

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**Estudio del efecto de la radiación UV en la
permeabilidad de cutículas de hojas de limón.**

JORGE ANDRÉS MUÑOZ FREIRE

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA



**Estudio del efecto de la radiación UV en la
permeabilidad de cutículas de hojas de limón.**

JORGE ANDRÉS MUÑOZ FREIRE

Profesor Guía : Dr. Raúl Cordero.
Profesores Comisión : Dr. Francisco Melo.
: Dr. Roberto Bernal.

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO FÍSICO.

SANTIAGO DE CHILE
ABRIL 2013

“Estudio del efecto de la radiación UV en la permeabilidad de
cutículas de hojas de limón.”

Trabajo de Graduación presentado a la Facultad de Ciencia, en
cumplimiento parcial de los requerimientos exigidos para optar al
Título profesional de Ingeniero Físico.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL 2013

©JORGE ANDRÉS MUÑOZ FREIRE

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

“Estudio del efecto de la radiación UV en la permeabilidad de
cutículas de hojas de limón.”

JORGE ANDRÉS MUÑOZ FREIRE

Este trabajo de Graduación fue preparado bajo la supervisión del profesor guía Dr. Raúl Cordero Carrasco del Departamento de Física de la Universidad de Santiago de Chile y ha sido aprobado por los miembros de la comisión calificadora del candidato.

.....

Francisco Melo Hurtado

.....

Roberto Bernal Valenzuela

.....

Raúl Cordero Carrasco

Profesor Guía

.....

Yolanda Vargas Hernández

Director

A mis padres.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mis padres, María Freire y Jorge Muñoz, por el apoyo incondicional durante esta formación, los cuales siempre me incentivaron a estudiar para que en el futuro no hayan distinciones de clases sociales.

Francisca Quiroz te agradezco por tu apoyo, paciencia y compañía en este tiempo.

También agradezco a mis amigos de infancia Raúl Santos y Felipe Vio, por su compañía incondicional y a mis compañeros de carrera que me ayudaron en esta formación como ingeniero. Doy las gracias a los profesores: Roberto Bernal, Carlos Esparza, Francisco Santibañez, Jorge Ferrer y Danny Ahumada quienes siempre tuvieron tiempo para ayudarme sea en el contexto de algún curso u otra asignatura, destacando su disposición y amabilidad.

Finalmente agradezco al profesor Raúl Cordero, que me permitió trabajar en su laboratorio y al Proyecto ACT 98, Radiación Espectral UV y Efectos Asociados en Especies Endémicas, que ayudó a financiar, en parte, este trabajo de tesis.

Índice general

Abreviaciones y Términos Utilizados.	XV
Resumen.	XVI
1. Introducción.	1
1.1. Cutícula vegetal.	1
1.2. Permeabilidad.	3
1.3. Radiación UV.	4
Objetivos.	6
2. Protocolo de aislamiento de cutículas.	7
2.1. Protocolo de aislamiento de cutículas.	8
2.1.1. Recolección de las hojas de limón.	8
2.1.2. Inmersión enzimática de las cutículas.	8
2.1.3. Lavado de las cutículas.	9
2.1.4. Separación de las cutículas adaxiales y abaxiales.	10
2.1.5. Tratamiento con bórax.	10
2.1.6. Limpieza con HCl.	10
2.1.7. Secado y almacenamiento de las cutículas.	10
2.2. Selección de cutículas sin daños	11
2.2.1. Determinación de las cutículas con daños o microcracks	11

3. Medición de la permeabilidad.	14
3.1. Montaje de las cutículas en la celda de difusión.	15
3.1.1. Descripción General y Método Experimental.	15
3.1.2. Resultados y Análisis.	16
3.2. Radiación de cutículas.	18
3.2.1. Descripción General y Método Experimental.	18
3.2.2. Control de la temperatura de la cámara de radiación.	19
3.2.3. Cutícula irradiada durante 15 horas.	20
3.2.4. Resultados y Análisis.	21
3.2.5. Cutícula irradiada durante 30 horas.	22
3.2.6. Resultados y Análisis.	23
3.2.7. Cutícula irradiada durante 45 horas.	24
3.2.8. Resultados y Análisis.	25
4. Determinación del espesor de una cutícula de hoja de limón.	28
4.1. Análisis y determinación del espesor de una cutícula de hoja de limón.	29
4.2. Análisis de imágenes de las celdas de cutículas de hoja de limón obtenidas con un microscopio confocal.	29
4.2.1. Descripción General y Método Experimental.	29
4.3. Análisis de imágenes de la nerbadura de cutículas de hoja de limón obtenidas con un microscopio confocal.	35
4.3.1. Descripción General y Método Experimental.	35
5. Conclusiones.	39
Apéndices	42
A. Apéndice.	42
A.1. Montaje para la medición de la masa de agua perdida de las cutículas.	43
A.2. Algoritmo de análisis de imágenes de cutículas.	45

Bibliografía.

51

Índice de figuras

1.1. Segmento de la estructura de una hoja.	2
2.1. Cutícula vista en microscopio óptico.	12
2.2. Cutícula vista en microscopio óptico con daño.	13
3.1. Esquema de la celda de difusión.	15
3.2. Soporte de las celdas.	16
3.3. Masa permeada por una cutícula aislada de hoja de limón.	17
3.4. Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón. . .	17
3.5. Cutículas en la cámara de radiación.	18
3.6. Temperatura en la cámara de radiación.	20
3.7. Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 15 horas. . . .	21
3.8. Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 15 horas.	22
3.9. Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 30 horas. . . .	23
3.10. Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 30 horas.	24
3.11. Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 45 horas. . . .	25
3.12. Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 45 horas.	26
3.13. Permeabilidad versus las horas de radiación	27
4.1. Celda de una cutícula de hoja de limón.	30

4.2. Promedio de las 20 imagenes del archivo obtenido del microscopio confocal de la cuticula de hoja de limón.	31
4.3. Promedio de intensidades en una celda por cada 0.5 (μm) al interior de una cutícula.	32
4.4. Promedio de intensidades en una celda por cada 0.5 (μm) al interior de una cutícula.	33
4.5. Variación de la intensidad en la sección transversal a una cutícula de hoja de limón.	34
4.6. Histograma del espesor de las celdas de una cutícula aislada de hoja de limón.	35
4.7. Gráfico del perfil de intensidades de una fila de pixeles de una imagen de una cutícula.	36
4.8. Gráfico del perfil de intensidades sin las frecuencias altas.	37
4.9. Histograma del espesor de las nerbaduras de una cutícula aislada de hoja de limón.	38
A.1. Montaje de las cutículas en ambiente seco	43
A.2. Montaje de las cutículas en ambiente seco	44
A.3. Montaje de las cutículas en ambiente seco	44
A.4. Algoritmo de medición del espesor de las celdas de cutículas	46
A.5. Algoritmo de promedio de imágenes	47
A.6. Código del algoritmo de determinación del centro de las celdas.	47
A.7. Algoritmo de medición del espesor de las celdas de cutículas	50

Índice de cuadros

Abreviaciones y Términos Utilizados.

Cutícula:	Capa cerosa externa a la planta que la protege de la desecación a la que es expuesta en la atmósfera terrestre.
NaN ₃ :	azida de sodio.
HCl:	Ácido clorhídrico.
Permeabilidad:	La permeabilidad es definida como la transmisión de una sustancia que penetra a través de un material resistente.
Nervadura:	Haces vasculares o nerbios que presentan una continuidad con el sistema vascular del tallo.
Difusión:	Extender, esparcir, propagar físicamente..
Radiación UV:	Radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400 nm y los 15 nm.
Microscopio confocal:	El microscopio confocal es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste y/o reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un "pinhole" espacial (colimador de orificio delimitante) para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal.
Silica Gel:	Forma granular y porosa de dióxido de silicio fabricado sintéticamente a partir de silicato sódico, de gran porosidad siendo un gran absorbente de la humedad.
Fluorecencia:	Es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente.

Resumen

La cutícula es una capa de polímeros lipofílicos, tales como cutina y cutan, generada de manera natural que cubre la capa celular más externa de las partes verdes de las plantas (incluidas las hojas). En condiciones de sequía o estrés hídrico, las plantas controlan su hidratación cerrando las estómatas, por las que usualmente pierden agua. Sin embargo una vez tomada esta acción, las plantas pueden continuar deshidratándose al perder agua por transpiración a través de la cutícula. Mayor transpiración implica mayores necesidades de riego y mayores costos de producción para la industria agrícola por lo que la permeabilidad cuticular debe ser caracterizada. Además, atendiendo al contexto climático global (caracterizado por el calentamiento progresivo de la atmósfera terrestre), resulta de interés el estudio de factores naturales que pudieran afectar negativa o positivamente la permeabilidad cuticular.

Este trabajo de tesis implica estudiar el efecto provocado por altas dosis de radiación ultravioleta UV en la permeabilidad de cutículas aisladas de hojas de limón. Los objetivos principales son determinar algunos de los parámetros físicos que determinan la variabilidad natural de la permeabilidad (como por ejemplo, el espesor de la cutículas), y luego medir las dosis de radiación UV que provocan cambios significativos en la permeabilidad. Este estudio se concentrará en el análisis de cutículas aisladas de hojas de limón, debido a que estas son elemento de estudio estándar en el área. Mediciones del espesor se realizarán usando un microscopio confocal; la permeabilidad se medirá aplicando la ley de Fick (monitoreando la cantidad de agua que fluye a través de una cutícula aislada). Dada la variabilidad

natural esperada, se requiere realizar un gran número de ensayos y el análisis estadístico de los resultados.

Capítulo 1

Introducción.

1.1. Cutícula vegetal.

Las partes aéreas de las plantas superiores, hojas y estructuras especializadas como tallo, flores, frutos, están cubiertas, con excepción de la abertura estomática¹, de una membrana continua lipídica extracelular que se denominada cutícula como se muestra en la figura 1.1. El principal constituyente de la cutícula es la cutina, una estructura multicapas secretada, que cubre las paredes celulares de la epidermis de las partes aéreas de todas las plantas. Está compuesta por una cubierta superior de ceras, una gruesa capa intermedia que contiene cutinas embebidas en ceras (cutícula propiamente dicha) y la capa más baja formada por cutina y cera mezcladas con sustancias de la pared celular: pectinas, celulosa y otros carbohidratos, constituyendo la capa cuticular (Taiz y Zeiger, 1998). También se ha sugerido que además de cutina, la cutícula puede contener cutanos, polímeros lipídicos secundarios constituidos por largas cadenas hidrocarbonadas (Jeffree,1996).

El rol de la cutícula como barrera para la pérdida de agua, parece ser su función primaria y más importante. La cutícula y, en particular la cera cuticular, impide o dificulta la vaporización del agua así como la entrada de sustancias solubles en agua. La cantidad de agua que fluye a través de la planta, depende del agua que esté presente en el suelo, de las características estructurales y

¹Abertura microscópica en la epidermis de las partes verdes de los vegetales superiores que permite el intercambio de gases y líquidos con el exterior.

funcionales de la planta, y de las condiciones atmosféricas. En cada momento de su vida, el estado hídrico de la planta depende del balance entre el agua que la planta absorbe del suelo y la que pierde por transpiración. Las plantas poseen mecanismos capaces, dentro de ciertos límites, de regular la tasa de absorción y transpiración, y consecuentemente, el balance hídrico. La transpiración puede definirse como la pérdida de agua en forma de vapor por las plantas. Sin embargo difiere de la evaporación desde una superficie libre de agua, porque la transpiración es modificada por la estructura de la planta y el funcionamiento de los estomas², los que operan conjuntamente con los principios físicos que gobiernan la evaporación.

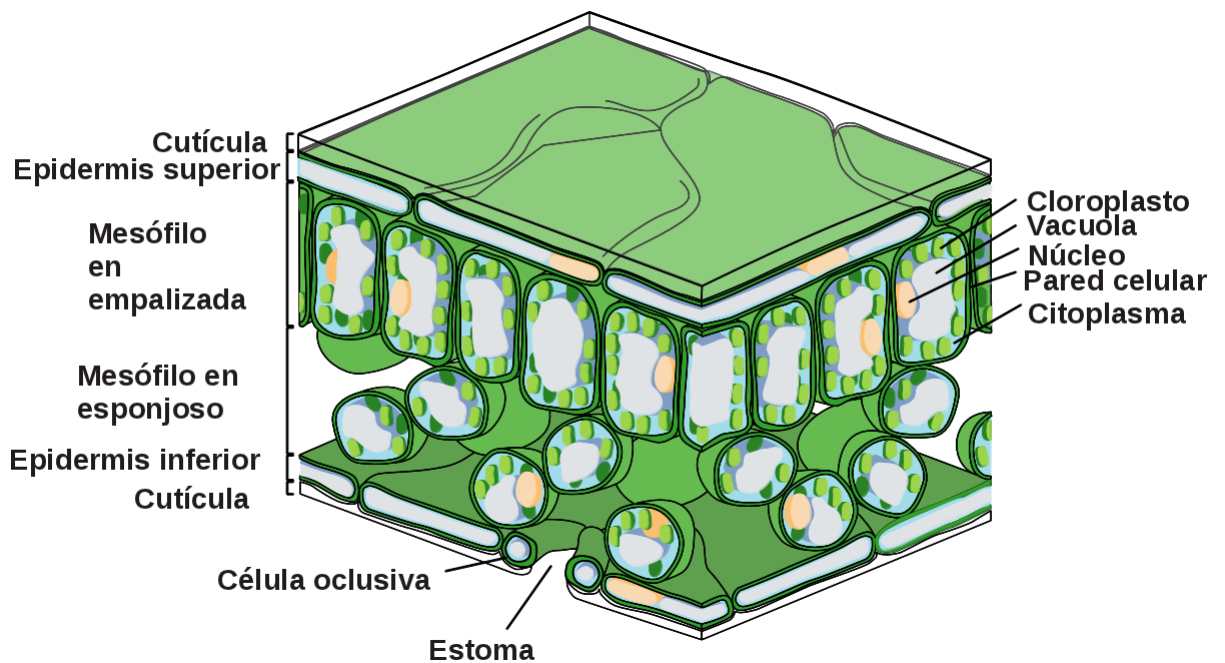


Figura 1.1: Segmento de la estructura de una hoja con los tejidos principales y en la parte superior la cutícula.

²Estomas: Abertura microscópica en la epidermis de las partes verdes de los vegetales superiores que permite el intercambio de gases y líquidos con el exterior.

1.2. Permeabilidad.

La permeabilidad es definida como la transmisión de una sustancia que penetra a través de un material resistente. En ausencia de grietas y agujeros, el mecanismo primario para el flujo de gas y vapor a través de una película o recubrimiento es por difusión activa. Por ejemplo, la sustancia que penetra, se disuelve en la matriz de la película del lado de alta concentración, se difunde a través de la película por medio del gradiente de concentración y se evapora del lado de la otra superficie. La difusión depende del tamaño, forma y polaridad de las moléculas penetrantes así como del movimiento segmental de la cadena del polímero dentro de la matriz de la película. Los factores que afectan el movimiento segmental de las cadenas de polímeros incluyen las fuerzas de atracción entre cadenas tales como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, el grado de enlaces cruzados y el grado de cristalinidad. Los pasos de disolución y evaporación son influenciados por la solubilidad de la sustancia que penetra en la película. La permeabilidad es una función de la diferencia en presiones parciales de vapor en los dos lados del material (Lerici et al., 1985). La permeabilidad de las películas a los gases que pasan a través de ella, es definida de la misma forma que la permeabilidad al vapor de agua. La permeabilidad puede ser fuertemente dependiente de la actividad de agua. La primera ley de Fick, establece que el flujo del permeado, F , es dependiente del coeficiente de difusión, D , de la diferencia de concentraciones en la película (dC) y de la diferencia del espesor (dx), esto se puede expresar mediante la ecuación 1.1.

$$F = -AD \frac{dC}{dx} \quad (1.1)$$

El coeficiente de difusión depende de la temperatura y de las propiedades de la sustancia que difunde y de la naturaleza del medio (interfase) a través de la cual se realiza la difusión. El signo negativo simboliza que el paso de materia tiene lugar desde la solución más concentrada a la menos concentrada.

La difusión a través de membranas, se puede introducir en la ecuación 1.1

el ancho de la membrana como parte del coeficiente de difusión, originándose la constante de permeabilidad expresada como en la ecuación 1.2.

$$P = \frac{D}{d} \quad (1.2)$$

siendo d en este caso el espesor de la cutícula y P una constante de permeabilidad de dimensiones [cm/s].

Cuando se sustituye la constante de permeabilidad en la ecuación 1.1 y se asume que la disminución de la concentración de la sustancia que difunde es lineal a medida que cruza la membrana, la ley de Fick se formula como en la ecuación 1.3

$$F = -PA(\Delta C) \quad (1.3)$$

De la ecuación 1.3 se puede despejar la permeabilidad resultando la expresión 1.4

$$P = \frac{-F}{A(C_1 - C_2)} = \frac{F}{A(C_2 - C_1)} \quad (1.4)$$

Siendo:

F : flujo del vapor de agua [mg/s]

A : sección por la que se realiza el traspaso de vapor de agua [m²]

C_1 : concentración en el lado de menor concentración [mg]

C_2 : concentración en el lado de mayor concentración [mg]

P : permeabilidad [cm/s]

1.3. Radiación UV.

La radiación ultravioleta es la parte del espectro electromagnético con longitud de onda más corta que el violeta del espectro visible. La banda completa del UV abarca longitudes de ondas en el rango entre 200 a 400 nm, la cual se subdivide en tres regiones UVA, UVB y UVC. Los límites entre las tres clases de la

radiación UV, están definidos por la radiación UVB. La Commission Internationale d' Eclairage (C.I.E) define a la radiación UVB como la banda entre 280-315 nm, pero considerando los efectos de esta radiación a menudo se ubica entre los 280 y 320 nm. La radiación UVA constituye, entonces, la longitud de onda más larga de la radiación UV (320-400 nm), mientras que la radiación UVC abarca la banda entre los 200-280nm.

La radiación UVB es absorbida por el ozono de la atmósfera, pero un porcentaje no despreciable, 10 % aproximadamente, alcanza la superficie terrestre y afecta a los seres vivos. Su efecto sobre las personas puede producir quemaduras, envejecimiento y cáncer a la piel, cataratas, etc. Los efectos de la radiación UVA sobre las personas son similares a los de los UVB, pero en dosis 1000 veces superiores, por lo que proporcionalmente resulta menos perjudicial. La radiación UVC es altamente dañina para los seres vivos y en presencia de la cual no sería posible la vida en la Tierra. Esta radiación es totalmente absorbida por el ozono estratosférico, vapor de agua y gases (O₂, CO₂), de modo que en ningún caso alcanza la superficie terrestre.

Objetivos.

Objetivo General.

Estudiar los efectos en la permeabilidad de hojas aisladas de limón debido a la exposición de altas dosis de radiación UV y la determinación de la variabilidad natural que presenta el espesor de la cutícula.

Objetivos específicos.

1. Determinar la permeabilidad de cutículas aisladas de hojas de limón.
2. Determinar los cambios en la permeabilidad de cutículas aisladas de hojas de limón inducidos por la exposición a altas dosis de radiación UV.
3. Determinar distribución de espesores de cutículas de hojas de limón a través de análisis de imágenes por microscopia confocal.

Capítulo 2

Protocolo de aislamiento de cutículas.

2.1. Protocolo de aislamiento de cutículas.

2.1.1. Recolección de las hojas de limón.

Para retirar la hoja del árbol, se debe usar una tijera o pinza para cortar en el peciolo¹ de la hoja, evitando tocar la superficie y se almacenan en un recipiente o bolsa sin aplastarlas. Las hojas que se recolectan, no deben presentar necrosis ni otras lesiones.

Cada hoja debe ser marcada por el lado abaxial², con un lápiz resistente al agua, para reconocerlas posteriormente de la parte adaxial³.

Con un molde, de radio aproximado de 2 [cm] se realiza una punción sobre la hoja. Estos discos no deben contener parte de la nervadura central, y si el tamaño de la hoja no lo permite, se coloca la nervadura lo más cercana al borde posible del disco.

2.1.2. Inmersión enzimática de las cutículas.

La solución enzimática se debe preparar en agua desionizada, agregando 0,01 molar de solución de citrato a un pH de 3 - 3,3 medido con un phmetro BECKMAN Φ 34, con 1 molar de solución de KOH (KOH en lentejas de Winkler). En este buffer se mezclan 2% de pectinasa (Pectinase from *Aspergillus niger* marca Sigma) y 0,2% de celulasa (Cellulase from *trichoderma longibrachiatum* marca Sigma).

Se introducen los discos de hoja de limón en un vaso precipitado junto con la solución enzimática, dejando 1 a 2 cm de solución sobre el nivel de las hojas.

Para lograr un aislamiento más rápido, el vaso se somete a vacío con una

¹Peciolo o peciolo: es el rabillo que une la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.

²Cara inferior de la hoja, opuesta al haz.

³Cara superior del limbo de la hoja de una planta, se diferencia del envés en que no posee estomas.

bomba de membrana Vacubrand MZ2NT, hasta que ya no se observen burbujas saliendo de los trozos de las hojas, esto permite que las hojas que flotan, deciendan al fondo del vaso y que la solución tenga una mayor superficie de contacto al infiltrarse dentro de la hoja. Se debe agitar el vaso para que las hojas que aún flotan, deciendan. Puede realizarse más de 1 vez el vacío.

Luego de realizada la infiltración, se debe agregar por cada litro de solución enzimática (considerando las hojas), 1 ml de 1 molar de NaN_3 (Citric acid monohydrate - Merck) como medida de protección para que no aparezcan gérmenes en el recipiente. Agitar para que el ácido se disuelva homogéneamente. Se debe agregar NaN_3 después de haber realizado el vacío, ya que el NaN_3 es volátil y podría ser inhalado, siendo muy tóxico.

Se cubren los vasos con papel parafilm "M" Pechiney plastic PackaGing, y se dejan 37°C de temperatura por 1 ó 2 semanas dependiendo de la turbiedad de la solución. También se debe agitar unas cuantas veces en la semana, en este caso 1 vez al día, suavemente para no dañar las cutículas.

Cuando la solución se vuelve oscura, se debe cambiar la solución enzimática (revisar 2.1.3), procurando agregar NaN_3 y no es necesario infiltrarlas nuevamente.

2.1.3. Lavado de las cutículas.

Cuando se cambia la solución, pueden lavarse directamente las cutículas y separar los restos de tejido. El contenido se traspasa a un embudo Büchner. Si se quedan cutículas pegadas en las paredes del vaso, se hacen flotar nuevamente. Nunca se debe apuntar el chorro de fluido directamente sobre las cutículas, sino, sobre las paredes internas del vaso. Para favorecer el desprendimiento mecánico de las cutículas de la matriz de la hoja, los trozos deben girar (moverse dentro del fluido) mientras se lavan. Pero esto debe ocurrir moderadamente, ya que los bordes duros de la matriz, podrían dañar la cutícula. Cuando todas las cutículas se hayan desprendido durante el proceso de limpieza, se puede proceder al paso 2.1.4.

2.1.4. Separación de las cutículas adaxiales y abaxiales.

Las cutículas lavadas y las matrices de las hojas, se ponen en un recipiente de vidrio plano y se llena con agua desionizada más o menos hasta una altura de 2 cm. Se separan primero las matrices de las hojas con pinzas, y con el extremo de una vareta de vidrio con punta redondeada se separan las cutículas no marcadas y se sacan del agua. Las cutículas quedan adheridas a la vareta, si es que se pueden colocar en un vaso lleno de agua para que se desprendan. Si aún algunas cutículas se encuentran adheridas a restos o a la matriz de la hoja, se deja en solución enzimática unos días más.

2.1.5. Tratamiento con bórax.

Luego de separar las cutículas del lado adaxial, estas aún pueden presentar ácidos grasos. Para eliminarlos, se pueden disociar con un buffer de bórax . Para esto se dejan las cutículas en una solución de 0,01 molar de buffer bórax con un valor de pH aproximado de 9. Al día siguiente se lavan con agua desionizada. Si las cutículas se quedan por más de 1 día en el buffer, se debe agregar 1ml por cada litro de NaN_3 a la solución.

2.1.6. Limpieza con HCl.

Según necesidad, se pueden finalmente incubar las cutículas de 6 a 12 horas en 1 normal de ácido clorhídrico marca Winkler, para saturar los grupos Epoxi.

2.1.7. Secado y almacenamiento de las cutículas.

Se colocan las cutículas en un recipiente plano lleno de agua destilada. Se sumerge en el recipiente, en un ángulo de 45° aproximadamente, un trozo cuadrado de teflón (de 4 a 5 cm de canto y 0,5 mm de espesor), y con una pinza de punta roma, se toma la cutícula cuidadosamente de un borde y se desliza sobre la lámina

de teflón, al mismo tiempo que se retira del agua. La cutícula sobre la lámina de teflón se retiran del agua y se dejan secar a temperatura ambiente. Cada cutícula debe ser retirada de la misma forma.

Una vez que las cutículas están secas, se retiran cuidadosamente de la lámina de teflón y se almacenan en un recipiente para que no sufran daño alguno.

2.2. Selección de cutículas sin daños

2.2.1. Determinación de las cutículas con daños o microcracks

Después de aislar las cutículas de hoja de limón, aunque se tomén las precauciones de no dañarlas, se deben identificar las posibles cutículas con daños. Para identificar las cutículas dañadas, se realiza una inspección en un microscopio óptico Olympus Ix81 con lámpara UV Olympus U-RFL-T, las cutículas expuestas a la radiación UV fluorescen observandose los lugares con material fluorescente como se muestra en la figura 2.1.

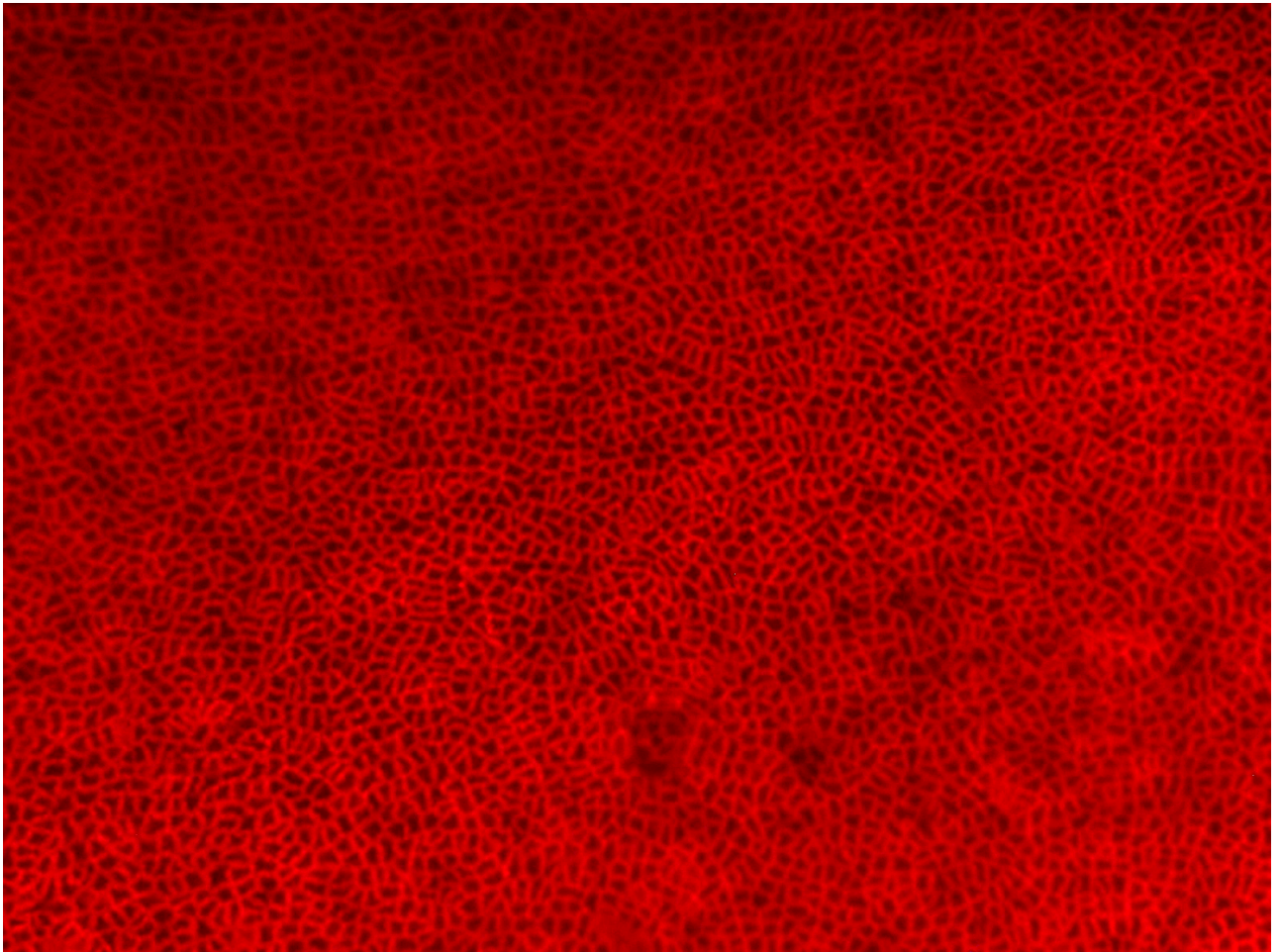


Figura 2.1: *Imagen de fluorescencia de una cutícula vista en un microscopio óptico.*

Para identificar las zonas que tienen daño, el sector debe estar oscuro al observarlas con el microscopio, debido a que en esa zona no hay material fluorescente o la configuración natural de la cutícula no corresponde al patrón como se muestra en la figura 2.2.

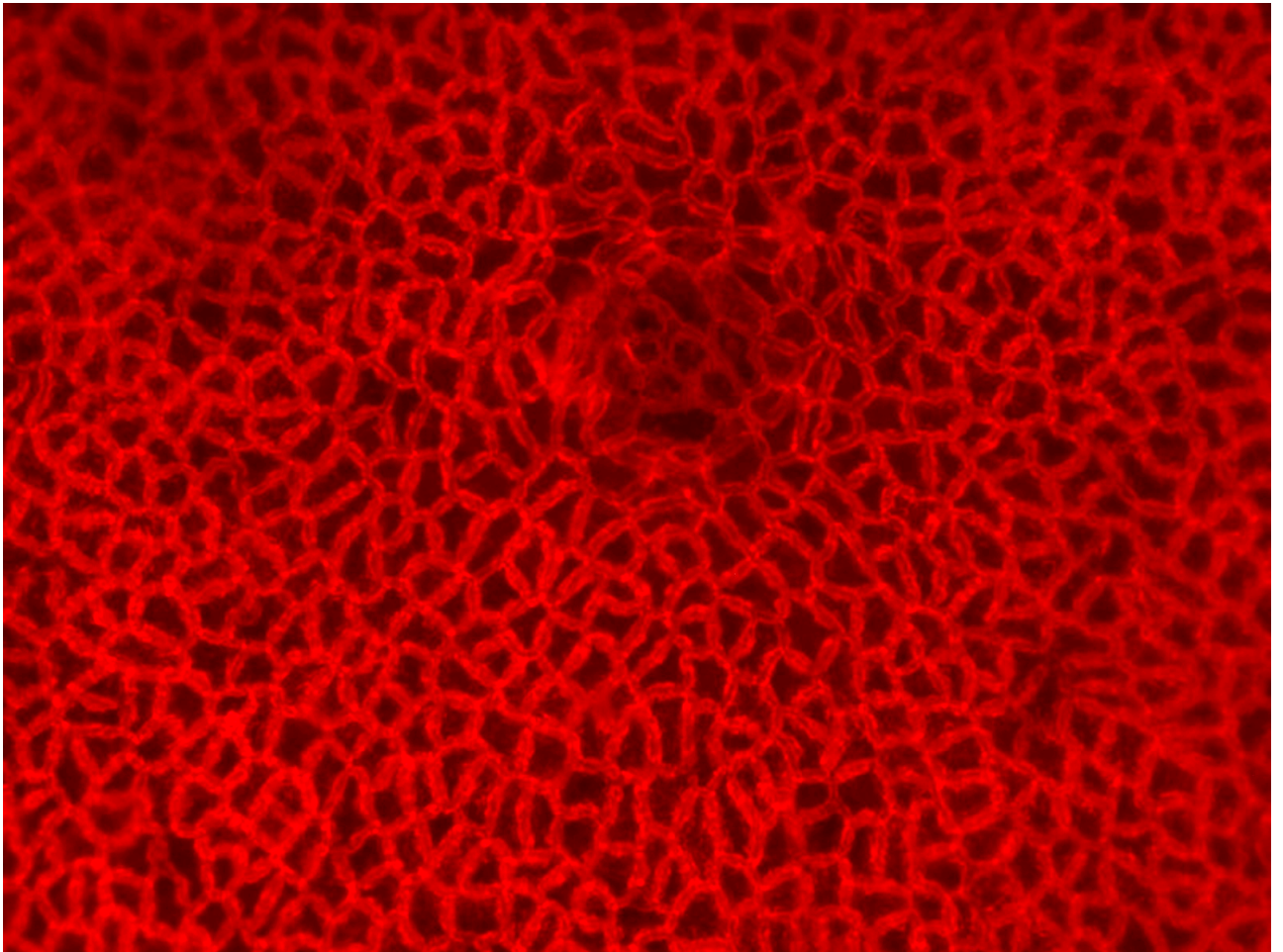


Figura 2.2: *Imagen de fluorescencia de una cutícula vista en un microscopio óptico pero con daño en su estructura.*

Una vez identificadas las cutículas que presentan algún daño, son eliminadas del grupo de control.

Capítulo 3

Montaje y medición de la permeabilidad de cutículas aisladas de hoja de limón.

3.1. Montaje de las cutículas en la celda de difusión.

3.1.1. Descripción General y Método Experimental.

En esta sección se describe el montaje experimental con el cual se mide la masa de agua permeada por la cutícula de hoja de limón.

El sistema que permite la difusión se ilustra en la figura 4.1 en el cual hay un depósito donde contiene 400 [μL] de agua bidestilada con una micropipeta Biopette autoclavable. En la cara de este depósito se espesa una fina capa de grasa de vacío para que la cutícula quede adherida, también se agrega otra fina capa de grasa de vacío a la tapa de esta celda de difusión, para que el sistema mantenga cierta inmovilidad y la cutícula no sea dañada o se mueva de su posición original.

La cutícula de un vegetal tiene un lado que está expuesto al medio ambiente y otro que está hacia el interior de la hoja. La cutícula cuando se coloca en la celda de difusión, debe ser en dirección de tal manera que el agua contenida en el depósito de la celda de difusión esté en contacto con la cara interior de la cutícula, y así imitar el traspaso de agua desde el interior de una hoja hacia el medio ambiente como se ilustra en la imagen b) de la figura 4.1.

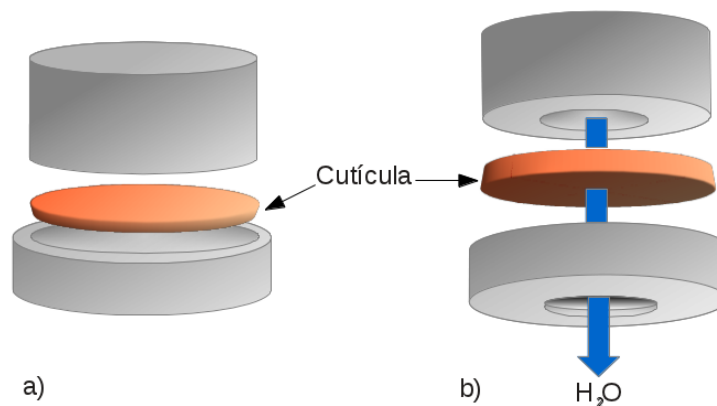


Figura 3.1: Esquema de la celda de difusión; a) vista superior de la celda de difusión; b) vista inferior de la celda de difusión y sentido del movimiento del agua.

En un envase de plástico hermético se coloca sílica gel Arquimed con indicador azul, sobre esto se coloca una pieza de acrílico con aberturas para que la celda case en ella y evitar así el contacto de la cutícula con la sílica gel. La sílica gel absorbe la humedad del interior del envase y provoca el gradiente de concentración de agua entre el interior de la celda y el interior del envase sellado herméticamente. Para mantener este gradiente de concentración, se cambia la sílica gel cada 2 días. El envase junto con la sílica y las celdas de difusión, se mantienen a una temperatura de 20°C.

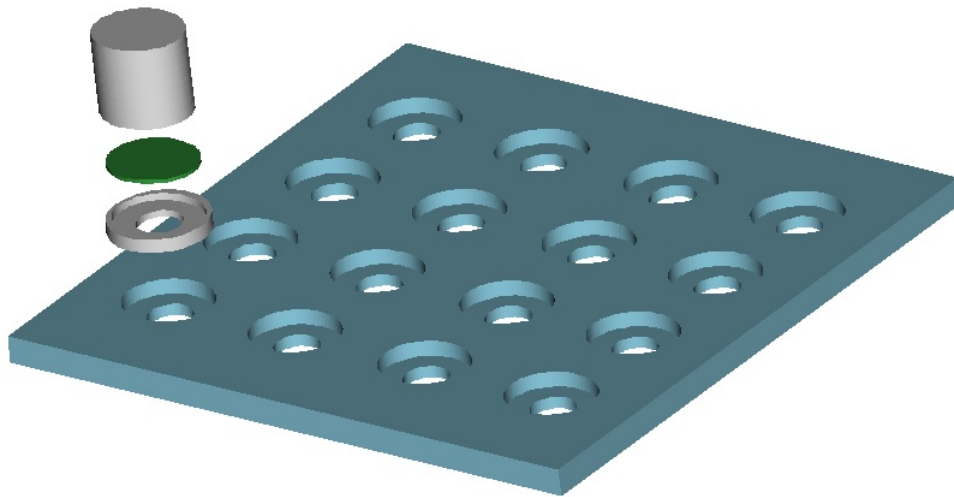


Figura 3.2: Soporte de acrílico para las celdas de difusión.

La medición de masa de cada celda se realiza en una balanza Mettler Toledo ML503. Cada celda es retirada del envase y se masa 1 ó 2 veces por día durante 2 semanas, obteniendo así la masa de agua perdida a través de la cutícula.

3.1.2. Resultados y Análisis.

Se midió la masa perdida a través de cutículas aisladas de hoja de limón, datos con los cuales se obtiene el gráfico de la figura 3.3. De estos datos se obtuvo una regresión lineal para encontrar la pendiente de estas rectas, que representan F de la ecuación 1.4

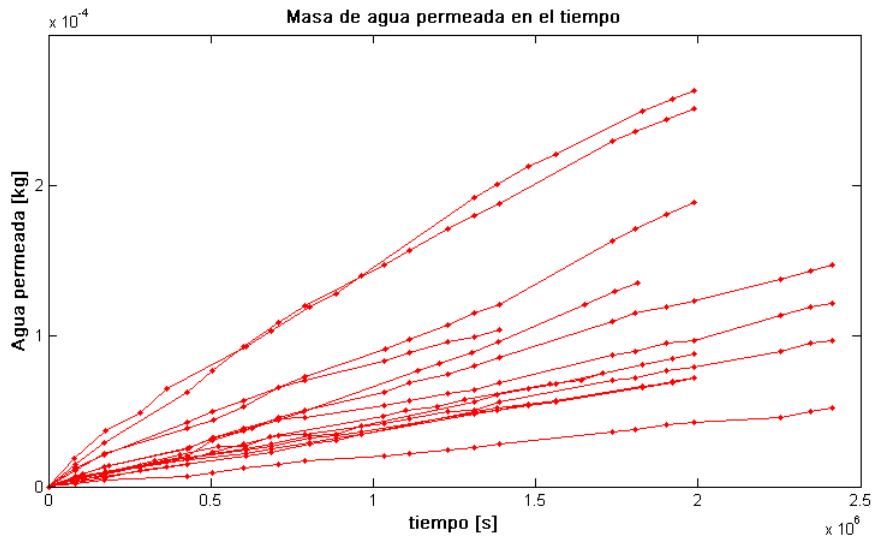


Figura 3.3: Masa permeada por cutículas aisladas de hojas de limón.

En la figura 3.4 se observa la dispersión de los valores de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón, con una media de $1,3624 \cdot 10^{-9} [m/s]$ y una desviación estandar de $1,32 \cdot 10^{-9} [m/s]$

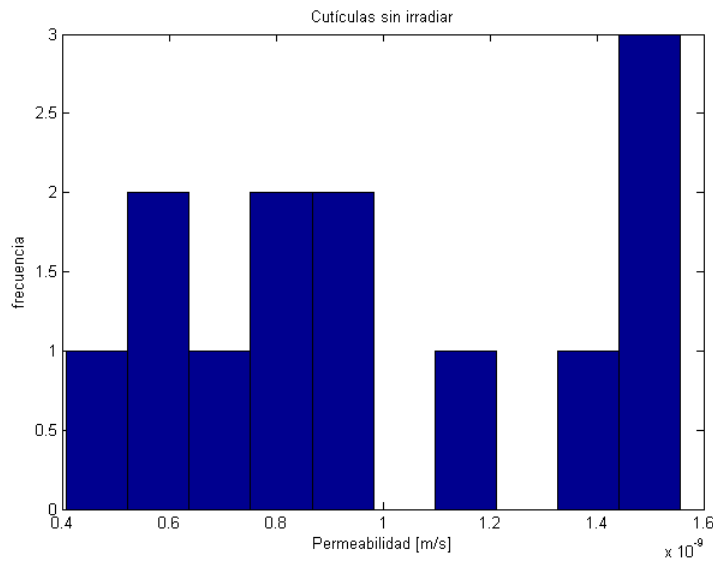


Figura 3.4: Distribución de la permeabilidad de cutículas de hoja de limón.

3.2. Radiación de cutículas.

3.2.1. Descripción General y Método Experimental.

Una vez determinada la permeabilidad de la cutícula de hoja de limón, se dispone a realizar mediciones de permeabilidad de cutículas aisladas de hojas de limón expuestas a distintas dosis de radiación UV para determinar los efectos en la permeabilidad de la cutícula.

Para irradiar las cutículas, estas se exponen bajo la radiación ultravioleta de una cámara de radiación durante distintos periodos. Las cutículas se disponen dentro de la cámara como se muestra en la imagen de la figura 3.5, cada cutícula es puesta sobre la superficie, procurando no realizar daño sobre la cutícula, con el fin de que la cutícula de hoja de limón sea irradiada en toda su superficie. Una vez suministradas las dosis de radiación ultravioleta a las cutículas, se retiran y se almacenan en un lugar seco.

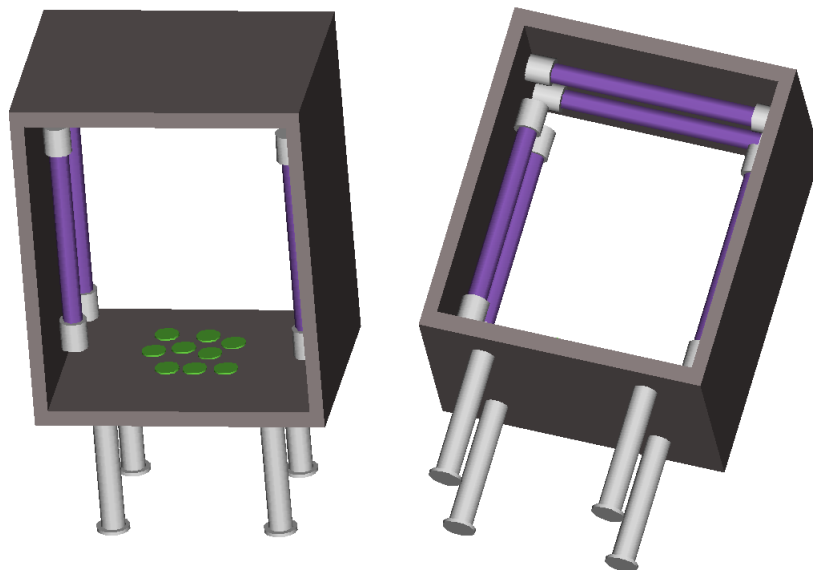


Figura 3.5: Disposición de las cutículas en la cámara de radiación.

Los grupos de 33 cutículas son irradiadas durante 15, 30 y 45 horas de

radiación UV.

3.2.2. Control de la temperatura de la cámara de radiación.

Como medida de control, se verifica la temperatura al interior de la cámara de radiación. Esta cámara de radiación cuenta en su interior con lámparas de radiación UV, con la cual se irradian las muestras. Para el correcto uso de esta cámara y que el factor de radiación UV sea el único parámetro que afecte a las cutículas, se realiza la medición de la temperatura en el interior, donde se encuentran las muestras a irradiar. Para determinar el rango de temperatura en la que opera la cámara de radiación, se realizan 2 configuraciones para medir:

1. Cámara cerrada.
2. Cámara sin puerta ni pared de fondo, abierta para una libre circulación del aire.

Ambas pruebas se realizaron durante un periodo de 10 horas continuas y la medición se realizó con una termocupla tipo K en el centro de la cámara de radiación. Las consecuencias de mantener la cámara cerrada, provoca que la temperatura en el interior tenga una variación de 13[°C] alcanzando 32[°C], pero retirando la puerta y pared del fondo de la cámara de radiación, la temperatura aumentó solo 1°C manteniendo un promedio de 19.5°C como se ve en el gráfico de la figura 3.6.

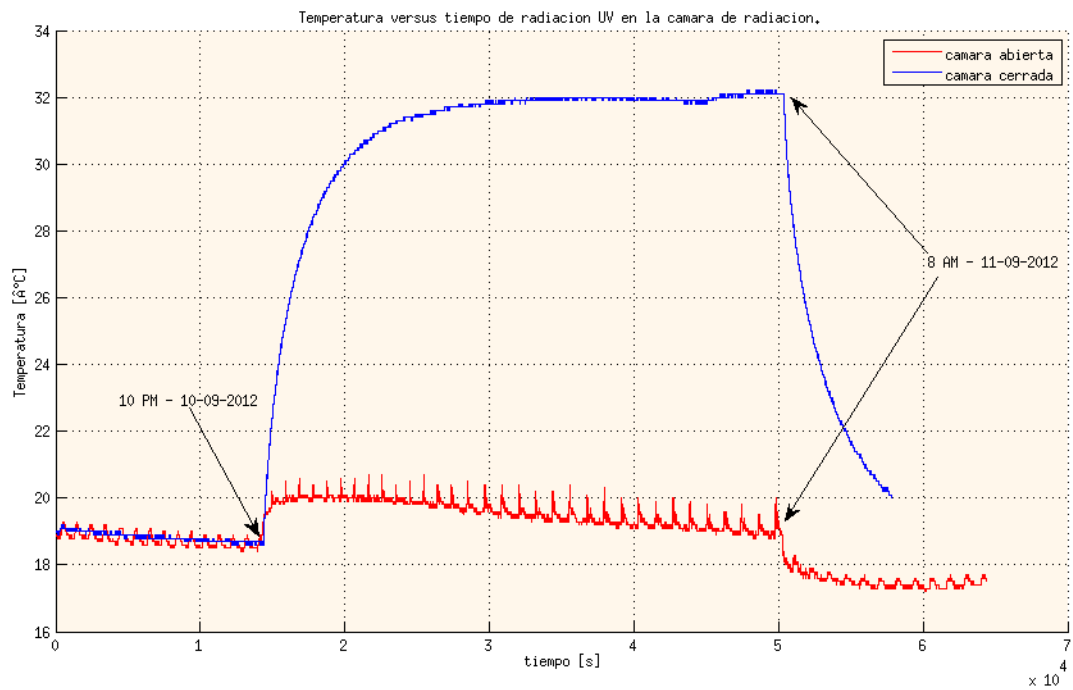


Figura 3.6: Temperatura en el interior de la cámara de radiación; cámara cerrada y cámara sin puertas ni pared de fondo.

3.2.3. Cutícula irradiada durante 15 horas.

Un grupo de cutículas aisladas se expusieron a radiación UV en una cámara de radiación, recibiendo una dosis de 15 horas continuas.

Se montaron las cutículas en las celdas de difusión como se ilustra en la figura 4.1 y se registró la masa permeada en una balanza Mettler Toledo modelo ML503, y se graficó la masa permeada con respecto al tiempo como se muestra en la figura 3.11

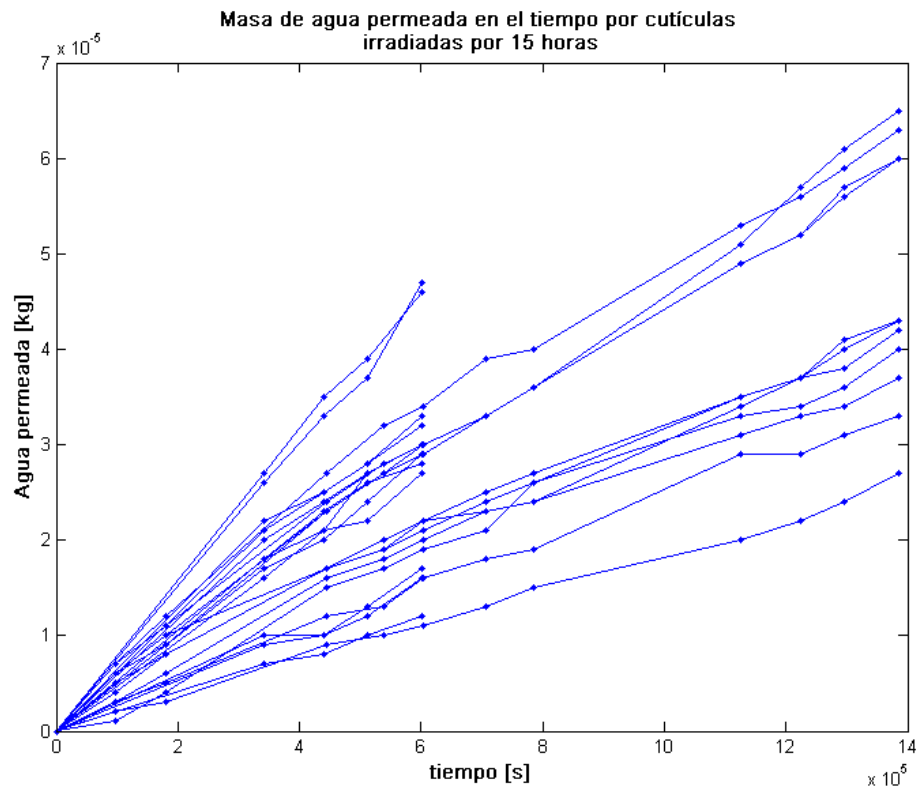


Figura 3.7: Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 15 horas.

3.2.4. Resultados y Análisis.

De estos datos se obtuvo una regresión lineal para encontrar la pendiente de estas rectas, que representan F de la ecuación 1.4, obteniendo el histograma de la figura 3.8, de la permeabilidad de cutículas aisladas de hoja de limón irradiadas durante 15 horas.

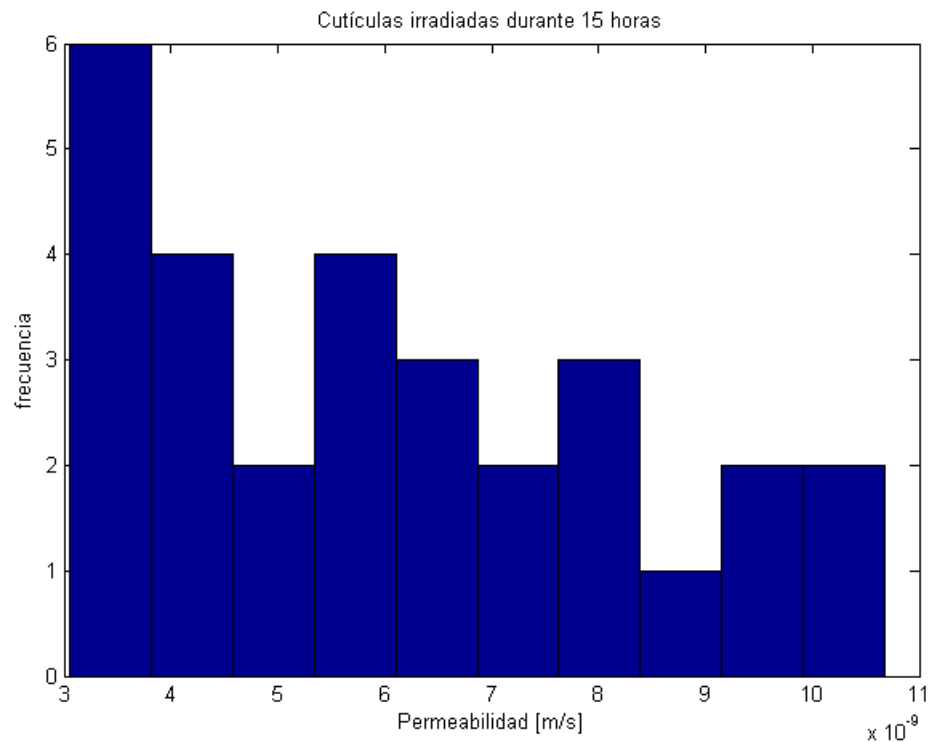


Figura 3.8: *Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 10 horas de radiación UV.*

La permeabilidad promedio es de $5,5925 \cdot 10^{-9} [m/s]$ con una desviación estandar de $4,00 \cdot 10^{-9} [m/s]$

3.2.5. Cutícula irradiada durante 30 horas.

Un grupo de cutículas aisladas se expusieron a radiación UV en una cámara de radiación recibiendo una dosis de 30 horas continuas. Se montaron las cutículas en las celdas de difusión y se registró la masa permeada por la cutícula como se muestra en el gráfico de la figura 3.9.

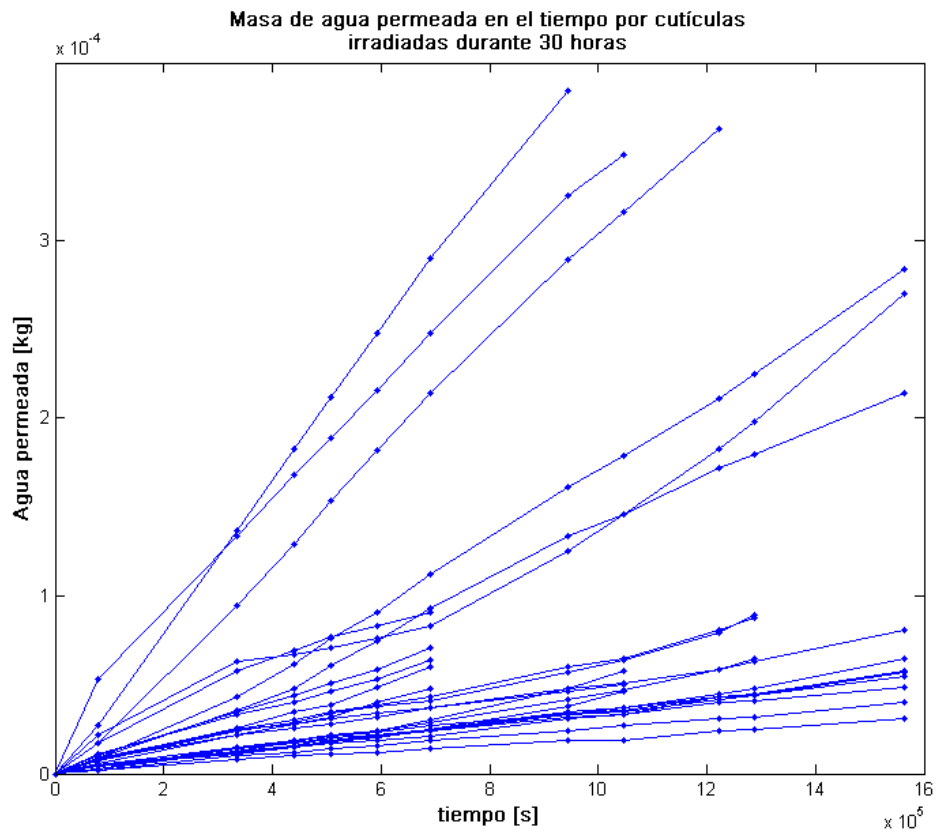


Figura 3.9: Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 30 horas.

3.2.6. Resultados y Análisis.

De estos datos se obtuvo una regresión lineal para encontrar la pendiente de estas rectas, que representan F de la ecuación 1.4, obteniendo el histograma de la figura 3.10, de la permeabilidad de cutículas aisladas de hoja de limón irradiadas durante 30 horas.

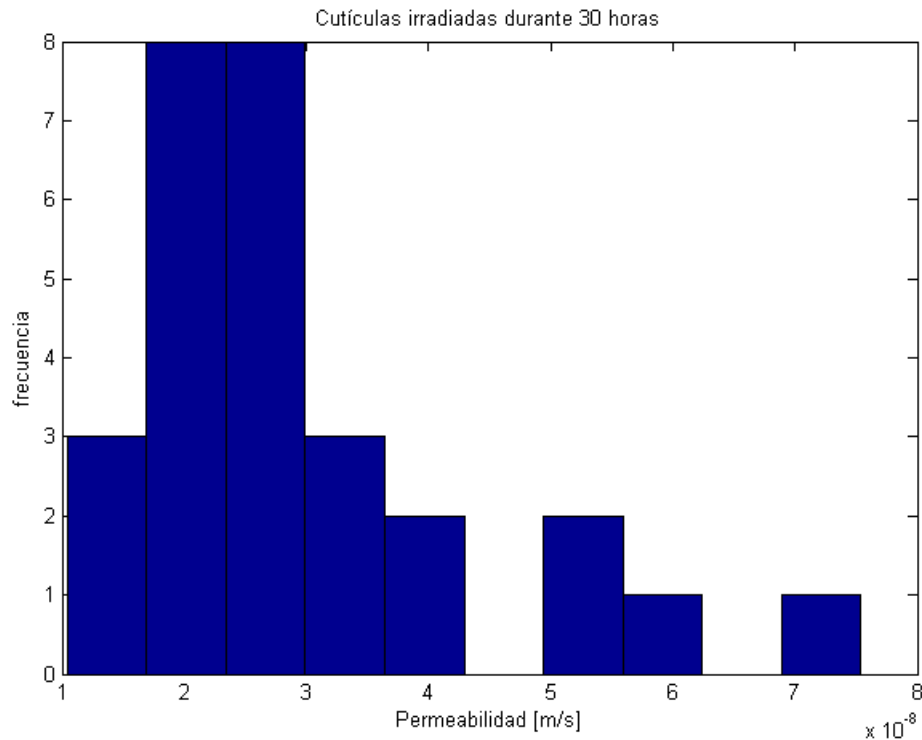


Figura 3.10: *Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 30 horas de radiación UV.*

En el caso de la permeabilidad de la cutícula irradiada durante 30 horas de radiación UV, el promedio es $2,8798 \cdot 10^{-8} [m/s]$ y la desviación estandar $1,489 \cdot 10^{-8} [m/s]$.

3.2.7. Cutícula irradiada durante 45 horas.

Un grupo de cutículas aisladas se expusieron a radiación UV en una cámara de radiación recibiendo una dosis de 45 horas continuas. Se montaron las cutículas en las celdas de difusión y se registró la masa permeada por la cutícula como se muestra en el gráfico de la figura 3.11.

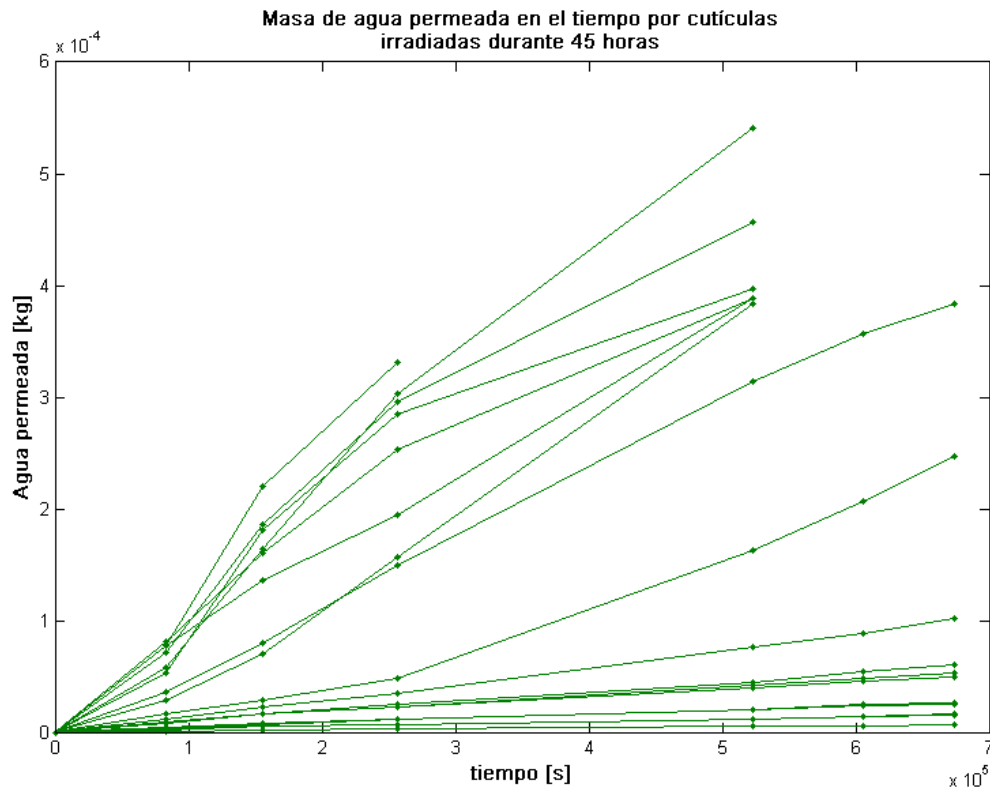


Figura 3.11: Masa permeada de cutículas irradiada con UV durante 45 horas.

3.2.8. Resultados y Análisis.

De estos datos se obtuvo una regresión lineal para encontrar la pendiente de estas rectas, que representan F de la ecuación 1.4, obteniendo el histograma de la figura 3.12, de la permeabilidad de cutículas aisladas de hoja de limón irradiadas durante 45 horas.

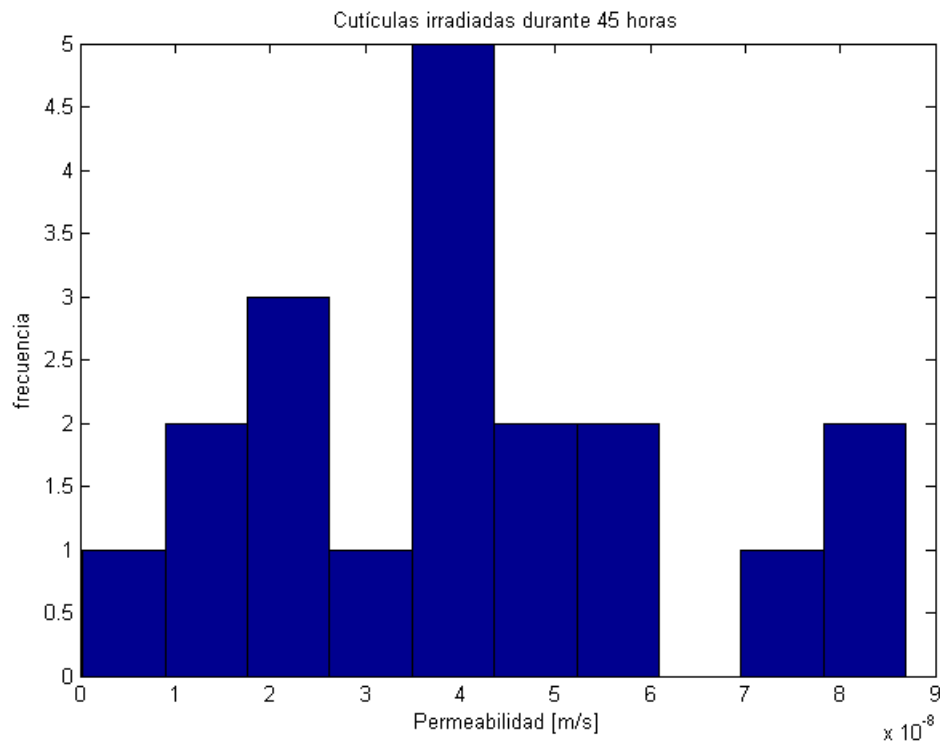


Figura 3.12: *Histograma de la permeabilidad de una cutícula de hoja de limón irradiada durante 45 horas de radiación UV.*

En el caso de las cutículas irradiadas durante 45 horas, se aprecia un efecto en la fragilidad de la cutícula. Estas cutículas se rompen fácilmente al manipularlas y las que se logran usar para medir la masa de agua permeada, se rompen entre la primera y segunda semana de medición. Para este caso el promedio de la permeabilidad es $4,1052 \cdot 10^{-8} [m/s]$ y la desviación estandar $2,391 \cdot 10^{-8} [m/s]$.

El efecto de la radiación podría afectar en la permeabilidad de la cutícula, debido a que una cutícula si se expone mayor tiempo con radiación UV, la permeabilidad tiene un cambio como se refleja en el gráfico de la figura 3.13.

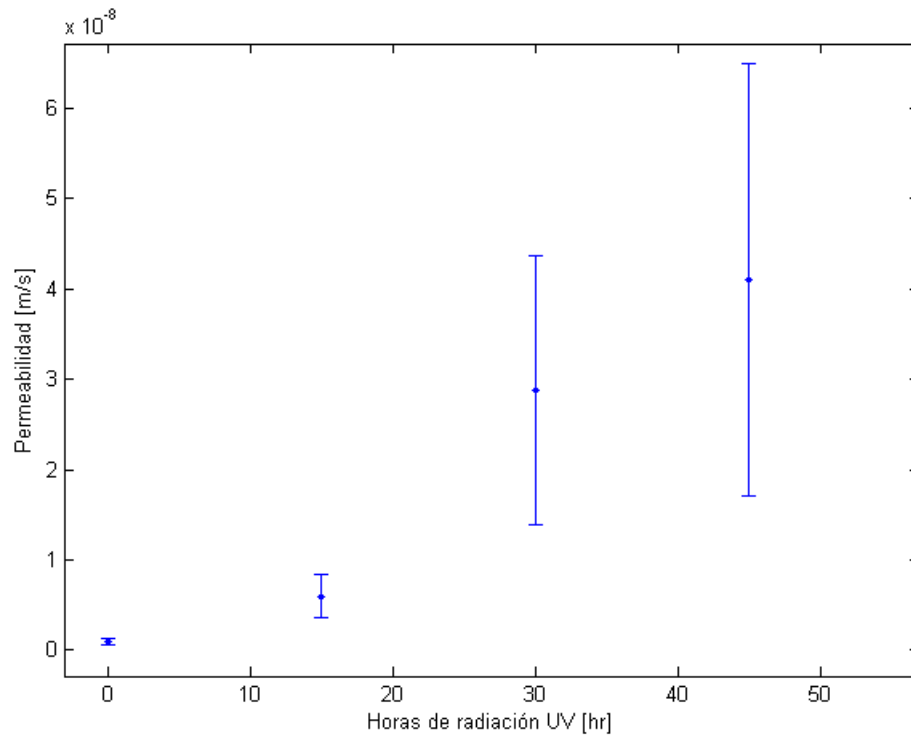


Figura 3.13: *Permeabilidad de cutículas aisladas de hoja de limón expuestas a distintas horas de dosis de radiación UV.*

Y el error de cada medición se debe a la variabilidad natural que presenta la cutícula en su espesor, pero si se logra visualizar una tendencia a aumentar la permeabilidad a medida que se aumentan las dosis de radiación UV.

Capítulo 4

Análisis y determinación del espesor de una cutícula de hoja de limón.

4.1. Análisis y determinación del espesor de una cutícula de hoja de limón.

Una de las características de las cutículas de hoja de limón, es el caso del espesor y su alta variabilidad que presenta naturalmente. En la cutícula se puede identificar una serie de celdas y nervaduras que rodean estas celdas.

Un grupo de cutículas aisladas de hojas de limón son analizadas con un microscopio confocal con laser argón (458-488 nm) y laser de helio-neón (543 nm) marca Carl Zeiss modelo LSM 510, obteniendo un conjunto de imagenes por cada archivo. Cada archivo generado por el microscopio confocal, cuenta de un conjunto de 40 imagenes, de donde 20 de ellas tiene información de la fluorecencia de la muestra y las otras 20 imagenes son del contraste de fase de la muestra.

El archivo con las 20 imagenes de fluorecencia de la cutículas de hoja de limón, son analizadas usando un algoritmo confeccionado en matlab versión 2010b.

El algoritmo de análisis de imagenes, consta de 2 partes de análisis, el primero consta en determinar los espesores de las celdas de las cutículas de hoja de limón y la segunda parte consta de determinar los espesores de las nervaduras de las cutículas de hoja de limón.

4.2. Análisis de imagenes de las celdas de cutículas de hoja de limón obtenidas con un microscopio confocal.

4.2.1. Descripción General y Método Experimental.

Para determinar la distribución de espesores de las celdas de las cutículas de hoja de limón (ver imagen de la figura 4.1) en donde se muestra una celda de la cutícula de hoja de limón), se realiza un promedio de todo el conjunto de imagenes

(ver imagen en la figura 4.2) de cada archivo obtenido del microscopio confocal, para obtener una mejor definición del contorno de cada celda, y determinar el número de celdas y la posición del centro de cada una como se muestra en la figura 4.3.

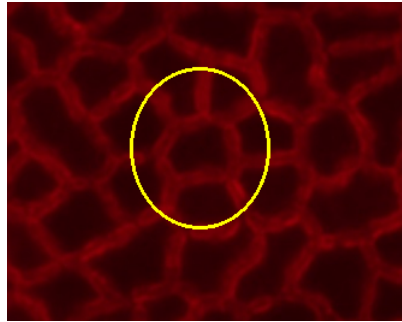


Figura 4.1: *Celda de una cutícula de hoja de limón.*

Una vez identificada la posición de cada celda, se obtiene el promedio de la intensidad de los píxeles vecinos de radio 5[px], en la posición determinada anteriormente y por cada imagen que compone este set de imágenes equiespaciada $0,5[\mu\text{m}]$ que atraviesa la cutícula.

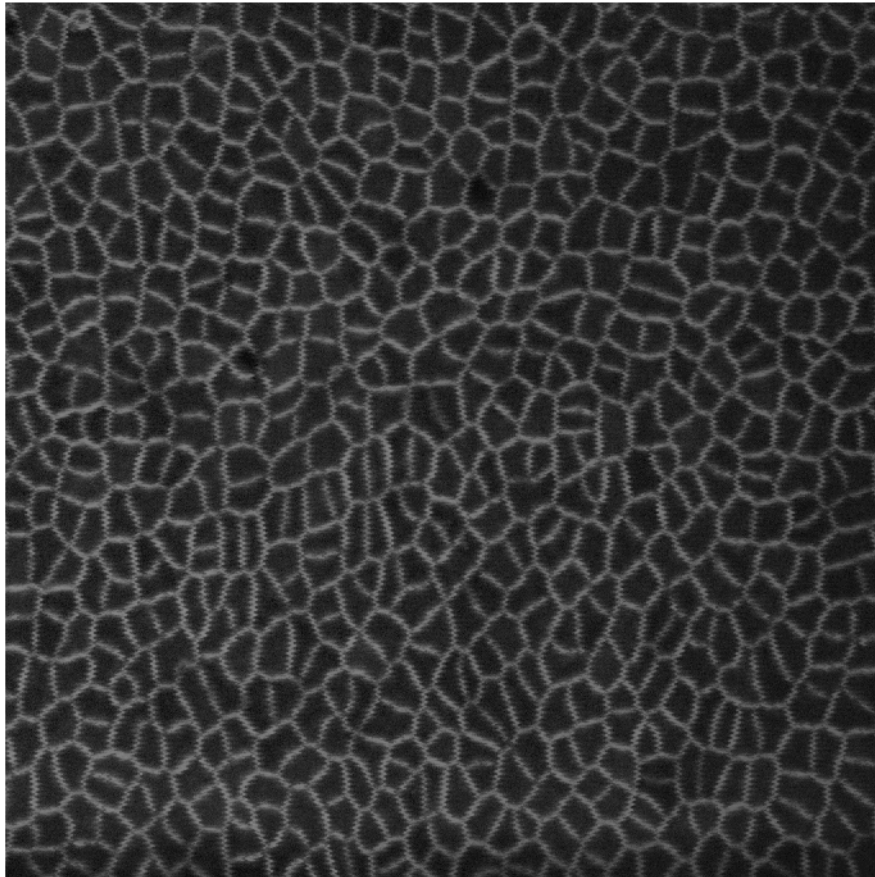


Figura 4.2: *Promedio de las 20 imágenes del archivo obtenido del microscopio confocal de la cutícula de hoja de limón.*

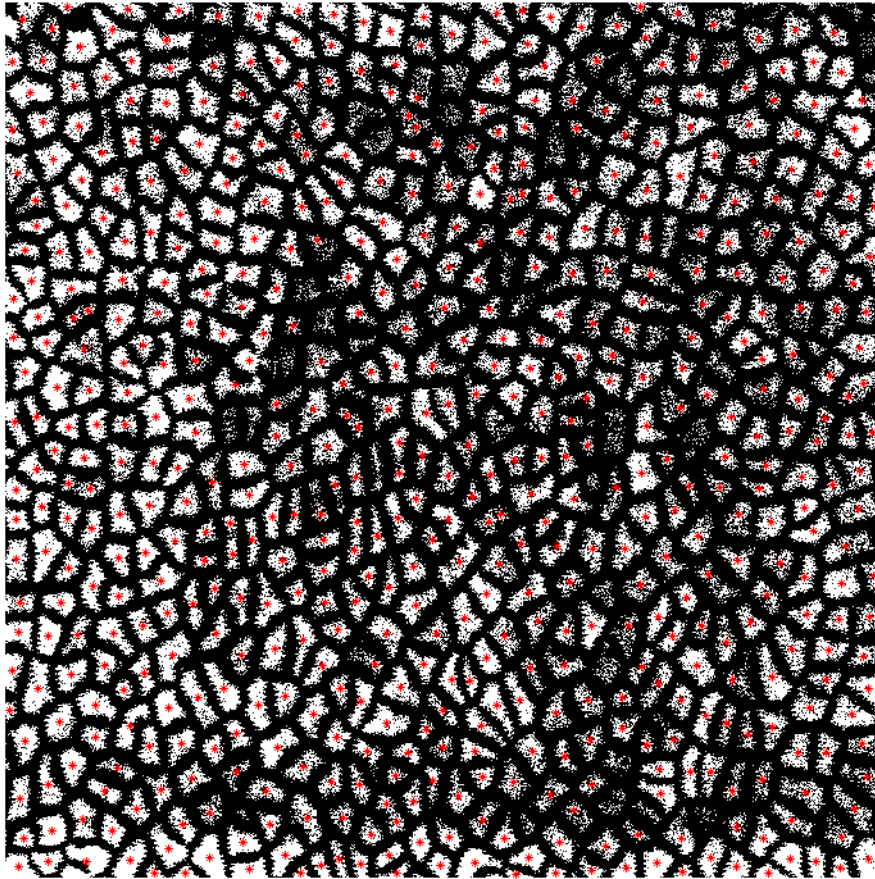


Figura 4.3: *Intensidad promedio por cada $0.5[\mu m]$ al interior de la cutícula.*

Por cada celda identificada se determina el valor de intensidad promedio en la primera capa, luego se realiza el promedio de intensidades de la misma celda pero ubicada en la segunda capa que se encuentra a $0,5[\mu m]$ de la celda de la primera capa, así se procede con las 20 capas que tiene el archivo de imagenes. Con los datos de intensidades y posición, se obtiene un gráfico como el que se muestra en la figura 4.4 donde el eje X representa la posición de una celda en la imagen a $0,5[\mu m]$ entre cada plano y el eje Y la intensidad promedio de $25[px^2]$ en el centro de una celda de la cutícula de hoja de limón.

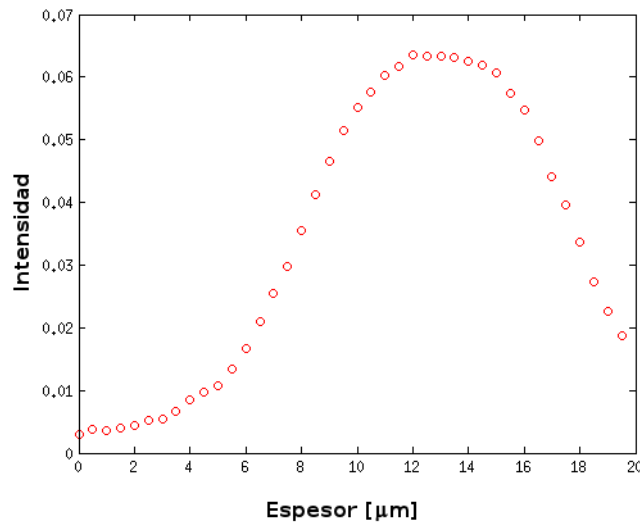


Figura 4.4: Intensidad promedio por cada $0,5[\mu\text{m}]$ al interior de la cutícula.

En cada gráfico como el de la figura 4.4 se puede identificar que en el centro de la curva es mayor la intensidad, esto debido a que en el centro de la cutícula hay mayor cantidad de material fluorescente.

El microscopio confocal toma imágenes por capas cada $0,5 [\mu\text{m}]$ y debido a que la cutícula no se encuentra completamente plana hay secciones en la imagen en que la intensidad disminuye considerablemente, lo que determina que el microscopio está pasando por una zona en donde no se encuentra material fluorescente, se infiere entonces que se está midiendo fuera de la cutícula. Con este criterio, se debe identificar cuando comienza la cutícula y cuando termina, para esto se identifican los cambios en la curva de intensidad (∇I). Estos cambios se pueden ver en el gráfico de la figura 4.5 en el cual se identifican dos picks, uno superior y otro inferior, que están ubicados en las zonas en que comienza y termina la cutícula según el criterio indicado anteriormente. Se identifica la posición de cada pick y la de los primeros vecinos, generando una interpolación de una función cuadrática (ver 4.5), obteniendo los vértices y así poder determinar la posición de cada uno de estos dos picks, con lo cual se determina el espesor en esta celda de la cutícula.

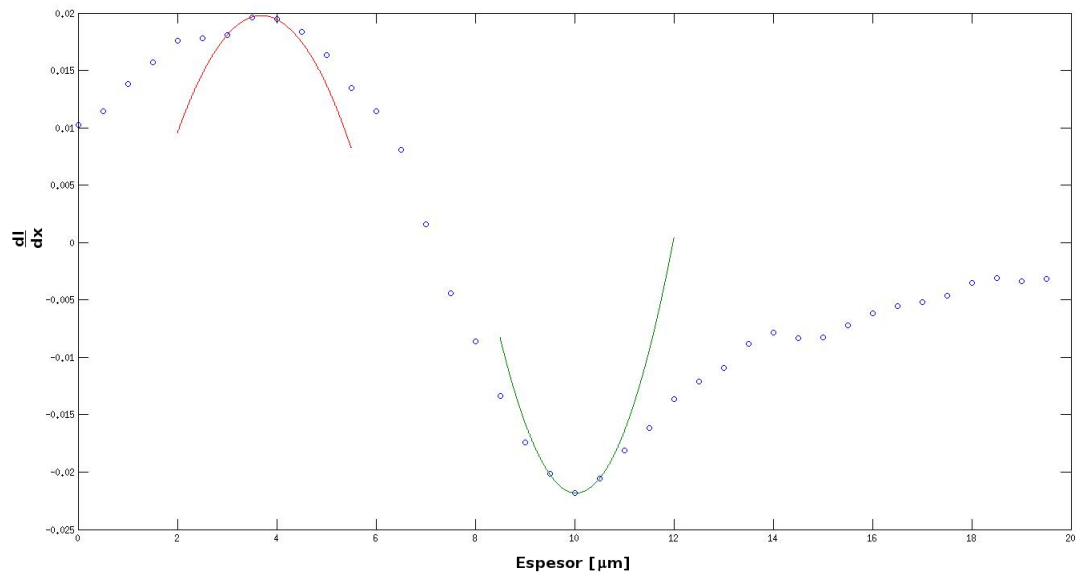


Figura 4.5: Variación de la intensidad por cada $0.5[\mu\text{m}]$ al interior de la cutícula.

Luego de obtener la posición de los picks y registrar la distancia entre los puntos para obtener el espesor promedio en esa celda de la cutícula, para lo cual el algoritmo lo realiza para todas las celdas y por cada uno de los archivos obtenidos del microscopio confocal.

La distribución de espesores de las celdas de las cutículas de hoja de limón se muestran en el histograma de la figura 4.6

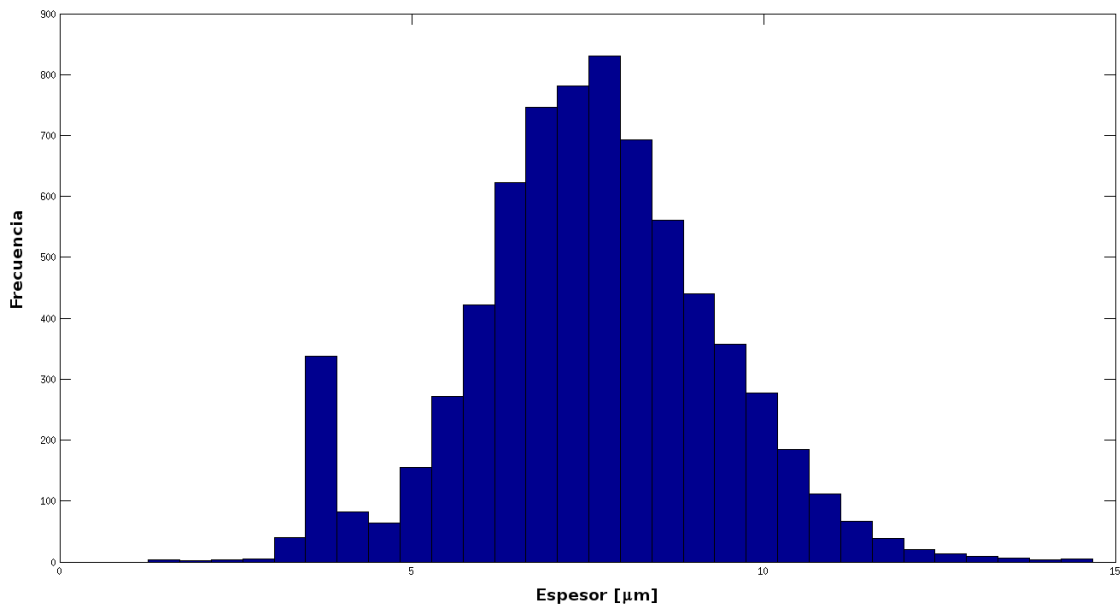


Figura 4.6: *Histograma del espesor de las celdas de una cutícula aislada de hoja de limón.*

El espesor promedio de las celdas de cutículas aisladas de hoja de limón es de $7.522[\mu\text{m}]$ con una desviación estandar $1.800[\mu\text{m}]$

4.3. Análisis de imágenes de la nerbadura de cutículas de hoja de limón obtenidas con un microscopio confocal.

4.3.1. Descripción General y Método Experimental.

Para el caso de las nerbaduras de las cutículas de hoja de limón, el algoritmo realiza un promedio de todo el conjunto de imágenes de cada archivo obtenido del microscopio confocal (como se observa en la imagen de la figura 4.2), para lograr una mejor definición de la imagen de la cutícula. De esta imagen se eligen filas de píxeles equiespaciadas $10[\text{px}]$ entre ellas, obteniendo un perfil de esta fila de píxeles como el que se muestra en el gráfico de la figura 4.7.

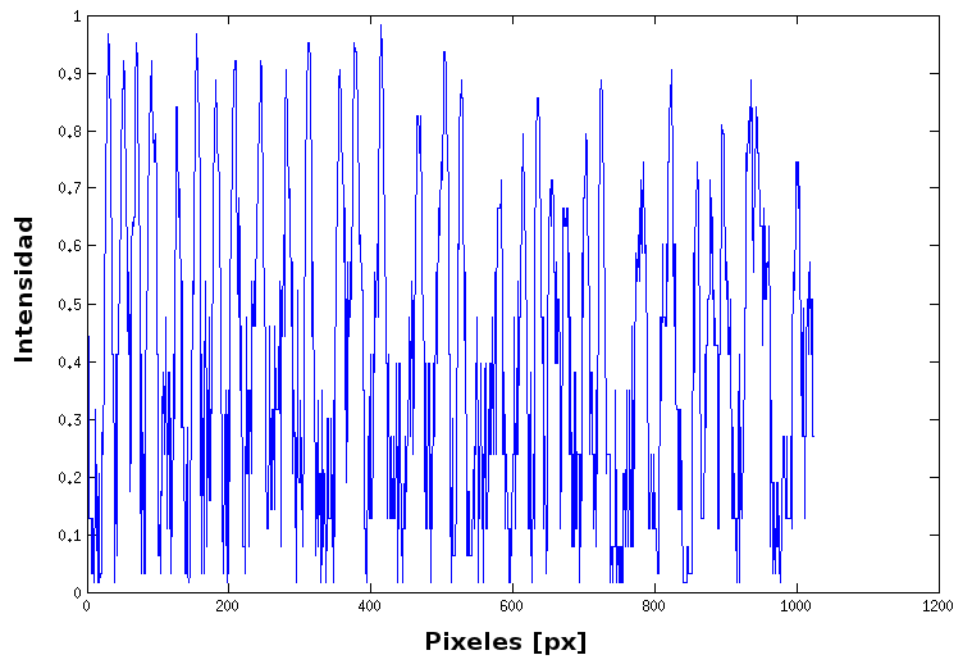


Figura 4.7: *Gráfico del perfil de intensidades de una fila de píxeles de una imagen de una cutícula.*

A este perfil de intensidades se le quitan las altas frecuencias para obtener un perfil más definido como el de la figura 4.8 y se transforma a una imagen binaria para obtener un máximo cuando hay un pick, que en este caso sería una nervadura que al tener mayor cantidad de material cuticular, es más fluorescente, y un cero de intensidad cuando hay una celda.

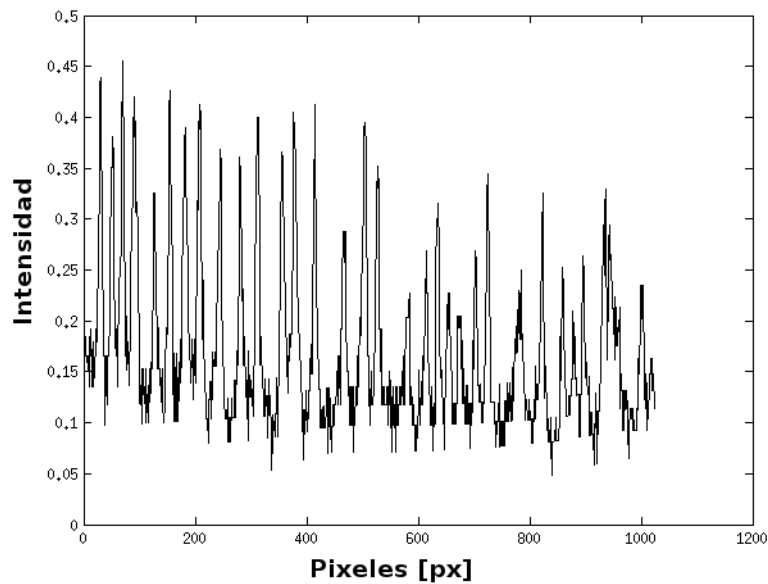


Figura 4.8: Gráfica del perfil de intensidades filtrado, dejando solo las bajas frecuencias.

Por cada posición de la celda identificada, se determina el valor de intensidad promedio en la primera capa, luego se realiza el promedio de intensidades de la misma celda pero ubicada en la segunda capa que se encuentra a $0,5[\mu\text{m}]$ de la celda de la primera capa, así se procede con las 20 capas que tiene el archivo de imágenes. Con los datos de intensidades y posición según la posición, se obtiene un gráfico como el que se muestra en la figura 4.4 donde el eje X representa la posición de una celda en la imagen a $0,5[\mu\text{m}]$ entre cada plano y el eje Y la intensidad promedio de $25[\text{px}^2]$ en el centro de una celda de la cutícula de hoja de limón.

A esta fila de píxeles, se identifica las posiciones del pick donde está la nervadura. Una vez obtenidas las posiciones de las nervaduras, se realiza la medición del espesor en cada una de las posiciones, para registrar los espesores de las nervaduras. Para obtener este espesor, se utiliza el mismo criterio visto en el caso de las celdas. El microscopio confocal toma imágenes de la cutícula por capas, las cuales están equiespaciaes $0,5 [\mu\text{m}]$ entre capas, además como la cutícula presenta irregularidades y no es completamente plana, hay secciones en que la intensidad disminuye considerablemente debido a que el microscopio está

pasando por una zona en donde no hay material fluorescente de la cutícula, por lo cual se infiere que se está midiendo fuera de la cutícula. Con este criterio, se debe identificar cuando comienza y cuando termina la cutícula. Identificando los cambios de intensidad (∇I) en la curva de la figura 4.5 se observan dos picks, uno superior y otro inferior que considerando el criterio visto anteriormente, están ubicados en las zonas en que comienza y termina la cutícula. Se identifica la posición de cada pick y la de los primeros vecinos, generando una interpolación de una función cuadrática (ver 4.5), obteniendo los vertices y así poder determinar la posición de cada uno de estos dos picks, con lo cual se determina el espesor en esta celda de la cutícula.

Con la determinación de los espesores de la nerbadura, se obtiene un histograma como el de la figura 4.9

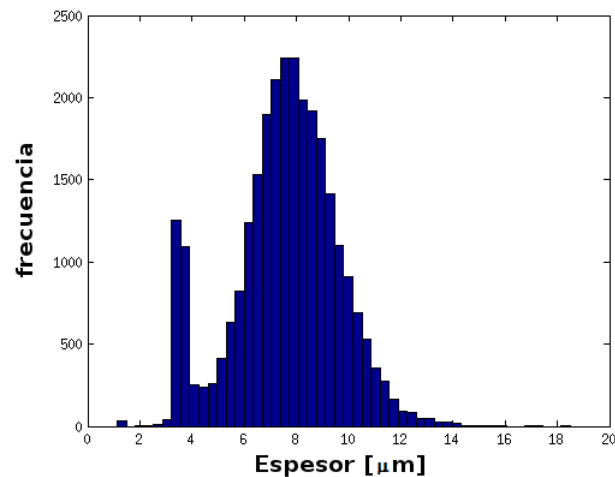


Figura 4.9: *Histograma del espesor de las nerbaduras de una cutícula aislada de hoja de limón.*

El espesor promedio de las nerbaduras de las cutículas aisladas de hojas de limón es 7.588[μm] y la desviación estandar de 2.020[μm]

Capítulo 5
Conclusiones.

Una de las características de la cutícula de hoja de limón es la variabilidad del espesor, lo que podría explicar la variabilidad de la permeabilidad. Por esto se realizó la determinación del espesor de la cutícula analizando imágenes obtenidas con un microscopio confocal. Se eligieron aleatoriamente 20 cutículas para ser analizadas. Cada archivo contenía 20 imágenes de la cutícula separadas $0,5[\mu\text{m}]$. Haciendo un análisis de los espesores de las celdas y la nerbadura de la cutícula, los resultados fueron $7.522[\mu\text{m}]$ y $5,5925 \cdot 10^{-9}[m/s]$ respectivamente. La dispersión de los datos fue $1,32 \cdot 10^{-9}[m/s]$ para el caso de las celdas y para las nerbaduras $4,00 \cdot 10^{-9}[m/s]$.

Los efectos que podría provocar la radiación ultravioleta sobre el desarrollo de la planta o sus frutos debido a la variación de la permeabilidad de la hoja, se reflejan en los resultados obtenidos al irradiar cutículas aisladas de hojas de limón. Las dosis de radiación suministradas a las cutículas que fueron de 15, 30 y 45 horas continuas, reflejaron en la cantidad de agua perdida por la cutícula, el efecto profocado por la radiación UV.

Una de las primeras etapas fue determinar la permeabilidad natural de las cutículas aisladas de hojas de limón, para esto se aislaron cutículas y se efectuaron mediciones de la perdida del agua por medio de la evaporación a través de dichas cutículas. En promedio permearon $0.6 [\text{mg}]$ de agua durante 12 días, manteniendolas a temperatura constante de $20[^\circ\text{C}]$.

Como resultado de la medición de la perdida de agua a través de la cutícula, dio como resultado que la permeabilidad de la cutícula aislada de hoja de limón es $1,36 \cdot 10^{-9}[m/s]$ con un error de $\pm 1,32 \cdot 10^{-9}[m/s]$.

Para observar los efectos de la radiación ultravioleta sobre la permeabilidad de la cutícula de hoja de limón, un grupo de cutículas fueron irradiadas bajo distintas dosis de luz ultravioleta. Un grupo al que se le suministró durante 15 horas continuas de radiación, recibió $600[KJ/m^2]$.

La masa de agua permeada por estas cutículas irradiadas durante 15 horas aumentó, teniendo como consecuencia la variación del valor de la permeabilidad, el cual resultó $5,7 \cdot 10^{-9}[m/s] \pm 4,0 \cdot 10^{-9}[m/s]$.

Para el caso en que la cutícula recibió 30 horas de radiación UV, $1200 [KJ/m^2]$, la cantidad de agua permeada dio como resultado que la permeabilidad sea $2,87 \cdot 10^{-8} [m/s] \pm 1,49 \cdot 10^{-8} [m/s]$, y para las cutículas irradiadas durante 45 horas, esto quiere decir $1800 [KJ/m^2]$ la permeabilidad es $4,11 \cdot 10^{-8} [m/s] \pm 2,39 \cdot 10^{-8} [m/s]$.

Por lo tanto, a medida que se aumenta la exposición de radiación ultravioleta, la cantidad de agua que permea la cutícula aumenta, por ende la permeabilidad de la cutícula aislada de hoja de limón, es mayor a medida que la dosis de radiación a la que está expuesta también crece.

Una de las características de la cutícula de hoja de limón es la variabilidad del espesor, lo que podría ser uno de los factores de la variabilidad de la permeabilidad.

Apéndice A

Apéndice.

A.1. Montaje para la medición de agua perdida de las cutículas.

En la figura A.1 se encuentra una fotografía del sistema para realizar el gradiente de agua entre la celda de difusión y el medio.



Figura A.1: Montaje de las celdas de difusión con las cutículas para generar el gradiente de concentración de agua debido a la silica gel.

Figura A.2 vista lateral del espacio entre la silica y las celdas de difusión con las cutículas.

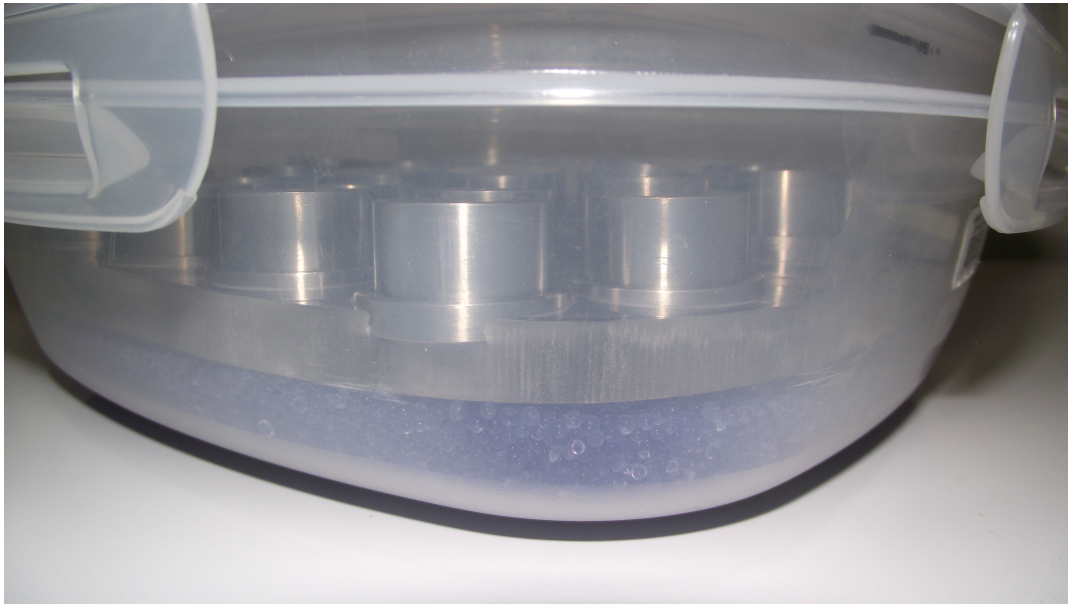


Figura A.2: Montaje de las celdas de difusión con las cutículas para generar el gradiente de concentración de agua debido a la silica gel.

Sistema de acrílico para ubicar las celdas de difusión y distanciar las cutículas de la silica gel se muestran en la figura A.3



Figura A.3: Montaje de las celdas de difusión con las cutículas para generar el gradiente de concentración de agua debido a la silica gel.

A.2. Código del algoritmo de análisis de imágenes de cutículas aisladas de hoja de limón.

Código en matlab del algoritmo de análisis de imágenes del espesor de las celdas de la cutícula de hoja de limón:

```

1 - tic
2 - clear all;close all;clc
3 - format long
4 - % scaling:
5 - % X: 0.35 micrometro
6 - % Y: 0.35 micrometro
7 - % Z: 0.50 micrometro -> distancia entre los planos
8 - % stack size:
9 - % X: 354.7 micrometro
10 - % Y: 354.7 micrometro
11 - % Z: 19.50 micrometro tamaño total de las imagenes.
12 - delta = [];
13 - for hj = 2
14 -     display(hj)
15 -
16 -     IM = '/media/Hitachi/IT0/respaldo 26-01/';
17 -     IM2 = 'Confocal/imagenes_confocal/';
18 -     IM3 = ['Cuticulas/confocal_ima/C' int2str(hj) '.tif'];
19 -     [pathstr, name, ext] = fileparts([IM IM2 IM3]);
20 -     File = [pathstr name];
21 -
22 -     Info = imfinfo(File);
23 -     W = Info(1).Width;
24 -     H = Info(1).Height;
25 -     [ImaBW2,Iavee] = prog_p2(File,Info);
26 -     figure,imshow(Iavee)
27 -     ImaBW = im2bw(ImaBW2);
28 -     [posicion] = position_center(ImaBW);
29 -
30 -     h = 0:0.5:19.5;
31 -
32 -     delta_H = [];
33 -     long = length(posicion);
34 -     for s = 1:long
35 -         x = s;
36 -         y = s;
37 -         espesores=[];
38 -         for ind = 1:length(Info)
39 -             pos_x = posicion(x,1);
40 -             pos_y = posicion(y,2);
41 -             if pos_x > 6 && pos_x < (W-6) && pos_y >6 && pos_y < (W-6);
42 -                 i = pos_x-5;
43 -                 ii = pos_x+5;
44 -                 j = pos_y-5;
45 -                 jj = pos_y+5;
46 -                 Ima_hist_centro = im2double(imread(File,ind));

```

```

46 -             Ima_hist_centr      = im2double(imread(File,ind));
47 -             valor_medio        = mean2(Ima_hist_centr(i:i,j:j));
48 -             espesores          = [espesores valor_medio];
49 -
50 -         end
51 -     if pos_x > 6 && pos_x < (W-6) && pos_y >6 && pos_y < (W-6);
52 -         espesores2            = smooth(espesores,0.2,'moving');
53 -         diffe                  = (gradient(espesores2));
54 -
55 -         [A,p_max]              = max(diffe);
56 -         [B,p_min]              = min(diffe);
57 -
58 -         if p_max~=1 && p_min ~= length(Info) && p_min>p_max
59 -             xp_max              = (h((p_max-1):(p_max+1)))';
60 -             yp_max              = diffe((p_max-1):(p_max+1));
61 -             p                    = polyfit(xp_max,yp_max,2);
62 -             xp1                  = (h(p_max-1)-1):0.001:(h(p_max+1)+1.5);
63 -             y1                    = polyval(p,xp1);
64 -             max_y1               = find(y1 == (max(y1)));
65 -             max_h1                = xp1(max_y1);
66 -             %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
67 -             xp_min                = (h((p_min-1):(p_min+1)))';
68 -             yp_min                = diffe((p_min-1):(p_min+1));
69 -             p                      = polyfit(xp_min,yp_min,2);
70 -             xp2                    = (h(p_min-1)-1):0.001:(h(p_min+1)+1.5);
71 -             y2                      = polyval(p,xp2);
72 -             min_y2                 = find(y2 == (min(y2)));
73 -             max_h2                  = xp2(min_y2);
74 -
75 -             h2_h1                  = max_h2 - max_h1;
76 -             delta_H                 = [delta_H h2_h1];
77 -
78 -         end
79 -     end
80 - end
81 - delta = [delta delta_H];
82 - end
83 - hist(delta,20)
84 - toc

```

Figura A.4: Código del algoritmo de análisis de imágenes realizado en matlab para la medición de los espesores de las celdas de cutículas de hoja de limón.

Código en matlab del algoritmo de lectura y filtros de imágenes:

```

1  function[Iave3,Iave4]=prog_p2(File,Info)
2
3  N=length(Info);
4  W=Info(1).Width;
5  H=Info(1).Height;
6  x=(1:W);
7  y=(1:H)';
8  [X Y]=meshgrid((1:W),(1:H));
9
10 Iave = 0;
11 for i = 1:N,
12     Iave = Iave+im2double(imread(File,i))/N;
13 end
14 Iave = adapthisteq(Iave,'Distribution','rayleigh');
15 Sx = mean(Iave);
16 Sy = mean(Iave)';
17
18 px = polyfit(x,Sx,1);
19 py = polyfit(y,Sy,1);
20
21 bkg = px(1)*X+py(1)*Y+px(2)+py(2);
22
23 Iave2 = Iave-bkg;
24 Iave2 = (Iave2-min(min(Iave2)))/(max(max(Iave2))-min(min(Iave2)));
25 Iave4 = Iave2;
26 background = imopen(Iave2,stre1('disk',50));
27 Iave2 = Iave2 - background;
28 Iave2 = histeq(Iave2);
29 % figure,plot(Iave(1,:))
30 Iave3 = im2bw(Iave2);

```

Figura A.5: Código del algoritmo de promedio de imágenes.

Código en matlab del algoritmo para determinar las posiciones de los centros de las celdas de las cutículas:

```

1  function[posicion]=position_center(ImaBW)
2
3  ImaBW2 = bwareaopen(ImaBW,100); %elimina celda más pequeñas que 100 pixeles
4  % cc = bwconncomp(ImaBW, 4)
5  % cc.NumObjects
6  bw2 = imfill(ImaBW2,'holes');
7  s = regionprops(bw2, 'centroid');
8  centroids = cat(1, s.Centroid);
9
10 imshow(ImaBW)
11 hold(imgca,'on')
12 figure,plot(imgca,centroids(:,1), centroids(:,2), 'r*')
13 hold(imgca,'off')
14
15 posicion = round(centroids); %posicion centro de la celda

```

Figura A.6: Código del algoritmo de determinación del centro de las celdas.

Código en matlab del algoritmo de análisis de imágenes del espesor de las

nervaduras de la cutícula de hoja de limón:

```

1 - tic
2 - clear all;close all;clc
3 - format long
4 - % scaling:
5 - % X: 0.35 micrometro
6 - % Y: 0.35 micrometro
7 - % Z: 0.50 micrometro -> distancia entre los planos
8 - % stack size:
9 - % X: 354.7 micrometro
10 - % Y: 354.7 micrometro
11 - % Z: 19.50 micrometro tamaño total de las imagenes.
12 - delta = [];
13 - for hj = 1:19
14 -     display(hj)
15 -
16 -     IM = '/media/Hitachi/IT0/respaldo 26-01/';
17 -     IM2 = 'Confocal/imagenes_confocal/';
18 -     IM3 = ['Cutículas/confocal_ima/C' int2str(hj) '.tif/'];
19 -     [pathstr, name, ext] = fileparts([IM IM2 IM3]);
20 -     File = [pathstr name];
21 -
22 -     Info = imfinfo(File);
23 -     W = Info(1).Width;
24 -     H = Info(1).Height;
25 -     [ImaBW2,Iavee] = prog_p2(File,Info);
26 -
27 -     h = fspecial('motion');
28 -     ImaBW3 = imfilter(ImaBW2,h);
29 -     %position = zeros(W,H);
30 -     posx = [];

```

```

30 - posx = [];
31 - posy = [];
32 - for m = 1:9:W-1
33 -     picks = smooth(Iavee(m,:));
34 -     %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
35 -     % hold on
36 -     % plot(picks,'r')
37 -     % figure,plot(ImaBW2(1,:),'k')
38 -     % xxx = linspace(1,1030,500);
39 -     % plot(xxx,0.6,'g')
40 -     %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
41 -     a=1;
42 -     %%% esta parte del código busca los picks en la fila de pixeles
43 -     for j = 1:length(picks)-1
44 -         if picks(j)<0.7 && picks(j+1)>0.7 || picks(j+1)<0.7 && picks(j)>0.7
45 -             x(a) = j;
46 -             a = a+1;
47 -         end
48 -     end
49 -
50 -     for i = 1:length(x)/2
51 -         aa = picks(x(2*i -1):x(2*i));
52 -         maxim = x(2*i -1)+find(picks(x(2*i -1):x(2*i)) == max(aa)) -1;
53 -         posx = [posx maxim];
54 -     end
55 -     ah = length(posx)-length(posy);
56 -     posy = [posy (m*ones(1,(ah)))];
57 -     ah = 0;
58 -     end
59 -     imshow(Iavee)
60 -     hold(imgca,'on')
61 -     plot(imgca,posx, posy, 'r*')
62 -     hold(imgca,'off')
63 -
64 -     posicion = [posx; posy]';
65 -
66 -     h = 0:0.5:19.5;
67 -
68 -     delta_H = [];
69 -     long = length(posicion);
70 -     for s = 1:long

```

```

70 - for s = 1:long
71 -     x = s;
72 -     y = s;
73 -     espesores=[];
74 -     for ind = 1:length(Info)
75 -         pos_x = posicion(x,1);
76 -         pos_y = posicion(y,2);
77 -         if pos_x > 6 && pos_x < (W-6) && pos_y >6 && pos_y < (W-6);
78 -             i = pos_x-5;
79 -             ii = pos_x+5;
80 -             j = pos_y-5;
81 -             jj = pos_y+5;
82 -             %imas = imread(File,ind);
83 -             Ima_hist_centra = im2double(imread(File,ind));
84 -             valor_medio = mean2(Ima_hist_centra(i:ii,j:jj));
85 -             espesores = [espesores valor_medio];
86 -         end
87 -     end
88 -     if pos_x > 6 && pos_x < (W-6) && pos_y >6 && pos_y < (W-6);
89 -         espesores2 = smooth(espesores,0.2,'moving');
90 -         diffe = (gradient(espesores2));
91 -
92 -
93 -         [A,p_max] = max(diffe);
94 -         [B,p_min] = min(diffe);
95 -
96 -         if p_max~=1 && p_min ~= length(Info) && p_min>p_max
97 -             xp_max = (h((p_max-1):(p_max+1)))';
98 -             yp_max = diffe((p_max-1):(p_max+1));
99 -             p = polyfit(xp_max,yp_max,2);
100 -
101 -             xp1 = (h((p_max-1)-1):0.001:(h(p_max+1)+1.5));
102 -             y1 = polyval(p,xp1);
103 -             max_y1 = find(y1 == (max(y1)));
104 -             max_h1 = xp1(max_y1);
105 -             %%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
106 -             xp_min = (h((p_min-1):(p_min+1)))';
107 -             yp_min = diffe((p_min-1):(p_min+1));
108 -             p = polyfit(xp_min,yp_min,2);
109 -             xp2 = (h((p_min-1)-1):0.001:(h(p_min+1)+1.5));
110 -             y2 = polyval(p,xp2);
111 -             min_y2 = find(y2 == (min(y2)));
112 -             max_h2 = xp2(min_y2);
113 -
114 -             h2_h1 = max_h2 - max_h1;
115 -             delta_H = [delta_H h2_h1];
116 -         end
117 -     end
118 - end
119 - delta = [delta delta_H];
120 - end
121 - hist(delta,20)
122 - toc

```

Figura A.7: Código del algoritmo de análisis de imágenes realizado en matlab para la medición de los espesores de las celdas de cutículas de hoja de limón.

Bibliografía

- [1] Gerhard Kerstiens *Cuticular water permeability and its physiological significance* Journal of Experimental Botany, Vol. 47, No. 305, pp. 1813-1832, December 1996.
- [2] T. Kirsch, F. Kaffarnik, M. Riederer and L. Schreiber *Cuticular permeability of the three tree species Prunus laurocerasus L., Ginkgo biloba L. and Juglans regia L.: comparative investigation of the transport properties of intact leaves, isolated cuticles and reconstituted cuticular waxes* Journal of Experimental Botany, Vol. 48, No. 310, pp. 1035-1045, May 1997.
- [3] Deysi Petit, Alberto González, Gustavo González, Rogerio Sotelo, Reginaldo Báez-Sañudo. *Ultraestructura y permeabilidad de la cutícula durante la ontogenia del fruto de mango*, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Km 0.6 carretera a la Victoria C.P. 8300. Hermosillo-Sonora, México.
- [4] Markus Riederer and Lukas Schreiber *Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles* Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 363, Plants under Stress Special Issue, pp. 2023-2032, October 2001.
- [5] María del C. Lallana, Cristina E. Billard, José H. Elizalde, Victor H. Lallana *Breve revisión sobre características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas*. Ciencias Agrarias - Ciencias Médicas - U. Nacional de Entre Ríos.

- [6] Elsa Bósquez Molina. *Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (Citrus latifolia Tanaka)*, Tesis doctoral en Ciencias Biológicas, México, D.F. Octubre de 2003
- [7] Ramón Latorre et. al. *Biofísica y Fisiología Celular*. ISBN: 84-472-0339-5 (1996).
%bibitem7 Slusser J.R., J.H. Gibson, D.S. Bigelow, D. Kolinski, P. Disterhoft, K. Lantz, A. Beaubien , J. Geophys. Res. 105 (2000) 4841.
- [8] Ann R. Webb: *UVB Instrumentation and Applications* CRC Pr I Llc ISBN: 9056991213 (1998).
<http://www.solmaforo.cl/index4.html>
(último acceso, Febrero 2013)