

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

Ana Gabriela Del Hierro. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Septiembre 2013

Dr. Alexis Debut, Director de tesis. Centro de Microscopía Electrónica.

Ing. Flavio Padilla, docente Departamento de Ciencias de la Vida.

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 _ores 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.

Introducción

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 (Ríos, 2010). 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. Sin embargo, Lucio et 1997, han reportado enfermedades relacionadas con el desarrollo de plagas de insectos, nematodos, áfitidos y hongos que afectan al cultivo. 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 (Tort, 2005). 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.

Materiales y Métodos

Se empezó el estudio a partir de un muestreo que consistió en la recolección de 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). 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. Para la observación en el TEM se siguió el protocolo de acondicionamiento químico que consistió 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 posfijación. En la deshidratación se tomó como base el protocolo descrito por Kullmann (2008), efectuando diluciones seriadas de etanol a distintos porcentajes: 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90% y 99.9%. Los tiempos para ambos protocolos fueron modificados, para la fijación en glutaraldehído al 2% se dejó al polen suspendido durante toda la noche. Para continuar, se realizó la posfijación en TOO durante una hora y se efectuaron dos lavados con agua destilada. Para finalizar, la deshidratación consistió en soluciones seriadas de etanol al 30 %, 50% y 70% por 30 minutos y por una hora en 90% y 99.9%. Se elaboró resina epon y se infiltró la muestra empezando con una proporción 1:1 acetónitrilo:etanol, 2:1 acetónitrilo:resina, 1:1 resina: acetónitrilo, 2:1 resina:acetónitrilo 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. Los cortes semifinos fueron obtenidos con una cuchilla de vidrio seca o con una cuchilla incorporada con un bote lleno. Las secciones ultrafinas fueron obtenidas después de localizar en los cortes semifinos el área de interés para el seccionamiento. Posteriormente, se obtuvo en el ultramicrotomo a una velocidad de corte de 1.5 mm/seg cortes de 90nm de espesor. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 2% previo a la observación en el TEM.

Resultados

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 1A, 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 1B) ayuda a distinguir la estructura interna del polen, la exina (EX) gruesa que recubre al grano de polen y la intina (IN) más delgada. 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 1C), imagen obtenida en el SEM, donde se apreció la formación de un tubo polínico de 15 nm. Por su parte, el corte ultra fino 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 um.

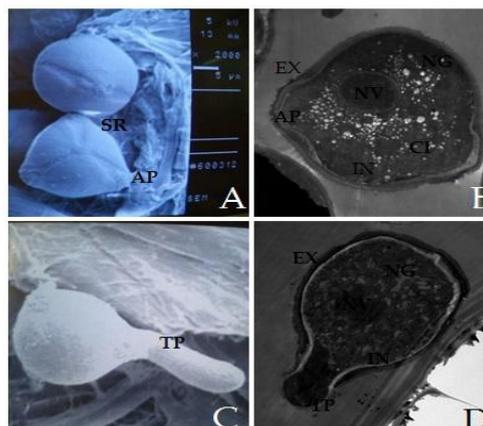


Figura 1: Polen de *Solanum betaceum*. A. Vista polar de un polen sin germinación muestra la presencia de un polen de un tamaño de 25 nm (barra indicadora de la escala 5 mm) y presencia de tres poros (SEM). B. Corte ultrafino de 90 nm visualizado a 2500X, muestra una exina gruesa, una intina fina, tres aperturas, la presencia de un núcleo vegetativo prominente situado cerca a una apertura y un núcleo generativo junto a la intina (TEM).

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 2). En cuanto a los núcleos generativo y vegetativo, no se pudieron identificar claramente, pero se visualizó abundantes plástidos en todo el citoplasma.

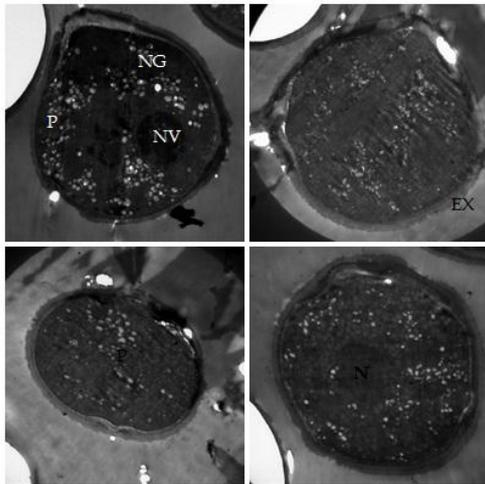


Figura 2: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 100nm, control sin germinación. Presencia de pólenes con morfología similar, observación de tres aperturas y núcleos internos. El núcleo prominente representa el núcleo vegetativo (NV) y al lado opuesto se encuentra el núcleo generativo (NG). La capa externa, exina (EX) se mantiene constante envolviendo a toda la estructura (TEM 2500X).

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 3A y 3D, 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 figuras 3B y 3C revelan un núcleo generativo de un tamaño considerable y no se diferencia claramente la localización del núcleo generativo.

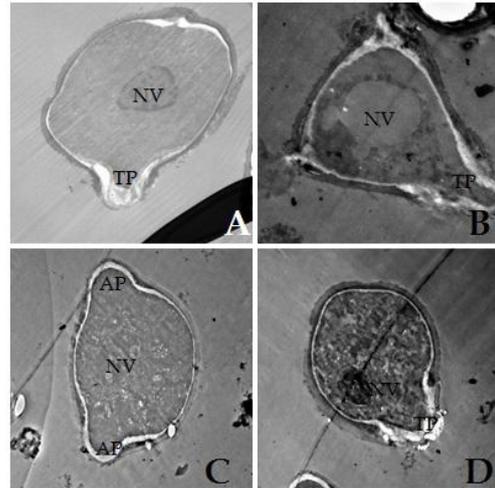


Figura 3: Polen de *Solanum betaceum*, muestra control sin germinación, cortes ultra finos de 90-100 nm. Al interior del polen se observan un núcleo grande localizado en el centro el citoplasma, núcleo vegetativo (NV). Se evidencia la morfología tricolporada y la formación de un tubo polínico (TEM 2500X).

CORTES ULTRAFINOS 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 4AC). Por otro lado, existen otros pólenes que mantienen la forma característica de la familia Solanacea (Figura 4BD). 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 4A).

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.

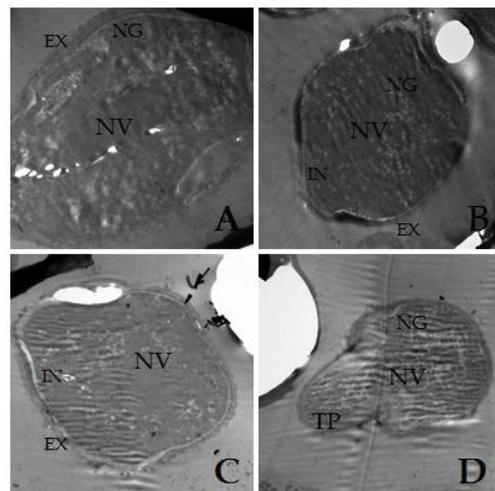


Figura 7: Polen de *Solanum betaceum*, cortes ultra finos de 90 nm, pesticida ecológico. A. No se evidencia una estructura tricolporada, sino más bien alargada, los núcleos generativo y vegetativo se encuentran situados uno junto al otro y no varían notablemente en tamaño. B. Núcleo generativo predominante (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).

CORTES ULTRAFINOS 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 8B,D). En la figura 8A, se observa la formación del tubo polínico, pero no se divisan núcleos internos. 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 8C).

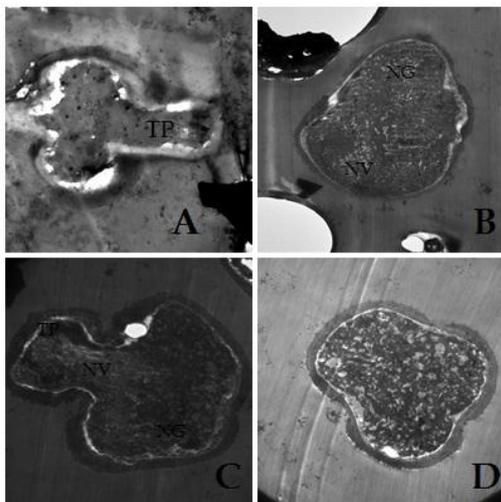


Figura 8: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100 nm, pesticida químico. A. Se observó deformación en la morfología del polen y ausencia de organelos. B. Estructura con presencia de núcleo germinativo (NG) junto a la intina y un núcleo vegetativo (NV) al lado opuesto. C. Formación de un tubo polínico en donde se encuentra alojado el núcleo vegetativo (NV). D. Morfología tricolporada sin núcleos internos. (TEM 2100X).

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 9A). En pólenes en los que se observó la formación del tubo polínico (Figura 9B,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.

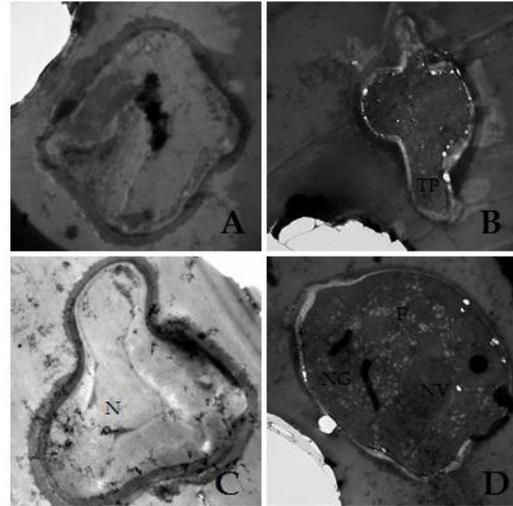


Figura 9: Polen de *Solanum betaceum*, cortes de 90-100 nm, pesticida químico F. A. Observación de polen de cuatro aperturas y sin organelos internos. B, C. Formación de tubo polínico con presencia de una masa interna sin definición. D. Morfología tricolporada, núcleo vegetativo (NV) de mayor tamaño que el núcleo germinativo (NG), presencia de

Discusión

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 (Abreu, Costa, Oliviera, Cunha, & Castro, 2006). 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). Para ayudar a observar el daño de los pesticidas sobre el polen, se realizó el estudio del grano de polen de tomate bajo el TEM. 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 bioinsectida 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 (Martínez, Álvarez, & Ramos, 1996). 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). 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 ácaros, afectando a los insectos de los órdenes *Hemiptera*, *Homoptera* y *Thysanoptera* en un lapso de 4 a 6 días (Franco, Rodríguez, Cevantes, & Barranco, 2011). 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 fitopatógeno 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). El pesticida E o clorotalonil (C₈Cl₄N₂) 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, 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. Por otro lado, F o Pyraclostrobin + 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. En los cultivos es usado generalmente debido a que inhibe la germinación de esporas y el desarrollo de tubos germinativos de los hongos (Carretero, 1992). Según De Lacerda (De Lacerda, Gomes, Cruz, & De Oliveira, 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.

Conclusiones

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.

Referencias

- Abreu, I., Costa, M., Oliviera, M., Cunha, M., & Castro, R. (2006). Ultrastructure and germination of *Vitis vinifera* cv. Loureiro pollen. *Protoplasma*, 131-135.
- Carretero, B. (1992). Estudio ultraestructural y citoquímico del desarrollo y maduración de la microspora de tomate (*Lycopersicon esculentum* m).
- 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.

- Elskus, A. (2012). Toxicity, sublethal effects, and potential modes of action of select fungicides on freshwater fish and invertebrates. *US Geological Survey*, 1212- 1213.
- 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*.
- 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.
- 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.
- 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*.
- Martínez, M., Álvarez, C., & Ramos, J. (1996). Control alternativo para el perforador del fruto del tomate. *Centro de Investigaciones de Lara*, 54.
- Mondragón, A. (2006). Caracterización morfológica de la Exina del polen de siete especies del género *Sterculia* L. *Bioagro*, III, 139-143.
- Padilla, F. (2013). Efecto de pesticidas químicos, ecológicos y biológicos sobre la viabilidad del polen en mora de castilla y tomate de árbol. *Anteproyecto de tesis de Maestría*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Ríos, M. (2010). Control biológico de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el ecotipo tamarillo mediante hongos endófitos. *Ingeniería Agropecuaria Industrial*, 150.
- Tort, A. (2005). Tort. A. *Pakistan Journal of Botany*, 23-30.
- 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*.