance máximo que puede realizarse con el soporte posterior es de 8 mm: 4 mm hacia adelante y otros 4 mm hacia atrás, razón por la cual se debe prestar atención en caso de estar cerca de la muestra para no ocasionar daños en la cuchilla.

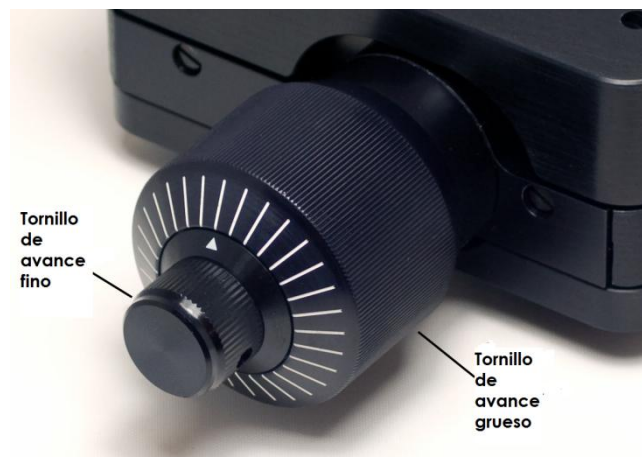


Figura 1.19: Soporte posterior. Tornillos micrométricos de control de avance grueso y fino (Products).

El tornillo de avance fino es el más pequeño, cuenta con una flecha blanca que indica la marca graduada de la posición, puede ser usada para acercamientos precisos hacia el espécimen o para igualar superficies irregulares del bloque mediante minúsculos acercamientos en cada corte. Una rotación completa del tornillo de avance fino corresponde a 25 mm de viaje o cerca de 1.0 mm por marca graduada (Products).

Consola electrónica: El sistema electrónico del ultra micrótomo permite programar la ventana de corte, el grosor (nm), la velocidad de corte mostrada en la consola electrónica el número de cortes realizados y el número de veces que la muestra ha avanzado hacia la cuchilla. La mayoría de las funciones son comunes en todos los dispositivos de corte modernos variando solamente en el sistema digital automático que lo controla. Al momento de realizar el corte se debe encender las dos lámparas de iluminación ubicadas en la parte superior y bajo la cuchilla de vidrio. Se debe establecer la ventana de corte, es decir el límite superior e inferior de contacto entre el bloque de resina y la cuchilla. En el panel de la consola se encienden botones para mostrar el punto en el que se encuentra el corte. Conforme avanza el brazo hacia la cuchilla, la consola marca los pasos de avance efectuados y una vez que el sistema sea detenido o iniciado se emitirá dos sonidos "beep" advertencia al operador de que el sistema ha iniciado o ha terminado el seccionamiento. La velocidad de seccionamiento es el rango en el cual el espécimen pasa la cuchilla durante un movimiento de corte y es generalmente expresada en milímetros por segundo. Esta velocidad debe permanecer constante durante una distancia específica para mantener el grosor y el tipo de sección. La fuerza de corte es proporcionada por la gravedad o por una fuerza aplicada como un motor. De tal manera que se pueden obtener diferentes velocidades

de cortes cuando se usa el efecto de la gravedad aplicando una fuerza de quiebre o por medio de la variación de la velocidad del motor (Products).

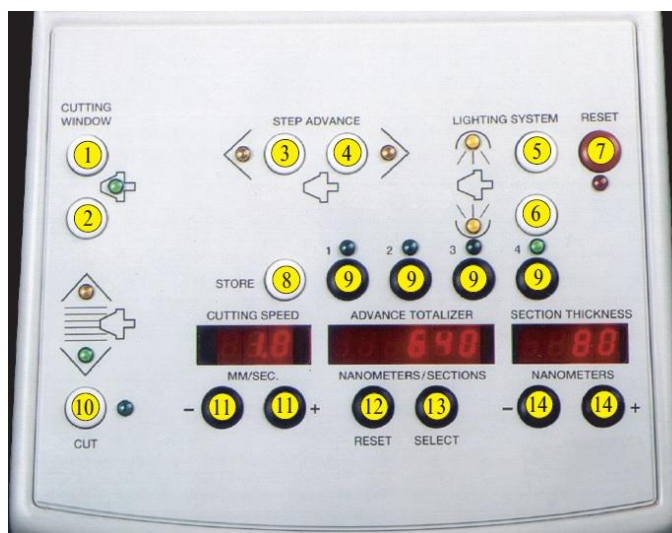


Figura 1.20: Componentes de la consola electrónica para la programación de cortes: 1. Límite superior de la ventana de corte. 2. Límite inferior de la ventana de corte. 3. Pasos de avance. 4. Retroceso de avances. 5. Iluminación superior. 6. Iluminación inferior. 7. Reseteo de datos. 8. Almacenamiento de programación. 9. Datos almacenados. 10. Obtención de corte. 11. Selección de velocidad (mm/seg). 12. Reseteo de avance total. 13. Selección del avance total. 14. Selección del espesor (Products).

1.8.1. Formación de secciones

La producción de cortes se obtiene a partir de cualquier tipo de muestra biológica o materia inerte por medio del ultramicrotomo, el cual debe mantener un movimiento de avance del brazo y velocidad constante. A medida que se producen los cortes, el brazo avanza hacia la cuchilla, movimiento que es equivalente al espesor de la sección. A su vez, la velocidad de corte puede regularse manualmente o automáticamente para que se produzca el seccionamiento. Durante el corte tanto la muestra, la cuchilla y el ultramicrotomo están sometidos a condiciones de estrés lo que

puede causar distorsiones, los cuales tras un periodo de tiempo vuelven a relajarse. Al momento de realizar el seccionamiento, la cara frontal del bloque con el espécimen se encuentra comprimida y cuando ya no se encuentra en contacto con la cuchilla, esta cara se expande. La cantidad de expansión depende del intervalo de tiempo que ha transcurrido antes de que la cara tope nuevamente la cuchilla. El contacto con la cara del bloque en donde se encuentra el espécimen causa una ligera vibración en la punta de la cuchilla y si el siguiente corte es realizado muy rápido, estas vibraciones pueden no desaparecer generando daños en el bloque (Reid, 1977).

Por otro lado, las fuerzas desde la punta hacia el espécimen causan que una fina capa del material se desprenda y al topar la cuchilla la sección se dobla. Para lograr estirar el corte sin ocasionar daños, se cuenta con una superficie líquida para rotar. Idealmente, el corte mantendrá el tamaño y forma de la cara del bloque de donde fue desprendido con un espesor igual al avance del espécimen hacia la cuchilla. No obstante, en la práctica existe deformación mostrada como una reducción del corte en la dirección del seccionamiento junto con el aumento del espesor. En la ultramicrotomía la variación del ángulo de la cuchilla y el ángulo de rozamiento afectará la cantidad de estrés introducido en el material y por lo tanto variará la calidad de los resultados. Otros factores que afectan la calidad del seccionamiento son la velocidad de corte, la temperatura, y la agudeza de las cuchillas. Las variaciones de temperatura en la región de la cuchilla y el bloque de espécimen son críticas pues pueden generar retracción o expansión en varias partes del ultra micrótopo. La alteración de la temperatura puede ser causada por el contacto directo del operador con las partes del dispositivo o por respiración sobre el área de seccionamiento. Todos estos factores afectarán la reproductibilidad del espesor de los cortes y por ello deben

ser evitados en la manipulación o manteniendo un movimiento regular de corte para obtener secciones uniformes (Products).

Por esta razón, los ultramicrotomos actuales como el Power Tome XL, mostrado en la figura 1.17, cuentan con un dispositivo automático de avance de la cuchilla hacia la muestra, capaz de mantener la velocidad de corte para obtener secciones con igual espesor y sin ocasionar daños en la cuchilla o en el sistema. Además mantienen al operador sin tocar el dispositivo para evitar vibraciones. Sin embargo, a pesar de ser un proceso mecánico, el operador debe alinear el trapecio tallado en la punta de la resina con la cuchilla de vidrio para evitar errores que afecten la calidad de los cortes como arrugas, visualizadas posteriormente como bandas que varían el contraste en el TEM (Products).

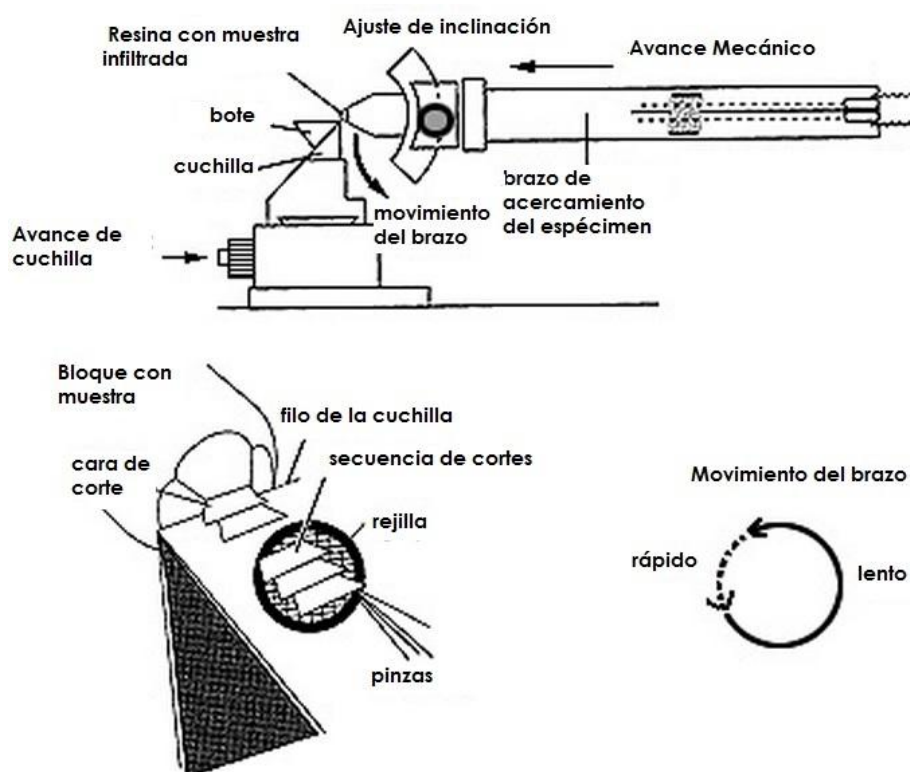


Figura 1.21: Ilustración de la formación de la cinta de secciones en el ultramicrotomo por medio de pasos repetitivos y precisos que avanzan para formar secciones que son depositadas en un contenedor con agua y son

recogidas con una pinza en una rejilla metálica. El brazo mecánico se mueve lentamente mientras corta y avanza rápidamente para continuar con el seccionamiento.

El primer contacto entre el bloque de muestra y la cuchilla es el más importante pues si no se toman las medidas pertinentes ambos pueden resultar lesionados definitivamente. La velocidad de corte también es importante y variará de acuerdo a la naturaleza del espécimen; la velocidad inicial no debe ser muy lenta o el líquido cubrirá el borde antes de realizar el primer corte. Se utiliza una velocidad de corte de 2-3 mm por segundo para empezar y posteriormente se varía la velocidad de acuerdo al espesor que se desea obtener y al tipo de material usado. Cuando se cortan especímenes suaves se estudió la importancia de emplear altas velocidades de corte para desprender la primera sección y reducirla conforme se produce la cinta de secciones. Para cortes ultrafinos, una vez que se obtenga el primer corte se debe poner atención para que se produzca un corte cada vez que se pongan en contacto el bloque y la cuchilla; caso contrario el bloque rasgará de a poco el filo de la cuchilla (Reid, 1977). Por último, las secciones son depositadas en el bote y flotan libremente en la superficie del líquido por lo que el filo de la cuchilla debe mantenerse en contacto con el agua para que se produzca la cinta de secciones como se muestra en la figura 1.21.

1.8.2. Espesor de las secciones

Para obtener secciones ultra delgadas son tres factores los que deben considerarse: el tamaño de la cara del bloque, la calidad de la infiltración y la calidad de las cuchillas de vidrio. Además, como ya se ha mencionado, mediante el uso de este dispositivo es posible obtener cortes finos, semifinos y ultrafinos. Las secciones finas tienen un espesor de 50 a 100 nm y resultan adecuadas para la observación en el

TEM. Las secciones semifinas constan de un espesor de 0,5 a 2 μm y ayudan a la localización de la muestra en el Microscopio Óptico antes de realizar secciones ultrafinos. La razón por la cual las secciones deben ser extremadamente delgadas es porque los electrones acelerados de 50 a 250 kV de un Microscopio Electrónico estándar no pueden penetrar un material biológico con un espesor que sobrepase los 150 nm. De hecho, para contar con una buena resolución de las imágenes los cortes deben estar dentro de un rango de espesor de 30 a 60 nm, equivalente a un cabello humano de un grosor de 0,1 mm cortado en 2000 secciones o una célula sanguínea en 100 (Bozzola & Russell, 1999). Para la visualización en el TEM, se examina más de una sección pues una sola sección únicamente provee información en dos dimensiones y se requiere contar con toda información fiable en tres dimensiones. Ventajosamente, esto no es un problema pues el ultra micrótomo brinda una cinta de cortes que se adhieren la una a la otra por medio de sus filos que al ser observados se aprecia la secuencia de corte y la coloración que presentan cuando están flotando en el agua. Esta coloración ocurre cuando la luz se refleja tanto en la superficie de las secciones como en el borde de las ondas del agua que se mueven, produciendo colores de interferencia relacionados con el espesor y el índice refractivo del material (Reid, 1977).

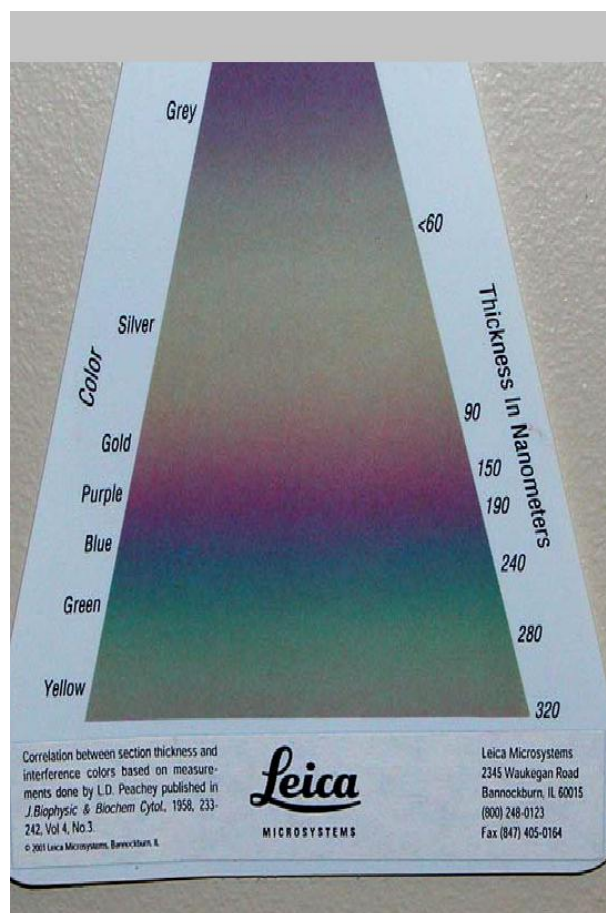


Figura 1.22: Relación entre el espesor y la coloración de secciones. Correlaciones realizadas por L.D Peachey en 1958 (Moddla, 2012).

Sin embargo, aunque en el ultramicrotomo se controle el espesor de las secciones, el verdadero espesor de las secciones debe ser determinado de acuerdo a los colores de interferencia. Cuando la luz blanca es reflejada debajo de la sección y sobre la misma, la luz es diferenciada lentamente dependiendo del espesor de la sección y consecuentemente la fase de la luz va a cambiar. Estas ondas emergentes, van a interferir con aquellas ondas reflejadas de la superficie del agua. Así es posible determinar el espesor por medio de una carta de interferencia, la cual muestra un espectro de coloración relacionado con el espesor del corte obtenido de acuerdo al tipo de material. En este caso de la resina epoxy con un índice de refracción de 1.5

(Moddla, 2012). Por su parte, los colores son observados claramente sólo cuando la luz es reflejada directamente sobre la superficie y variará ligeramente dependiendo del ángulo en el cual el corte está siendo observado; por lo que este ángulo no deberá ser mayor a 45° . El color de interferencia sirve como índice aproximado del espesor, la escala utilizada en la tabla 1.2 es aplicable para todo tipo de resinas (epoxy, poliéster y metacrilates) con un índice de refracción cercano a 1.5

Tabla 1.2: Índice de interferencia de color continuo. Escala de visualización de grosor de secciones (Moddla, 2012).

Color	Espesor aproximado (nm)
Gris	60
Plateado	90
Dorado	150
Morado	190
Azul	240

Debido a que los colores de interferencia forman un espectro constante en lugar de mostrar colores por separado, la escala que se utiliza es una guía para el espesor que debe ser interpretada por el operador (Hayat, 2000).

1.8.3 El Ultramicrotomo en la historia

Ante la necesidad de contar con secciones más finas para la observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión, a lo largo de la historia se han realizado cambios en el mecanismo del micrótopo desarrollándose así los hoy conocidos ultra micrótopos. Empezando en 1939 con Von Ardenne, quien intentó obtener secciones suficientemente delgadas mediante un micrótopo rotatorio para producir cortes que puedan ser penetrados por el haz de electrones. Poco a poco se realizaron diferentes diseños en distintos laboratorios hasta destacar la idea de reducir el tiempo de contacto entre la cuchilla y el bloque con la muestra, de tal manera que sea menor la tensión en la sección. Siguiendo esta teoría O'Brien y McKinley en 1943, Fullam y Gessler en 1946, realizaron dos micrótopos de alta velocidad usando una rasuradora como el filo de corte y un brazo que sostiene el bloque de muestra con rotaciones a alta velocidad ocasionando que las secciones fueran lanzadas en todas las direcciones dificultando su recolección. Pese a los cambios en el dispositivo, esta idea fue abandonada al presentarse nuevas técnicas de embebimiento para reducir la velocidad de corte, motivando a la creación de nuevos diseños en los instrumentos (Reid, 1977).

En 1957, el profesor Huxley elabora el ultra micrótopo Mark 1 operado de manera manual y empleando un mecanismo de avance mecánico, en donde el brazo de la muestra está adaptado para alinear la muestra con la cuchilla. Posteriormente, se realizan cambios a los instrumentos para mejorar la velocidad de corte y permitir que el brazo de corte sea manipulado lentamente para obtener cortes sin arrugas ni daños. En 1960, la empresa suiza LKB entra al mercado comercializando el dispositivo Ultratome I, el cual dispone de un avance mecánico con un brazo retractado magnético que permite cortes de un solo paso (Dykastra & Reuss, 2003).

En 1962, Sorvall Porter-Blum después de realizar cambios en diseños ya presentados previamente, desarrollan el primer ultra micrótopo con una lámpara de tungsteno de 60 W ajustada sobre el porta muestra para generar un avance térmico. Dos años más tarde se modifica este funcionamiento y se crea una versión automática obteniendo un sistema de movimiento del brazo mecánico que regula la velocidad de corte de 0.09 mm a 3.2 mm por segundo. Luego, en 1964 aparece en el mercado el Reichert OM-U2 con un sistema de avance térmico automático modificado con una unidad de ajuste de la ventana de corte y de la velocidad. Finalmente, LKB presenta el Ultratome III que incluye un novedoso arreglo de luces, incorporando lámparas incandescentes y fluorescentes una tras la cuchilla y otra sobre el porta muestra. En la década de 1970, se vieron una serie de modificaciones en los ultramicrotomos enfatizando en una mejor estabilidad mecánica debido a la introducción de la técnica de crioultramicrotomía, abandonando así el avance térmico por el mecánico.



Figura 1.23: Ultramicrotomo Cambridge Huxley Mark 2 (LXB Huxley). Incorpora un motor bajo el dispositivo y el microscopio descansa sobre la mesa con opción de movimiento hacia adelante y atrás.

La Mark II es entonces comercializada ya con sus modificaciones por la empresa LKB Huxley. El principio de funcionamiento es el mismo que la Mark I, pero contiene un motor en la base del instrumento, de tal manera que el brazo del espécimen puede ser operado automáticamente. Así, el motor levanta al brazo del espécimen hacia arriba y luego es desconectado durante el movimiento hacia abajo para evitar vibraciones (Reid, 1977). Hasta 1980 se habían presenciado importantes variaciones en los dispositivos de corte, no obstante Du Pont en 1985 desarrolla su línea de productos RMC y Cambridge Instruments compra los productos de Reichert y LKB.

Finalmente, es en 1990 que Leitz adquiere de Cambridge Instruments ultramicrotomos, creando la hoy conocida marca Leica (Dykastra & Reuss, 2003). Los ultramicrotomos actuales mantienen el mismo principio de corte, los cambios aplicados en modelos antiguos radican en:

- Contar con un sistema de avance lineal térmico o mecánico y de unidades integradas para el amortiguamiento de la vibración.
- Emplear mecanismos de corte manual o automático con una velocidad automática de corte de hasta 0.1 mm/s.
- Contar con un sistema de fácil operación a través de consolas electrónicas para la obtención de cortes de distintos espesores.
- Estar dotados de un óptimo sistema óptico para alinear de forma precisa la muestra embebida en la resina con la cuchilla de vidrio o diamante (Hernández, Prin, & Rojas, 2010).

1.8.5. Desarrollo de la cuchilla de vidrio

Los ultramicrotomos fueron diseñados para cortar secciones ultrafinas, una gran parte a partir de cuchillas de diamante. En la historia, Latta & Hartmann fueron los pioneros, en el año de 1950 al crear un sistema de corte de cuchillas a partir de vidrio que contaban con bordes _los para cortar secciones ultrafinas. Tres años más tarde para mejorar este mecanismo Fernández utiliza cuchillas de diamante dotando de un filo de corte más preciso y capaz de cortar materiales duros. Con el paso del tiempo, se fueron creando sistemas, como es el caso de Van Iterson, quien añade a la cortadora unas pinzas que presionen la tira de vidrio y realizan el corte. Nutcracker también inventa un dispositivo donde el vidrio es retenido entre dos bisagras con puntos de presión. Al mismo tiempo, una cortadora de vidrio japonesa empieza a ser comercializada, conteniendo una tira de vidrio de 100 mm colocada entre dos paneles de goma en la base del instrumento y fijada en posición por un soporte principal, un diamante traza una línea de corte y un tornillo de rotación quiebra el vidrio. La primera tira se quiebra a la mitad y esta mitad en la mitad, hasta lograr cuadrados perfectos, los cuales son cortados diagonalmente para obtener triángulos (Kuhlmann, 2008).

Finalmente, Biddlecome en 1971 toma el diseño Japonés modificando el soporte de las tiras de vidrio para que el cuadrado final de 38 mm que producía dos triángulos sea un cuadrado de 25 mm que obtenga dos triángulos isósceles. La cortadora LKB KnifeMaker mantiene el último mecanismo pero en lugar de usar diamante para trazar la línea de corte usa carburo de tungsteno. Es así que a partir del principio aplicado en instrumentos desarrollados en el anterior siglo, se han construido las hoy llamadas “Knife-Makers” a partir de vidrio y con una rueda de diamante

(Figura 1.24), pero manteniendo también la cuchilla de diamante para materiales duros o para obtener cortes más precisos (Reid, 1977).



Figura 1.24: RMC cortadora de cuchillas

1.8.6. Evaluación de las cuchillas de vidrio

Las buenas secciones nunca pueden ser obtenidas a partir de una cuchilla de vidrio en malas condiciones, por lo que es necesario examinar la calidad del filo de la cuchilla en seco. En el estereomicroscopio del ultra micrótopo el operador puede observar una banda de luz clara y continua en todo el borde si la cuchilla no contiene imperfecciones. Caso contrario se deben descartar las cuchillas que presenten irregularidades, hendiduras, astillas, prominencias o partículas adheridas. Otro factor clave es la agudeza del filo, relacionada con el radio de la curvatura pues al momento de existir un defecto en el filo de corte, la agudeza de la cuchilla no será la misma y la sección será marcada por arrugas. Resulta prácticamente imposible no tener estos

defectos, por lo que es de importancia conocer la parte de la cuchilla que puede ser usada y manipulada al momento de colocar el bote. En la figura 1.25 se detalla la línea de stress, la cual ayuda como separación de la zona de agudeza para el corte de la región que contiene irregularidades y defectos. Esta región delimita el lugar donde empezó la ruptura del vidrio y a partir de donde se redujo la velocidad de corte. La cantidad del filo disponible dependerá del ángulo y del método de corte empleado. Sin embargo, el área con defectos puede ser usada para cortes gruesos o para el tallado de la pirámide en la punta de la resina. Por otro lado, se debe considerar la rectitud del filo aunque este factor no afecte a la agudeza, debido a que puede dificultar el alineado para e seccionamiento (Reid, 1977).

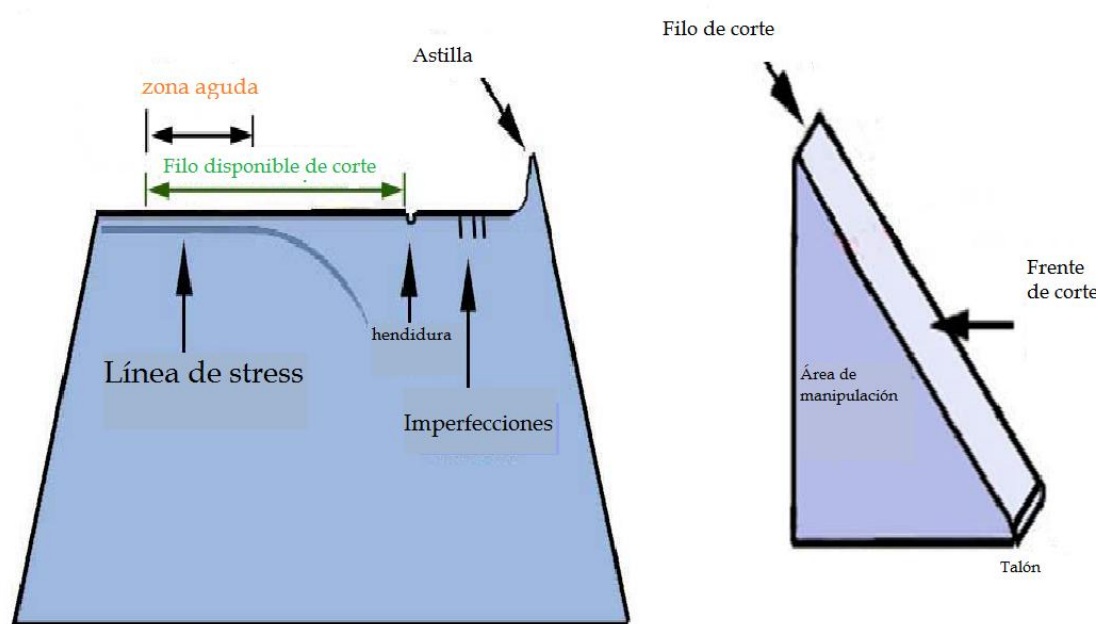


Figura 1.25: Diagrama de representación del borde de una cuchilla de vidrio. La línea de stress indica el lado en donde se dio el quiebre. A partir de este punto hacia la derecha aumentan las irregularidades (Moddla, 2012).

La humedad es otro factor que afecta también a la cuchilla por lo que debe siempre mantenerse en contacto con el agua. Para conseguir este propósito se coloca un dispositivo denominado bote que puede ser de plástico o de cinta adhesiva. El bote hace posible que las secciones floten en la superficie del líquido siendo pegado en el lado frontal de la cuchilla. Para colocar el bote, el costado del mismo debe formar un ángulo de 90° con el filo de la cuchilla (Figura 1.26) y no debe sobrepasarla, caso contrario la muestra puede topar el bote e interrumpir el proceso de seccionamiento (Reid, 1977).

1.8.7. Cuchilla de diamante

La cuchilla de diamante es una herramienta de corte con características superiores a la cuchilla de vidrio debido a la naturaleza dura del diamante que provee a la cuchilla de un filo de corte preciso, agudo y que no se daña fácilmente. La mayoría de cuchillas son sometidas a procesos especiales para presentar un filo hidrofílico, capaz de atraer el agua hacia el filo para mantener un nivel apropiado y una superficie de menisco para el seccionamiento (Tech, 2012.). En el mercado, se encuentran disponibles algunas presentaciones de estas cuchillas de acuerdo al grosor del filo y al diseño del bote (Figura 1.26a) y al igual que la cuchilla de vidrio precisa de un ángulo para realizar cortes de un determinado espesor (Diamond knives, 2013).

Existen dos tipos de ángulos importantes en el seccionamiento: el ángulo característico de cada cuchilla y el ángulo de inclinación en el ultra micrótomo (Tech, 2012.). La cuchilla de 45° , es usada para el seccionamiento de rutina de materiales duros y quebradizos. La cuchilla de 35° es usada para cortar materiales industriales

suaves como metales y polímeros. Es recomendable cuando se requiere reducir la compresión en el corte para mantener al mínimo los daños morfológicos de la muestra y para obtener secciones con superficies más suaves. El rango óptimo de grosor de las secciones con cuchillas de diamante es de 30 a 150 nm (Diatome, 2011). La cuchilla de diamante a pesar de ser de un material extremadamente duro puede presentar lesiones en el borde, razón por la cual nunca debe ser rozada con ningún tipo de material (Kuhlmann, 2008).

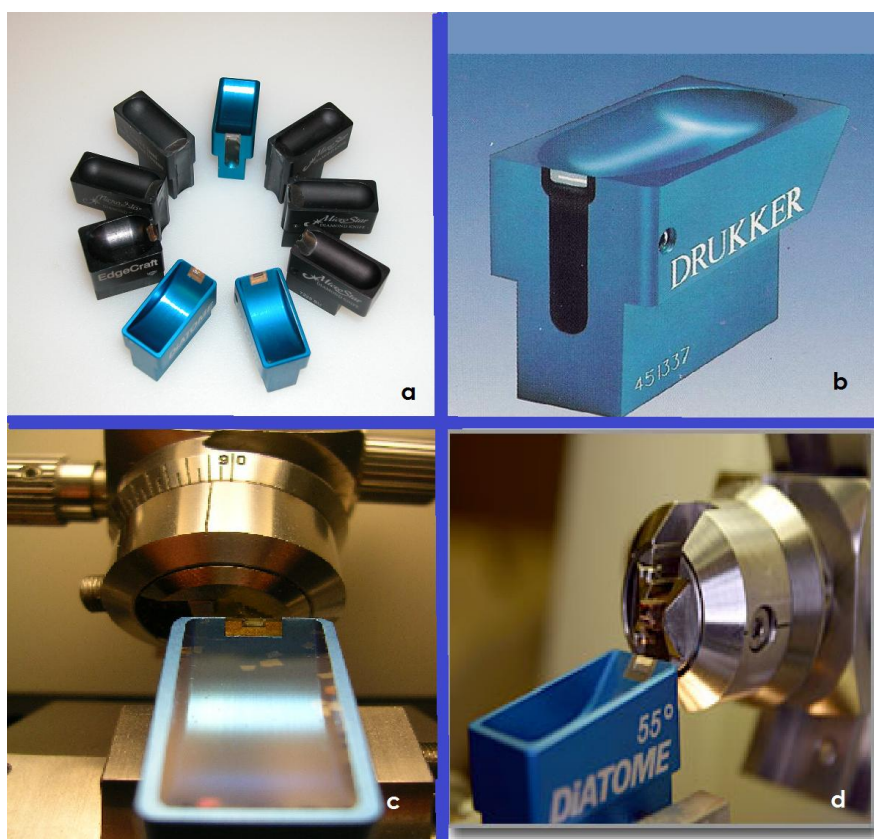


Figura 1.26: Representación de las cuchilla de diamante para realizar cortes en el ultramicrotomo. A, B. Diferentes diseños de botes incorporados disponibles en el mercado. C. Bote lleno de agua para recoger las secciones. D. Seccionamiento con la cuchilla de diamante (Diatome, 2011) (Arnold, 2013)

Limpieza de la cuchilla de vidrio Una cuchilla de diamante limpia es necesaria para evitar partículas adheridas al borde que pueden dificultar el seccionamiento creando puntos de estrés e imperfecciones en la cuchilla. El método ideal de limpieza de la cuchilla no debe requerir el contacto directo del borde con ningún sólido. Se recomienda el uso de dos herramientas: un atomizador de aire y agua destilada con 10% de detergente líquido sin amoníaco. Otras soluciones que pueden ser usadas también son el alcohol isopropílico o acetona al 25 %. Sin embargo, para minimizar daños, el operador debe enjuagar la cuchilla con agua destilada después de realizar los cortes, antes de que el agua se seque o que partículas se adhieran a la cuchilla y secarla con el atomizador de aire (Tech, 2012.).

1.8.8. Tallado de la resina

El tallado es el proceso en el cual se forma una figura que embarca el espécimen de interés para facilitar el seccionamiento y minimizar rupturas de la cuchilla. Generalmente se realiza un trapecio o una pirámide truncada. El trapecio tallado presenta algunas ventajas: hace que la orientación de la cuchilla con el bloque de la resina sea más sencillo, minimiza las fuerzas compresivas en la muestra mientras se realiza el seccionamiento, y facilita el seccionamiento seriado puesto que el trapecio tiene lados inclinados ocasionando que las secciones sean más grandes a medida que se profundiza en el corte de la muestra. La base del trapecio es la primera línea de contacto con el borde de la cuchilla de vidrio o diamante antes del seccionamiento, razón por la cual la muestra y la cuchilla debe ser paralela con el borde superior para reducir la presión en la muestra. Los lados del trapecio deben presentar la misma inclinación, 40° a 60°, para obtener una cinta de secciones uniformes y el alto de la pirámide debe ser moderado para obtener mayor cantidad de secciones. La

herramienta que se utiliza para formar esta figura es una cuchilla de metal, con un filo agudo que posibilite el corte en el polímero. Es recomendable no realizar el tallado por más de tres veces con la misma cuchilla y siempre realizar la base del trapecio con una cuchilla nueva pues tras realizarse los cortes se depositan partículas de metal en el bloque que rasguen las secciones (Tech, 2012.).

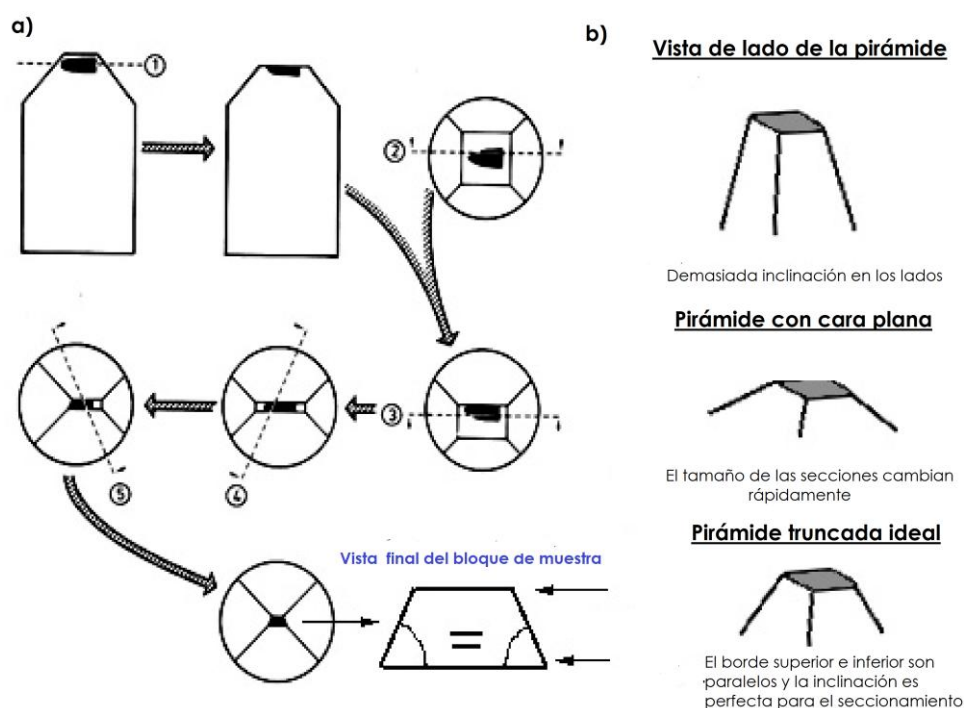


Figura 1.27: a) Representación de los pasos del tallado del bloque de resina por medio de una cuchilla de metal. b) Posibles pirámides que pueden ser obtenidas, la forma ideal es la pirámide truncada (Diamond knives, 2013).

El ultramicrotomo tiene un soporte específico para realizar el tallado que sujeta al bloque con el espécimen, se cambia a 10° en la inclinación de la montura del espécimen y se utiliza la cuchilla de vidrio para formar el trapecio. Anteriormente se mencionó las partes del borde de la cuchilla ideales para el seccionamiento, de igual manera se puede utilizar el borde de la cuchilla, en este caso el extremo izquierdo, no apropiado para el seccionamiento pero ideal para el tallado en caso de no contar con

cuchillas metálicas para este propósito. El dispositivo cuenta con un sistema para girar el soporte 180° e ir cortando los lados de la pirámide para que el operador pueda visualizar con mayor precisión por medio de los binoculares del estereomicroscopio (Tech, 2012.)

1.8.9. Alineación de la cuchilla de vidrio con la resina

La alineación es uno de los pasos más importantes y precisos que deben ser realizados, con el objetivo de formar una superficie reflectiva y paralela con la cuchilla de vidrio (Moddla, 2012). Las partes del ultramicrotomo vinculadas con este proceso son: el ángulo de inclinación de la cuchilla, la inclinación de la montura del espécimen y inclinación del espécimen en la montura. El ángulo de inclinación es el ángulo entre la cara posterior de la cuchilla y la cara del bloque con la muestra. El ultramicrotomo presenta un tornillo de rotación para modificar el ángulo de inclinación entre 0° a 15°. Para el seccionamiento se recomienda usar ángulos entre 2° a 10°, caso contrario una inclinación mayor a 10° aplicará demasiado estrés en el borde de la cuchilla y presentará daños que requieran cambios de cuchilla frecuentes. Por otro lado, una inclinación menor a 2° dificulta el seccionamiento y causa achatamiento de la muestra debido a que la cuchilla choca con la cara del bloque (Tech, 2012.).

El ángulo sugerido para la inclinación de cuchillas de diamante es 6° y para cuchilla de vidrio es de 3° debido a que el diamante al ser más preciso no necesita de tanta inclinación en comparación con el vidrio. Si la cara del bloque es alineada correctamente con el filo del vidrio, se obtendrá una sección completa que contenga la

resina y sin realizar muchos movimientos del brazo. Además se proyectará en la cara de la resina una sombra en el caso de utilizarse una cuchilla de vidrio o una línea para la cuchilla de diamante que ayuda a observar si la cuchilla se encuentra alineada correctamente. La inclinación de la montura del espécimen ocasiona que la resina se encuentra a diferente nivel con respecto al borde de la cuchilla por lo que debe regularse a 0° para asegurar que se cumpla este fin (Figura. 1.27a). De igual manera, la inclinación del espécimen en la montura permite alinear la base del trapecio con el borde de la cuchilla de vidrio para que todas estas líneas sean paralelas las unas a las otras, esto se realiza manipulando el tornillo de ajuste de la montura (Figura 1.27b) (Moddla, 2012).

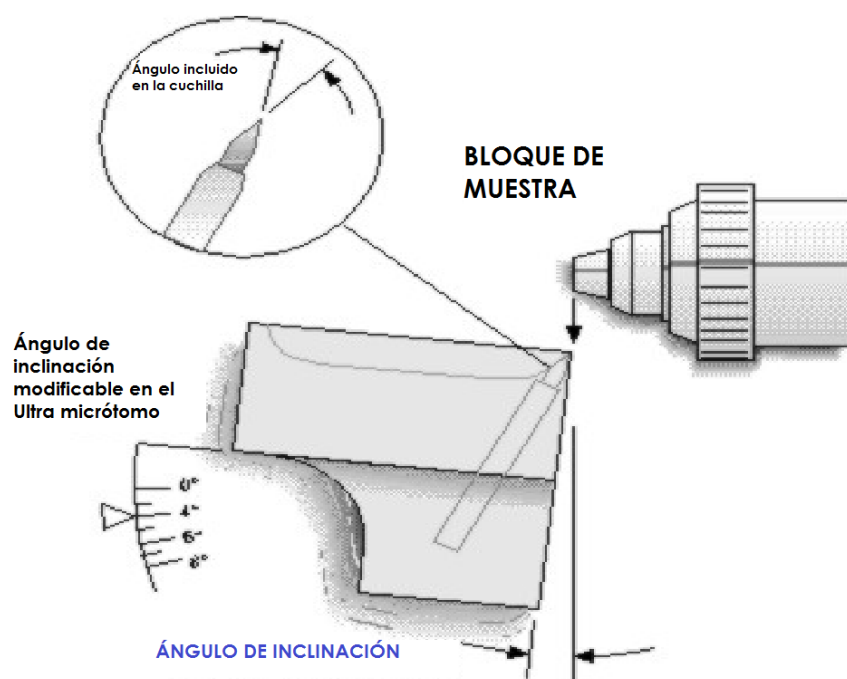


Figura 1.28: Ángulo de inclinación necesario para la alineación de la cuchilla de vidrio con la resina (Tech, 2012.).

Las consideraciones que deben ser tomadas en cuenta para evitar errores de alineación son:

- **El acercamiento en el ultramicrotomo:** El filo de la cuchilla y la cara del bloque de resina pueden ser observados por medio de los binoculares del ultramicrotomo. Sin embargo se debe poner atención al acercamiento debido a que puede confundir al operador y ocasionar problemas en la alineación.
- **La iluminación:** Las luces fluorescentes deben ser ajustadas para que se observe el menisco y el reflejo plateado sobre el agua antes del seccionamiento y la sombra durante la alineación.
- **El enfoque:** El microscopio debe mantenerse enfocado para observarse los elementos de la alineación y el proceso de seccionamiento. Debe ser modificado en caso de que la cuchilla avance o retroceda.
- **La sombra o figura en el bloque:** Es un factor clave para la alineación puesto que muestra la localización real entre la cuchilla y el bloque de resina. Cuando la línea se inclina hacia la derecha significa que la cuchilla se encuentra muy cercana al bloque y debe ser retrocedida para lograr que se proyecte una línea paralela y viceversa (Figura 1.29c).

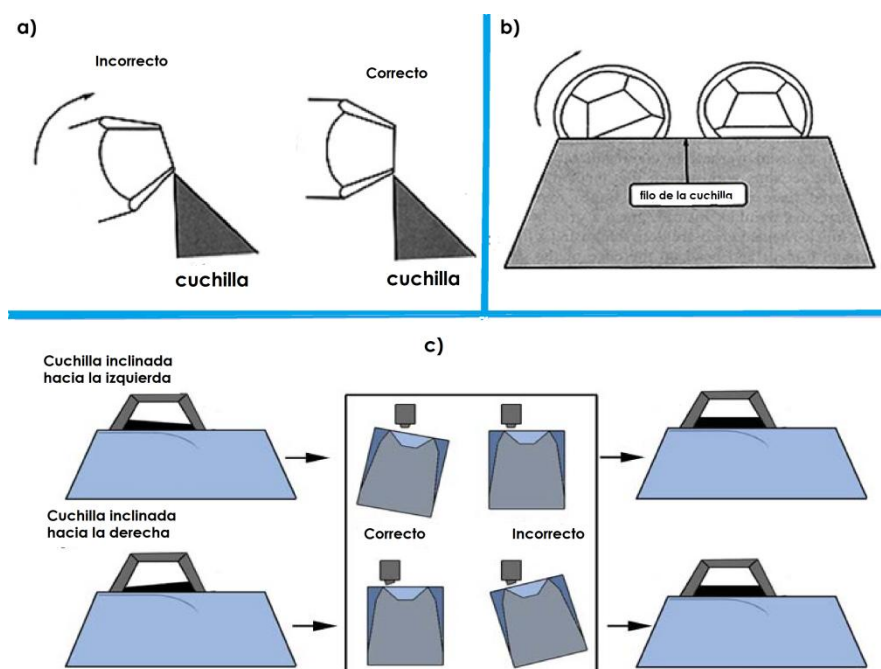


Figura 1.29: Importantes consideraciones en el proceso de alineación. a) La inclinación de la montura del espécimen debe ser modificada a 0°. b) La inclinación del espécimen en la montura alinea la base del trapecio con el borde de la cuchilla de vidrio. c) La inclinación y el acercamiento de la cuchilla pueden ser observados mediante el reflejo de una sombra en la resina que permite observar que lado de la cuchilla se encuentra más cerca del bloque (Moddla, 2012) (Diamond knives, 2013).

1.9. Daños comunes en las secciones

Líneas y estrías: Constituyen el contra tiempo más prevalente en el seccionamiento y generalmente la mayor razón para que la cuchilla de diamante se deteriore. La causa de la formación de estos dos problemas es la presencia de porciones de vidrio, impurezas en el borde de la cuchilla y mala calidad de la cuchilla (Tech, 2012.). Las impurezas son la consecuencia de una mala manipulación de la cuchilla o por no mantener las cuchillas en un estuche recolector que las proteja del medio ambiente. Es decir, si la cuchilla se mantiene en perfectas condiciones después

de su elaboración, puede evitar que las secciones presenten superficies irregulares que dificulten la observación en el TEM (Diatome, 2011).

Compresión en las secciones: Normalmente ocurre debido al proceso físico de seccionamiento. Puede ser rectificado mediante una adecuada alineación de la resina con la cuchilla de vidrio o puede darse también cuando la cuchilla de vidrio ha perdido su agudeza. Por otro lado, el ángulo de inclinación de la cuchilla puede ser el incorrecto, razón por la cual ejerce mayor presión en una de las áreas de la cuchilla. Finalmente, la compresión puede ocasionarse debido a una alta velocidad de corte que debe permanecer idealmente entre 1mm/seg a 0.5/mm/seg (Diatome, 2011).

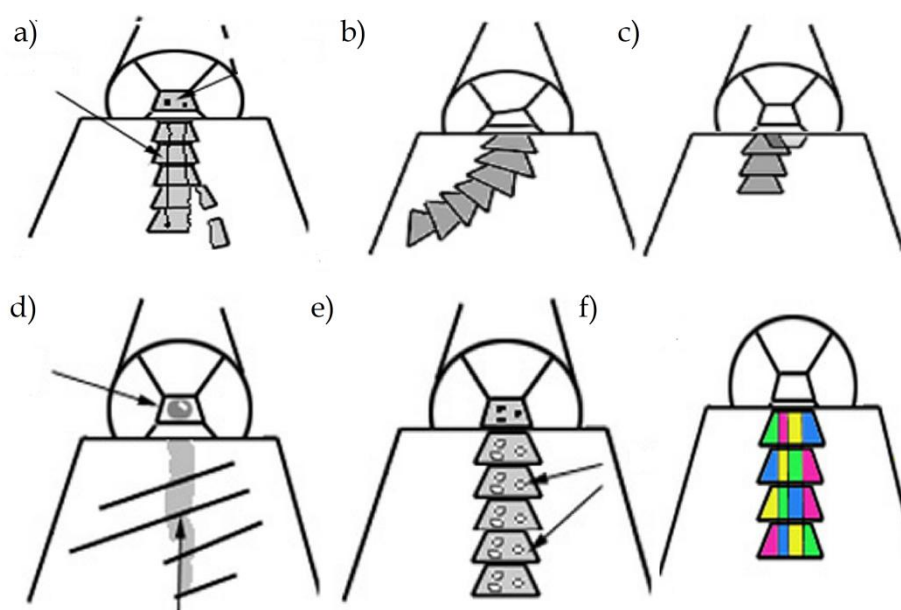


Figura 1.30: Representación de los problemas durante el seccionamiento. a) estrías formadas por una cuchilla sin filo. b) error de alineación. c) fricción de la cuchilla y la muestra. d) Humedecimiento de la muestra. e) orificios. f) variación en colores en el seccionamiento (Diamond knives, 2013).

Hendiduras: La cuchilla puede presentar un daño en el filo que ocasiona el rompimiento y rayado permanente de las secciones. Las hendiduras se producen al adherirse partículas de corte al filo de la cuchilla o debido al uso cotidiano de la misma.

Humedecimiento del bloque: La presencia de agua en el bloque de la resina puede dificultar el corte, la solución a esta problemática es reducir el nivel de agua mientras se realiza el corte y secar la punta de la resina con papel absorbente en caso de ser requerido

Orificios: La presencia de aire en el proceso de infiltración da lugar a orificios que se presentan en las secciones cortadas. En el caso de presentarse problemas de este tipo, se debe analizar el tipo de resina y proceso de infiltración empleado para reducir aire.

Variación de colores de las secciones: La manera para verificar el espesor de las secciones es por la coloración que presentan las secciones. En el caso de que los cortes no sean de igual coloración significa que el filo de corte no es igual de agudo en toda la cuchilla. En este caso, se debe mover la cuchilla por medio del tornillo de ajuste del vehículo hasta divisar secciones del mismo color.

(Diamond knives, 2013).

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

El procedimiento detallado en esta sección se realizó en el Centro de Microscopia Electrónica de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Corresponde a la preparación química establecida para el polen de tomate de árbol para de lograr infiltrar la muestra dentro de un bloque de resina que permita observa la estructura interna en el TEM.

2.1. Muestreo y extracción de polen

El muestreo consistió en recolectar aproximadamente 500 flores maduras de *Solanum betaceum* de los sectores de Selva Alegre y la Hacienda el Prado (Pichincha) y de la zona de Patate (Tungurahua).



Figura 2.1: Extracción de polen a partir de las flores de tomate de árbol apretando ligeramente el cáliz de la flor.

Las flores fueron almacenadas y transportadas en contenedores de plástico con aireación. La extracción del polen se realizó apretando ligeramente el cáliz de la flor para hacer caer el polen en un tubo ependorf hasta completar 0,5 ml (Figura 2.1). A nivel *in vitro* se sometió el polen a tres grupos de pesticidas: biológicos, ecológicos y convencionales o químicos, manteniendo un control libre de pesticidas. Cada clase de pesticida contó con dos representantes comerciales usados en Ecuador para combatir diferentes afecciones en tomate de árbol. A los pesticidas biológicos se denominaron A y B, los pesticidas ecológicos C y D y los pesticidas biológicos E y F. La dilución de cada pesticida se realizó en 2 ml de agua destilada, relacionando la dosificación de la tabla 2.1, obtenida a partir de la investigación en campo realizada por Padilla (2013)⁸.

⁸ Tesis de maestría en publicación. Ingeniero Flavio Padilla. Escuela Politécnica del Ejército. 2013. "Efectos de Pesticidas Químicos, Ecológicos y Biológicos sobre la viabilidad del polen en mora de castilla y tomate de árbol". Datos recolectados en campo con 18 pesticidas pertenecientes a los tres grupos de pesticidas empleados por lo

Tabla 2.1: Dosificación de las tres clases de pesticidas con sus representantes comerciales (Padilla, 2013).

Pesticida	Ingrediente activo	Dosificación
A	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1g/ l
B	<i>Lecanicillium lecanii</i>	1,0 - 1,5 cc/l
C	Extracto Carboxamida	300 g / ha
D	Hidroximetil Alquil N Dimetil	300 g / ha
E	Clorotalonil	2,5 - 3,0 cc/l
F	pyraclostrobin + epoxiconazol	0,5 l / ha

2.2. Germinación

Para la germinación se colocó al polen en medio de germinación compuesto por sacarosa y ácido bórico disuelto en 1ml de agua destilada (Figura 2.2) más 1 ml de los pesticidas anteriormente mencionados (Padilla, 2013). Se separó un control sin germinación y libre de pesticida al tiempo cero y otro control con germinación, pero sin pesticidas. Al cabo de seis horas en incubación a 22° C, se tomaron nuevamente muestras que representaron el polen ya germinado. Se obtuvieron un total de 6 muestras suspendidas en medio de germinación más pesticidas y dos controles con y sin germinación.

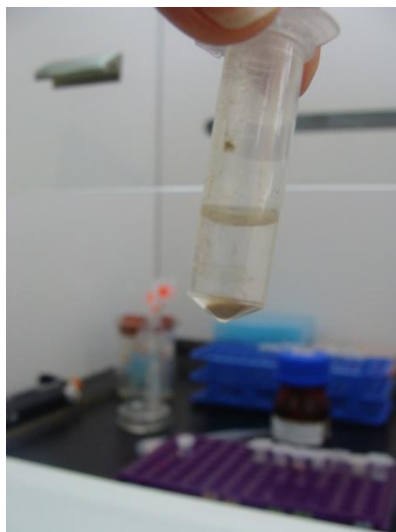


Figura 2.2: Polen suspendido en medio de germinación y pesticida.

2.3. Acondicionamiento químico

Para la observación en el TEM se siguió el protocolo de acondicionamiento químico que consiste de tres pasos fundamentales: fijación, posfijación y deshidratación. Para la fijación se tomó como base el protocolo descrito por Kuo (2007), se suspendió la muestra en glutaraldehído al 2% disuelto en buffer fosfato y tetraóxido de osmio (TOO) 1% para la pos_fijación. Finalmente, en la deshidratación se tomó como base el protocolo descrito por Kuhlmann [16], efectuando diluciones seriadas de etanol a distintos porcentajes: 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90% y 99.9% (Kuo, 2007) (Kuhlmann, 2008). Los tiempos para ambos protocolos fueron modificados, para la fijación en glutaraldehído al 2% se dejó al polen suspendido durante toda la noche, es decir 16 horas aproximadamente. Acto seguido, se llevó a cabo dos lavados en buffer fosfato y para recuperar la muestra se empleó una centrifugación por 30 segundos a 5000 rpm.

Para continuar, se realizó la posfijación en TOO durante una hora y se efectuaron dos lavados con agua destilada. Nuevamente la muestra fue centrifugada por 30 segundos a 5000 rpm. Para finalizar, la deshidratación consistió en soluciones seriadas de etanol al 30 %, 50% y 70% por 30 minutos. Posteriormente, se dejó la muestra suspendida una hora en etanol al 80% y 90 %, cada dilución fue seguida por la centrifugación durante 20 segundos a 5000 rpm. La muestra en la última dilución fue mantenida en 99.9% durante toda la noche hasta realizarse el proceso de infiltración.

2.4. Elaboración de resinas

La resina que se utilizó fue la resina Epon que se encuentra formada por cuatro compuestos químicos: Epon 812, anhídrido dodecnil succínico (DDSA), anhídrido metil ná dico (MNA) y 2, 4,6 tris (dimetil aminometil) fenol (BDMA) o a su vez por DMP 30 (Figura 2.3).

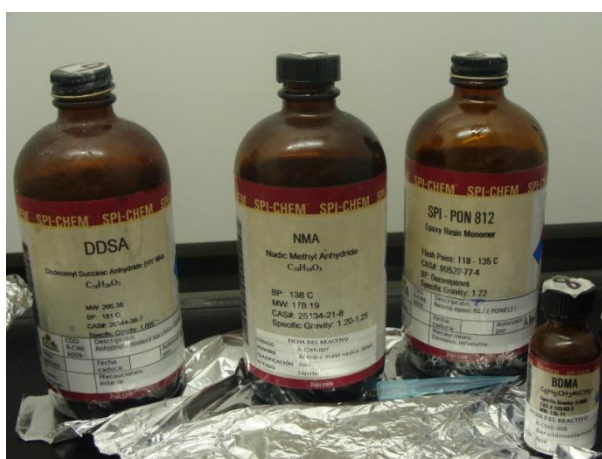


Figura 2.3: Componentes de la resina Epon: Epon 812, anhídrido dodecnil succínico (DDSA), anhídrido metil ná dico (MNA) y 2,4,6 tris (dimetil aminometil) fenol (BDMA).

Para la preparación de la resina se probaron protocolos descritos por Kuo (2007), con concentraciones distintas para la obtención de resinas: suave, media y dura como se detalla la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Concentraciones para la elaboración de resina epon suave, media y dura (Kuo, 2007).

Componente	Resina Suave	Resina Media	Resina Dura
Epon	20 ml	20 ml	20 ml
DDSA	22 ml	16 ml	9 ml
MNA	5 ml	8 ml	12 ml
BDMA	1.4 ml	1.3 ml	1.2 ml

La elaboración de la resina consistió en calentar durante 15 minutos en la estufa a 60° a los tres polímeros, excluyendo BDMA, y a todos los utensilios necesarios como vasos de precipitación y pipetas de vidrio.

Una vez transcurrido este tiempo, se agregó una por una las concentraciones indicadas para las distintas resinas en orden: se añadió Epon, DDSA y MNA.

Se revolvió la mezcla en un rotador durante 10 minutos y se adicionó el acelerador BDMA. Por último, se revolvió la resina durante 10 minutos adicionales en un rotador.

2.5. Infiltración de muestras y polimerización

El proceso de infiltración consistió en la suspensión de la muestra deshidratada en una proporción 1:1 de acetonitrilo:etanol, durante 1 hora en rotación. Para continuar se colocó el polen en acetonitrilo al 100% durante una hora, seguido por una proporción 2:1 de acetonitrilo: resina durante toda la noche en rotación (Figura 2.4).



Figura 2.4: Proceso de infiltración del polen en resina epoxy.

A la mañana siguiente, se continuó con la proporción 1:1 de resina: acetonitrilo por 8 horas en rotación, seguida por la proporción 2:1 resina: acetonitrilo durante toda la noche. Para terminar, se embebió a la muestra en resina al 100% por 6 horas y finalmente se realizó un cambio por resina pura. Una vez embebida se inició la

polimerización de la resina a 60° C en la estufa durante 72 horas. Luego, la resina endurecida fue desmoldada del pocillo para mantener lista para el seccionamiento.

2.6. Obtención de cuchillas

Las cuchillas para el seccionamiento fueron cortadas por medio de la cortadora RMC, dispositivo que fue calibrado previamente para obtener filos de las cuchillas impecables y agudos. El procedimiento general consistió en alinear la barra de vidrio para microscopia con el extremo final del tablero de la cortadora. Ajustar el número uno con la perilla graduada para obtener cuadrados iguales. Luego, asegurar la barra con la palanca superior, marcar la línea de corte con la rueda de diamante y finalmente ejercer presión sobre la barra para obtener dos pedazos de iguales dimensiones. De cada una de las dos barras se cortaron un total de 15 cuadrados de iguales dimensiones, de los cuales se obtienen 30 triángulos con filos agudos. Para finalizar, se cambió la marca del número uno al número dos para obtener triángulos y se siguen los mismos pasos. La variación para triángulos radica únicamente en que los cuadrados base no son alineados con el extremo final del tablero, sino con un soporte inferior para impedir el movimiento y dejar que la cuchilla de diamante corte en la mitad del cuadrado. Después de cada corte, se realizó una limpieza del dispositivo para impedir que pequeños cristales se depositen en el compartimiento de la rueda de diamante que podría producir cuchillas deficientes.



Figura 2.5: Obtención de cuchillas a partir de una barra de vidrio para microscopia

Incorporación del bote: Para la incorporación del bote a la cuchilla se colocó esmalte de uñas sobre la superficie posterior del bote y se pegó cuidadosamente a la cara frontal de la cuchilla. Se verificó que tanto el borde de la cuchilla como el borde del bote sean paralelos los unos con otros. Por otro lado, también se usó una cinta adherente en lugar del bote plástico, aquí se siguieron las mismas indicaciones, pero con esta cinta además de verificar los bordes de la cuchilla y del bote se alinearon los extremos derecho e izquierdo de la cinta para que sean paralelos uno con otro. Se adicionó una capa extra de esmalte de uñas en el lado de contacto inferior entre la cinta y el borde de la cuchilla (Figura 2.6). Después de 30 minutos de secado, se llenó con agua el bote hasta observar una superficie plana brillante.

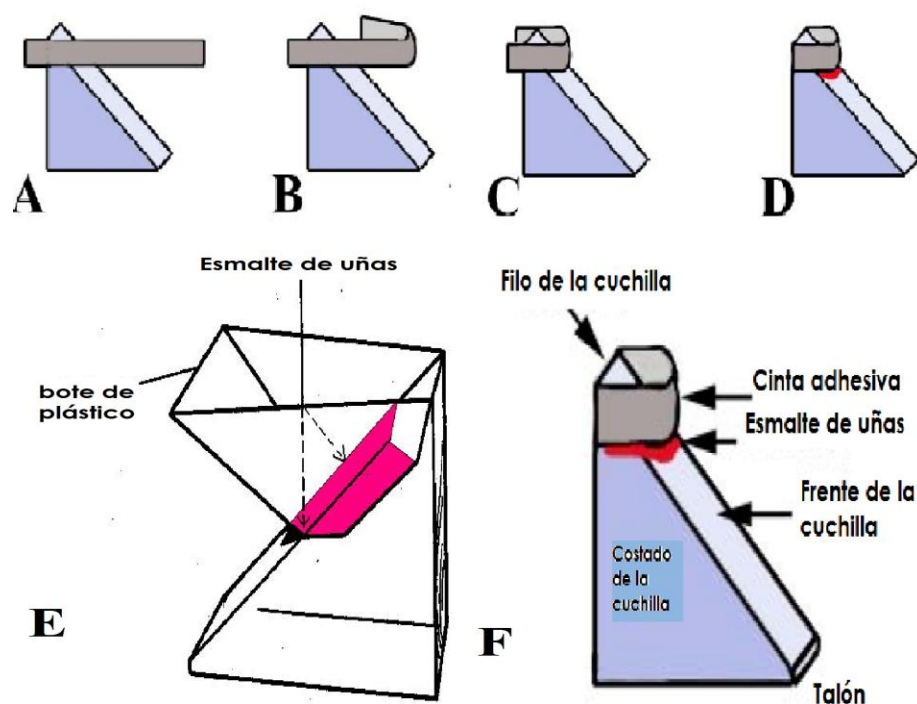


Figura 2.6: Procedimiento para la incorporación del bote a la cuchilla. A. La cinta adherente se coloca en un extremo de la cuchilla. B. Se mide para cortar la longitud necesaria para el bote. C. Se adhiere el otro extremo de la cinta al filo de la cuchilla, cuidando que los dos lados sean paralelos. D. se corta el sobrante de cinta y se coloca esmalte en la parte inferior del bote. E. El bote de plástico precisa del mismo alineamiento y del esmalte de uñas. F. Partes de la cuchilla.

2.7. Tallado de la resina

Previo al corte en el ultramicrotomo se realizó el tallado de una pirámide truncada en la punta de la resina. Primero, se colocó el bloque en el soporte de muestra del ultramicrotomo y se lo aseguró con el tornillo de ajuste para ser visualizado en el estereomicroscopio. Usando un bisturí o una hoja de rasuradora nueva, se procedió a cortar transversalmente la cara frontal de la resina para exponer la muestra para el seccionamiento, luego se tallaron los extremos inferior y superior de la pirámide localizando en el centro a la muestra a ser seccionada y asegurando que los dos

extremos sean paralelos uno con otro. Cuidadosamente se formaron los lados del trapecio con una ligera inclinación de la hoja de rasuradora hasta obtener la menor cara posible que abarque el espécimen. La pirámide truncada fue observada en el estereomicroscopio para verificar que los lados no tengan irregularidades que afecten la cuchilla de vidrio.

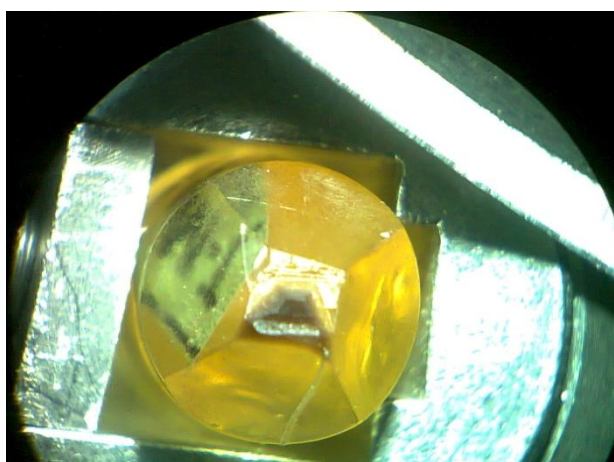


Figura 2.7: Observación de la punta de la resina mediante el estereo microscopio, tallado de una pirámide truncada.

2.8. Alineación de la cuchilla de vidrio con la resina

Una vez obtenida las cuchillas de vidrio y realizado el tallado de la cara frontal del bloque con el espécimen se continuó con la alineación de la cuchilla de vidrio con el borde inferior de la resina. El proceso consistió en colocar el soporte de la muestra en el arco de montura segmentado (Figura 1.16) y regularlo en cero grados con el tornillo de ajuste verificando que el borde más pequeño de la pirámide sea aquel que se encuentra con el filo de la cuchilla. Caso contrario, con la perilla de movimiento del soporte se realiza una rotación del porta muestras para modificación

esta condición. Seguidamente, se colocó la cuchilla de vidrio en el vehículo, se ajustó con su respectivo tornillo y se constató que el ángulo de inclinación de la cuchilla se encuentre en 3° . Posteriormente, se giró ligeramente el brazo de rotación para hacer descender cerca de 1mm a la resina y lograr observar una sombra en la cara frontal de la misma. Se examinó que el borde inferior pequeño y el filo del vidrio sean paralelos y por medio del tornillo de ajuste de la inclinación del vehículo se modificó la inclinación proyectada en la sombra de la cara frontal de la resina. Además, por medio del tornillo micrométrico se acercó lentamente a la cuchilla para mantener la formación de una línea paralela en la cara frontal de la resina hasta no verse proyectada ninguna sombra que indicó la proximidad máxima de la cuchilla con la resina y el inicio correcto para el seccionamiento.

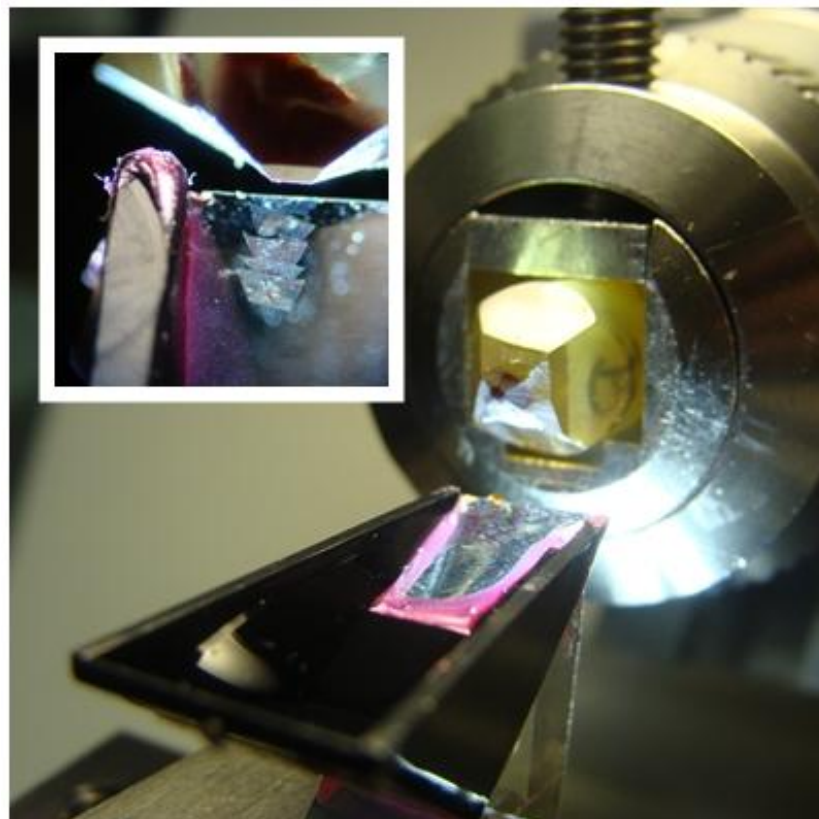


Figura 2.8: Proceso de alineamiento de la cuchilla de vidrio con la resina formando una línea paralela en la cara frontal del bloque con la muestra.

2.9. Obtención de cortes

2.9.1. Semifinos

Los cortes semifinos fueron obtenidos con una cuchilla de vidrio seca o con una cuchilla incorporada con un bote lleno de agua. Para producir este tipo de secciones, se programó en la consola electrónica del ultra micrótopo: la ventana superior e inferior de corte, la velocidad de corte de 1.5 mm/seg y el espesor de 0.5 a 1 μm .

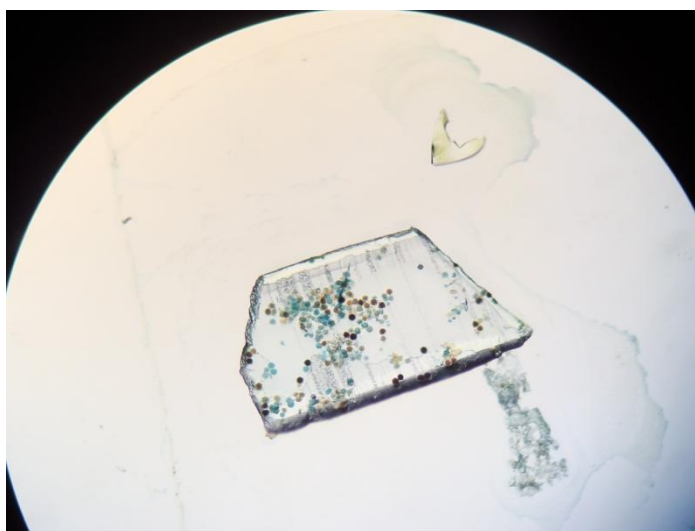


Figura 2.9: Observación de un corte semifino, teñido con aceto carmín, microscopio óptico (40X).

Cuando se utilizó una cuchilla de vidrio seca, los cortes fueron retirados del borde de la cuchilla por medio de un palillo adaptado con una pestaña. Por otro lado, cuando se colocó el bote, las secciones fueron depositadas en el agua contenida en el mismo y fueron recogidas con una rejilla de cobre o mesh.

2.9.2. Cortes ultrafinos

Las secciones ultrafinas fueron obtenidas después de localizar en los cortes semifinos el área de interés para el seccionamiento. Posteriormente, se programó en la consola electrónica del ultramicrotomo: la ventana superior e inferior de corte, la velocidad de corte de 1.0 mm/seg y el espesor de 50 a 100 nm. A diferencia de los cortes semifinos, se utilizó la cuchilla de vidrio con bote incorporado lleno siempre con agua. Al momento de darse el seccionamiento, los cortes formaron una cinta uniforme de coloración dorada, la cual fue cuidadosamente separada por medio de un palillo con pestaña y fueron recogidos con un mesh. La rejilla de cobre fue calentada cerca de 1 minuto y fue cubierta previamente con un capa de 0.2 nm de espesor de oro en el evaporador de oro para incrementar la conductividad de la muestra a ser observada.

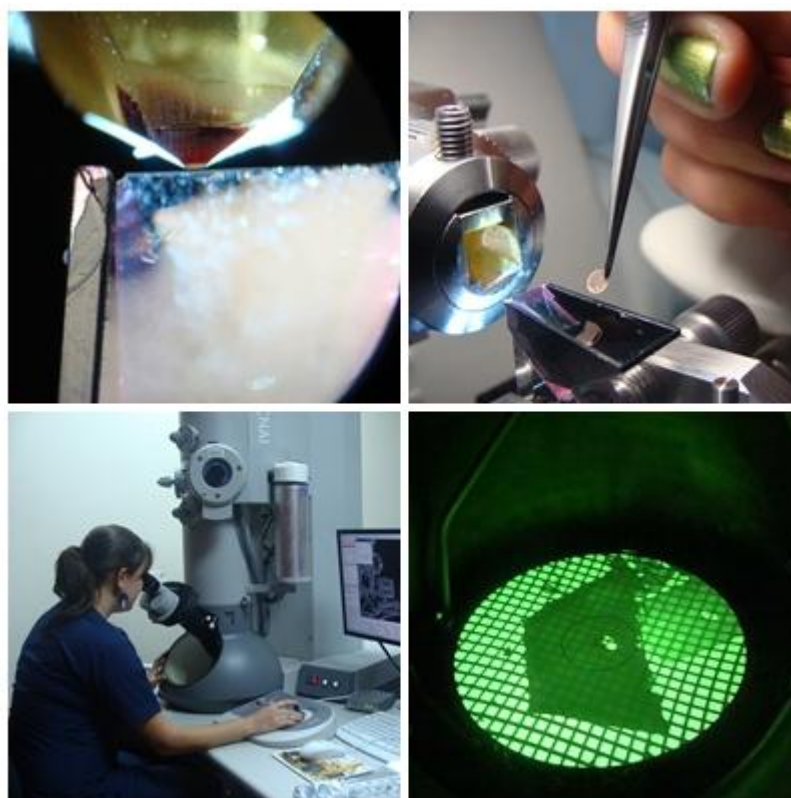


Figura 2.10: Obtención de cortes ultrafinos para la observación en el TEM.

2.10. Tinción

2.10.1. Tinción específica para polen

Los cortes semifinos fueron teñidos durante 1 minuto con aceto carmín y fueron enjuagados con agua destilada por dos ocasiones. Posteriormente, fueron colocados en una toalla de papel absorbente y visualizados en el microscopio óptico.

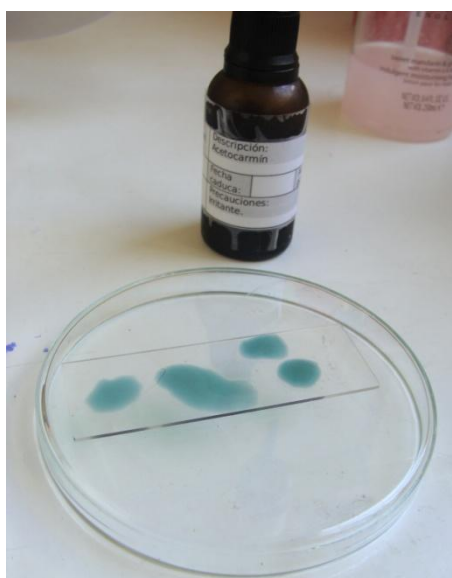


Figura 2.11: Tinción de polen con acetocarmín.

2.10.2. Tinción doble

La tinción doble positiva se realizó con dos metales pesados: acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 2 %. El procedimiento consistió en calentar agua destilada a 100 ° C, preparar en dos cajas petri una cama de papel toalla humedecida con agua y colocar un pedazo de parafilm como superficie sobre esta cama. Acto seguido, en una de las cajas petri se dejó caer una gota de acetato de uranilo sobre el parafilm y se

colocó el mesh bajo la gota de acetato de uranilo durante 7 minutos, tapando la caja con papel aluminio para evitar la luz. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados con agua destilada caliente de 30 repeticiones de un segundo cada una. Por otro lado, en la otra caja petri se introdujeron cristales de hidróxido de potasio (KOH) en todo el borde del parafilm y se dejó caer en el centro una gota de citrato de plomo. De igual manera, después del primer lavado se situó al mesh bajo la gota de citrato de plomo durante 4 minutos en la oscuridad para completar la tinción. Luego, se realizaron 5 lavados de 30 repeticiones de un segundo cada una y para finalizar se ubicó la rejilla de cobre o mesh sobre el papel toalla durante 10 minutos.

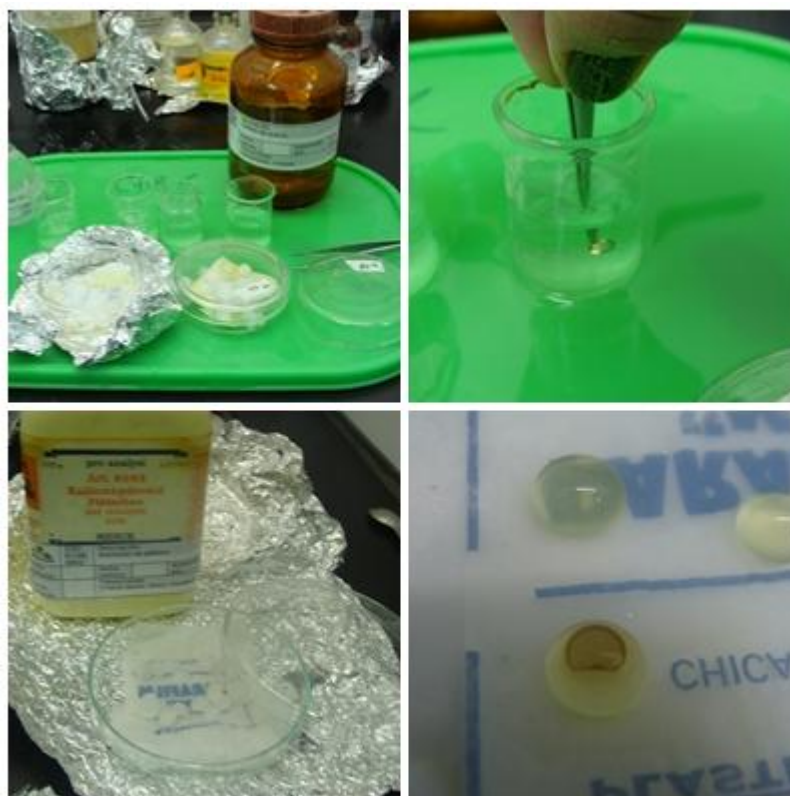


Figura 2.12: Tinción doble con acetato de uranilo y citrato de plomo.

2.11. Observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión

Las muestras previamente teñidas, fueron introducidas en el porta muestras del TEM para buscar y captar imágenes de cortes ultrafinos que muestren la estructura interna del polen de tomate de árbol.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

El polen de tomate de árbol recibió un tratamiento especial para poder ser embebido en la resina epoxy. Durante los ensayos de preparación se utilizó histoclear para la infiltración, junto con resina epoxy. Sin embargo, los cortes observados en el microscopio presentaron cierta irregularidad en la resina y no permitieron identificar estructuras. En la figura 3.1 se muestra una fotografía tomada en el TEM que muestra un error en el proceso de infiltración de la muestra presentado como acumulación de grumos que ocasionan falta de uniformidad de la resina.

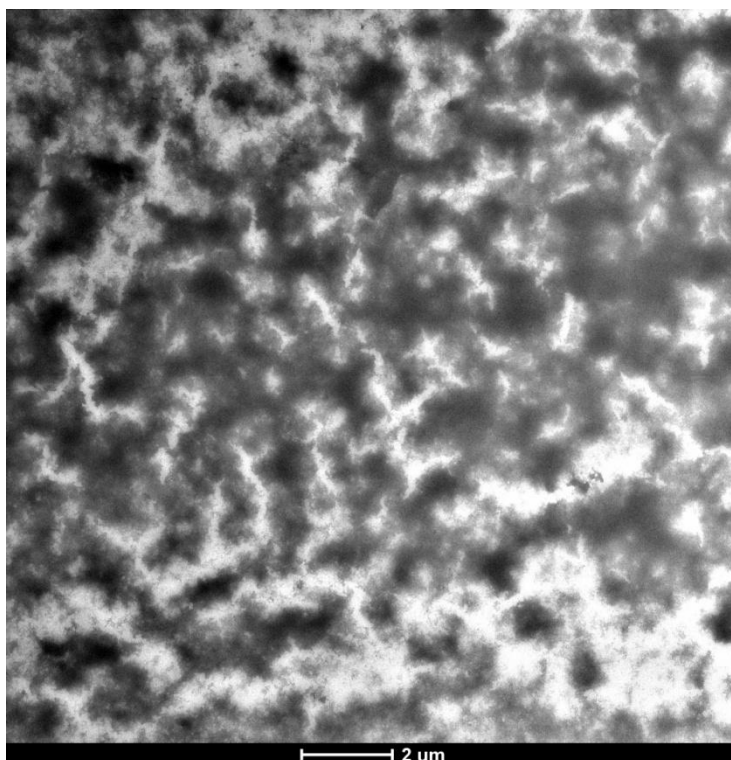


Figura 3.1: Observación de un error en el proceso de infiltración de la muestra, TEM (3000X).

Posteriormente, se inició el seccionamiento, el cual mostró algunos problemas como: alineación de la resina y de cuchilla, tipo de resina y de técnica en la obtención de cortes. Los cortes obtenidos presentaron arrugas y rayones por la cuchilla (Figura 3.2 A, B). Algunas muestras no se mostraron completas o se rompieron, interrumpiendo la observación del polen (Figura 3.2 C, D).

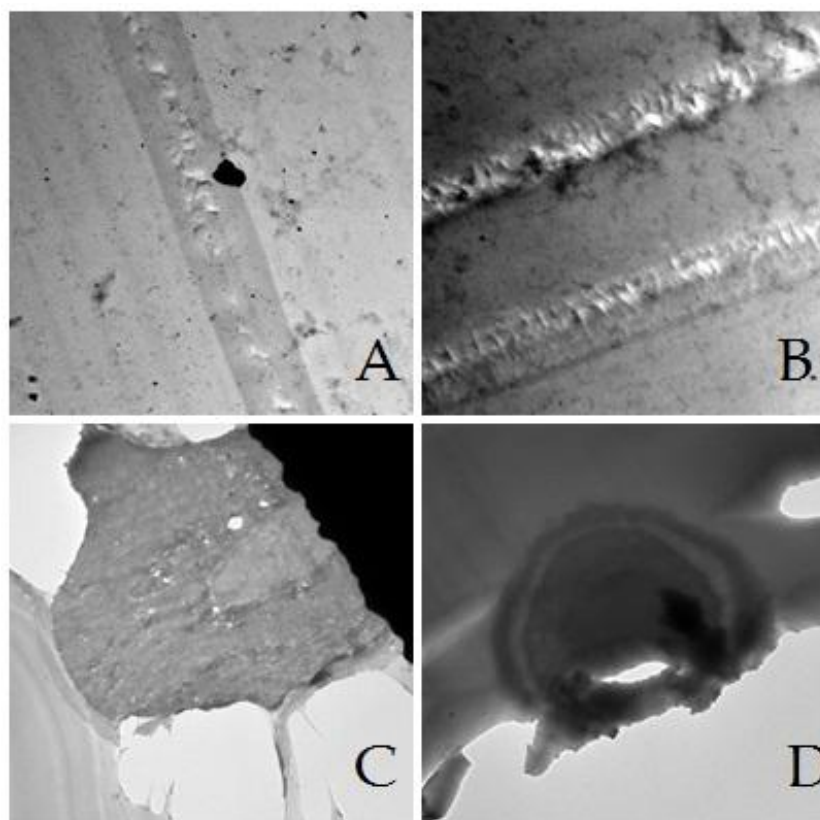


Figura 3.2: Errores de seccionamiento. A, B cuchilla mal alineada y sin filo. C, D, muestras quebradas durante el seccionamiento TEM (2500X).

El paso final del procedimiento antes de la visualización en el TEM, es la tinción doble con acetato de uranilo y citrato de plomo. Ambos reactivos presentaron residuos que dificultaron la observación del polen; el acetato de uranilo forma unos

bastones alargados (Figura 3.3A) y el citrato de plomo (Figura 3.3B) unos grumos redondos pequeños que se localizan en cualquier lugar de la muestra.

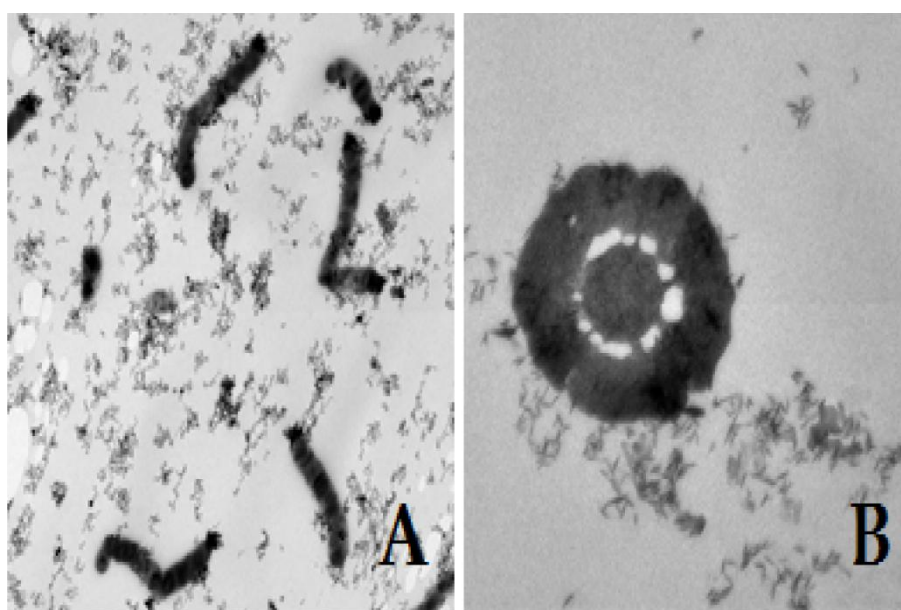


Figura 3.3: Error producido en la tinción, formación de residuos de colorante. A. Acetato de Uranilo. B.Citrato de plomo (TEM).

Los primeros cortes visualizados fueron los cortes semifinos de un espesor de 150 nm que se observaron bajo el microscopio óptico. Se distinguió la diferencia de coloración de las muestras resultado de la diferencia de profundidad en la que se encuentran sumergidos los granos de polen en la resina epoxy.

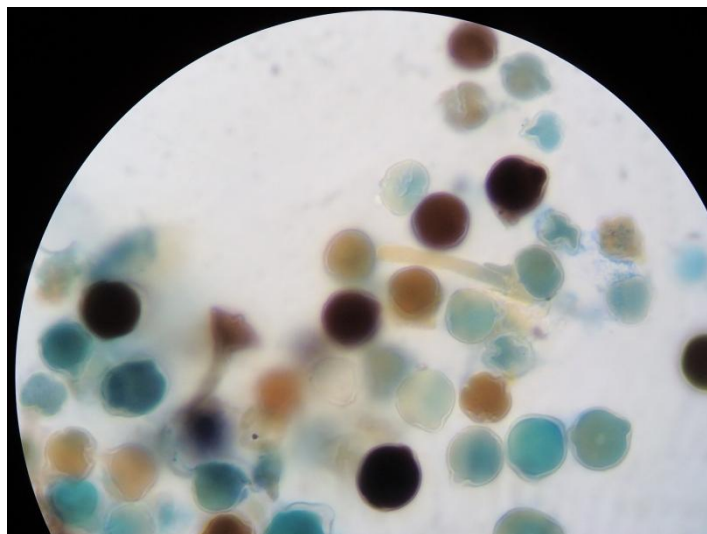


Figura 3.4: Polen de **Solanum betaceum**, observado bajo el microscopio óptico (100X). Localización de la muestra previa al seccionamiento de cortes ultrafinos para la observación en el TEM.

Una vez localizada la región que presentó mayor concentración de muestra, se realizaron cortes ultrafinos. Las observaciones en el microscopio óptico ayudaron a identificar levemente la presencia de una estructura tricolpada.

Al momento de realizar el corte el polen puede ser seccionado en distintos puntos, presentando variedad de tamaños en la visualización. En la gura 3.5 se observan dos granos de polen de distinto tamaño, en los cuales se puede visualizar iguales estructuras como núcleo vegetativo y generativo, residuos celulares y tres aperturas.

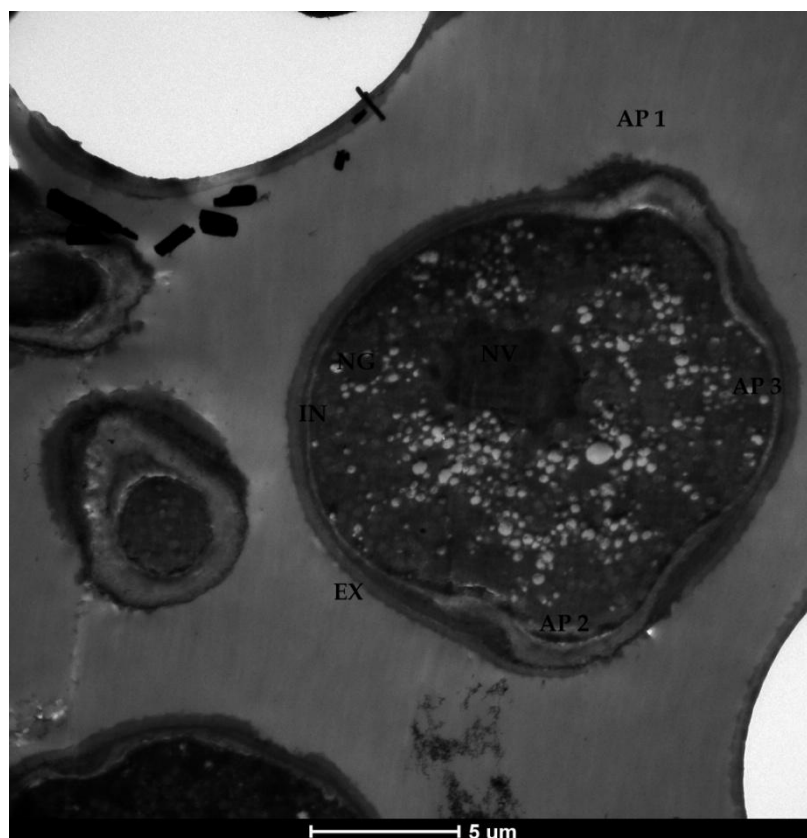


Figura 3.5: Polen de *Solanum betaceum*, la imagen muestra pólenes de distinto tamaño, barra de escala 5 μm (TEM 2800X).

El estudio morfológico del polen de *Solanum betaceum* se dividió en tres grupos de pesticidas: químicos, ecológicos y biológicos; un control sin germinación y un control germinado. El total de pesticidas analizado fue seis, dos por cada grupo de pesticida, más los dos controles. El control sin germinación fue tomado tras la recolección sin exposición a ningún tipo de pesticida ni medio de germinación y fue suspendido directamente en el fijador glutaraldehído. Este control corresponde a la forma natural del polen de tomate, en el cual se observó la estructura característica de la familia Solanaceae. La figura 3.6A, obtenida en el microscopio electrónico de Barrido (SEM) permite apreciar un polen de un tamaño de aproximadamente de 27

nm, una simetría radial (SR) y la presencia de tres poros o estructura tricolporados. El corte ultrafino (Figura 3.6B) ayuda a distinguir la estructura interna del polen, la exina (EX) gruesa que recubre al grano de polen y la intina (IN) más delgada.

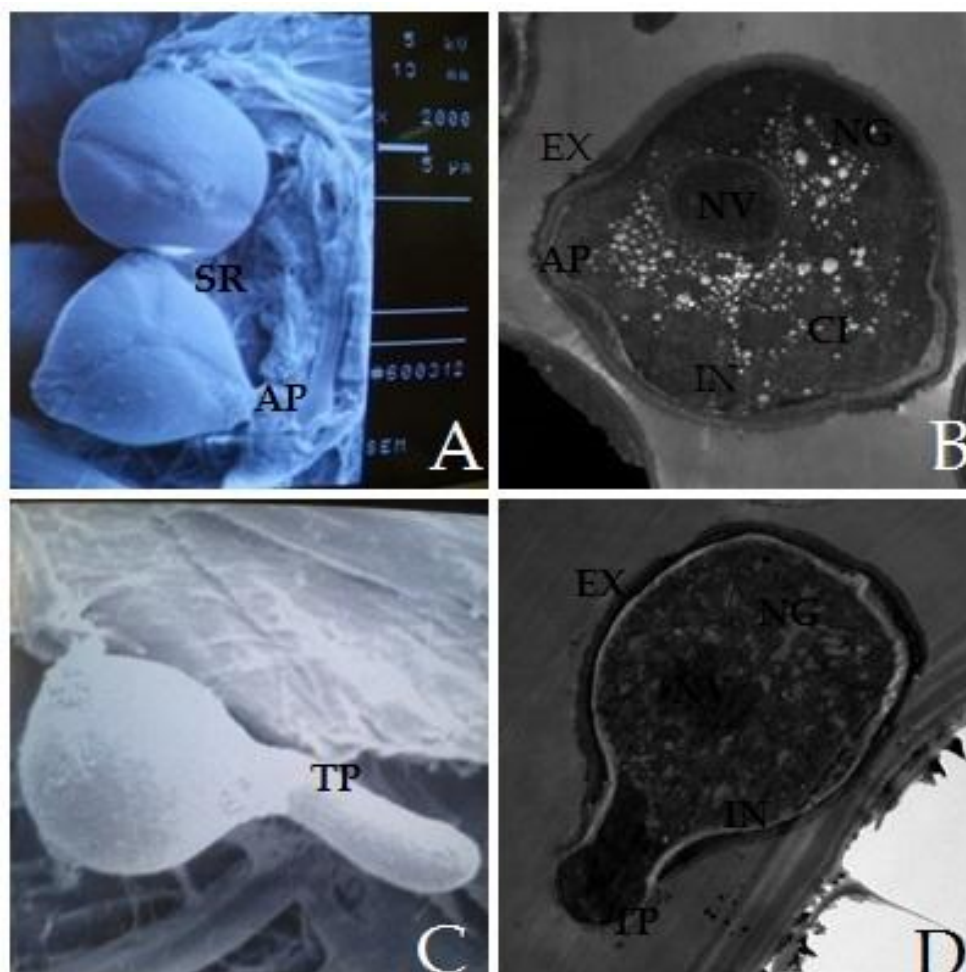


Figura 3.6: Polen de *Solanum betaceum*. A. Vista polar de un polen sin germinación muestra la presencia de un polen de un tamaño de 25 nm (barra indicadora de la escala 5 mm) y presencia de tres poros (SEM). B. Corte ultrafino de 90 nm visualizado a 2500X, muestra una exina gruesa, una intina fina, tres aperturas, la presencia de un núcleo vegetativo prominente situado cerca a una apertura y un núcleo generativo junto a la intina (TEM).

También se notó abundante citoplasma (CI) con un núcleo prominente que representa al núcleo vegetativo (NV), localizado casi en el centro de la estructura próximo a una apertura (AP) y un núcleo generativo (NG) situado cerca de la intina. El otro control corresponde a un grano de polen tras seis horas de germinación (Figura 3.6 C), imagen obtenida en el SEM, donde se apreció la formación de un tubo polínico de 15 μm . Por su parte, el corte ultrafino de otro grano de polen control germinado, permitió observar la presencia de dos núcleos.

El núcleo más grande representa al núcleo vegetativo localizado cerca de la apertura y junto al mismo se encuentra un núcleo más pequeño, el núcleo generativo. Dentro de la estructura, se puede apreciar unas estructuras blancas, identificadas como plástidos rellenos con gránulos de almidón presentes en granos de polen. Como parte característica del polen germinado se observó la elongación de un tubo polínico de 3 μm .

3.1. Cortes ultrafinos de polen no germinado

Las imágenes obtenidas a partir del control sin germinación fueron similares unas de otras al presentar dos núcleos y tres aperturas cortas. No se evidenció la presencia del tubo polínico, pero se divisó una exina de igual grosor recubriendo todo el grano (Figura 3.7). En cuanto a los núcleos generativo y vegetativo, no se pudieron identificar claramente, pero se visualizó abundantes plástidos en todo el citoplasma.

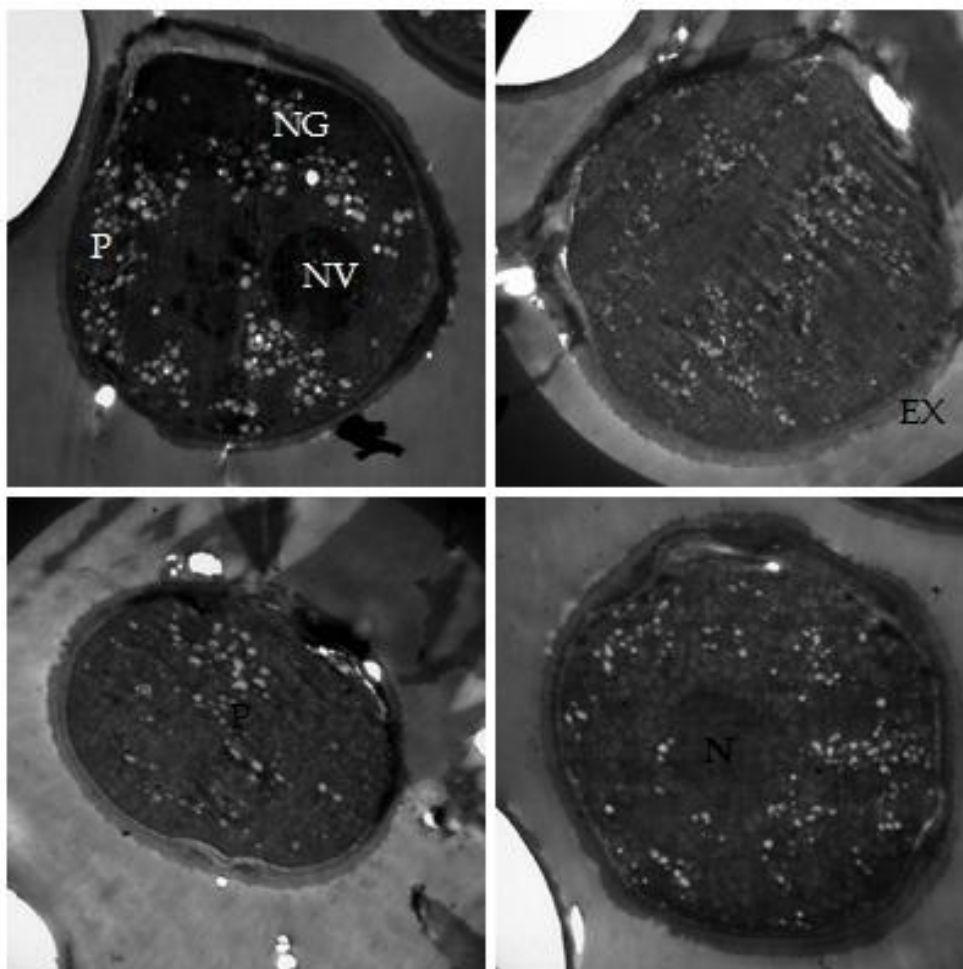


Figura 3.7: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 100nm, control sin germinación. **Presencia de pólenes con morfología similar, observación de tres aperturas y núcleos internos.** El núcleo prominente representa el núcleo vegetativo (NV) y al lado opuesto se encuentra el núcleo germinativo (NG).

La capa externa, exina (EX) se mantiene constante envolviendo a toda la estructura (TEM 2500X).

3.2. Cortes ultrafinos de polen germinado

Cada grano de polen observado mostró diferentes tamaños, formas y localización de estructuras. Tal es el caso de las figuras 3.8A y D, las cuales muestran la presencia de un único núcleo en el centro correspondiente al núcleo vegetativo y la formación de un tubo polínico pequeño. Independiente a lo anterior, las figura 3.6B y

C revelan un núcleo generativo de un tamaño considerable y no se diferencia claramente la localización del núcleo generativo.

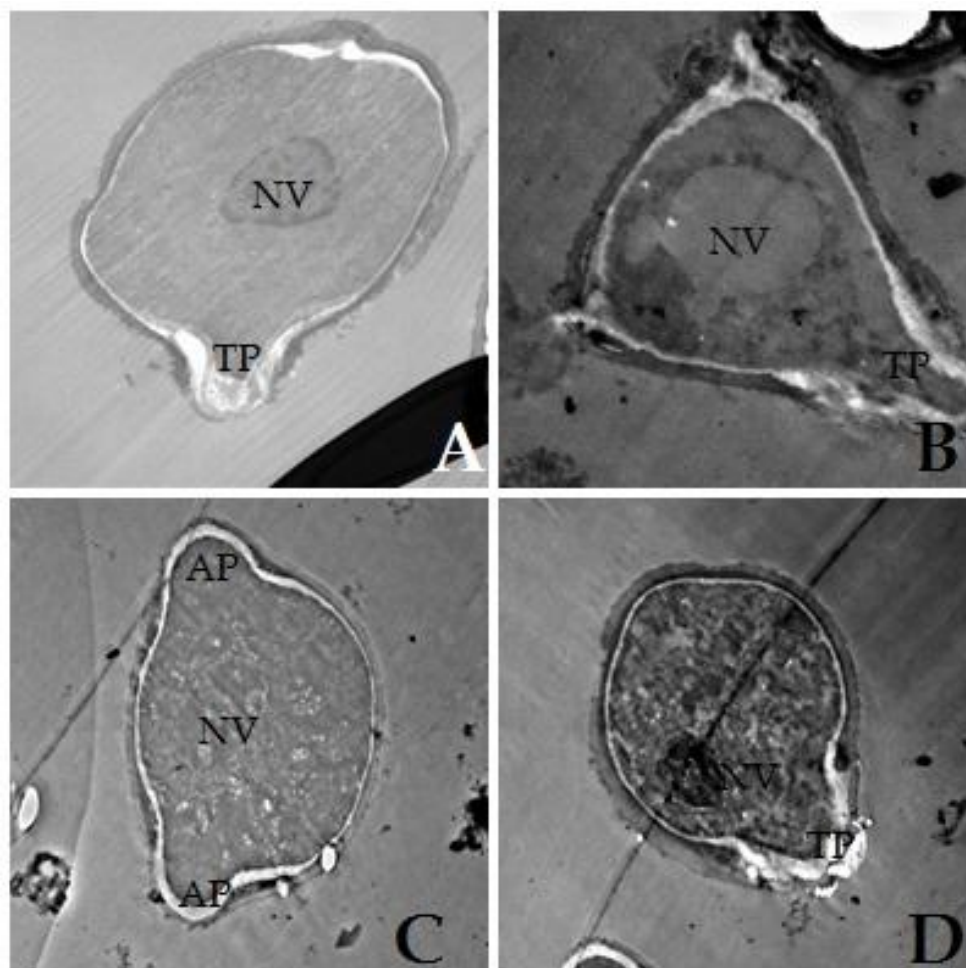


Figura 3.8: Polen de Solanum betaceum, muestra control sin germinación, cortes ultrafinos de 90-100 nm. Al interior del polen se observan un núcleo grande localizado en el centro el citoplasma, núcleo vegetativo (NV). Se evidencia la morfología tricolporada y la formación de un tubo polínico (TEM 2500X).

3.3. Cortes ultrafinos de pesticidas biológicos

Los pesticidas biológicos en los cuales fue sometido el polen de tomate de árbol fueron A y B. Los cortes ultrafinos del pesticida A presentaron una variación en

la morfología, los pólenes son alargados y no mantienen la estructura tricolporada (Figura 3.7AC). Por otro lado, existen otros pólenes que mantienen la forma característica de la familia Solanacea (Figura 3.9 BD). En cuanto a los núcleos, todos los pólenes presentaron un núcleo grande, un núcleo vegetativo, cerca de una de las aperturas y en contadas ocasiones se distinguió el núcleo germinativo claramente (Figura 3.9A). Casi todas las fotografías captadas en el TEM ayudaron a distinguir la capa externa, exina, rodeando al polen, y la capa interna intina delineando ligeramente al citoplasma.

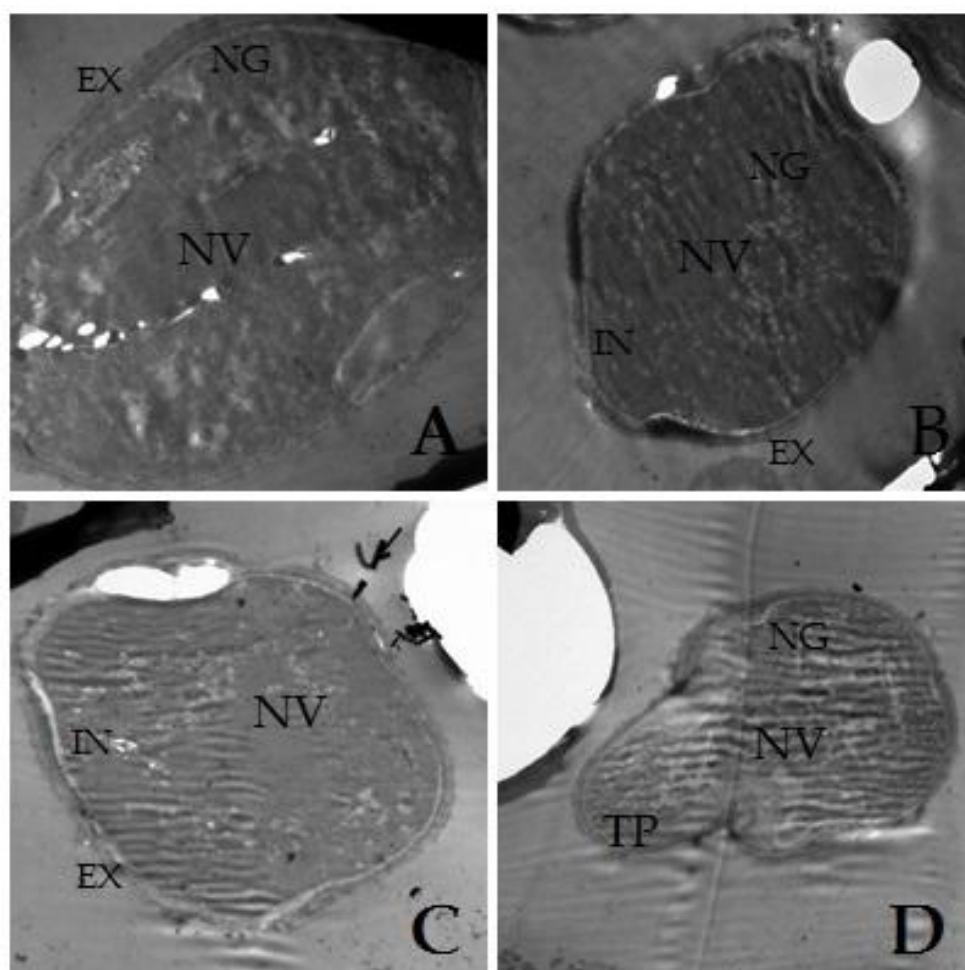


Figura 3.9: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90 -100nm, pesticida biológico. A, D Cambio de la forma tricolpada del polen a una forma alargada. B,D Los pólenes mantuvieron la forma común de la familia Solanacea (TEM 2500X). D Formación del tubo polínico.

En el segundo pesticida biológico B, se observaron cambios en la morfología del polen pues no se logró ver la forma tricolporada de un polen perteneciente a la familia Solanaceae (Figura 3.10B, D). También se apreció la formación de dos tubos polínicos en dos de tres aperturas del grano de polen y se notó variación en el grosor de la exina en una de las imágenes captadas (Figura 3.10B) junto con la presencia de una abundante presencia de plástidos (P) rellenos con almidón (AL) en todo el citoplasma.

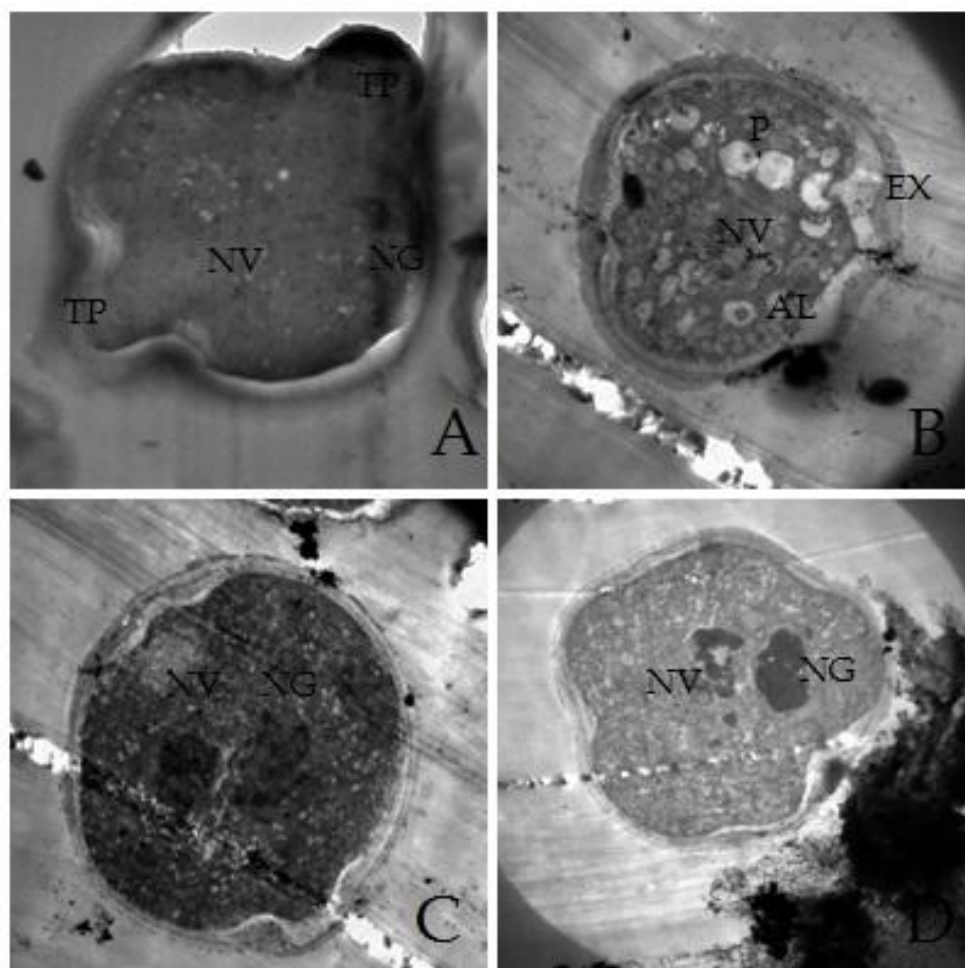


Figura 3.10: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100, pesticida biológico. A. Visualización de dos tubos polínicos (TP) creciendo a partir de dos de las tres aperturas del grano de polen. B. Notable variación en la morfología, sin observarse la estructura característica de la familia Solanacea y se aprecia la presencia de abundantes plástidos con un centro de almidón dentro. C. Observación de la presencia de dos núcleos de casi igual tamaño,

núcleo generativo (NG) y núcleo vegetativo (NV). D. Notable deformación en la morfología del grano de polen y de los núcleos vegetativo y generativo (TEM 2200X).

3.4. Cortes ultrafinos de pesticidas ecológicos

Los dos pesticidas ecológicos empleados para el estudio fueron: C y D. El primer pesticida, C presentó una estructura acolpada, sin prominencias o aperturas (Figura 3.11 A, B,C) y mostró una variación en la localización de los núcleos generativo y vegetativo (Figura 3.11 B). Sin embargo, permitió distinguir organelos internos como células generativas (CG) dentro de su núcleo y la presencia de más de un tubo polínico en el grano de polen (Figura 3.11 C).

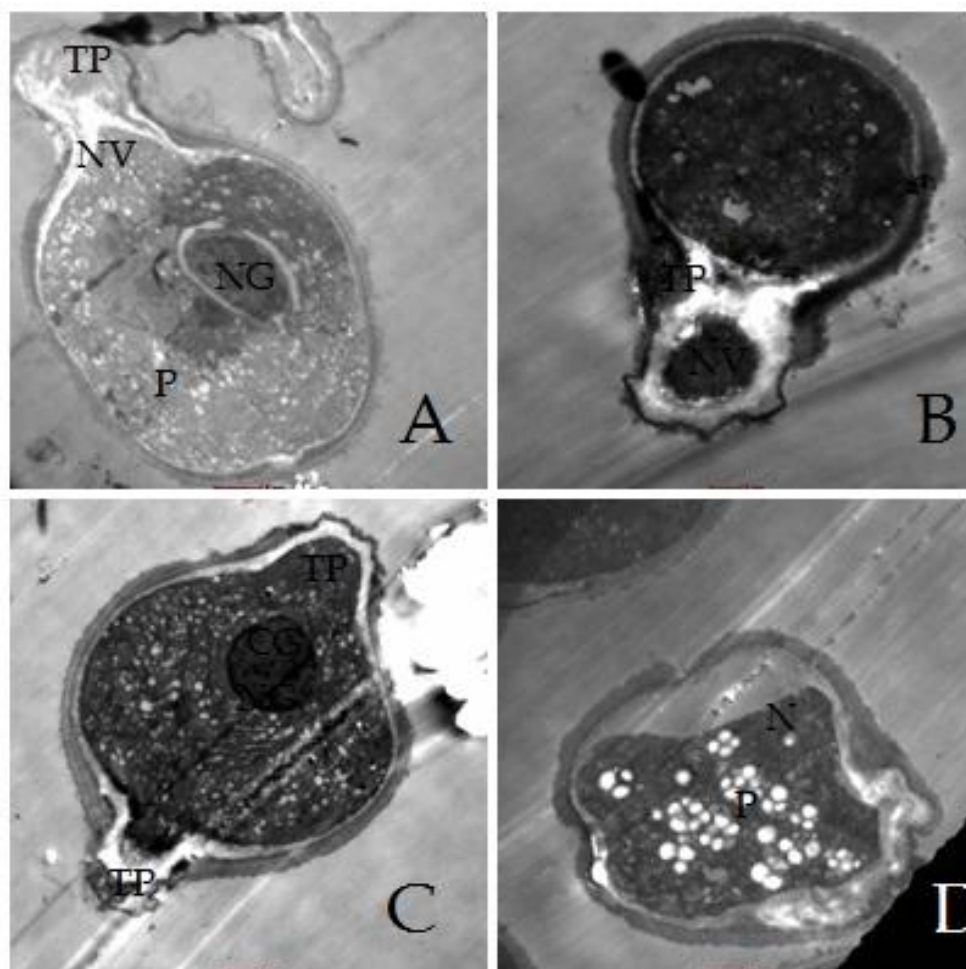


Figura 3.11: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100 nm, pesticida ecológico. A, Observación del núcleo vegetativo (NV) cerca del tubo polínico (TP) y un núcleo generativo (NG) al lado opuesto dentro del citoplasma del polen. B. Formación de tubo polínico (TP) y el núcleo vegetativo (NV) ubicado dentro del tubo, C. Núcleo generativo (NG) de gran tamaño con estructuras internadas identificadas como las células germinativas (CG) y presencia de la formación de dos tubos polínicos. D. Grano de polen con estructura interna irregular llena de plástidos internos (P) (TEM 2200X).

Finalmente, una de las estructuras observadas presentó una morfología particular al evidenciar un sólo núcleo cubriendo casi la totalidad del citoplasma y dentro del mismo unas estructuras blancas, plástidos (Figura 3.11 D). En cuanto al segundo pesticida ecológico D, se observó una morfología alargada en la mayoría de los granos de polen que presentaron casos con formación de dos tubos polínicos (Figura 3.12 A).

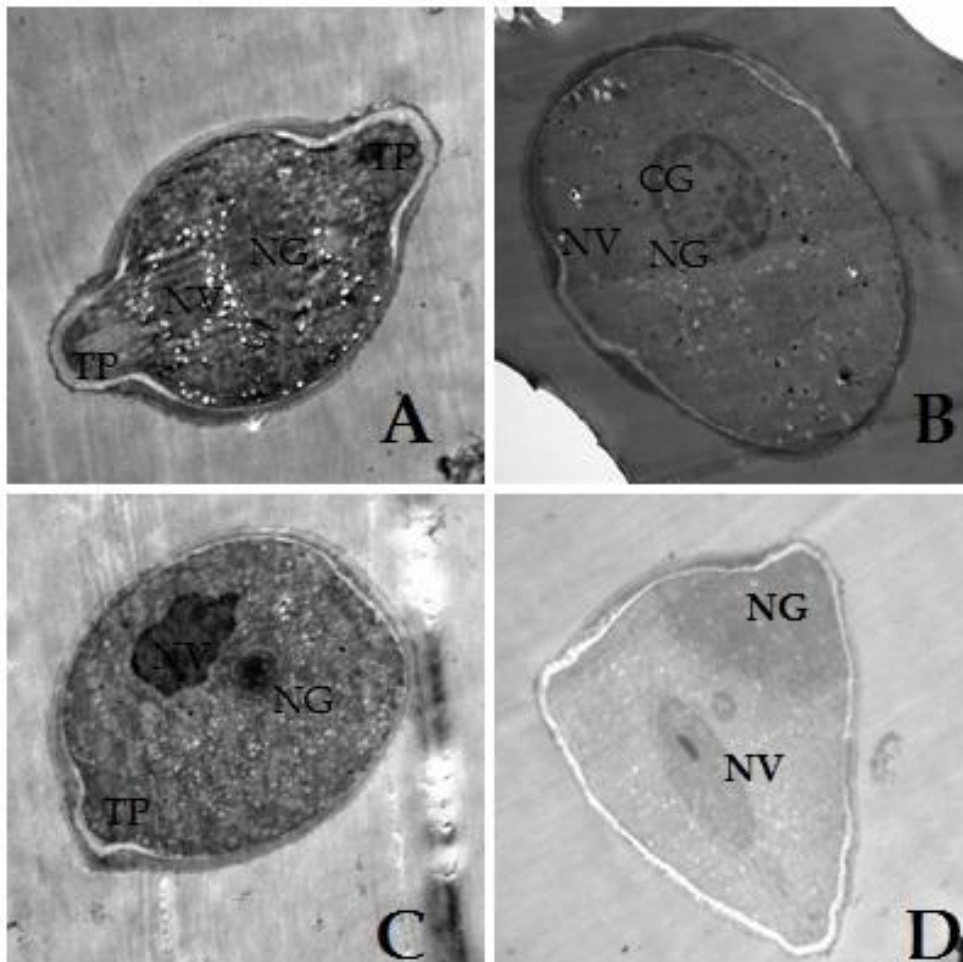


Figura 3.12: Polen de *Solanum betaceum*, cortes ultrafinos de 90 nm, pesticida ecológico. A. No se evidencia una estructura tricolporada, sino más bien alargada, los núcleos generativo y vegetativo se encuentran situados uno junto al otro y no varían notablemente en tamaño. B. Núcleo generativo predominante (NG) con presencia de organelos y célula germinativa (CG). C. Morfología con una sola apertura, núcleo vegetativo de gran tamaño. D. Se evidencia un núcleo vegetativo alargado y un núcleo germinativo sin definición localizado junto a la intina (TEM 2100X).

Nuevamente, se observó en estas muestras la presencia de células generativas definidas dentro del núcleo y se generó una variación en el tamaño del núcleo vegetativo. Otra variación encontrada fue el alargamiento del núcleo vegetativo, la falta de definición del núcleo germinativo y falta del tubo polínico.(Figura 3.12C).

3.5. Cortes ultrafinos de pesticidas químicos

Los dos pesticidas químicos empleados para la observación de la morfología fueron: E y F. El pesticida E presentó grandes variaciones en cuanto a morfología, pues los pólenes fueron totalmente deformados o no presentaron estructuras internas reconocibles (Figura 3.13 B, D). En la figura 3.13A, se observa la formación del tubo polínico, pero no se divisan núcleos internos.

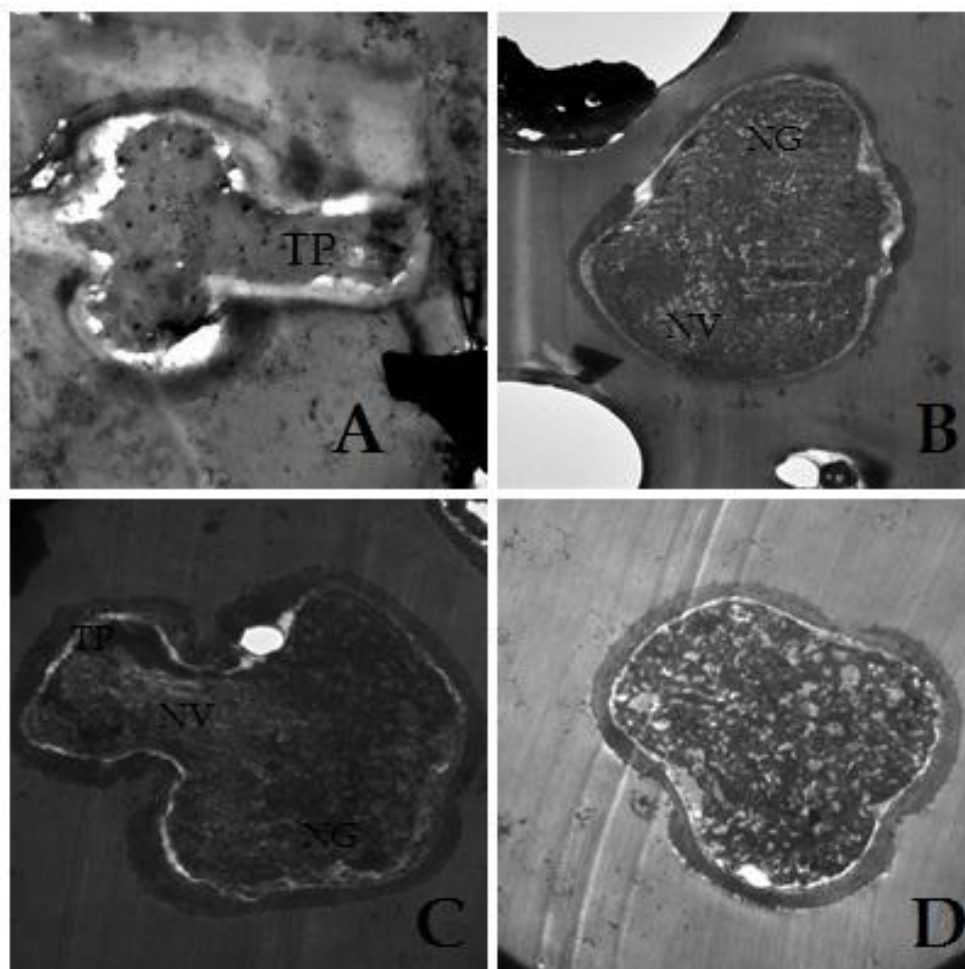


Figura 3.13: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100 nm, pesticida químico. A. Se observó deformación en la morfología del polen y ausencia de organelos. B. Estructura con presencia de núcleo germinativo (NG) junto a la intina y un núcleo vegetativo (NV) al lado opuesto. C. Formación de un tubo polínico en donde se encuentra alojado el núcleo vegetativo (NV). D. Morfología tricolporada sin núcleos internos. (TEM 2100X).

Por otro lado, de los pocos granos de polen que presentaron núcleos internos, se pudo observar que el núcleo vegetativo migró hacia el tubo polínico y el núcleo germinativo se sitúa junto a la pared en el extremo opuesto (Figura 3.13 C). El segundo pesticida químico F, al igual que E mostró una fuerte variación en la morfología del grano de polen y no se distinguieron organelos internos en el citoplasma ni tubo polínico (Figura 3,12 A). En pólenes en los que se observó la formación del tubo polínico (Figura 3.12 B, C), se divisó un sólo núcleo interno.

Finalmente, en las pocas secciones observadas con presencia de núcleo germinativo y vegetativo no se identificó la presencia de tubo polínico.

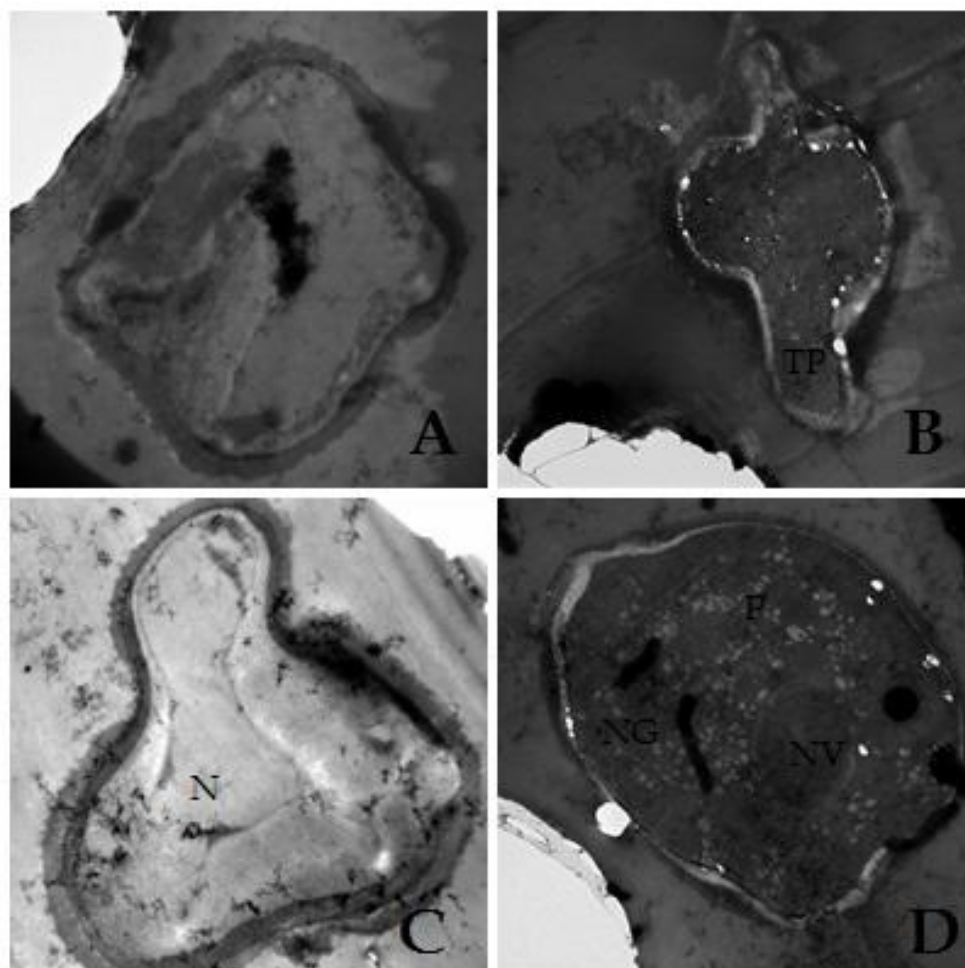


Figura 3.14: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100 nm, pesticida químico F. A. Observación de polen de cuatro aperturas y sin organelos internos. B, C. Formación de tubo polínico con presencia de una masa interna sin defonición. D. Morfología tricolporada, núcleo vegetativo (NV) de mayor tamaño que el núcleo germinativo (NG), presencia de plástidos (P) en el citoplasma y sin evidencia de tubo polínico (TEM 2100X).

CAPITULO IV

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización del análisis estadístico se capturaron 20 fotografías en el TEM de los seis pesticidas denominados como A, B, C, D, E y F y el control germinado sin pesticida. El otro control sin germinación no fue tomado en cuenta para este análisis ya que sólo representó un patrón para observar cambios en la morfología. La unidad experimental para el análisis estadístico fue un grano de polen observado en el TEM. La hipótesis nula (Ho) planteada es “La exposición a pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos incide significativamente sobre la morfología del polen”. Para la comprobación de Ho, se analizó cada grano de polen para observar los daños en la morfología enfatizando la diferencia entre el control y cada uno de los pesticidas. La tabla a continuación resume los datos recolectados:

Tabla 4.1: Resultados del análisis de daños en el polen de toma de árbol.

Muestra	Ingrediente Activo	Daño Morf.	Porc. %	Sin daño Morf.	Porc. %
SP	Control	5	3.5%	15	10.7%
A	<i>Metarhizium anisopliae</i>	4	2.8%	16	11.4%
B	<i>Lecanicillium lecanii</i>	6	4.2%	14	10%
C	Extracto Carboxamida	7	5%	13	9.2%
D	Hidroximetil Alquil N Dimetil	13	9.2%	7	5%
E	Clorotalonil	16	11.4%	4	2.8%
F	pyraclostrobin + epoxiconazol	16	11.4%	4	2.8%

El modelo de regresión logística binomial fue aplicado para el análisis al ser una herramienta estadística de análisis bivariado para variables cualitativas. La finalidad de este modelo es explicar la probabilidad de ocurrencia de un proceso en función de determinadas variables dependientes o independientes. De tal manera, se analiza la influencia de las variables independientes sobre la variable dependiente. La variable dependiente es cualitativa y las variables independientes aplicadas a este estudio son dicotómicas (Cástor & Guisande, 2006). Para estimar el efecto del tratamiento de los pesticidas sobre la morfología del polen, contamos con variables explicativas expresadas mediante la estimación de odd ratio (OR) que se ajusta por otros factores denominados covariables (Núñez, Steyerberg, & Núñez, 2011).

El odd ratio es un parámetro característico de la distribución binomial que indica la mayor probabilidad de éxito o fracaso en un modelo, denominado cociente p/q . La presente tesis de grado analizó los daños causados en tres grupos de pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos más un control sin pesticida. La tabla 4.2 muestra una tabla de contingencia de 2×2 con datos obtenidos del estudio:

Tabla 4.2: Representación de la distribución binomial para muestras de polen de tomate de árbol sometidas a tres grupos de pesticidas: convencionales, químicos, biológicos y un control sin pesticida

Factor de riesgo		Daño en la Morfología		
		SI	NO	TOTAL
Con pesticidas	SI	62	58	120
Sin Pesticidas	NO	5	15	20
TOTAL		67	73	140

Mediante el parámetro OR, se representa el cociente entre el número de veces que ocurre el daño, frente al número de veces en las que no ocurre un daño. En el cuadro 4.3, el odd de presentar daño la morfología del polen con una proporción de 62/58. Es decir, la ocurrencia de sufrir un daño con el uso de pesticidas es de 62 veces por 58 veces que no ocurre. El cálculo del odd ratio en una tabla de contingencia de 2 x 2 es:

Tabla 4.3: Tabla de cálculo para el uso de la ecuación de Odd Ratio.

	Grupo A	Grupo B
Suceso	a	b
No suceso	c	d

Si los valores de la razón de probabilidad son:

- $OR < 1$: Este resultado muestra que existe una asociación “protectora”, es decir es poco probable que ocurra el evento.
- $OR = 1$: Refleja la falta de asociación entre ambas variables.
- $OR > 1$ indica que hay una asociación, la cual es más fuerte como mayor sea el número.
-

El cálculo de OR que relaciona la variable independiente, uso de pesticidas, con la variable dependiente, daño en la morfología muestra el siguiente resultado:

El resultado obtenido indica que el uso de pesticidas está asociado con el daño en la morfología del polen por ser el valor de OR mayor a uno. Con el fin de obtener un análisis estadístico, los datos obtenidos fueron evaluados mediante la herramienta estadística InfoStat. Los criterios analizados son:

Prueba de independencia Chi-cuadrado: Permite determinar si existe una relación entre las dos variables partiendo de un nivel de confianza del 95 %, para el cual alfa (α) debe ser 0.05. La hipótesis de donde se parte en esta prueba es la falta de relación entre las dos variables y por ello ninguna variable ejerce un efecto sobre la otra (Cerdeira & Villaroel, 2007).

Test exacto de Fisher: El test exacto de Fisher tiene objetivo analizar si dos variables dicotómicas están asociadas al presentar una muestra que no cumpla el 80% de datos mayor a 5. Permite evaluar la probabilidad asociada en una tabla de contingencia 2 x 2 formando con las filas y columnas los mismos valores totales. Para analizar los datos bilaterales se parte de la hipótesis nula que establece la independencia de las dos variables (Díaz & Fernández, 2004).

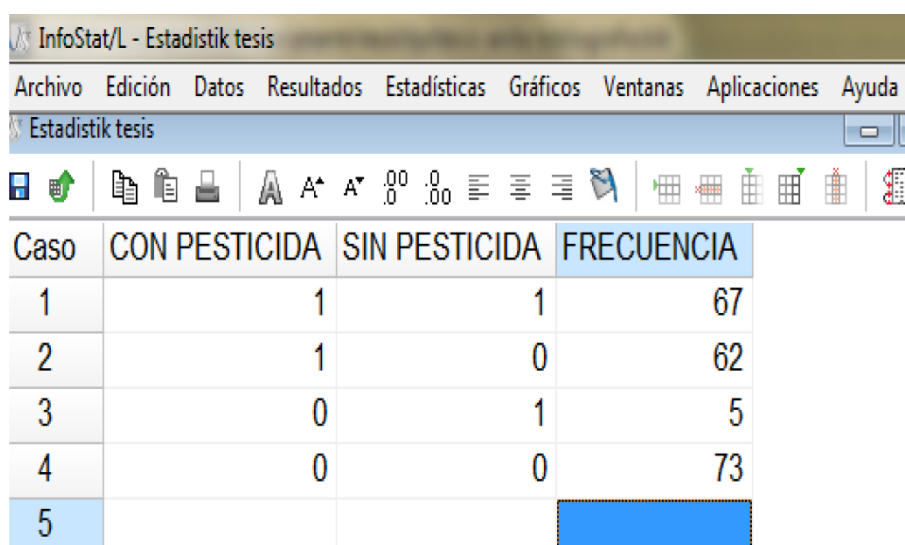
Odd ratio (OR): El OR determina un estimado (con intervalo de confianza) para las relaciones entre variables dicotómicas binarias, ofrece una interpretación más adecuada en términos de eficacia. 2) El OR es utilizable para examinar el efecto de otras variables sobre las relaciones usando la regresión logística (Pavlov, Aedo, & Chalero, 2010).

Riesgo relativo (RR): El riesgo relativo indica la probabilidad de que se desarrolle un evento ante la exposición a un factor de riesgo, relacionando con un grupo no expuesto al mismo factor (Pavlov, Aedo, & Chalero, 2010).

Intervalo de confianza (IC): Representa un rango de valores en el que se encuentran los datos muestrales con un nivel de confianza para el verdadero valor del parámetro en la población. Permite obtener una buena estimación cuando el OR se aproxima a uno y es la garantía de que el análisis no se realizó al azar. Generalmente los IC se calculan con una seguridad del 95 %, valor con el cual resta sólo la probabilidad de 5% (0.05) de que el verdadero valor del OR no se halle en ese intervalo, proporcionando la misma información cualitativa que el valor p (Pavlov, Aedo, & Chalero, 2010).

Para el análisis de la relación entre el uso de pesticidas sobre el daño en la morfología del polen fue requerido el programa estadístico InfoStat. Se estableció las variables dicotómicas: presencia de daño (1) y ausencia (0). Se tomaron todos los posibles problemas que podrían ocurrir al presentar: daños con el uso y sin el uso de pesticidas (1:1), daño sólo con el uso de pesticida (1:0), daño sin el uso de pesticida (0:1) y ausencia de daño con y sin pesticida. La tabla 4.4 resume los resultados.

Tabla 4.4: Tabla de contingencia 2x2 de representación de los posibles escenarios que podría ocurrir ante la presencia de daño en la exposición a pesticidas 1 y ausencia de la misma 0 en el estudio de la morfología del polen de tomate de árbol. InfoStat.



Caso	CON PESTICIDA	SIN PESTICIDA	FRECUENCIA
1	1	1	67
2	1	0	62
3	0	1	5
4	0	0	73
5			

A partir de los resultados de esta tabla de contingencia se analizaron parámetros como frecuencia absoluta, Chi cuadrado, Test de Fisher, odd ratio, riesgo relativo e intervalos de confianza para establecer si se cumple la hipótesis planteada para la presente investigación.

Tabla 4.5: Resultados de prueba de hipótesis y odd ratio. InfoStat

Estadístico	Valor gl	p	Cocientes de chance (odds ratio) y riesgos relativos		
Chi Cuadrado Pearson	44.42	1 <0.0001			
Chi Cuadrado MV-G2	51.70	1 <0.0001			
Irwin-Fisher bilateral	0.47	<0.0001			
Coef. Conting. Cramer	0.33				
Coef. Conting. Pearson	0.42				
Coeficiente Phi	0.46				

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio 1/2	15.78	6.21	40.08
Odds Ratio 2/1	0.06	0.02	0.16
R. Relat. (Col 1 1/2)	7.79	3.03	16.89
R. Relat. (Col 1 2/1)	0.13	0.06	0.33

Tabla 4.6: Resultados del análisis estadístico del daño en el polen relacionado con el uso de pesticidas. InfoStat

InfoStat/L - Estadistik tesis

Archivo Edición Datos Resultados Estadísticas Gráficos Ventanas Aplicaciones Ayuda

Resultados

C:\Users\ACER\Documents\tesis\Estadistik tesis.IDB2: 6/30/2013 - 11:35:22 AM

Tablas de contingencia

Frecuencias: FRECUENCIA

Frecuencias absolutas
En columnas: CON PESTICIDA

SIN PESTICIDA	0	1	Total
0	105	70	175
1	5	75	80
Total	110	145	255

Estadístico	Valor gl	p
Chi Cuadrado Pearson	64.66	1 <0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	75.73	1 <0.0001
Irwin-Fisher bilateral	0.54	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0.36	
Coef. Conting. Pearson	0.45	
Coeficiente Phi	0.50	

Cocientes de chance (odds ratio)

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio 1/2	22.50	9.00	56.27
Odds Ratio 2/1	0.04	0.02	0.11

Análisis de resultados

La aplicación de una herramienta informática de estadística, InfoStat, permitió el análisis de los resultados obtenidos para el estudio de la incidencia del uso de pesticidas (variable independiente) sobre los daños en la morfología del polen (variable dependiente). El análisis empleado fue de tipo bivariado para comprobar la hipótesis nula (H_0) planteada “La exposición a pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos incide significativamente sobre la morfología del polen”. De acuerdo a los resultados arrojados por InfoStat a partir de la tabla de contingencia 2x2, se indica efectivamente que el OR calculado como mayor a 1 se encuentra en un intervalo de confianza de [6,21; 40,08] para un nivel de confianza del 95 %. En esta situación, el valor 1 no forma parte del intervalo, por lo que se comprueba como factor de riesgo la relación entre las dos variables. En cuanto al riesgo relativo obtenido significa que el grano de polen sometido a un pesticida presenta un daño de 7.79 veces más que si no se usara pesticida es decir 0.13. Por otro lado, la prueba de hipótesis realizada mediante el test de Chi cuadrado y de Fisher contrastó la hipótesis nula y la hipótesis alternativa (H_1) “La exposición a pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos no incide significativamente sobre la morfología del polen”. En el cálculo se obtuvo un valor para chi cuadrado (χ^2) de 0.005 para un nivel de significación del 95 %. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis alternativa al presentar χ^2 un valor de alfa menor a 0.05.

En consecuencia, la asociación encontrada entre las dos variables es de carácter significativo y corresponde a un factor de riesgo el uso de pesticidas en la morfología del polen de tomate de árbol.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El tomate de árbol es uno de los diez cultivos de mayor importancia económica en Ecuador; sin embargo presenta enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos, afíidos, nematodos y plagas que reducen la calidad de los cultivos (Calvo, 2009). El método más común para combatir esta problemática es el uso de pesticidas de tipo químico, ecológico y biológico que al ser aplicados en dosis inadecuadas o por tiempos prolongados ocasionan una reducción en la fertilidad de la planta [26]. Por tal razón, el objetivo planteado de la presente investigación fue observar en el TEM cortes ultrafinos de polen de tomate de árbol para evidenciar y demostrar estadísticamente que los pesticidas convencionales, biológicos y ecológicos causan un efecto significativo en la morfología del grano de *Solanum betaceum*. Se han realizado estudios de morfología de polen, ultraestructuras y daños de productos tóxicos en varias de las 2.950 especies que forman parte de la familia *Solanaceae*. Pese a esto, a nuestro conocimiento, *Solanum betaceum* no ha sido estudiado todavía (Lashin, 2012). Para la realización del presente trabajo, se establecieron tres partes fundamentales: (1) recolección, germinación in vitro del polen y preparación de las muestras, (2) seccionamiento en el ultramicrotomo y (3) observación en el TEM. Cada uno de los procesos señalados sufrió problemas y modificaciones que fueron superados con la finalidad de cumplir el objetivo planteado.

Recolección y germinación *in vitro*

El espécimen seleccionado fue el grano de polen por ser el gameto masculino de las plantas gimnospermas que juega un papel central en la reproducción sexual de la planta (Nuran, Feruzan, & Goksel, 29-37). Los lugares de recolección de las muestras fueron el sector de Selva Alegre y la Hacienda El Prado en la provincia de Pichincha y el sector de Patate en la provincia de Tungurahua. Para observar los cambios que los pesticidas generan se extrajo polen de las anteras de la flor. Acto seguido se realizó la germinación *in vitro* del polen en un medio con ácido bórico y sacarosa para simular las condiciones que presenta el estilo al empezar la elongación paulatina del tubo polínico. En la investigación base realizada en campo por Padilla (2013), se probaron 18 tipos de pesticidas sometiendo al cultivo de tomate a dosis recomendadas por los fabricantes de cada producto. Los datos recolectados en campo indicaron los pesticidas que generan mayor y menor daño mediante la aplicación de un análisis de fertilidad del polen observado bajo el microscopio óptico (MO). Las muestras para ser observadas deben ser teñidas con acetocarmín que tiñe de rojo a los granos de polen.

Sin embargo, esta tinción ocasiona la degeneración del citoplasma efectuando una sobreestimación de la fertilidad de los granos. Para ayudar a observar mejor el daño de los pesticidas sobre el polen, se realizó el estudio del grano de polen de tomate bajo el TEM. Este microscopio permite observar con detalle la estructura

interna de los cortes ultrafinos de polen a un aumento de 2100 veces en comparación con el aumento máximo de 100 veces en el MO.

Los seis pesticidas utilizados para el ensayo son de naturaleza distinta y en campo actúan para combatir patógenos específicos. La mayoría de plagas que afectan a los cultivos de tomate de árbol son hongos, razón por la cual se emplean fungicidas encargados de combatir a estos organismos. Empezando por los pesticidas que mostraron menores daños en la morfología del polen aquellos de origen biológico.

El pesticida A es un bioinsecticida obtenido a partir del hongo facultativo parásito *Metarhizium anisopliae* que afecta a un amplio rango de insectos de diferente orden. El ciclo de vida de este organismo consiste en la germinación asexual de la conidia o espora sobre la cutícula del insecto. La infección ocurre cuando el tubo germinativo del hongo penetra la cutícula del insecto e introduce pequeñas hifas. Estos fragmentos de hifas crecen y se multiplican y eventualmente matan al insecto (Leland, 2013). Así, juega un papel muy importante en el control biológico por no ser un compuesto contaminante del ambiente y por formar parte del equilibrio natural del ecosistema (Hayat, 2000). El otro pesticida biológico utilizado es B, también obtenido a partir de un hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii*. Este insecticida biológico ayuda al control de la mosquita blanca (*Bemisia* sp.), trips y ádos, afectando a los insectos de los órdenes Hemiptera, Homoptera y Thysanoptera (Franco, Rodríguez, Cevantes, & Barranco, 2011). Las esporas de *Lecanicillium lecanii* se adhieren a la cutícula del insecto por medio de acción enzimática y lo infecta produciendo hifas a partir de la germinación de las esporas que ingresaron y penetraron el tegumento. El

hongo destruye internamente al insecto por medio de una toxina denominada *Bassianolida* y crece a partir del tegumento en un lapso de 4 a 6 días.

Por otro lado, entre los pesticidas ecológicos se utilizó C o denominado Extracto Carboxamida, el cual es aplicado en los cultivos para inhibir el crecimiento de hongos. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la enzima *ubiquinona succinato* deshidrogenasa del complejo II mitocondrial ocasionando la interrupción del transporte de electrones en la cadena de la respiración mitocondrial; así el hongo permanece sin energía y es eliminado (Elskus, 2012). El pesticida D también de tipo ecológico, formado por *Hidroximetil Alquil N Dimetil* es un fungicida y bactericida de contacto de acción sistémica. Su mecanismo de acción consiste en localizar al topatógeno y activar un mecanismo de competencia por oxígeno, donde se precipitan las proteínas propias del hongo y se las elimina por bloqueo enzimático (Padilla, 2013).

Finalmente, los productos químicos empleados para observar daños son E y F. El pesticida E o clorotalonil ($C_8Cl_4N_2$) es de acción fungicida de amplio espectro usado en plantaciones de árboles frutales y posee alta persistencia en el suelo. Ha sido reconocido por la FAO como un producto carcinogénico, tóxico para animales acuáticos y que ocasiona infertilidad en humanos (FAO O. d., 1982). El mecanismo de acción de clorotalonil radica en afectar a los enlaces del glutatión, un antioxidante no enzimático que es básico para importantes funciones enzimáticas en la detoxificación y respiración celular. También, inhibe la acción de la oxidasa NADPH y en el proceso de glicólisis, inhibe a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y afecta a las

respuestas inmunes incidiendo negativamente en la función de los fagocitos. Es decir es un compuesto altamente tóxico de múltiples efectos a nivel celular, razón por la cual incide negativamente sobre la morfología del polen. Por otro lado, F o *Pyra-clostrobin* + *Epoxiconazol* es un fungicida sistémico empleado para el control de enfermedades foliares, empleado debido al doble modo de acción combinado de sus dos ingredientes. El ingrediente activo Epoxiconazol inhibe la biosíntesis de ergosterol, constituyente de la membrana celular de los hongos. El otro ingrediente activo Pyraclostrobin actúa como inhibidor del transporte de electrones en las mitocondrias de las células de los hongos inhibiendo la formación de ATP. Produce radicales libres y afecta uniéndose a la enzima ubiquinol oxidasa del complejo citocromo bc1.

Los radicales producidos durante el proceso alteran a las membranas mitocondriales y citoplasmáticas inhibiendo a futuro el crecimiento del hongo (Elskus, 2012). En los cultivos es usado generalmente debido a que inhibe la germinación de esporas y el desarrollo de tubos germinativos de los hongos (Mantecón, 2008). Según De Lacerda (1994) existe interferencia de los agrotóxicos en la germinación del polen observando que ciertos productos reducen la germinación del tubo polínico, tanto in vitro como in vivo al ser utilizados de manera excesiva. Esta es una de las motivaciones por las cuales se decidió emprender un estudio que muestre las variaciones a nivel interno, permitiendo observar los cambios morfológicos generados ante la influencia del uso de pesticidas.

Preparación de muestras

La preparación de muestras para acondicionar al polen es fundamental debido a que en lo posible no se debe alterar la naturaleza de la muestra, lo cual es el mayor obstáculo para la observación de muestras biológicas (Cortadellas, Garcia, & Fernández, 2010). El primer paso, la fijación, fue realizada con glutaraldehído al 1% durante toda la noche a temperatura ambiente para asegurar que se suspendan todos los procesos celulares, pero preservando las características internas y la organización de las proteínas. De hecho, Cortadellas y otros (2010) enfatizan la importancia de la fijación al ser el primer proceso de preservación que sufre la célula, el cual garantiza la preservación del tejido u organismo intentando mantener al máximo las condiciones naturales de la muestra. La fijación debe ser realizada con una muestra fresca porque al darse el proceso de muerte celular ocurre inmediatamente la autólisis, autodestrucción, generando una serie de enzimas digestivas en la célula que eliminan el tejido. Debido a este hecho, la fijación debe suspender los procesos celulares de manera paulatina y simultáneamente debe estabilizarlos para la prevención de la autólisis. Una vez fijada la muestra se realizaron dos lavados con buffer fosfato para retirar todo el exceso de reactivo que puede interferir con otros procesos y para mantener la fisiología natural del tejido (Cortadellas, Garcia, & Fernández, 2010).

El problema que se presentó en el lavado fue la pérdida gradual del polen al encontrarse sumergido, por lo que se sometió a la muestra a microcentrifugación. La centrifugación diferencial es una técnica empleada para producir fracciones celulares en un tejido homogéneo para separar mitocondrias, núcleos, lisosomas y vesículas de la membrana y generar un pellet (Frei, 2011). Sin embargo, el afán de centrifugar al

polen no fue fraccionarlo, sólo reunirlos para evitar su pérdida. Se intentó modificar el tiempo y las revoluciones en la microcentrifugación para evitar el menor daño posible de la estructura y poder concentrar el polen en la base del tubo ependorf. Posteriormente, se ejecutó la posfijación con un fuerte oxidante, tetraóxido de osmio para detener los procesos celulares que no fueron modificados previamente con glutaraldehído. El TOO actúa uniendo a los dobles enlaces de la cadena insaturada de los ácidos grasos y a su vez los conserva para que en la deshidratación no se sean dañados por el solvente orgánico. Por ser un metal pesado también adiciona un contraste positivo a la muestra al lograr dispersar electrones (Skepper & Powell, 2008). En el caso particular del polen de tomate de árbol que no presenta coloración, ayuda fundamentalmente a teñir de negro a los granos para que sean visualizados y se evite la pérdida de más muestra en los siguientes procesos. A su vez se realizaron también dos lavados con agua destilada después del TOO para retirar residuos de la solución que pueden reaccionar en la infiltración de la muestra. A continuación se procedió con la deshidratación de la muestra con soluciones seriadas de etanol para eliminar el agua de la muestra que puede interferir en el embebimiento al no ser miscible con la resina epoxy y en la observación en el TEM. El agua al ser la molécula más abundante de los organismos biológicos debe ser retirada paulatinamente para que la célula no sea deformada. En adición, el agua presenta una estructura bipolar y al tener esta condición puede interactuar fácilmente con otras moléculas cargadas; incluyendo los grupos "R" de las proteínas y los aminoácidos (Cortadellas, Garcia, & Fernández, 2010). Es decir, al deshidratar el agua de la muestra es posible ocasionar una distorsión en la estructura interna de la célula, condición poco favorable para la observación.

Al culminar la deshidratación, la muestra es expuesta a un solvente químico que es miscible con la resina epoxy generalmente el óxido de propileno. El inconveniente presentado en este estudio fue que se contó con histoclear, un compuesto utilizado como solvente orgánico con paraplast, otro tipo de medio de embebimiento. Por lo tanto, el histoclear no ayudó a que se cumpla el proceso de infiltración pues no es miscible con resina epoxy. Para comprobar este hecho se puede observar en la figura 13.1 que la resina no se compactó totalmente mostrando granulaciones en toda la sección dado que la resina y el histoclear no son compuestos compatibles. En lugar, protocolos para microscopia emplean óxido de propileno (EtOH/OP) (Kuo, 2007). Sin embargo por carencia del mismo en la investigación se utilizó un sustituto, acetonitrilo. Ventajosamente, Edwards y otros (1992) en su publicación establece que es conveniente usar el acetonitrilo en lugar de óxido de propileno pues es menos tóxico y no es carcinogénico. En adición, es un solvente bipolar altamente miscible en agua, alcoholes, ésteres, éteres, en resina epoxy y sobre todo combina las propiedades del etanol y la acetona mejorando los resultados de la infiltración. De hecho, a diferencia del EtOH/OP, el acetonitrilo no solubiliza a los fosfolípidos cargados, ayudando a limitar la pérdida de los mismos durante la deshidratación (Edwards, Yeh, Tarnowsky, & Schnbaum, 1992). Los resultados obtenidos en la infiltración con acetonitrilo fueron óptimos al no volver a presentar inconsistencia en la resina.

En cuanto al embebimiento, fue realizado con resina epoxy, formada por tres monó-meros y un acelerador. Los monómeros que conforman la resina epoxy se unen para formar una larga cadena de polímeros que a su vez se unen a polímeros adyacentes durante el proceso de polimerización ayudándolos a mantenerse estables

ante el haz de electrones del TEM (Skepper & Powell, 2008). Se ha comprobado por diversos estudios que la resina epoxy es útil para embeber muestras biológicas debido a varios factores como: la sencillez y uniformidad en la polimerización de los compuestos que la conforman, mínimo encogimiento o expansión de los polímeros, la excelente calidad de las secciones finas polimerizadas y la gran estabilidad bajo el haz de electrones en el TEM.

A diferencia de otras resinas como metacrilato, distorsiona mínimamente la muestra a observarse (Edwards, Yeh, Tarnowsky, & Schnbaum, 1992); condición observada en los resultados presentados a lo largo del proyecto. Mediante experimentaciones previas, se ha establecido la necesidad de ajustar el procedimiento de infiltración al tipo de muestra que se necesita embeber en la resina para lograr difundir el químico en la muestra (Hillier & Gettner, 1950). El polen en este caso fue infiltrado en un proceso que duró tres días para garantizar la inclusión del polímero y los resultados fueron los esperados.

Seccionamiento

Las muestras para visualizarse en el TEM deben presentar una estructura delgada que posibilite el paso de los electrones para formar la imagen. Para cumplir este requisito, los bloques de resina fueron cortados con cuchillas de vidrio en el ultramicrotomo Power Tome XL. Este dispositivo opera con un sistema automático de avance mecánico para cortar la muestra en los parámetros señalados en la consola de control y cuenta con un porta muestras en donde para colocar la resina tallada junto

con una cuchilla de lo agudo para el seccionamiento. Hillier y Gettner (1950) identifican en su estudio de mejoramiento del seccionamiento ultrafino de tejido para Microscopia Electrónica algunas fuentes de variación en el sistema de avance del ultramicrotomo: (1) fricción estática, (2) vibraciones de origen externo y (3) expansión térmica. En contraste, al realizar la operación de seccionamiento manualmente se producen variaciones en el espesor de un orden de 0,2 mm, el cual en seccionamiento de cortes ultrafinos altera significativamente el corte.

Durante el seccionamiento, se evitó en lo posible el movimiento manual de la rueda del ultramicrotomo para reducir estas variaciones en el espesor y obtener secciones uniformes de color dorado, correspondiente en la tabla de coloración-espesor en el rango de 90 a 100 nm. Cabe recalcar que el mecanismo de avance mecánico de este dispositivo consiste en el movimiento de una rueda que tiene piñones, el paso de cada pino genera una unidad de avance y se refleja en un giro completo de la rueda de corte, lo que genera fricción estática. Razón por la cual debe prestarse atención al alineamiento de la cuchilla y de la muestra para reducir en lo posible esta fricción. Si se pretende observar si el ultramicrotomo está avanzando normalmente, se puede observar en la consola electrónica los avances en cada movimiento, la velocidad y el espesor de la sección. Para disminuir la fricción, se requiere de una alineación óptima de la cuchilla y la muestra de tal forma que una fuerza de corte, es decir la acción de la cuchilla sobre el bloque, genere el seccionamiento. Se ha encontrado que para un determinado bloque, cuchilla, velocidad de corte y superficie de líquido, la longitud de la sección flotando en el agua es una función directa del espesor de corte (Hillier & Gettner, 1950).

Así, el corte es recogido en agua para evitar la reducción del tamaño del mismo y para observar el espesor obtenido. Generalmente, el encogimiento de la muestra es apreciable desde 0.3 mm de espesor e incrementa con el decrecimiento del espesor de la sección, usualmente mayor al 50 por ciento de secciones de 0,1mm de espesor.

Por otro lado, la fuente que origina los cambios térmicos ha sido reconocida como la luz utilizada para iluminar la cuchilla durante el seccionamiento, razón por la cual los dispositivos cuentan con luces fluorescentes. A pesar de ello, la sección al ser ultradelgada se expone al medio ambiente y a sus cambios por lo que el dispositivo debe estar colocado en un lugar donde se eviten corrientes de aire y los cambios de temperatura (Hillier & Gettner, 1950). Los principales errores encontrados en el seccionamiento, aún evitando ocasionar fricción en la muestra y mejorando el alineamiento, fueron la falta de agudez del borde de la cuchilla de vidrio. Este error fue evidenciado en las fotografías tomadas en el TEM, donde se visualizaron terribles daños en las secciones como rayones profundos y arrugas. Se ha establecido que la calidad de las secciones tiene una estrecha relación con variables como: la naturaleza del tejido, el proceso de fijación y deshidratación empleado, el tipo y medio de infiltración, la agudeza y limpieza de la cuchilla, los ángulos de inclinación en el alineamiento, la velocidad de corte, la temperatura y las propiedades del líquido donde se depositan los cortes. Las secciones observadas que presentaron una línea marcada sobre la resina son consecuencia de una alineación resina-cuchilla deficientes. Cuando se observa microscópicamente contracción en las secciones en dirección del seccionamiento se establece una dependencia entre la naturaleza del tejido y el espesor de la cuchilla (Hillier & Gettner, 1950).

La presencia de secciones encogidas y dobladas indica acumulación de partículas en el filo de la cuchilla y es producto de la tensión superficial producida en la recolección en el agua, generalmente para evitar esta condición se debe ajustar el nivel del agua hasta formar en la superficie un reflejo plateado. Las lesiones más serias en las cuchillas ocasionan rompimiento de la resina al momento de realizar el seccionamiento (Hillier & Gettner, 1950). Para remediar los problemas enfrentados por las fallas se realizaron cuchillas nuevas, previamente observadas en el estereomicroscopio para evitar la presencia de partículas en el filo de la cuchilla que pudieran ocasionar rupturas o estrías. También para que los cortes se extiendan en el momento de recogerlos, se calentó durante 3 minutos a las rejillas de cobre. Este hecho ayudó a que los cortes se adhieran mejor a la superficie de la rejilla y también a evitar el encogimiento en las secciones. Sin embargo, a pesar de no lograr eliminar los daños en las secciones en su totalidad, los pólenes pudieron ser observados y analizados.

Tinción

El procedimiento de tinción fue realizado de acuerdo a la técnica de doble tinción establecida por Daddow (1983) usando dos metales pesados acetato de uranilo y citrato de plomo. Se ha demostrado que la doble tinción permite observar organelos en secciones ultrafinas y mejora el contraste en especímenes con bajo contraste que han sido expuestas a largos tiempos de fijación (Daddow, 1983) . El primer metal usado para la tinción fue el acetato uranilo, este químico puede ser utilizado como fijador o también para tinción al ayudar a retener fosfolípidos y añadir contraste en las

secciones finas por desviación de electrones (Skepper & Powell, 2008). El tiempo utilizado para la tinción con acetato de uranilo fue modificado en dos ocasiones pues las secciones observadas presentaron demasiada coloración con lo que no se pudo observar claramente la estructura.

Posteriormente, se usó citrato de plomo para emplear el mecanismo descrito para la tinción doble donde los organelos teñidos primero con uranilo, mejoran la tinción con citrato. Reynolds (1962) estable que el citrato de plomo en altas concentración de soluciones básicas es un compuesto quelante con una asociación entre ligandos y el ion plomo que se une mejor a pH más alto. El citrato se une a compuestos organofosfatatos y otras especies aniónicas presentes en componentes biológicos seguidos de una fijación, deshidratación e infiltración en polímeros. Como resultado se pueden observar estructuras teñidas como membranas citoplasmáticas, ribosomas, glicógeno y material nuclear. En cuanto a los tiempos de tinción, varían de acuerdo al tipo de resina y al proceso de fijación, siendo para resina epoxy un tiempo recomendado de 5 a 10 minutos para el citrato de plomo. Si la muestra es fijada con glutaraldehído y buffer fosfato, posfijada con tetraóxido de osmio el tiempo de tinción se reduce a 5 minutos máximo o puede darse una sobre tinción (Reynolds, 1962). En el protocolo establecido para la tinción se comprobó este hecho, pues aparentemente el polen al exponerlo a tiempos mayores a 10 minutos con acetato de uranilo y 5 minutos con citrato de plomo se sobre tiñe dificultando la observación de la estructura interna. Finalmente, otros inconvenientes presentados con la tinción fueron los lavados y la formación del precipitado. Los lavados son una parte fundamental para la observación debido a que retiran los residuos de los colorantes de la muestra y deben ser realizados lentamente para evitar la caída de los cortes. Además, se pueden mejorar los resultados

calentando el agua para que también evite la formación de precipitados, los cuales también se forman por el uso prolongado de las soluciones.

Observación de cortes ultrafinos Hillier y Gettner (1950), en su estudio de mejoramiento del seccionamiento ultrafino de tejido para Microscopia Electrónica recalcan la necesidad de la aplicación de la Microscopia Electrónica en los campos de la medicina y de la biología direccionados al seccionamiento de muestras ultrafinas en el orden de 0,2 μ m, con lo cual se mejora la observación de estructuras superando la limitación en el microscopio óptico. La familia Solanaceae en el campo de la palinología ha sido descrita por tener simetría radial, tres poros o estructura tricolporada (Lashin, 2012). En las secciones obtenidas se logró apreciar esta condición porque se visualizó en el control sin germinación la presencia clara de las tres aperturas y en el control con germinación una de las aperturas originó al tubo polínico. Teniendo claras estas características para el polen de tomate de árbol, se analizaron los pólenes expuestos a pesticidas biológicos, ecológicos y químicos. Los criterios tomados para el reconocimiento de daños en la morfología fueron: la forma, el grosor de la intina y exina y la presencia de organelos en el citoplasma. Los resultados obtenidos indican que el tipo de pesticida que generó mayor daño en el polen es de tipo químico, seguido por los de tipo ecológico y biológico. Las variaciones son claras debido a que el polen pierde totalmente su forma tricolporada e inclusive adopta formas irregulares que no son propias de su naturaleza. En cuanto a la formación del tubo polínico, se puede apreciar que los pesticidas biológicos no afectan de forma significativa a esta condición al evidenciarse la presencia de tubo polínico en las muestras. Por otro lado, los pesticidas ecológicos si ocasionan variaciones en la morfología del polen pero no inciden sobre la reducción del tubo polínico. A nivel

estructural los granos de polen maduros deben presentar ambos núcleos, generativo y vegetativo y un citoplasma denso por la presencia de plástidos. Abreu y otros (2006) en su estudio con polen de *Vitisvinifera cv* establece que los pólenes maduros tricolporados presentan sustancias de almacenamiento de proteínas, lípidos pues son necesarias para la división de las células generativas y para la formación de las dos células espermáticas durante la polinización.

Sin embargo, en los granos de polen observados expuestos a productos químicos resulta difícil el reconocimiento de los núcleos internos y en el caso de los pesticidas ecológicos ambos núcleos presentan igual tamaño y forma. Para comprobar los cambios evidenciados en el polen se efectuó un análisis estadístico empleando el riesgo relativo (RR) y Odds ratio (OR). Los resultados obtenidos de este análisis establecen que el uso de pesticidas es un factor de riesgo para la morfología del polen, por lo que si se llega a comprobar la hipótesis.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- El estudio de la morfología del polen ayudó a establecer un protocolo de preparación de muestras de polen evidenciando la importancia de considerar el tipo de muestra, el tamaño y la naturaleza de la misma para establecer una preparación que no modifique al espécimen y permita su observación.
- El embebimiento en resina epoxy media resultó satisfactorio para el seccionamiento ultrafino y la posterior observación en el TEM. Además, se estableció una técnica de tinción que proporcionó de un óptimo contraste a los organelos y a la pared celular del polen.
- El análisis de los cambios efectuados en la morfología del polen sometido a tres grupos de pesticidas identificó los daños internos sufridos ante la exposición *in vitro* durante la germinación. De los tres tipos de pesticidas empleados los productos de tipo químico generan un daño del 80% de los pólenes observados en los dos pesticidas empleados. Seguido por los pesticidas ecológicos que dañan el 50% de los pólenes donde el producto

que generó mayor efecto corresponde a Hidroximetil Alquil N Dimetil. Por último los pesticidas biológicos generaron una variación en la morfología del 10% de los cuales *Metarhizium anisopliae* es el tipo de pesticida que generó mayor daño en las muestras. Por lo tanto, se establece que los pesticidas de tipo químico son los productos que ocasionan mayores cambios en la morfología del polen, la intina y los núcleos internos presentes.

- El estudio de los efectos de los tres grupos de pesticidas ayudó a evaluar la viabilidad del polen, la cual refleja una incidencia significativa en la morfología interna que en consecuencia afecta a la reproducción sexual de la planta.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Para futuras aplicaciones de cortes ultrafinos se recomienda para la preparación de muestras con buffer fosfato, glutaraldehído y tetraóxido de osmio elaborar la solución de citrato de plomo para la tinción con una dilución de 1:1000 veces con 0.001 N de NaOH para prevenir una excesiva tinción (Reynolds, 1962). Además, sería favorable comparar la infiltración con óxido de propileno y acetonitrilo para establecer el mejor protocolo de fijación. También sería conveniente emplear distintos tipos de resina dura y suave con polen para comparar y observar si existe variación en los resultados. Finalmente, para obtener cortes ultrafinos de espesor menor a 90 nm es recomendable usar una cuchilla de diamante que obtiene secciones de alta calidad sin dañar la muestra a observarse.
- Los resultados obtenidos evidenciaron que existe una variación en la morfología del polen por lo que sería interesante ampliar el estudio a nivel molecular para dar a conocer las mutaciones ocasionadas por los pesticidas en el polen. Para complementar la información obtenida acerca del efecto de los pesticidas sobre el grano de polen se podría también realizar un estudio bioquímico de rutas biológicas afectadas por el uso de pesticidas que expliquen la variación en la morfología interna del polen.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, I., Costa, M., Oliviera, M., Cunha, M., & Castro, R. (2006). Ultrastructure and germination of *Vitis vinifera* cv. Loureiro pollen. *Protoplasma*, 131-135.
- Amano, Y. (2004). *Introducción a la Microscopía Electrónica: Principios y Aplicaciones*. Guayaquil: Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical " Leopoldo Izquieta Pérez".
- Amelinckx, D., Dyck, J., Landuyt, G., & Tendeloo, S. (1997). *Electron Microscopy: Principles and Fundamentals*. VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Andalucía, J. d. (2012). *Partes de la flor*. España.
- Arnold, S. (2013). *olymer sample approaching diamond knife in ultramicrotome*.
- Beck, S. (2010). *Electron Microscopy: A Handbook of Techniques for the Biologist*. Nassau Community College.
- Blasco, A., & Jimeno, A. . (2013). *Reino de las plantas. las angiospermas*.
- Bozzola, J., & Russell, L. (1999). *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones & Bartlett Learning.
- Calvo, I. (2009). Cultivo de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) área: Manejo integrado de cultivos / frutales de altura. *Proyecto Microcuenca Plantón - Pacayas Boletín técnico No. 8*.
- Carretero, B. (1992). Estudio ultraestructural y citoquímico del desarrollo y maduración de la microspora de tomate (*Lycopersicon esculentum* m).
- Cástor, G., & Guisande, F. (2006). *Tratamiento de datos*. Ediciones Díaz de Santos.
- Cerda, J., & Villaroel, L. (2007). Interpretación del test de chi-cuadrado (χ^2) en investigación pediátrica. *Revista Chilena de Pediatría*, 414-417.

- Cortadellas, N., Garcia, A., & Fernández, E. (2010). Transmission Electron Microscopy in Cell Biology:, chapter Sample preparation techniques and image information,.
- Daddow, L. (1983). A double lead stain method for enhancing contrast of ultrathin sections in electron microscopy: a modified multiple staining technique. *Journal of Microscopy*, 147-153.
- De Lacerda, C., Gomes, O., Cruz, E., & De Oliveira, L. (1994). Pesticides in vitro interference in the germination and in the tube pollinic germination and elongation in the tomato plant cultivar santa cruz kada. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 1651-1656.
- Diatome, L. (2011). *Patente nº PA 19440*.
- Díaz, P., & Fernández, P. (2004). Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. 304-308.
- Dykastra, M., & Reuss, L. (2003). *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques and Troubleshooting*. Springer.
- Edwards, H., Yeh, Y., Tarnowsky, B., & Schnbaum, G. (1992). *Journal of Microscopy Research and Technique*, 39-59.
- Egerton, R. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. New York: Springer Science Business Media, Inc.
- Elskus, A. (2012). Toxicity, sublethal effects, and potential modes of action of select fungicides on freshwater fish and invertebrates. *US Geological Survey*, 1212-1213.
- Esau, K. (1982). *Anatomía de las plantas con semilla*.
- FAO, O. d. (1982). Residuos de plaguicidas en los alimentos, 1981: informe de la reunión conjunta del cuadro de expertos de la FAO en residuos de plaguicidas en los alimentos y en el medio ambiente. *FAO*.
- FAO, O. d. (2013). *La agricultura andina: Tomate de árbol*.
- Focosi, D. (2013). *Microscopy*.
- Franco, K., Rodríguez, S., Cevantes, J., & Barranco, J. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *SOCIEDADES RURALES, PRODUCCIÓN Y MEDIO AMBIENTE*, 11.
- Frei, M. (2011). *Biofiles*. SIGMA- ALDRICH.
- Gilbert, S. (2005). *Biología Del Desarrollo*.
- González, A. (2008). *Botánica morfológica, morfología de plantas vasculares*.

- González, A. (2008). *Botánica morfológica, morfología de plantas vasculares*.
- González, M., Estévez, A., & García, D. (1995). Métodos para la determinación de la fertilidad del polen y su relación con los resultados de las polinizaciones. *II(16)*, 84-88. (C. Tropicales, Ed.) La Habana, Cuba: Enfermedades Tropicales.
- Hayat, M. (2000). *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*. Cambridge University Press.
- Hernández, G., Prin, J., & Rojas, B. (Septiembre de 2010). El Microscopio Electrónico como herramienta para el estudio de los polímeros y otros materiales. *Ultramicrotomía. Revista Iberoamericana de Polímeros, 11(5)*, 258-273.
- Hesse, R., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., & Ulrich, S. (2009). *Pollen Terminology*. New York: SpringerWien.
- Hillier, J., & Gettner, M. (1950). Improved ultrathin sectioning of tissue for electron microscopy. *Journal of Applied Physics*, 889-895.
- Honys, D., Reòák, D., & Twell, D. (2006). Male gametophyte development and function. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, 76-87.
- Kaech, A. (2012). *Introduction to electron microscopy*. university of zurich center for microscopy and image analysis.
- Kuhlmann, D. (2008). *Microtomy of tissue specimens, collection of sections*. Heidelberg.
- Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy: Methods and protocols*. Tototawa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Lashin, G. (29-30 de Abril de 2012). Ultraestructure and Pollen Morphology Significance of some species os Solanum (Solanaceae). 141-156.
- Leland, J. (2013). U.S.A.
- Lucio, D., Espín, S., & Soria, N. (1997). iveres residuales de plaguicidas en frutas andina: Tomate de árbol (cyphomandra betacea s) y naraNjilla (solanum quitoense). *INIAP*.
- Lucio, D., Espín, S., & Soria, N. (1997). Niveles Residuales de plaguicidas en frutas andinas: TOMATE DE ARBOL (Cyphomandra betacea S.) Y NARANJILLA (Solanum quitoense). Quito: INIAP.
- Mantecón, J. (2008). Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (septoria glycines). *Ciencia e Investigación Agraria*, 211-214.

- Martínez, M., Álvarez, C., & Ramos, J. (1996). Control alternativo para el perforador del fruto del tomate. *Centro de Investigaciones de Lara*, 54.
- Ministerio de Agricultura, G. A. (2011). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca*. Ecuador.
- Moddla, S. (2012). Guide to Sectioning on the Reichert-Jung Ultracut E Ultramicrotome. En D. B. Institute. Leica Systems.
- Núñez, E., Steyerberg, E., & Núñez, J. (2011). Estrategias para la elaboración de modelos estadísticos de regresión. *Revista Española de Cardiología*, 64.
- Nuran, E., Feruzan, D., & Goksel, O. (29-37). Ultrastructural features of *mimilus aurantiacis* (scroplulariaceae) pollen tubes in vivo. *Annals of Brazilian Academy of Sciences*, 2009.
- Padilla, F. (2013). Efecto de pesticidas químicos, ecológicos y biológicos sobre la vialidad del polen en mora de castilla y tomate de árbol. *Anteproyecto de tesis de Maestría*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Pavlov, S., Aedo, S., & Chalero, F. (2010). Riesgo relativo y odds ratio ¿qué son y cómo se interpretan? *Revista de Obstetricia y Ginecología*, 51-54.
- Perveen, A., & Qaiser, M. (2007). Pollen morphology of family solanaceae from pakistan. *Pakistan Journal of Botanica*, 2243-2256.
- Porter, K. (1964). *Ultramicrotomy, in: Modern developments in electron microscopy*. . New York: Academic Press.
- Potts, H. (1983). Desarrollo y Morfología de la semilla. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*.
- Products, R. (s.f.). User Guide for PowerTome Ultramicrotomes. *Boeckeler Instruments*.
- Punt, W., Hoen, P., Blackmore, S., Nilsson, S., & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 1-81.
- Purves, W., & Sadava, D. (2009). Vida / Life: La ciencia de la biología / The Science. *Sinnaver Associates*.
- Reid, N. (1977). *Ultramicrotomy: Practical Methods in Electron Microscopy*. (A. Glauert, Ed.) New York.
- Reynolds, E. (1962). The use of lead citrate at high ph as an electron opaque stain in electron microscopy. *Harvard Medical School*, 208-212.
- Ríos, M. (2010). Control biológico de la antracnosis (*colletotrichum gloesporioides*) en tomate de árbol (*solanum betaceum*) en el ecotipo tamarillo mediante hongos endófitos. *Ingeniería Agropecuaria Industrial*, 150.

- Silva, J., & da Sasson, C. (1998). *Biologia*. São Paulo: Editora Saraiva.
- Skepper, J., & Powell, J. (2008). Immubogold staining of epoxy resin sections for transmission electron microscopy (TEM). *Cold Spring Harbor Protocols*, 1-4.
- Solagro. (2006). Recuperado el Febrero de 2013, de <http://www.solagro.com.ec/cultdet.php?vcultivo=Tomate%20de>
- Tech, M. S. (2012.). *Online manual of star tech diamond knife*. Obtenido de Tech, Micro Star.
- Tewell, D. (2013). *Pollen development: Pathways of pollen development*. Recuperado el Mayo de 2013, de University of Leicester: <http://www2.le.ac.uk/departments/biology/people/twell/lab/pollenis/development>
- Tort, N., ÖZTÜRK, I., & GÜVENSEN, A. (2005). EFFECTS OF SOME FUNGICIDES ON POLLEN MORPHOLOGY AND ANATOMY OF TOMATO (LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL.). *I(37)*, 23-30. Turquía: Pakistan Journal of Botany.
- University of Delaware*. (2013). Recuperado el Abril de 2013
- Urbina, C., Rodríguez, P., Finol, H., Mérida, T., & Ogura, M. (1997). *Introducción a la microscopía electrónica- guía teórico práctica*. Universidad Central de Venezuela.
- Urbina, C., Rodríguez, P., Finol, H., Mérida, T., & Ogura, M. (s.f.). *Introducción a microscopía electrónica- guía teórico práctica*. Universidad Central de Venezuela.
- Voutou, R., & Chrysanthi, E. (2008). *Electron microscopy: The basics*. Physics of Advanced Materials.
- Williams, D., & Carter, B. (2009). *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. Springer.
- Yopez, S. (2012). *Glosario de botánica*.