



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Variación anatómica foliar de *Abies religiosa* (H. B. K.)
Schlecht. & Cham. y *Pinus hartwegii* Lindl. (Pinaceae) en
tres sitios contrastantes**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta:

María Inés González Espinosa

México D. F. Octubre de 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para llevar a cabo esta investigación

Un especial agradecimiento a la Dra. Teresa Terrazas Salgado por su paciencia en la enseñanza y apoyo para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Sergio Bernal Salazar por su apoyo en la colecta de material en campo.

A cada uno de mis maestros de la Facultad por sus enseñanzas.

A mis padres: por su apoyo a lo largo de mi formación académica.

A mis hermanos: por sus palabras de aliento en los momentos difíciles.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Anatomía Vegetal del Colegio de Postgraduados: Monse, Gaby, Mireya, Rosa, Doris y Vicky.

A mis compañeros y amigos de la Carrera- Miriam, Claus Gal. Angélica, Yadira, Claus de Teodoro, Paty, Gris, Lalo, Miguel, Eloir, Hernán: gracias por su apoyo y compañía en las buenas y las malas.

A todas y cada una de las personas que de alguna forma me han alentado para continuar con mi formación profesional y personal.

CONTENIDO

Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen.....	v
Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
Material y métodos.....	8
Áreas de estudio.....	8
Descripción de especies.....	10
<i>Abies religiosa</i>	10
<i>Pinus hartwegii</i>	11
Recolecta de material.....	12
Trabajo de laboratorio.....	13
Tinción de cortes.....	13
Aclarado de hojas.....	13
Histoquímica.....	14
Observaciones y Medición.....	14
Análisis estadístico.....	15
Resultados	
<i>Abies religiosa</i>	15
<i>Pinus hartwegii</i>	20
Histoquímica.....	25
Proteínas en <i>Abies religiosa</i>	25
Proteínas en hojas de herbario de <i>Abies religiosa</i>	27
Almidón en <i>Abies religiosa</i>	28
Almidón en hojas de herbario de <i>Abies religiosa</i>	31
Proteínas en <i>Pinus hartwegii</i>	32
Almidón en <i>Pinus hartwegii</i>	33
Comparación entre localidades.....	34
Discusión.....	41
Conclusiones.....	45
Literatura citada.....	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Media del número de células epiteliales en canales resiníferos de <i>Abies religiosa</i>	18
Cuadro 2. Distribución de proteínas en tejidos de hoja de <i>Abies religiosa</i>	26
Cuadro 3. Comparación de la distribución de proteínas en tejidos de hoja de <i>Abies religiosa</i> de cuatro localidades, provenientes de muestras de herbario.....	28
Cuadro 4. Contenido de almidón en tejidos de hoja de <i>Abies religiosa</i>	30
Cuadro 5. Acumulación de granos de almidón en tejidos de hoja de <i>Abies religiosa</i> provenientes de muestras de herbario	31
Cuadro 6. Distribución de proteínas en los tipos celulares de hojas de <i>Pinus hartwegii</i> a lo largo de un año	33
Cuadro 7. Distribución de almidón en tejidos de hoja de <i>Pinus hartwegii</i>	34
Cuadro 8. Valores de la media y desviación estándar para ocho caracteres anatómicos en hoja de <i>Abies religiosa</i>	35
Cuadro 9. Valores de la media y desviación estándar entre edades para ocho caracteres anatómicos en hoja de <i>Abies religiosa</i>	36
Cuadro 10. Valores de la media y desviación estándar de siete caracteres anatómicos en hoja de <i>Abies religiosa</i> procedentes de herbario.....	37
Cuadro 11. Valores de la media y desviación estándar entre edades de siete caracteres anatómicos en hojas de <i>Abies religiosa</i> procedentes de herbario	38
Cuadro 12. Valores de la media y desviación estándar para tres caracteres anatómicos en hoja de <i>Pinus hartwegii</i>	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del área de estudio.....	9
Figura 2. Cortes transversales y diafanizado en hoja de <i>Abies religiosa</i>	16
Figura 3. Mesofilo en hoja de <i>Abies religiosa</i>	19
Figura 4. Tejido vascular en hoja de <i>Abies religiosa</i>	20
Figura 5. Cortes transversales de hoja de <i>Pinus hartwegii</i>	22
Figura 6. Mesofilo en hojas de <i>Pinus hartwegii</i>	23
Figura 7. Tejido vascular en hoja de <i>Pinus hartwegii</i>	24
Figura 8. Distribución de almidón en hoja de <i>Abies religiosa</i>	30

INTRODUCCION

Varios estudios han mencionado que el deterioro ambiental de los bosques de coníferas en la Cuenca de México está asociado a la exposición crónica por contaminantes aéreos (Bravo-Alvarez y Torres-Jardón, 2002). Un estudio sobre la anatomía de *Abies religiosa* mostró que sí existen modificaciones estructurales asociadas a la presencia de O₃ en el ambiente (Álvarez *et al.*, 1998). Con base en esta información se decidió estudiar la anatomía foliar en individuos de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*, ambas especies consideradas como susceptibles a los contaminantes aéreos, procedentes de dos bosques de la Cuenca de México con diferente grado de deterioro y una comunidad de referencia fuera de la Cuenca, para confirmar las diferencias reportadas para *Abies religiosa* (Álvarez *et al.*, 1998) y evaluar por primera vez a *Pinus hartwegii*. Se hicieron cortes incluidos en metilmetacrilato. Los resultados de un año de muestreo se compararon con material de herbario para evaluar el efecto del deterioro reportado a partir de la década de 1970 (Bernal-Salazar *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

Los bosques de *Abies religiosa*, se consideran comunidades en donde esta especie arbórea tiene mayor abundancia. Por otra parte, en condiciones naturales de poco disturbio, *Abies* comparte, en ocasiones, ciertos hábitats con otras especies de árboles. En la Faja Volcánica Transmexicana, que es su principal área de distribución, el bosque de oyamel se encuentra formando tanto masas puras como mezcladas con *Pinus montezumae* (Rzedowski, 1978).

Los árboles de *Abies religiosa* en el bosque del Desierto de los Leones, localizado al suroeste de la ciudad de México, muestran una significativa reducción en su vigor, manifestado por una disminución en el número de ramas y hojas, que los lleva eventualmente a su muerte (Alvarado, 1989; Álvarez *et al.*, 1998). Alvarado (1989) constató que la mayoría del arbolado dañado se encuentra en las cañadas, y sobre todo, al final de las mismas. Estas cañadas tienen una exposición u orientación al norte, es decir, hacia la ciudad de México, precisamente de donde provienen los vientos cargados de contaminantes. Vázquez (1987) señaló que el deterioro por patógenos, extracción de agua y el mal manejo del bosque juegan un papel secundario en el proceso de declinación y propuso como agente causal a los contaminantes aéreos, entre ellos, al ozono. Este efecto también lo proponen Muñiz, 1987, Aguirre y Bernal, 1988; Alvarado *et al.*, 1987.

En México, desde 1976 se detectó daño de tipo crónico por ozono en *Pinus hartwegii* y *P. leiophylla* en el Ajusco, Distrito Federal, además se reportó que *P. hartwegii* es más sensible a los gases oxidantes que *P. montezumae* var. *lindleyi* (Hernández y de Bauer, 1984). Uno de los efectos más obvios del ozono en las plantas es la clorosis y necrosis expresada como discretas lesiones esparcidas sobre la superficie de la hoja (Álvarez *et al.*, 1998). Alvarado (1989) mencionó que la ausencia de patógenos en la raíz y en el follaje de los árboles dañados, indica que los síntomas presentes en el follaje, así como la muerte ascendente no se pueden atribuir a los microorganismos presentes. La muerte ascendente de los árboles de oyamel en el Parque Nacional Desierto de los Leones, puede explicarse debido a que las ramas de la parte inferior han estado más tiempo expuestas a los contaminantes aéreos que han sido acarreados por los vientos desde la ciudad de México (Alvarado, 1989).

En áreas que frecuentemente experimentan altas concentraciones de ozono, los árboles son más susceptibles a padecer estrés hídrico, porque sus raíces son más pequeñas (Wellburn y Wellburn, 1994). La contaminación del aire afecta las funciones de los estomas y acelera la degradación de las ceras epicuticulares, lo cual reduce la habilidad de los árboles para resistir la desecación. Los estomas de árboles expuestos a los efectos del ozono responden menos efectivamente a la sequía y, con la contaminación, su habilidad para cerrarse disminuye (Chappelka y Smith, 1995). Bennet *et al.* (1992) mencionaron que ciertas características de la hoja tales como densidad de estomas, grosor de la hoja, grosor del parénquima en empalizada y esponjoso; así como los espacios intercelulares, pueden estar relacionados con la sensibilidad al ozono. El ozono entra a la planta a través de la apertura estomatal. El ingreso de gases al parecer depende del número y tamaño de estomas, así como de su grado de apertura. Bajo condiciones de humedad, la apertura de los estomas se incrementa y las plantas son usualmente más sensitivas a la contaminación (McLaughlin y Taylor, 1981).

El ácido nítrico gaseoso es uno de los contaminantes nitrogenados más abundantes en el smog. Este gas puede ser absorbido por las hojas y metabolizado presenta potencial fitotóxico. Los efectos de este contaminante se manifiestan en la cutícula foliar; ya que el ácido nítrico puede alterar la composición química de las ceras epicuticulares y afecta la conductancia estomatal y la entrada de contaminantes vía estomas (Krywult *et al.*, 1994). La neblina ácida y el ozono aplicado a hojas de pino rojo (*Picea rubens*) en dosis representativas de estos contaminantes en el noreste de Estados Unidos de Norteamérica, produjeron modificaciones estructurales en el desarrollo de la capa de ceras epicuticulares (Percy *et al.*, 1990).

La cutícula protege a la hoja y disminuye la excesiva radiación solar. Esta capa es el primer punto de contacto con la neblina ácida y los contaminantes gaseosos como el ozono. El grosor de la cutícula en hojas de *Picea rubens* es mayor en los árboles que se desarrollan bajo exposición al ozono que aquellas que crecen con aire filtrado (Percy *et al.*, 1992).

Wellburn y Wellburn (1994) en *Pinus halapensis* y Günthard-Goerg *et al.* (1993) en *Betula pendula*, encontraron que hay acumulación de los granos de almidón durante el verano en hojas tratadas con ozono. Estos autores observaron que la acumulación de almidón se presenta a lo largo de la vena media de la hoja, lo que sugiere que el ozono atmosférico causa problemas en el mecanismo de carga del floema apoplástico. Wellburn y Wellburn (1994) también registraron para hojas de *Pinus halapensis* cambios estructurales en el mesófilo y en el tejido vascular, cuando las hojas son expuestas a altos niveles de ozono y lo asociaron con la distribución de carbohidratos dentro de la hoja. Con el avance del daño por ozono en hojas de *Betula pendula*, el almidón en las células de mesófilo desaparece y hay remantes de los granos desintegrados dentro de las células (Günthard-Goerg *et al.*, 1993).

Al estudiar el efecto de la exposición crónica de ozono en *Pinus ponderosa* se observó que existe retención de azúcares solubles y almidón en el ápice de las hojas. Este cambio foliar está asociado con una reducción de los azúcares solubles en el floema y en las raíces; así como con una reducción en los almidones pero solo en las raíces (Tingey *et al.*, 1976).

Pearce (1996) observó los efectos del ozono en altas concentraciones sobre la corteza de *Picea sitchensis* y encontró que el contenido de almidón en árboles jóvenes es reducido en árboles fumigados con ozono, comparados con los que crecieron bajo aire filtrado, aunque los valores son similares. La reducción de reservas de almidón en el xilema en árboles tratados con ozono puede ser una consecuencia de la reducción en fotosíntesis y distribución alterada de fotosintatos cuando existe ozono en el medio.

La plasmolisis celular en hojas de *Sequoiadendron giganteum* se incrementa con la edad; sin embargo, el efecto del ozono puede acentuar más este problema en células correspondientes al mesofilo. En la medida en que se eleva el tiempo de exposición o concentración de ozono sobre el follaje aumenta el porcentaje de células que exhiben plasmolisis y necrosis (Lance y Michel, 1991).

Günthard-Goerg *et al.* (1996) observaron un engrosamiento de las paredes del mesofilo en hojas de *Betula pendula* sujetas a tratamiento con ozono. Bussoti *et al.* (1998) también encontraron en las hojas de *B. pendula* que estas se adaptan al estrés ambiental por ozono. En términos de morfología, estas adaptaciones consisten primeramente de una reducción en la superficie de la hoja y un incremento en el grosor de la capa de mesofilo, especialmente en el parénquima en empalizada. Estas alteraciones son acompañadas por un incremento en la producción de compuestos fenólicos, identificados en este estudio en su mayoría como taninos.

Álvarez *et al.* (1998) localizaron daño en el parénquima en empalizada en hojas de *Abies religiosa* de árboles creciendo en los bosques que rodean la cuenca de México, aunque permanecen sin daño aparente la hipodermis, la epidermis y la cutícula. El daño

puede involucrar tanto la plasmolisis y la necrosis celular, como el aumento en el contenido de compuestos fenólicos en vacuolas completamente desintegradas. Las alteraciones generalizadas de los cloroplastos y la degradación de vacuolas en las células del parénquima en empalizada en los tejidos de hojas jóvenes de oyamel son síntomas de senescencia prematura y constituyen una evidencia característica de daño crónico por ozono (Álvarez *et al.*, 1998). Sin embargo, se desconoce que sucede con el tejido de las hojas de otras especies susceptibles como *Pinus hartwegii* que también habita en estos bosques.

Evidencias bioquímicas y moleculares indican que los mecanismos de defensa de la planta son inducidos por ozono (Kangasjärvi *et al.*, 1994). Kangasjärvi y colaboradores señalan que las reacciones de defensa que se observan en las plantas por ozono son similares a la reacción de las plantas inducidas por estrés biótico o abiótico. Por lo anterior, se podría suponer que si existe un efecto por los contaminantes aéreos en los bosques situados en las cercanías de la ciudad de México, este efecto será diferente a la variación por distribución geográfica tanto de *Abies religiosa* como de *Pinus hartwegii*.

La variación se puede presentar en varios niveles: geográfica, dentro de una localidad o en los individuos de una misma población. La variación geográfica representa las diferencias fenotípicas entre árboles nativos que crecen en localidades distintas del área de distribución de una especie, donde la cantidad de variación está determinada por la extensión del área de distribución de las especies y diversidad ambiental dentro de la misma; así como la presencia y extensión de barreras geográficas (Callaham, 1964). La variabilidad que presentan las especies con frecuencia corresponde a la existencia de

patrones de variación, la cual puede ser continua (clinal) o ecotípica. El primer caso, se presenta cuando las especies se distribuyen a lo largo de gradientes climáticos, permitiendo que el cambio de los genotipos sea gradual desde un extremo del gradiente hasta el otro. Por el contrario, la variación ecotípica se presenta cuando existen cambios marcados en el medio, ocasionando la distribución discontinua de los genotipos (Wright, 1976). Para Critchfield (1957) citado por Cervantes (1986), la variación individual se presenta entre los individuos de una localidad donde existen condiciones ambientales más o menos uniformes. La variación puede deberse a diferencias genéticas o micro ambientales como la textura, nutrimentos del suelo y competencia. La variación entre de individuos se presenta debido a diferencias en sus características, que guardan relación con la orientación o edad de los mismos.

HIPÓTESIS

Las diferentes condiciones de estrés ambiental (contaminantes aéreos) a las que están expuestas las poblaciones de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* podrían generar modificaciones en los caracteres anatómicos del follaje en ambas especies. Se espera encontrar un mayor número de caracteres anatómicos afectados en hojas provenientes de El Parque Desierto de los Leones, ya que está expuesto a una mayor concentración de contaminantes aéreos que las otras dos localidades; siendo la localidad de Michoacán la menos afectada por la contaminación.

OBJETIVOS

*Comparar los caracteres anatómicos foliares: epidermis, hipodermis, parénquima en empalizada, parénquima esponjoso, endodermis, tejido vascular y canales resiníferos en individuos de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* procedentes de tres poblaciones naturales sometidas a diferentes condiciones de estrés ambiental.

*Identificar las variaciones anatómicas que se presenten para los diferentes caracteres.

*Inferir los factores que podrían influir sobre la variación en los caracteres anatómicos estudiados.

MATERIAL Y METODOS

Los árboles seleccionados y la recolecta de las muestras de hojas elegidas al azar, se llevó a cabo en tres poblaciones tanto de *Abies religiosa* como de *Pinus hartwegii*, ubicadas en localidades pertenecientes a la Faja Volcánica Transmexicana y sometidas a distintos grados de exposición a la contaminación ambiental aérea.

Áreas de estudio

El Parque Desierto de los Leones se localiza al suroeste de la zona metropolitana de la ciudad de México, en la Sierra de las Cruces. Se sitúa entre los 19°19'00" y los 19°13'27" de latitud norte y los 99°20'00" y los 99°17'40" de longitud oeste (Fig. 1). De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1981), la fórmula climática reportada para la zona es C (e) (w₂) (w) que corresponde a un clima semifrío subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación media anual es de 1 265 mm y la temperatura media anual de 10.3°C. Es una zona fisiográficamente homogénea, con suelos andosoles profundos, órticos, húmicos, bien drenados, pH ácido, derivados de cenizas volcánicas. La vegetación es un bosque de coníferas (Rzedowski, 1978), donde los principales árboles que componen el bosque en esta región son *Abies religiosa*, *Pinus patula* y *Pinus hartwegii*.

La segunda localidad se ubica en la Reserva Especial de la Biosfera Mariposa Monarca en la Sierra El Campanario, Estado de Michoacán. Esta localidad presenta gran similitud con el área del Desierto de los Leones. Se localiza entre los 19°30' y 19°36' de latitud norte y los 100°10' y 100°15' de longitud oeste (Fig. 1). La zona presenta un clima semifrío y subhúmedo con lluvias en verano. La fórmula climática reportada para la zona corresponde

al C (e) (w₂) (w) (García, 1981). La precipitación media anual es de 1 228 mm y la temperatura media anual de 10.7°C. Fisiográficamente la zona es homogénea, con suelos andosoles, profundos, órticos, bien drenados, ácidos y derivados de cenizas volcánicas. Los principales árboles que componen este bosque de coníferas son *Abies religiosa*, *Pinus pseudostrubus* y varias especies de *Cupressus* (Rzedowski, 1978).

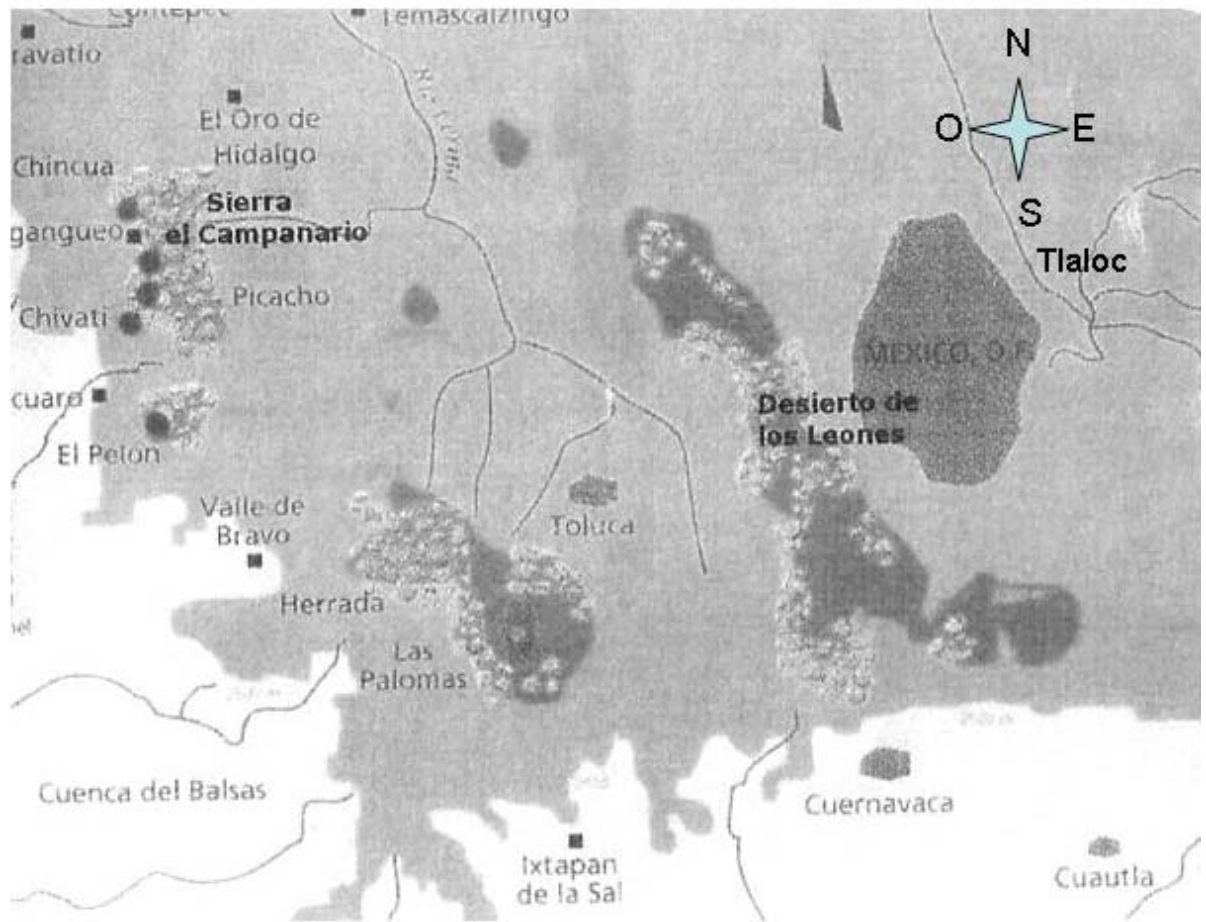


Figura 1. Localización del área de estudio

La tercera localidad se ubica en la región fisiográfica conocida como Sierra Nevada, al oriente del Estado de México y se extiende sobre el declive oeste del cerro Tlaloc entre los 19°23'43'' - 19° 28'37'' latitud norte y entre los 98°42'51'' - 98°48'12''

longitud oeste. Forma parte de la Sierra de Río Frío, en lo que corresponde a la región norte de la Sierra Nevada. Tiene una distribución altitudinal entre los 2 800 y 3 500 m. Los suelos presentes son profundos, moderadamente profundos y someros. Son suelos negros, con texturas medias y gruesas. Su grado de acidez es de moderado a ligero, con una variación promedio de 5.1 a 6.8. Los horizontes superficiales son francos o franco-arenosos, en tanto que el horizonte C con frecuencia se clasifica como migajoso-arenoso. El clima es templado-húmedo, con lluvias en verano, mayores a los 1 000 mm anuales y temperaturas extremas entre 3 y 22°C. La fórmula predominante para esta zona es C (e) (w₂) (w) (García, 1981).

Descripción de las especies

A continuación se presenta la descripción de las especies de acuerdo con: Eguluz (1978); Madrigal (1964, 1967, 1982); Manzanilla (1974); Martínez (1948,1963) Rzedowski *et al.* (1977) y Vázquez *et al.* (1962).

Abies religiosa. Es uno de los árboles mexicanos de más elegante porte, alcanza por lo general de 35 a 45 metros de altura, a veces hasta 50 ó 60 metros; con las ramas verticiladas y extendidas que se acortan gradualmente formando una copa piramidal o cónica. El tronco de *Abies religiosa* es erguido con crecimiento monopódico. Las hojas son alternas, dispuestas en espiral, lineares, rectas o algo falcadas, subdísticas, torcidas en la base; con el ápice por lo común agudo y córneo, rara vez obtuso y redondeado, tienen una hendidura longitudinal en la cara superior que se desvanece cerca del ápice, y una cresta saliente en la inferior, miden de 20 a 30 mm, rara vez hasta 35 mm, más comúnmente alrededor de 25 mm de largo por un milímetro de ancho. Las hojas tienen de una a cinco

hileras discontinuas de estomas en la cara superior hacia el ápice, cerca de la hendidura o en ella, y de 8 a 12 en la cara inferior a cada lado de la cresta, percibiéndose como hileras de puntos blancos. En condiciones naturales, la formación de conos en *Abies*, se da en diciembre y la polinización en marzo y abril del siguiente año. Los óvulos fecundados maduran hacia noviembre y en diciembre del mismo año se da la diseminación de las semillas. En general la reproducción se inicia a los 25 años, viéndose afectada por la densidad. Los conos femeninos de *Abies religiosa* se observan en la misma época que los masculinos, pero en las ramillas más altas, hacia la cima del árbol y comúnmente son inaccesibles. Los conos son erguidos, cilíndricos y oblongos, romos, rara vez cortamente oblongos, resinosos, casi sésiles o con pedúnculo de 5 a 9 mm; su color es violáceo y miden de 10 a 16 cm de largo por 4 ó 6 cm de ancho. Se presentan solitarios maduran en el mismo año, en los meses de agosto y septiembre. Constan de un eje leñoso, que se angosta hacia la porción distal, persistente en la ramilla, y sobre el cual están dispuestas las escamas, que se desprenden en la madurez. Escamas uniformes de 28 a 35 mm de ancho por 18 a 25 mm de largo, con el ápice redondeado y entero. Brácteas espatuladas, exertas, reflejadas, morenas de 29 mm de largo, rasgadas en su parte inferior. La semilla es angulosa, cuneada oblonga, aguda en la base, comprimida en la base, de unos 9 a 10 mm de largo, por unos cinco mm de ancho, lisa y de color castaño brillante.

Pinus hartwegii. Árbol de 15 a 30 metros de altura, a veces más, de corteza agrietada, color pardo rojizo; con ramas extendidas y colocadas irregularmente, ramillas muy ásperas, de color moreno y rojizo o algo grisáceas. Las hojas comúnmente se observan en grupos de tres, en otros casos se ven hasta 4 ó 5, miden de 8 a 16 cm de largo, son de color verde claro, medianamente gruesas, algo tiesas, carinadas; sin embargo, se

notan trianguladas cuando son cinco. Los bordes son aserrados y tienen estomas en las tres caras. Los canales resiníferos son medianos, en número de dos a 12, comúnmente alrededor de seis, rara vez uno o dos internos. Los conos son largamente ovoides, acuminados, ligeramente oblicuos y ocasionalmente encorvados; de 8 a 10 cm de largo, pero pueden variar de 7 hasta 14 cm, son de color rojizo muy oscuros, casi negros, persistentes, casi sésiles, pocas veces con pedúnculos de 10 mm; presentes normalmente en pares, pero a veces agrupados en número de 3, 4 y 5. Al caer el cono suele quedar el pedúnculo en la ramilla con algunas escamas. Los conos maduran en diciembre. Las semillas son negras, pequeñas de 5 a 7 mm; con un ala café oscuro de 15 mm de largo por 5 mm de ancho, con ganchos.

Recolecta de material

Para *Abies religiosa* se seleccionaron hojas de 1, 2 y 3 años de edad, ésta se determinó por la posición que tienen en las ramas de la parte basal de la copa de los árboles, en la parte apical de la rama se localizan hojas de un año y hacia la base continúan las de dos y tres años de edad, provenientes de cinco árboles por localidad. Para *Pinus hartwegii* también se tomó una muestra de cinco árboles por localidad recolectando solamente hojas de dos años de edad. Las fechas de recolecta cubrieron un año de crecimiento para ambas especies. Todas las muestras fueron recolectadas al azar y a una altitud entre 2 400 y 2 600 m s.n.m. Las hojas se fijaron en una solución buffer pH 7 y glutaraldeído al 2% (Ruzin, 1999) en campo y transportaron al laboratorio.

También se removieron hojas de ejemplares de *Abies religiosa* depositados en el herbario del Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, recolectados

en: Desierto de los Leones en 1968, Municipio de Texcoco rumbo al Tláloc en 1980, Cerro Telapón, estado de México en 1962 y Cerro Cruz Gorda, San Gregorio, Michoacán en 1979. El objetivo fue hacer la comparación entre las hojas actuales y las recolectadas en años pasados.

Trabajo de Laboratorio

Una parte de las muestras fijadas en campo se cambiaron a fijador fresco por 24 h. A continuación se procedió a lavar las muestras en buffer frío pH 7. La otra parte de las muestras fueron colocadas en alcohol al 50% para iniciar el proceso de aclarado de las hojas. Las hojas provenientes de herbario primero se colocaron en alcohol al 50% por dos días para rehidratar y después se siguió con el procedimiento descrito para las hojas frescas.

La infiltración e inclusión se realizó siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Gutman y Feucht (1991). Las muestras se cubrieron con soluciones de glicolmetacrilato y etanol absoluto (50:50; v:v); (70:30; v:v) y glicolmetacrilato (100%) dejándolas por una semana en cada concentración. Las muestras ya infiltradas se depositaron en moldes donde se les agregó una mezcla de glicolmetacrilato y peróxido de benzoilo (100:1; v:v) (Ruzin, 1999), reposándolas por dos días. El proceso de polimerización se llevó a cabo dentro de una estufa de calentamiento a 40°C por 48 h. Una vez solidificado el plástico, las muestras se colocaron sobre pequeños cubos de madera (2 cm) con ayuda de pegamento de contacto para posteriormente hacer cortes transversales y longitudinales en un micrótopo rotatorio, con un grosor de 7 µm. Los cortes se montaron en portaobjetos con agua destilada y secaron sobre una plancha a 42°C.

Tinción de cortes. Se hizo una tinción sobre los cortes con azul de toluidina (Ruzin, 1999) para observar y describir la tipología de los tejidos.

Aclarado de hojas. Se siguió una modificación del proceso descrito por Shobe y Lersten (1967) para poder observar estomas y conocer el número de estos por área. A continuación se detalla este procedimiento: las hojas completas se colocaron entre 5 y 7 días en alcohol al 70% hasta remover la clorofila, una vez eliminada la clorofila, se sumergieron en hidróxido de sodio al 5% por 20 días aproximadamente con calentamiento por 12 horas al día a 60°C en una estufa, cambiando la solución de hidróxido de sodio, cuando se tornaba color café, hasta que la hoja se aclaró. Enseguida se pusieron las hojas en una solución de hipoclorito de sodio (comercial al 5% acuoso) por 2 horas; se lavaron con agua destilada hasta eliminar todo el olor a cloro; se colocaron las hojas en alcohol al 70% por 24 h y después se transfirieron a alcohol al 96% por otras 24 h. Por 8 ó 10 días, las hojas permanecieron en una solución aclaradora de ácido láctico, fenol, aceite de clavo y xileno (4:2:2:1) y bencil-benzoato (Ruzin, 1999) hasta que se observaron transparentes. Posteriormente las hojas se lavaron en alcohol al 96% hasta eliminar la solución aclaradora. En este paso, se tiño con safranina alcohólica y lavó con alcohol al 96% para remover el exceso de colorante hasta tener el contraste deseado. La deshidratación concluyó con alcohol absoluto – xilol; finalmente las muestras se montaron sobre portaobjetos con resina sintética.

Histoquímica. Para detectar diferencias en los contenidos celulares se realizaron varias pruebas histoquímicas: lugol, para verificar la presencia de almidones; Ponceau 2R plus para detectar proteínas y negro de Sudán IV para ver cutína (Ruzin, 1999).

Observaciones y Mediciones. Para verificar si existía o no variación en algunos caracteres anatómicos de las hojas, se observaron y midieron los siguientes caracteres: grosor de cutícula, largo y ancho de las células epidérmicas y de la hipodermis. Se observaron los tejidos de parénquima en empalizada y esponjoso, así como el número de estratos celulares del mesofilo; se hizo una descripción de los haces vasculares, observando características de floema y xilema secundarios. Además se describieron las células de transfusión y los canales resiníferos.

Los caracteres se cuantificaron con un analizador de imágenes. Image-Pro Plus v. 3.0 (Media Cybernetics, 1997) adaptado a una cámara de video Hitachi KP-D51 y un microscopio Olympus BX-50.

Análisis estadístico

Se hicieron análisis de varianza para detectar diferencias significativas entre sitios y entre edades de los diferentes caracteres anatómicos de las hojas estudiadas como son: número de estomas por área, grosor de cutícula, tamaño de células de epidermis e hipodermis, porcentaje de floema colapsado y no colapsado; así como el número de cristales contenidos dentro de la hoja; seguido de un análisis de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS

Descripción Anatómica

Abies religiosa. Las hojas de *Abies religiosa* vistas en corte transversal son lineares con una hendidura en la parte media de la superficie adaxial y un borde en la superficie abaxial. (Fig. 2a). Las células de la epidermis en *Abies religiosa* son de forma elíptica (Fig. 2b), en general, de menor tamaño tanto en la hendidura de la hoja como en la región cercana a los canales resiníferos. La epidermis muestra estomas sólo en la superficie abaxial donde es fácil distinguir dos células oclusivas y dos células adjuntas subyacentes al poro estomático (Fig. 2c,d). Los estomas se presentan en filas longitudinales paralelas a los haces vasculares en vista superficial (Fig. 2c). En todas las muestras la epidermis se observa bien estructurada con células turgentes sin daño aparente.

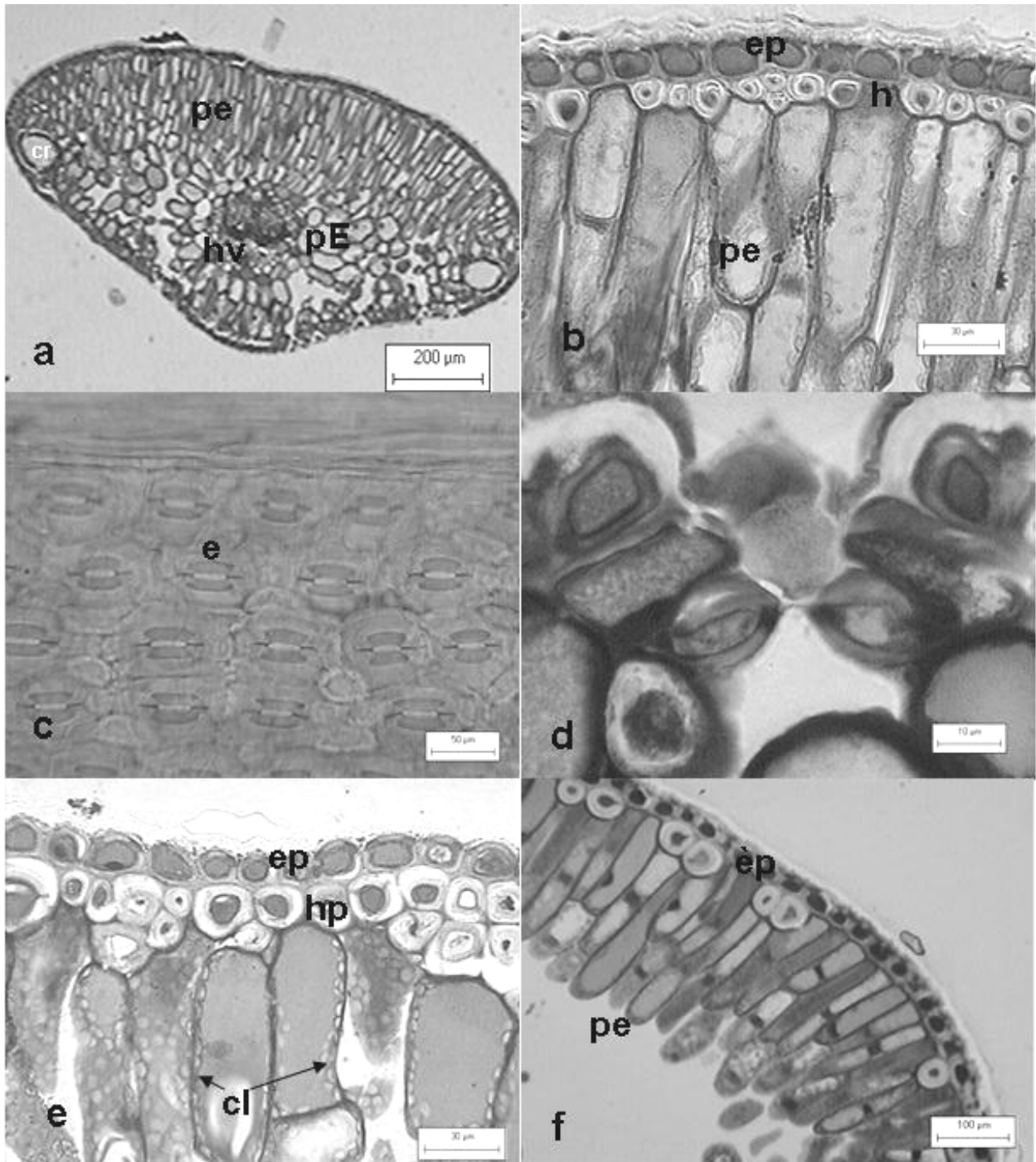


Figura 2. **a.** Corte transversal y diafanizado en hoja de *Abies religiosa*; **a** vista general. **b.** Epidermis, hoja de dos años del Desierto de los Leones. **c.** Vista superficial de estomas, hoja de un año de Mich. **d.** Detalle de estoma en corte transversal, hoja de tres años del Desierto de los Leones. **e.** Hipodermis continua, hoja de un año de Mich. **f.** Hipodermis discontinua, hoja de un año de Mich. pe = parénquima en empalizada, pE = parénquima esponjoso, hv = haces vasculares, ep = epidermis, hp = hipodermis, e = estomas, cl = cloroplastos.

La hipodermis está formada por un sólo estrato celular en la mayor parte de la periferia de las hojas (Fig. 2b); sin embargo, llegan a presentarse hasta dos estratos en puntos específicos principalmente en la hendidura y borde de las hojas, en el material proveniente de Michoacán y del Tláloc sin importar la edad o fecha de recolecta (Fig. 2e). En el caso del Desierto de los Leones, este hecho sólo se presenta en muestras recolectadas en el mes de agosto de un año de edad y de marzo de dos años. Las células de la hipodermis tienen paredes muy gruesas y bien definidas. La hipodermis se observa discontinua en la mayoría de las muestras del bosque del Desierto de los Leones (Fig. 2f) en comparación con los otros dos sitios de estudio, estando casi ausente en las hojas de uno y dos años de edad.

El mesofilo está diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso (Fig. 3a). El primero se encuentra tanto del lado adaxial de la superficie de la hoja (compuesto por dos estratos celulares) y en una muy pequeña proporción se encuentran algunas células de parénquima en empalizada por debajo de los haces vasculares (un sólo estrato celular) (Fig. 3a). El parénquima esponjoso se encuentra compuesto, en general, por dos estratos celulares del lado abaxial de la hoja aunque, algunas veces, en los extremos llegan a presentarse hasta cuatro estratos. En el mesofilo hay presencia de cloroplastos principalmente en la periferia de las células del parénquima en empalizada (Fig. 3b). Los cloroplastos son más abundantes en las muestras de la localidad de Michoacán (Fig. 3c) con respecto a las otras dos, especialmente en el parénquima en empalizada. También se observaron cristales dentro del mesofilo (Fig. 3d).

Se encuentran dos canales resiníferos hacia los extremos laterales de la hoja teniendo contacto con la hipodermis (Fig. 2a). Hacia el lumen del canal se observan las

células epiteliales (Fig. 3d), las cuales varían en número de ocho a 18 células por canal. La variación de las células epiteliales, sintetizada en el Cuadro 1, indica que no hay un patrón definido de su número ya sea por la edad, fecha de recolecta o sitio de procedencia. Las células de la vaina de los canales resiníferos en la mayoría de las muestras no se observaron, o estaban muy colapsadas.

Cuadro 1. Media del número de células epiteliales en canales resiníferos de *Abies religiosa*.

Localidad Edad-años	Desierto de los Leones	Tlálloc	Michoacán
1	14	12	12
2	13	12	12
3	13	9	10

La endodermis está compuesta por células de dos tamaños, las más grandes presentan un contenido que con las diferentes pruebas histoquímicas no reaccionaron, tienen paredes engrosadas; mientras que, las de menor tamaño tienen paredes más delgadas sin contenidos celulares evidentes (Fig. 4a). En la mayoría de las muestras el número de células grandes es menor al de las pequeñas. La endodermis de las hojas de *Abies religiosa* está menos definida conforme avanza su edad. El número de células que componen la endodermis fluctúa de 17 a 29.

Los haces vasculares en *Abies religiosa* son dos, arreglados en una sola nervadura, observándose el xilema con traqueidas y escaso parénquima radial del lado adaxial de la hoja y el floema del lado abaxial (Fig. 4b, c, d). La cantidad de floema colapsado difiere entre ambos haces. En algunas muestras el haz izquierdo tiene una mayor cantidad de floema colapsado que el derecho y en otras una disposición inversa. Sin embargo, esto

ocurre en la misma proporción y para las tres localidades sin importar la edad que tengan las hojas.

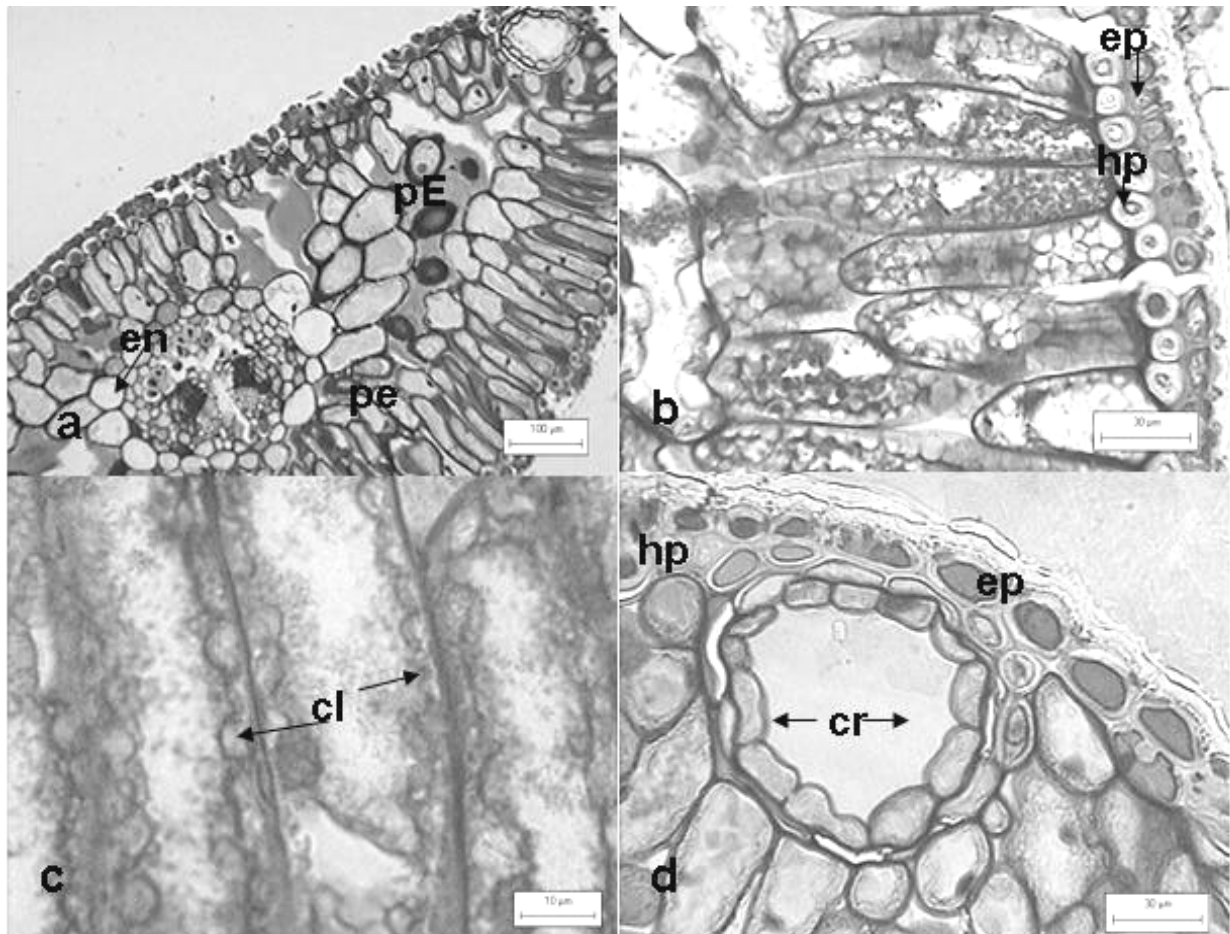


Figura 3. Mesofilo en *Abies religiosa*; **a.** Hoja de dos años del Desierto de los Leones). **b.** Parénquima en empalizada, hoja de un año del Tlaloc. **c.** Cloroplastos, hoja de dos años de Mich. **d.** Canal resinífero, hoja de dos años del Tlaloc. cr = canal resinífero, pe = parénquima en empalizada, en = endodermis, ep = epidermis, pE = parénquima esponjoso, hp = hipodermis, cl = cloroplastos.

Los haces vasculares están separados por esclereidas tanto colapsadas como turgentes (Fig. 4f) y, en algunos casos, por parénquima radial sobre todo en el xilema. Rodeando a los haces se encuentran esclereidas grandes con pared engrosada en la parte adaxial de los haces (por arriba del xilema) seguida de traqueidas y células de parénquima (Fig. 4a).

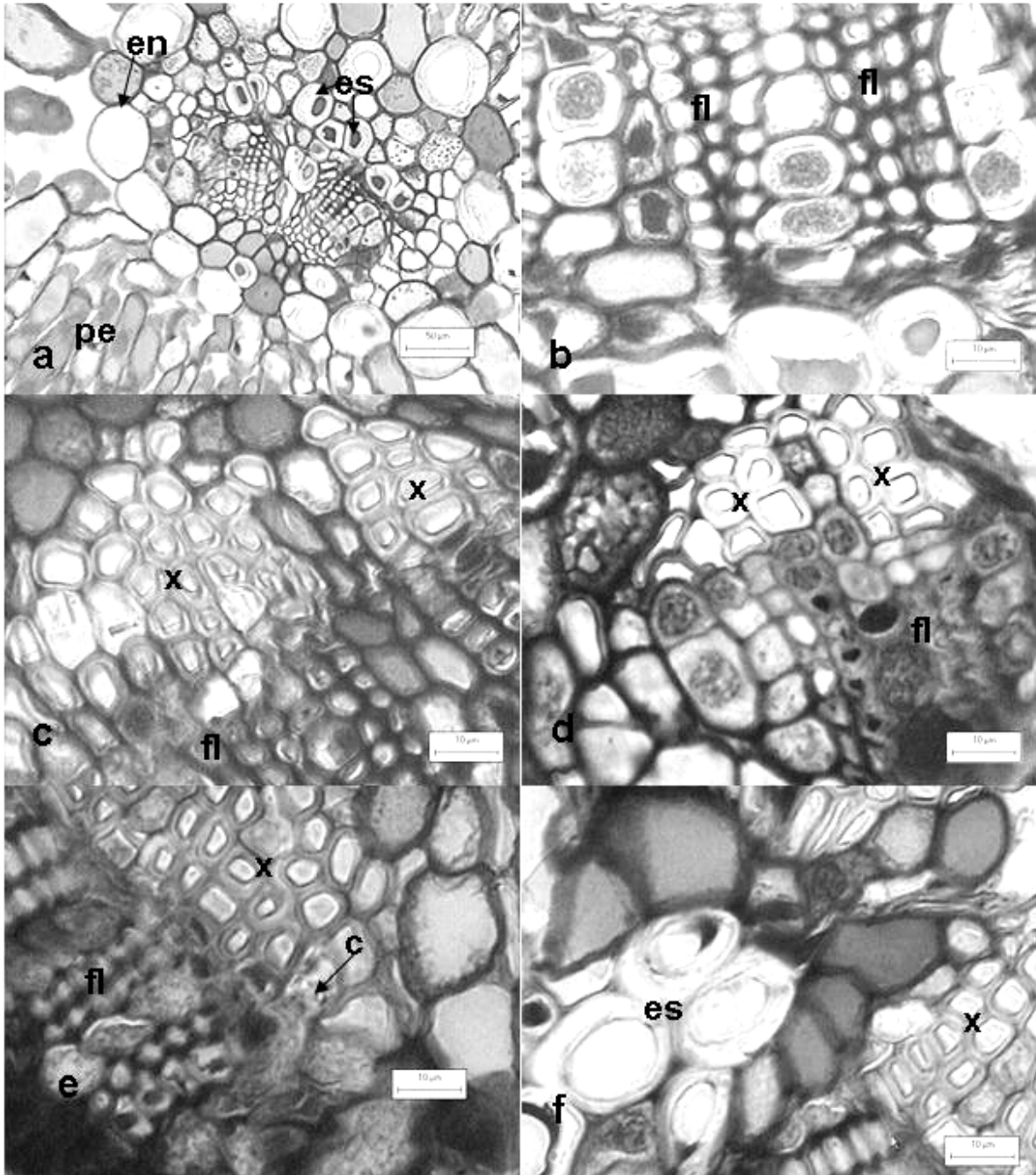


Figura 4. Tejido Vascular en hoja de *Abies religiosa*. **a.** Haces vasculares, hoja de un año del Tláloc. **b.** Floema, hoja de un año de Mich. **c.** Xilema, hoja de un año de Mich. **d.** Haces vasculares, hoja de dos años de Mich. **e.** Cristales en xilema, hoja de tres años de Mich. **f.** Esclereidas, hoja de tres años de Mich. en = endodermis, pe = parénquima en empalizada, es = esclereidas, fl = floema, x = xilema, c = cristales.

Pinus hartwegii. Las hojas de *Pinus hartwegii* vistas en corte transversal son triangulares, atravesadas en el centro por dos haces vasculares rodeados de tejido de transfusión (Fig. 5a). Las células de epidermis en *P. hartwegii* son de forma elíptica casi esférica en los ángulos de las hojas con paredes delgadas, en su mayoría (Fig. 5b), aunque algunas están levemente engrosadas, principalmente en las células de los extremos (Fig. 5b). Los estomas están presentes en las tres caras de la hoja, donde es fácil distinguir dos células oclusivas y dos células adjuntas subyacentes al poro estomático (Fig. 5c,d). Los estomas se presentan en filas longitudinales paralelas a los haces vasculares vistas en superficie (Fig. 5c).

En general, la hipodermis está compuesta por dos estratos celulares y, hasta tres o cuatro estratos en los extremos de las hojas (Fig. 5b,e,f); de éstos, los dos contiguos a la epidermis son continuos; sin embargo, el tercero y cuarto estratos se ven interrumpidos en varias zonas. En su mayoría, las células presentan paredes engrosadas siendo las células del estrato más interno las que presentan un mayor engrosamiento de su pared celular, observándose el lumen casi obliterado. El tamaño de las células aumenta del exterior hacia el interior de la hoja (Fig. 5e,f).

El mesofilo está compuesto por células de parénquima que en su pared presentan invaginaciones (Fig. 6a,c). En corte longitudinal las células pueden observarse dispuestas en capas horizontales separadas entre sí por espacios intercelulares. En la periferia de la pared celular es posible observar cloroplastos formando cadenas continuas. En el mesofilo se encuentran de cuatro a diez canales resiníferos, presentándose de manera general uno en cada extremo lateral y los otros varían en posición (Fig. 6c); ninguno de los canales se encuentra en contacto con la epidermis como sucede en *Abies religiosa*. Hacia el lumen del canal se observan las células epiteliales de forma esférica y las células de la vaina son elípticas, sin un patrón definido en su número (Fig. 6d).

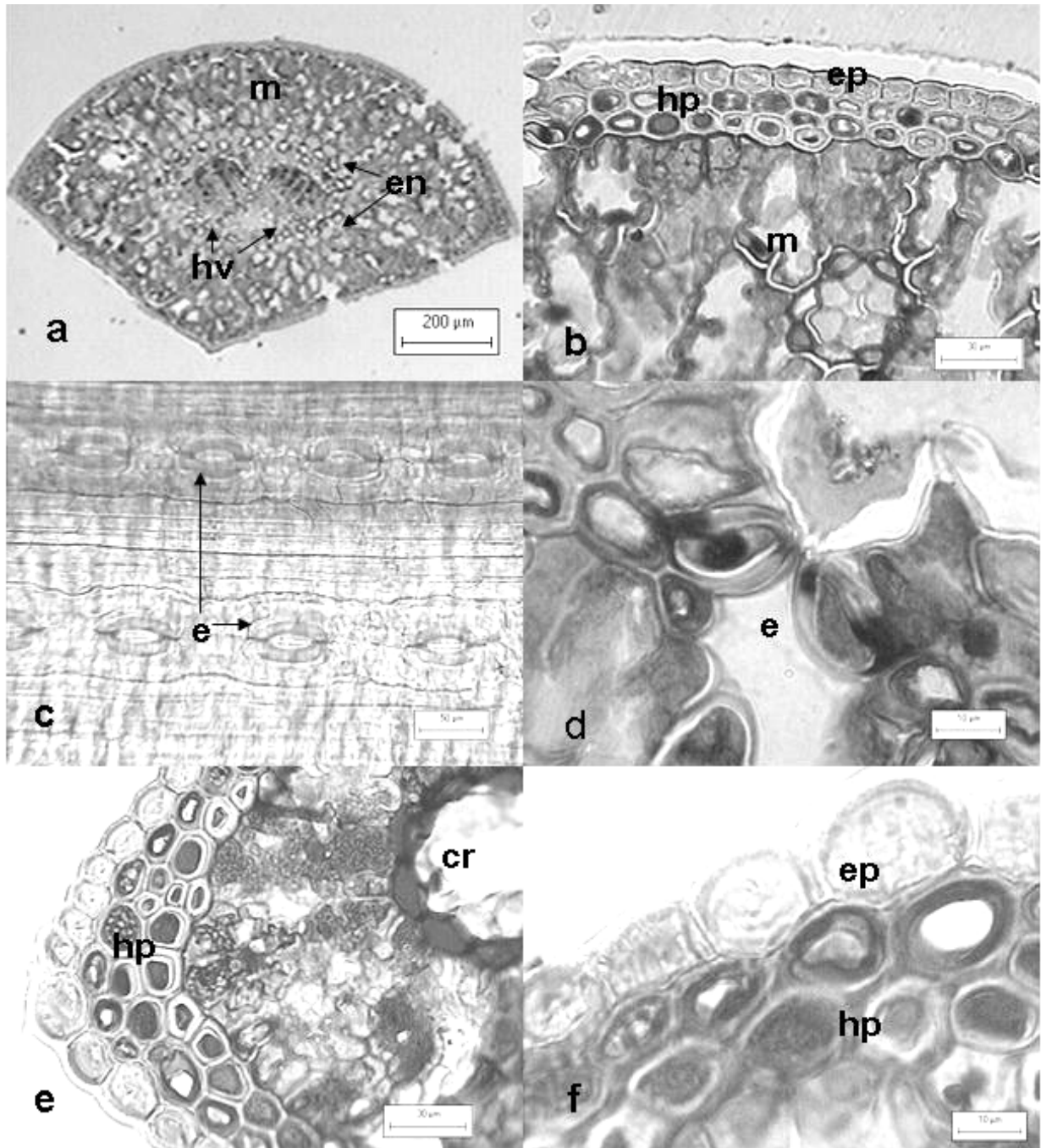


Figura 5. Cortes transversales y diafanizado de hojas de dos años de edad de *Pinus hartwegii*; **a.** Vista general, hoja Michoacán; **b.** Epidermis, Desierto de los Leones; **c.** Vista superficial de estomas, Michoacán; **d.** Detalle de estoma, Desierto de los Leones; **e.** Hipodermis en ángulo de la hoja, Desierto de los Leones; **e.** Detalle de hipodermis, Desierto de los Leones. m = mesofilo, en = endodermis, hv = haces vasculares, ep = epidermis, hp = hipodermis, e = estomas, cr = canales resiníferos.

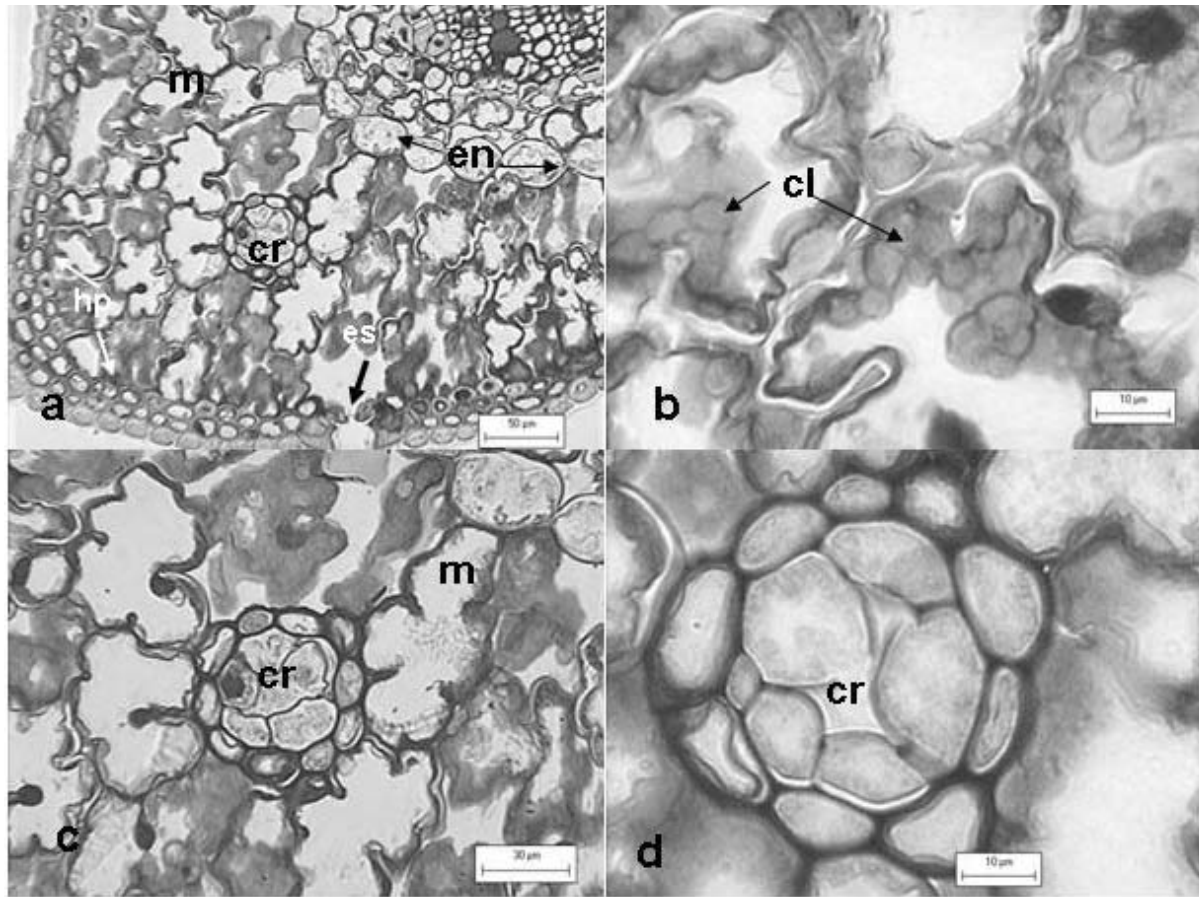


Figura 6. Detalle del mesofilo en hojas de dos años de *Pinus hartwegii* **a.** Parénquima esponjoso, Tláloc; **b.** Cloroplastos en células de mesófilo, Michoacán; **c.** Canal resinífero, Tláloc; **d.** Detalle de canal resinífero, Tláloc. m = mesofilo, en = endodermis, cr = canal resinífero, hp = hipodermis, cl = cloroplastos.

La endodermis se encuentra delimitando el tejido de transfusión que rodea a los haces vasculares; está bien definida y formada por células de forma elíptica las cuales fluctúan en número de 28 a 45, todas de un mismo tamaño y con paredes delgadas (Fig. 7a).

Los haces vasculares en *Pinus hartwegii* son dos, separados entre sí por esclerénquima y en algunos casos también por células de parénquima radial (Fig. 7a,f). El xilema se observa en la cara adaxial de la hoja y el floema en la abaxial. Las traqueidas del xilema se encuentran dispuestas en filas radiales que alternan con células de parénquima (Fig. 7b,c). Las células de

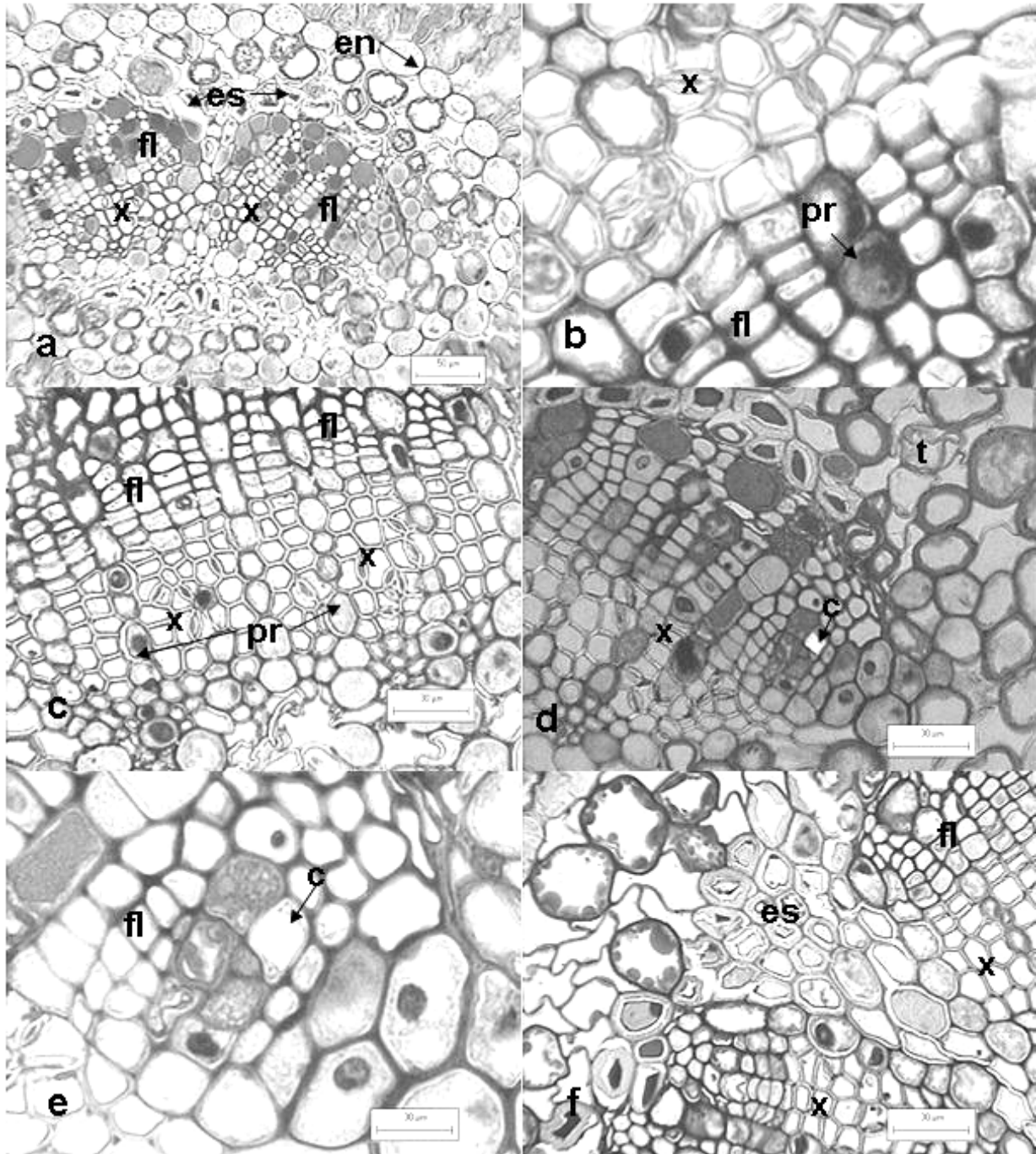


Figura 7. Tejido vascular en hojas de dos años de edad de *P. hartwegii* **a.** Vista general, Desierto de los Leones; **b.** Cámbium vascular, Tlálloc; **c.** Detalle de xilema, Tlálloc; **d.** Detalle de floema, Michoacán; **e.** Cristal en célula de floema, Michoacán; **f.** Esclereidas entre haces vasculares, Tlálloc. en = endodermis, es = esclereidas, fl = floema, t = tejido de transfusión, pr = parénquima radial, x = xilema, c = cristal.

floema también se encuentran alternando con parénquima radial floemático (Fig. 7d). En general, no se observa floema colapsado en corte transversal en ambos haces y en los casos donde es conspicuo, éste no excede el 5% del total. Las células de cámbium vascular también se distinguen sólo en las muestras de algunas fechas (Fig.7b). Se presentan cristales en células de xilema y parénquima radial de haces, en un número no mayor a dos (Fig. 7d,e).

Histoquímica

Proteínas en *Abies religiosa*

La tinción de Ponceau 2R aplicada sobre los cortes transversales y longitudinales de hojas de *Abies religiosa*, permitió diferenciar el contenido de proteínas en los tejidos de las mismas ya que éstas se tiñen de un color rojo a rosado debido a la concentración y contenido de proteínas en cada uno de los tejidos. La presencia de proteínas en los diferentes tejidos por sitio y fecha se sintetiza en el cuadro 2. La información obtenida refleja ciertas tendencias sobre la distribución y concentración de proteínas. Para ayudar a comprender lo que sucede dentro de la hoja, se generó una escala que indica que proporción de cada tejido reaccionó a la presencia de proteínas y ésta se representa por medio de símbolos (Cuadro 2).

No se detectaron diferencias en la distribución de proteínas en las hojas, para las tres localidades. La reacción para detectar proteínas fue más abundante en parénquima en empalizada y esponjoso. Para las tres edades todas las muestras presentaron proteínas en mesofilo, pero, no parece haber un patrón definido en su distribución dentro de las células de ambos tejidos relacionado con la edad. Se observaron proteínas en algunas células ocupando todo el lumen, en otras, sólo en la periferia de la pared celular y, en un tercer caso, únicamente en parte de la pared. En la endodermis se detectó tinción de proteínas en hojas de marzo y abril de diferente edad y de las tres localidades sólo en pared celular.

Cuadro 2. Proteínas en tejido foliar de *Abies religiosa* colectadas durante un año, provenientes de tres localidades y con uno, dos y tres años de edad.

Fecha	Tejido/Años	Desierto de los Leones			Tlálloc			Michoacán		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Marzo 2000	P.empalizada	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
	P.esponjoso	↑	•	•	••	••	••	•	•	↑
	Floema	—	+	+	+	↑	••	+	↑	↑
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—	•	—	—	—	—
	Endodermis	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Abril 2000	P.empalizada	•••	•••	•••				•••	•••	•••
	P.esponjoso	••	•••	••				•	••	••
	Floema	+	+	+				+	+	+
	Xilema	—	—	—				—	—	—
	Transfusión	—	—	—				—	+	—
	Endodermis	+	+	—				—	—	—
Agosto 2000	P.empalizada	••	•••	•••		••		•••	•••	•••
	P.esponjoso	••	•••	••		+		•	••	••
	Floema	↑	+	+		—		+	↑	+
	Xilema	—	—	—		—		—	—	—
	Transfusión	+	—	—		—		+	—	+
	Endodermis					—		—	—	—
Sept. 2000	P.empalizada	•••	+	•••	↑	•••	•••			
	P.esponjoso	••	+	••	—	+	+			
	Floema	—	—		—		•			
	Xilema	—	—	—	—	—	—			
	Transfusión	—	—	—	—	—	—			
	Endodermis	—	—	—	—	—	—			
Marzo 2001	P.empalizada	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
	P.esponjoso	•	•••	•••	••	••	•••	•	•••	•••
	Floema		—	□	•	□	•	•		•
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	+	↑	+	↑	—	+	+
	Endodermis	—	—	↑	+	+	•	—	—	—
Abril 2001	P.empalizada	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
	P.esponjoso	↑	••	+	••	•••	••	••	••	••
	Floema	+		+		+	+	+	•	•
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—	—	—	—	+	+
	Endodermis	—	—	—	—	—	+	+	—	+

ESCALA: - = proteínas ausente, + = ¼ de tejido con proteínas, ↑ = ⅓ de tejido con proteínas, • = ½ de tejido con proteínas, •• = ¾ de tejido con proteínas, ••• = totalmente con proteínas. P = parénquima, F = floema, X = xilema.

En el tejido de transfusión de la mayoría de las hojas provenientes del Tlálloc no se observó la presencia de proteínas a excepción de las colectadas en el mes de marzo; sin

embargo, éstas sólo se observaron en las paredes de las células. Para las otras dos localidades la presencia de proteínas en este tejido se observó, en hojas de diferente edad y fecha. En el tejido de transfusión se detectó en las hojas de un año de edad del mes de marzo y en hojas de tres años de de agosto y septiembre del Desierto de los Leones. En las muestras de Michoacán de agosto, marzo y abril de un año de edad, también se observaron proteínas en las paredes de las células del tejido de transfusión.

En haces vasculares se presentaron proteínas principalmente en el floema siendo más abundantes en los meses de marzo, abril y agosto para las tres localidades, sin existir un patrón de distribución definido.

Proteínas en hojas de herbario de *Abies religiosa*

El mesofilo de las hojas, a lo largo de uno a tres años, mostró la presencia de proteínas en las cuatro localidades de material proveniente de herbario (Cuadro 3). Sin embargo, en Cruz Gorda y en Telapón hubo una menor acumulación en relación con las otras localidades en hojas de un año de edad. En la endodermis no se detectó la presencia de proteínas para ninguna localidad. En el tejido de transfusión sólo se observaron proteínas en hojas de tres años del Desierto de Los Leones y de un año del Tlálóc únicamente en la $\frac{1}{4}$ parte de el tejido (Cuadro 3). También se presentó una reacción positiva a proteínas en floema de haces vasculares en hojas de uno y tres años del Desierto de los Leones y de Telapón, de uno y dos años en las de el Tlálóc y de dos años de Cruz Gorda.

Cuadro 3. Distribución de proteínas en tejidos foliar de *Abies religiosa* de cuatro localidades provenientes de muestras herborizadas.

	Localidad	Desierto de los Leones	Tláloc	Cruz Gorda, Michoacán	Telapón
Edad	Tejido/Año	1968	1980	1980	1962
Un año	P.empalizada	•••	•••	••	••
	P.esponjoso	•••	•••	+	
	Floema	+	+	—	+
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	—	+	—	—
	Endodermis	—	—	—	—
Dos años	P.empalizada	•••	•••	•••	•••
	P.esponjoso	•••	•••	•••	•••
	Floema	—	+	+	+
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—
	Endodermis	—	—	—	—
Tres años	P.empalizada	•••	•••	•••	•••
	P.esponjoso	•••	•••	•••	•••
	Floema	+	—	+	+
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	+	—	—	—
	Endodermis	—	—	—	—

ESCALA: - = proteínas ausente, + = ¼ de tejido con proteínas, 1̂ = ½ de tejido con proteínas, • = ½ de tejido con proteínas, •• = ¾ de tejido con proteínas, ••• = totalmente con proteínas. P = parénquima.

Granos de almidón en *Abies religiosa*

Al añadir a las cortes de hoja de *Abies religiosa* lugol, los granos de almidón se tiñeron de un color café oscuro a negro, lo que permitió diferenciarlos de los demás contenidos celulares presentes. La mayoría de las hojas de *Abies religiosa* para las tres localidades mostraron un mayor contenido de granos de almidón en los tejidos del parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso (Fig. 8a,b) durante marzo y abril para todas las edades (Cuadro 4), siendo más abundantes en las hojas recolectadas en Michoacán y, el caso inverso, en las muestras del Desierto de los Leones. Aunque todas las células del mesofilo presentaron almidón, es importante señalar que éste se concentra hacia los extremos de la hoja y por debajo de los haces vasculares ya que en las células de parénquima en empalizada del estrato subyacente a la hipodermis, sólo se

Cuadro 4. Contenido de almidón en tejido foliar de *Abies religiosa*. La escala usada es la misma que para proteínas, ver cuadro 2.

Fecha	Tejido/Años	Desierto de los Leones			Tlálloc			Michoacán		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Marzo 2000	P.empalizada	••	••	•	•••	••	•	•••	•••	•••
	P.esponjoso	••	••	•••	•••	••	•	•••	•••	•••
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—	+	—	—	+	—
	Transfusión	+	•	↑	+	—	—	•	•	•
	Endodermis	+	+	••	••	—	—	↑	•••	•••
Abril 2000	P.empalizada	+	↑	•••	•	—	•	•••	•••	••
	P.esponjoso	+	↑	•••	••	—	•••	••	•••	••
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	+	—
	Transfusión	↑	+	↑	—	—	+	+	↑	↑
	Endodermis	+	↑	••	—	—	—	↑	•••	•••
Agosto 2000	P.empalizada	—	—	—	—	—	••	—	—	—
	P.esponjoso	—	—	—	—	—	••	—	+	+
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	+	—	—	+	—	+	+
	Endodermis	—	—	+	—	—	—	—	—	↑
Sept. 2000	P.empalizada	—	—	—	—	—	—	—	•	•••
	P.esponjoso	—	—	—	—	—	—	—	↑	•••
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—	+	+	+	↑	+
	Endodermis	—	—	—	—	—	•	—	—	+
Marzo 2001	P.empalizada	•••	•••	•••	—	—	—	•	•	••
	P.esponjoso	•	•••	•••	+	—	—	•••	••	•••
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	+	+	—	—	—	—	—	—
	Transfusión	+	+	↑	+	—	—	↑	+	↑
	Endodermis	•	•••	•••	—	—	—	↑	—	—
Abril 2001	P.empalizada	•	+	—	+	+	•••	•••	—	•••
	P.esponjoso	↑	—	—	↑	••	•••	•••	—	•••
	Floema	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	Transfusión	—	↑	•	•	↑	↑	↑	↑	↑
	Endodermis	—	—	—	—	—	•••	•	•••	—

ESCALA: - =almidón ausente, + = ¼ de tejido con almidón, ↑ = ⅓ de tejido con almidón, • = ½ de tejido con almidón, •• = ¾ de tejido con almidón y ••• = totalmente con almidón.

observaron en la periferia de las células. Las células de los extremos estaban saturadas de granos de almidón hecho que también se presentó en las células del parénquima esponjoso.

Los meses de agosto y septiembre presentaron la menor acumulación de almidón, estando ausente en la localidad del Desierto de los Leones para el mes de septiembre. Mientras que, en el Tláloc sólo se presentó en el tejido de transfusión pero poco abundante. La presencia de almidón en los haces vasculares fue casi nula en las diferentes fechas de

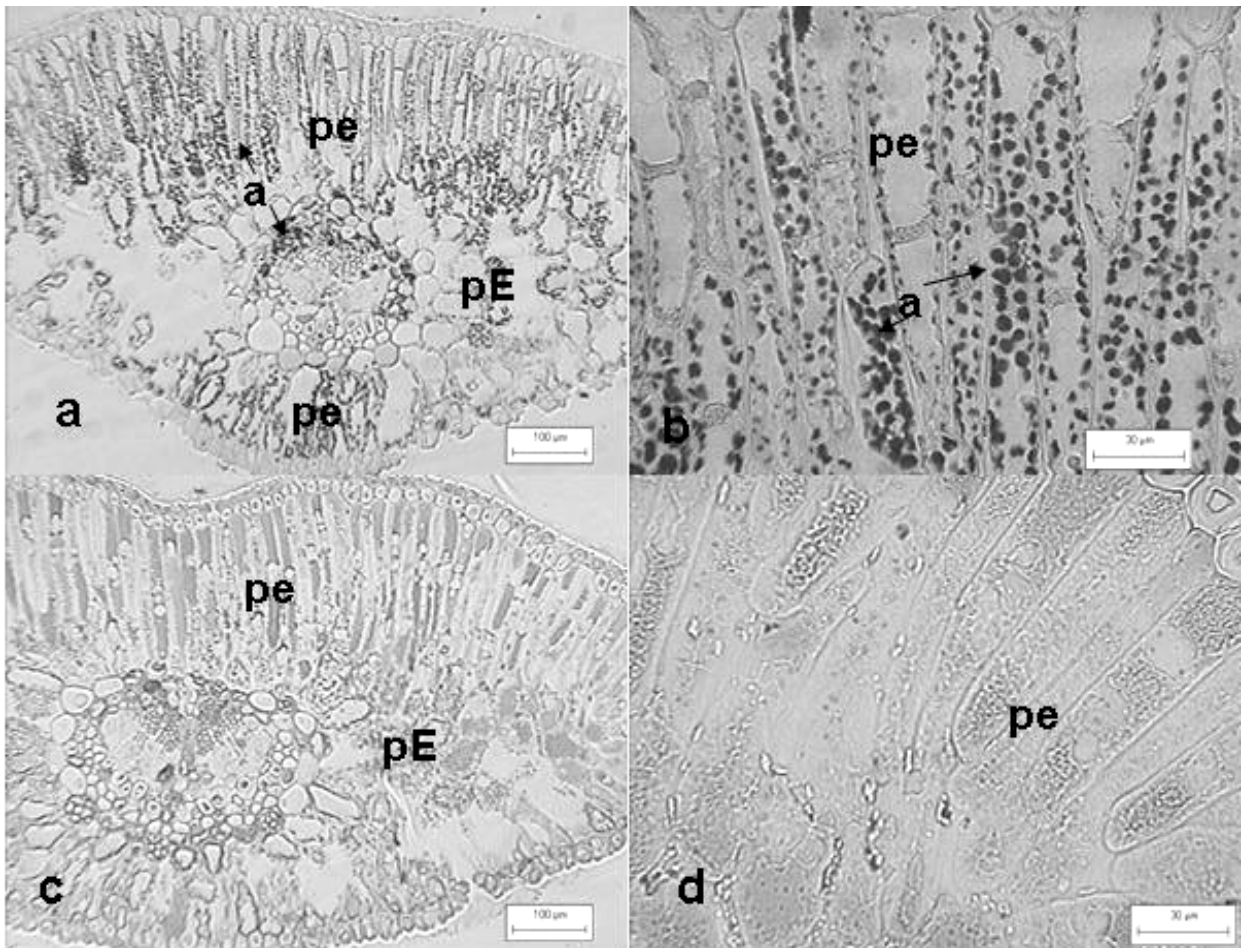


Figura 8. Cortes transversales de hoja de *Abies religiosa* con granos de almidón. **a.** Vista general, hoja de un año del Desierto de los Leones. **b.** Parénquima en empalizada con granos de almidón, hoja de un año del Desierto de los Leones. **c.** Hoja de tres años sin almidón, Tláloc. **d.** Parénquima en empalizada sin almidón, hoja de un año del Tláloc. a = almidón, pe = parénquima en empalizada, pE = parénquima esponjoso.

recolecta en el Desierto, excepto para las muestras del segundo mes de marzo donde en hojas de uno y dos años de edad se observaron pequeños granos de almidón sólo en parénquima del

xilema. En los meses de septiembre y marzo de 2001 para hojas de tres años de edad procedentes de el Tláloc no se observó almidón (Fig. 8c,d).

Granos de almidón en hojas de herbario de *Abies religiosa*

En hojas del Desierto de los Leones provenientes de herbario se observó la presencia de granos de almidón en mesofilo de hojas de uno y tres años de edad (Cuadro 5); así como en tejido de transfusión y endodermis de hojas de todas las edades; mientras que, en las muestras de Cruz Gorda de uno y tres años se observaron en parénquima esponjoso y endodermis, también en hojas de tres años se detectaron los granos de almidón en parénquima empalizada (Cuadro 5). En hojas del Tláloc y Telapón no se observaron granos de almidón en ningún tejido.

Cuadro 5. Acumulación de granos de almidón en tejido foliar de *Abies religiosa* provenientes de muestras herborizadas.

Edad	Localidad	Desierto de los Leones	Tláloc	Cruz Gorda, Michoacán	Telapón
	Tejido/Año	1968	1980	1980	1962
Un año	P.empalizada	—	—	—	—
	P.esponjoso	—	—	+	—
	Floema	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	•	—	—	—
	Endodermis	••	—	•	—
Dos años	P.empalizada	••	—	—	—
	P.esponjoso	••	—	—	—
	Floema	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—
	Endodermis	••	—	••	—
Tres años	P.empalizada	••	—	•	—
	P.esponjoso	••	—	•	—
	Floema	—	—	—	—
	Xilema	—	—	—	—
	Transfusión	—	—	—	—
	Endodermis	••	—	•	—

ESCALA: - =almidón ausente, + = ¼ de tejido con almidón, 1̂ = ½ de tejido con almidón, • = ½ de tejido con almidón, •• = ¾ de tejido con almidón y ••• = totalmente con almidón.

Proteínas en hojas de *Pinus hartwegii*

La reacción a proteínas fue positiva en hojas de *Pinus hartwegii*, detectándose mayor cantidad de proteínas en parénquima esponjoso en las muestras de las tres localidades correspondientes a los meses de febrero, marzo y abril a excepción del Tlálloc donde en el mes de marzo se observó una menor concentración de proteínas. Las células de endodermis de hojas provenientes del Desierto de los Leones recolectadas en los meses de marzo y abril (2001) presentaron proteínas en todas ellas; caso contrario al resto de las localidades, donde no se detectó presencia de proteínas (Cuadro 6). Con relación al tejido de transfusión se observaron proteínas en todas las hojas del Desierto; sin embargo, en las hojas provenientes del Tlálloc del mes de marzo y de Michoacán del mes de diciembre no se registró una reacción positiva.

En los haces vasculares la presencia de proteínas en el floema se observó en todas las muestras del Desierto de los Leones; para el Tlálloc, sólo en las del mes de marzo estuvieron ausentes; así como para las del mes de diciembre de Michoacán. Es notorio que la concentración de proteínas en las muestras de todas las localidades fue muy similar dentro de este tejido (Cuadro 6).

Cuadro 6. Proteínas en los tipos celulares de hojas de *Pinus hartwegii* a lo largo del año.

Localidad/Fecha	Tejidos				
	Esponjoso	Floema	Xilema	Tranfusión	Endodermis
Desierto de los Leones					
Febrero 01	•••	—	—	+	—
Marzo 01		+	—	↑	•••
Abril 01	•••	↑	—	↑	•••
Febrero 02	•••	+	—	↑	—
Marzo 02	•••	+	—	+	—
Tlálloc					
Febrero 01	•••	+	—	+	—
Marzo 01	+	—	—	—	—
Abril 01	•••	+	—	+	—
Febrero 02	•••	+	—	+	—
Marzo 02		+	—	+	—
Michoacán					
Febrero 01	•••	↑	—	↑	—
Marzo 01	•••	+	—	↑	—
Abril 01	•••	↑	—	+	—
Diciembre 01	•••	—	—	—	+
Enero 02	•••	+	—	+	—

ESCALA: - =proteínas ausente, + = ¼ de tejido con proteínas, ↑ = ⅓ de tejido con proteínas, • = ½ de tejido con proteínas, •• = ¾ de tejido con proteínas y ••• = totalmente con proteínas.

Granos de almidón en *Pinus hartwegii*

Las hojas de *Pinus hartwegii* mostraron mayor contenido de granos de almidón en células de endodermis en los meses de marzo y abril para el Desierto de los Leones, para el Tlálloc sólo en marzo y para Michoacán en abril y enero (Cuadro 7). Sin embargo, en hojas del Desierto de los Leones también se observaron granos almidón en tejido de transfusión aunque en una menor cantidad exclusivamente en las muestras de febrero y abril. En las hojas del Tlálloc y Michoacán no se observaron (Cuadro 7).

Cuadro 7. Distribución de almidón en hojas de *Pinus hartwegii*. Todas las hojas son de dos años de edad.

Localidad/Fecha	Tejidos				
	Espojoso	Floema	Xilema	Tranfusión	Endodermis
Desierto de los Leones					
Febrero 01	—	—	—	+	•••
Marzo 01	—	—	—	••	•••
Abril 01	—	—	—	+	•
Febrero 02	—	—	—	+	••
Marzo 02	—	—	—	—	•••
Tlálac					
Febrero 01	—	—	—	—	—
Marzo 01	—	—	—	—	•••
Abril 01	—	—	—	—	—
Febrero 02	—	—	—	—	—
Marzo 02	—	—	—	—	—
Michoacán					
Febrero 01	—	—	—	—	•
Marzo 01	—	—	—	—	+
Abril 01	—	—	—	—	•••
Diciembre 01	—	—	—	í	—
Enero 02	—	—	—	••	•••

ESCALA - =almidón ausente, + = ¼ de tejido con almidón, í = ⅓ de tejido con almidón, • = ½ de tejido con almidón, •• = ¾ de tejido con almidón y ••• = totalmente con almidón.

Comparación entre localidades

Las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes caracteres anatómicos analizados en hojas de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* se evaluaron a través de un análisis de varianza. Los análisis revelaron que si hay diferencias entre localidades para número de estomas, grosor de cutícula, ancho y largo de las células epidérmicas, largo y ancho de la célula hipodérmica y número de cristales (Cuadro 8). El análisis de comparación de medias mostró diferencias entre el Desierto de los Leones y las otras dos localidades para el grosor de la cutícula, ancho de la célula epidérmica así como el ancho y largo de la célula hipodérmica. Sin embargo, el número de estomas solo es diferente con los individuos de la localidad del Tláloc.

Cuadro 8 .Valores de media y desviación estándar para ocho caracteres anatómicos en hoja de *Abies religiosa*. Letras diferentes indican diferencias significativas (P< 0.05).

Población	Estomas (No/mm ²)	Floema colapsado (%)	Grosor de cutícula (μm)	Largo de célula epidermis (μm)	Ancho de célula epidermis (μm)	Largo de célula hipodermis (μm)	Ancho de célula hipodermis (μm)	Cristales (No/mm ²)
Desierto de los Leones	24±5.7 ^a	32±19 ^a	10.1±2.6 ^a	20.0±4.6 ^b	17.7±3.3 ^b	17.2±4.1 ^a	19.1±4.2 ^a	60±3 ^a
Tláloc	21±4.3 ^b	32±18 ^a	10.7±2.3 ^b	20.8±4.5 ^a	18.5±3.5 ^a	19.9±4.3 ^b	19.9±4.1 ^{ab}	31± 4 ^b
Cruz Gorda	23±5.3 ^a	34±17 ^a	10.9±2.5 ^b	19.5±4.3 ^a	18.3±3.4 ^a	18.8±4.6 ^c	19.7±4.4 ^{ab}	63±7 ^b
ANOVA								
gl	2	2	2	2	2	2	2	2
F	12.04	0.98	28.07	9.39	6.88	42.55	3.47	13.24
P > F	<0.0001	0.376	<0.0001	<0.0001	0.001	<0.0001	0.031	<0.0001
N	15	15	15	15	15	15	15	15

El análisis de varianza también mostró diferencias estadísticamente significativas para ocho caracteres entre edades y entre localidades (Cuadro 9). Hay una tendencia clara a

tener un menor porcentaje de floema colapsado en las hojas de un año de edad y un mayor porcentaje en hojas de tres años en las tres localidades.

El número de estomas es mayor sin importar la edad en la localidad del Desierto de los Leones con respecto a la localidad del Tlálloc, y no hay diferencias en el número de estomas entre años. Hay variabilidad en su número en la localidad de Michoacán (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de medias y desviación estándar para ocho caracteres anatómicos de hoja de *Abies religiosa*, (unidades igual a las del cuadro 8). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Comparación entre edades.

Localidad	Edad	Floema colapsado	No. de estomas	Grosor cutícula	Largo célula epidérmica	Ancho célula epidérmica	Largo célula hipodérmica	Ancho célula hipodérmica	Cristales
Desierto de los Leones	1	17±11 ^c	23±5 ^a	10.8±2.4 ^b	20.5±4. ^a	17.0±2.9 ^a	18.4±4.0 ^a	19.7±3.8 ^a	55±5 ^a
	2	31±11 ^{bc}	24±5 ^a	9.9±2.4 ^b	20.9±4.5 ^a	18.4±3.6 ^b	17.3±3.7 ^a	19.2±4.1 ^a	58±5 ^a
	3	44±22 ^a	24±8 ^a	10.2±2.8 ^b	18.8±4.7 ^b	17.8±3.3 ^a	15.9±4.3 ^b	18.5±4.6 ^a	65±7 ^a
Tlálloc	1	24±14 ^{bc}	20±4 ^b	10.3±2.2 ^{bc}	20.4±4.0 ^a	17.9±2.7 ^a	20.9±4.6 ^a	20.8±4.2 ^a	41±8 ^a
	2	29±18 ^{bd}	21±3 ^b	10.9±2.7 ^a	22.0±5.1 ^c	19.0±3.4 ^b	20.7±3.8 ^a	19.6±4.2 ^a	20±3 ^b
	3	42±17 ^c	20±6 ^b	11.1±2.0 ^a	19.4±3.6 ^a	18.5±4.2 ^a	17.9±3.7 ^b	19.1±3.6 ^a	30±4 ^c
Cruz Gorda	1	20±6 ^{cd}	23±3 ^a	10.3±1.9 ^{bc}	18.9±4.1 ^b	17.5±2.8 ^a	18.4±3.4 ^a	19.2±3.8 ^a	41±8 ^a
	2	43±16 ^a	25±5 ^a	11.4±2.8 ^a	20.8±4.7 ^a	18.6±4.0 ^b	19.8±6.2 ^a	20.7±5.5 ^b	71±8 ^a
	3	45±9 ^a	19±5 ^c	11.0±2.5 ^a	18.5±3.5 ^b	18.9±3.3 ^c	18.3±3.3 ^a	19.1±3.3 ^a	78±5 ^c
ANOVA									
gl		8	8	8	8	8	8	8	8
F		17.33	6.95	13.02	11.65	6.7	20.92	4.89	5.18
P > F		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

El grosor de la cutícula aumenta con la edad en las localidades de Tlálloc y Cruz Gorda; sin embargo, no hay diferencias significativas con el Desierto de los Leones. A pesar de que existen diferencias entre años para el ancho de la célula epidérmica y de la hipodermis no. Se registró una tendencia clara a tener un menor tamaño en un año y al siguiente aumentar, aunque las células de un año tienden a ser más grandes que aquellas de dos y tres años para el Desierto de los Leones y Tlálloc (Cuadro 9). Notoriamente hay un

incremento con la edad en el número cristales para El Desierto de los Leones y Michoacán; no así para Tlálloc, donde la mayor acumulación se presentó en las hojas de un año.

Cuadro 10. Valores de medias y desviación estándar de siete caracteres anatómicos en hoja de *Abies religiosa* procedentes de herbario (unidades similares a las del cuadro 8). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) Comparación entre poblaciones.

Población	Estomas (No/mm ²)	Grosor de cutícula (μm)	Largo de célula epidermis (μm)	Ancho de célula epidermis (μm)	Largo de célula hipodermis (μm)	Ancho de célula hipodermis (μm)	Cristales (No/mm ²)
Desierto de los Leones 1968	21±3 ^a	8.3±1.3 ^c	17.7±2.6 ^b	19.1±2.8 ^c	14.1±4.1 ^c	15.2±5.1 ^c	48±3 ^{bc}
Tlálloc 1980	21±2 ^a	9.2±1.3 ^b	18.3±3.1 ^b	20.7±3.5 ^b	19.5±3.8 ^a	20.6±4.4 ^{ab}	49±4 ^{bc}
Cruz Gorda 1968	21±2 ^a	9.2±1.8 ^b	17.4±2.8 ^b	21.5±3.1 ^{ab}	17.6±3.7 ^b	19.4±3.8 ^b	73±3 ^{ac}
Telapón 1962	20±2 ^a	9.9±1.7 ^a	20.2±2.3 ^a	22.4±3.9 ^a	19.8±3.4 ^a	21.1±3.4 ^a	10±2 ^a
ANOVA							
gl	3	3	3	3	3	3	3
F	0.74	26.71	18.37	15.82	42.91	33.92	8.91
P > F	0.532	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
N	106	600	360	360	360	360	120

El análisis de varianza entre hojas de las cuatro localidades procedentes de herbario, detectó diferencias estadísticamente significativas para siete de los ocho caracteres (Cuadro 10). El grosor de la cutícula y el tamaño de las células epidérmicas y de la hipodermis fueron mayores en el material de la localidad del Telapón que en Cruz Gorda y el Desierto de los Leones. Sin embargo, un patrón diferente se detectó para el número de cristales, siendo en Telapón menos abundante, más de cuatro veces (Cuadro 10) con respecto al resto de las localidades, registrándose un mayor número cristales en el material de la localidad de Michoacán.

Cuadro 11. Valores de medias y desviación estándar de siete caracteres anatómicos en hoja de *Abies religiosa* procedentes de herbario. Letras diferentes indican diferencias significativas (P< 0.05) Comparación entre edades.

Carácter		No. de estomas	Grosor de cutícula	Largo de células en epidermis	Ancho de células en epidermis	Largo de células en hipodermis	Ancho de células en hipodermis	No. de cristales
Localidad	Edad							
Desierto de los Leones 1968	1	19±2 ^b	8.0±0.93 ^d	17.6±2.1 ^A	19.2±2.8 ^a	15.0±1.8 ^a	17.0±3.3 ^a	37±8 ^a
	2	19±2 ^b	7.9±1.12 ^d	19.3±2.2 ^A	20±2.0 ^a	9.1±1.6 ^b	9.5±1.8 ^b	43±7 ^a
	3	24±2 ^a	8.9±1.6 ^d	16.1±2.5 ^A	17.9±2.2 ^b	18.1±1.6 ^a	19.0±3.6 ^c	61±4 ^a
Tlálloc 1980	1	22±1 ^{ab}	9.1±1.3 ^b	18.8±2.8 ^A	21.5±3.4 ^a	17.1±3.3 ^a	17.1±4.16 ^a	24±6 ^a
	2	20±2 ^b	9.1±1.5 ^b	17.6±3.6 ^A	20.4±3.6 ^a	20.7±3.4 ^b	23.0±2.9 ^b	39±4 ^a
	3	21±1 ^b	9.4±1.2 ^b	18.4±2.7 ^A	20.0±3.4 ^a	20.7±3.5 ^b	21.7±3.7 ^b	75±6 ^a
Cruz Gorda 1980	1	sin datos	8.0±1.2 ^d	16.8±2.8 ^A	20.7±3.1 ^a	17.1±4.6 ^a	19.0±4.7 ^a	68±4 ^a
	2	22±1 ^{ab}	9.4±1.8 ^b	17.6±3.6 ^A	20.2±2.5 ^a	17.2±2.7 ^a	18.8±3.4 ^a	69±6 ^a
	3	20±2 ^b	10.2±1.6 ^b	17.6±1.7 ^A	23.5±2.7 ^a	18.4±3.4 ^a	20.3±2.9 ^a	79±5 ^a
Telapón 1962	1	19±2 ^b	10.3±1.7 ^b	20.9±2.1 ^a	21.6±2.7 ^a	19.1±3.3 ^a	21.4±4.1 ^a	102±6 ^b
	2	21±2 ^b	9.9±1.7 ^b	20.2±2.6 ^a	23.7±3.3 ^a	20.0±3.9 ^a	19.3±3.0 ^a	120±53 ^b
3	20±2 ^b	9.6±1.8 ^b	19.4±1.9 ^a	21.8±5.0 ^a	20.1±2.8 ^a	22.6±4.4 ^a	68±51 ^a	
ANOVA								
gl		11	11	11	11	11	11	11
F		6	15.10	8.22	7.84	30.8	29.49	4.73
P > F		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

El análisis de varianza en hojas de *Abies religiosa* procedentes de herbario mostró diferencias estadísticamente significativas para siete de los ocho caracteres analizados entre edades y entre localidades (Cuadro 11). Existe la tendencia a tener un mayor número de cristales en las hojas provenientes de Cruz Gorda y el Tlálloc con respecto a las otras dos localidades. El número de estomas en las cuatro localidades parece homogéneo con excepción de las hojas de tres años provenientes del Desierto de los Leones, donde hay un número más alto que en las otras.

El grosor de la cutícula en las localidades del Desierto de los Leones, Tláloc y Cruz Gorda aumenta con la edad; sin embargo, para la localidad de Telapón sucede lo contrario. El tamaño de las células epidérmicas y de hipodermis fue muy variable entre edades y entre poblaciones (Cuadro 11). Se observó una clara tendencia a tener un mayor número de cristales a mayor edad en las localidades del Desierto de los Leones, Tláloc y Cruz Gorda; no obstante, en la localidad de Telapón las hojas que tuvieron un mayor número de cristales fueron las de dos años de edad.

Para las hojas de *Pinus hartwegii* el análisis de varianza solamente detectó diferencias estadísticamente significativas para tres de las cinco variables analizadas (Cuadro 12). A pesar de que la cutícula tiene menor grosor en las hojas procedentes del Tláloc, el análisis no detectó diferencias significativas. Las células epidérmicas fueron más pequeñas (en el largo) en las hojas del Desierto de los Leones, siendo estadísticamente diferentes (Cuadro 12).

Cuadro 12. Valores de medias y desviación estándar para tres caracteres anatómicos en hoja de *Pinus hartwegii*. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Carácter	Cutícula	Epidermis		Hipodermis	
		largo	ancho	largo	ancho
Localidad					
Desierto de Los Leones	7.2±2.7 ^a	14.1±2.7 ^{ab}	14.0±3.0 ^a	14.0±3.0 ^a	17.6±3.0 ^a
Michoacán	7.3±2.2 ^a	13.3±1.7 ^b	15.2±3.0 ^a	16.4±1.2 ^b	16.7±3.1 ^a
Tláloc	6.7±4.2 ^a	14.6±3.1 ^a	16.7±4.0 ^b	14.5±2.4 ^a	17.0±3.3 ^a
Anova					
GL	2	2	2	2	2
F (calculada)	0.89	4.66	14.63	3.97	1.03
P > F	0.4114	< 0.0101	< 0.0001	0.0201	0.3600
N	475	327	327	247	247

DISCUSIÓN

La cutícula en hojas de *Abies religiosa* expuesta a una mayor concentración de ozono en el Desierto de los Leones mostró diferencias significativas con Tláloc y Michoacán. El Desierto presentó un menor grosor de cutícula que las otras dos localidades. Este resultado parece contrario a lo encontrado en *Picea rubens* por Percy *et al.* (1992) en hojas expuestas a diferentes concentraciones de ozono. Al comparar el grosor de cutícula del material proveniente de herbario con el recolectado actualmente, se observó un aumento en el grosor en las muestras de las tres localidades. Sin embargo, para el Desierto de los Leones este incremento fue más significativo. No obstante en las plantas actuales de *Abies religiosa*, el grosor de la cutícula es similar para hojas de uno a tres años de edad, tendiendo a ser más gruesa en la localidad de Michoacán. Por lo tanto, la diferencia entre hojas recolectadas y las provenientes de herbario no puede ser atribuida a la edad. Posiblemente un estrés diferente al ozono se presente en las tres localidades. De los años 60's a la actualidad el grosor de cutícula se ha incrementado en 2 μm , seguramente como una forma de incrementar la capa frontera y reducir la temperatura de la hoja a través de una mayor depositación de cutina en la cutícula. A pesar de esto, las concentraciones de ozono si pueden llegar a contribuir a la disminución en el grosor de cutícula en hojas del Desierto de los Leones.

En hojas de *Pinus hartwegii* el grosor de la cutícula no mostró diferencias significativas al hacer el análisis estadístico. Aparentemente este carácter no está influenciado por el estrés al que está sometida esta especie en el Desierto de los Leones.

Bennet *et al.* (1992) sugieren que la densidad de estomas aumenta junto con otros atributos de la hoja que pueden estar relacionados con una diferente sensibilidad al ozono. Al comparar estadísticamente el número de estomas por área en las hojas de *Abies religiosa*, no se encontró una posible relación entre la exposición al ozono y el número de estomas, ya que no existen diferencias significativas entre la localidad de Michoacán (con menor concentración de contaminantes aéreos) y la del Desierto de los Leones (mayor concentración de contaminantes aéreos) como encontraron en *Pinus* McLaughlin y Taylor (1981). La densidad de estomas de las hojas provenientes de herbario en las localidades del Desierto de los Leones y Michoacán es menor con respecto a las hojas recolectadas en años recientes. En el caso del Tláloc, la densidad es semejante entre el material recolectado recientemente y el de herbario. Esta comparación sugiere que si puede existir un efecto en el incremento del número de estomas con la exposición crónica de ozono a partir de los 70's por lo que estos resultados son similares a lo reportado por Bennet *et al.* (1992) en *Pinus ponderosa*, especie que tuvo un incremento en el número de estomas con la exposición crónica al ozono.

Es importante señalar que hay un incremento en el número de estomas en la hoja con la edad de *Abies religiosa* de casi el 50% en todas las localidades a pesar de la variación entre años. Lo que sugiere que este comportamiento no permite ver la influencia del estrés causado por ozono en el Desierto de los Leones. Posiblemente este aumento en la densidad de estomas se asocia con el incremento de CO₂ a consecuencia del cambio climático global (Bazzaz, 1990).

La epidermis en hojas de *Abies religiosa* se observó bien estructurada, con células turgentes sin daño aparente, apoyando así las observaciones de Álvarez *et al.* (1998). Sin

embargo, al comparar el largo de las células de epidermis en hojas provenientes del Desierto de los Leones, se encontraron diferencias significativas con respecto a Michoacán. El tamaño de las células epidérmicas es mayor en las hojas del Desierto de los Leones y Michoacán recolectadas recientemente y similar las provenientes de herbario para las mismas localidades. El incremento en el tamaño de las células epidérmicas seguramente también es una respuesta a la mayor concentración de CO₂ que existe en el ambiente en las últimas décadas. Desafortunadamente no se muestrearon individuos de Telapón para confirmar este incremento en el tamaño celular.

El ancho de las células epidérmicas en *Pinus hartwegii* es similar entre las tres localidades. Sin embargo, al comparar el largo de las mismas se observó una reducción en las pertenecientes a la localidad del Tláloc. El crecimiento en células hipodérmicas de hojas de árboles provenientes de áreas con contaminación atmosférica no parece estar influenciado por este factor.

La acumulación y presencia de almidón en diferentes tejidos de hoja se ha relacionado con el estrés que el ozono provoca sobre las plantas (Álvarez *et al.*, 1998; McLaughin *et al.*, 1982). Pearce (1996) encontró que es reducido el contenido de almidón en árboles fumigados con ozono comparado con árboles creciendo con aire filtrado. En el caso de *Abies religiosa*, aunque se observó un menor contenido de granos de almidón en hojas del Desierto de los Leones similar a lo registrado por Álvarez (1996) al comparar estas observaciones, el Desierto de los Leones si presenta una reducción de almidón con respecto a las de Michoacán y el Tláloc, es necesario tener un mayor número de muestras que nos permitan evaluar la escasa diferencia encontrada estadísticamente. También, Wellburn y Wellburn (1994) observaron que hay acumulación de almidón durante el

verano en hojas de *Pinus halapensis* en condiciones de estrés. Las hojas de *Abies religiosa* no mostraron esta característica lo que demuestra que hay diferencias fisiológicas entre especies en cuanto a la forma en que responden al crecer bajo condiciones de estrés ambiental.

En *Pinus hartwegii* la acumulación de almidón no muestra diferencias con respecto al sitio de procedencia, lo que nos indica que esta especie a pesar de estar en las mismas condiciones de estrés ambiental a que está sometida *Abies religiosa*, tiene una respuesta fisiológica diferente a ésta y otras especies estudiadas. Las hojas de *Pinus hartwegii* no muestran acumulación de almidón en la vena media en ninguna de las muestras estudiadas como fue observado para *Betula pendula* (Güthard-Georg *et al.*, 1993).

En los haces vasculares de las hojas de *Abies religiosa* la presencia de almidón fue prácticamente nula, a excepción de las muestras de marzo donde en hojas de uno y dos años de edad, se observaron pequeños granos de almidón sólo en el parénquima del xilema. En parte, estas observaciones coinciden con Álvarez (1996), sin importar la edad no se observan granos de almidón. La presencia de éstos en el parénquima de xilema posiblemente se relaciona con la translocación durante la reactivación del cámbium vascular en el tallo (Bernal, 2004). La reducción de reservas de almidón en árboles expuestos al ozono puede ser una consecuencia de la reducida fotosíntesis y distribución alterada de fotosintatos que pueden resultar de los efectos de O₃ similar a lo observado para *Abies religiosa* (Bernal-Salazar *et al.*, 2004).

El contenido de proteínas dentro de la hoja en *Abies religiosa* parece no estar afectada por el estrés a que están sometidas, ya que la presencia y distribución dentro de

los diferentes tejidos es muy similar en las tres localidades, observando este mismo fenómeno en las hojas provenientes de herbario.

Pinus hartwegii muestra una distribución y contenido de proteínas dentro de las hojas semejante para las tres localidades al igual que en *Abies religiosa*, lo que permite pensar que efectivamente el estar bajo condiciones de contaminación ambiental no ejerce un efecto negativo sobre la distribución y concentración de proteínas en los diferentes tejidos de ambas especies. Álvarez (1996) presenta conclusiones similares para *Abies religiosa* creciendo en la cuenca de México. Posiblemente no se apreciaron las modificaciones incipientes causadas por ozono en las peroxidasas apoplásticas y proteínas que se detectaron en *Betula pendula* con ayuda del microscopio electrónico de transmisión (Güthard-Georg *et al.*, 1993). Por ello, se sugiere hacer cortes ultrafinos (una micra) y confirmar este daño en *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*.

Álvarez (1996) sugiere que los cristales que se observan en células del parénquima en empalizada provenientes del Desierto de los Leones, son producto de un flujo desmedido de calcio hacia el protoplasma generado posiblemente por efecto de el ozono, al alterar la permeabilidad de la membrana, favoreciendo el proceso de senescencia. Sin embargo, al estudiar las hojas de las tres localidades se detectó que la abundancia de cristales no es mayor en las hojas procedentes del Desierto de los Leones. Las muestras de Michoacán (sitio sin contaminación) tuvieron mayor abundancia de cristales que las de El Desierto de los Leones (con contaminación) incluso en las colectadas en 1968 se presenta un comportamiento similar.

La presencia de cristales en *Pinus hartwegii* es casi inexistente, ya que en la mayoría de los casos no se observaron cristales y en pocas muestras solo uno o dos en los haces vasculares, pero esta es una característica del género. La cantidad de floema colapsado observado fue menor al 5% del total en todas las hojas. No se hizo conteo de estomas por área ya que la forma triangular de las hojas no permitió enfocar de manera adecuada el microscopio.

CONCLUSIONES

- En *Abies religiosa* las altas concentraciones de ozono presentes en el Desierto de los Leones modifican el grosor de la cutícula y la densidad de estomas, pero, no se observó ningún daño en la epidermis, hipodermis, mesofilo y haces vasculares, como han señalado otros autores. Probablemente los árboles que actualmente se encuentran en este bosque tiene un genotipo de resistencia alta a las condiciones de estrés ambiental. No sólo a los contaminantes aéreos si no también al déficit hídrico, a una mayor exposición de rayos UV y al cambio gradual hacia temperaturas extremas.
- Las observaciones anatómicas indican que en *Pinus hartwegii*, las concentraciones de O₃ no alteran el grosor de la cutícula ni ningún otro elemento celular, ya que son semejantes entre sitios.
- No hay diferencias anatómicas contrastante entre hojas recolectadas actualmente y las provenientes de herbario de *Abies religiosa*, excepto en la cutícula. El engrosamiento de la cutícula, posiblemente sea el único carácter modificado que ayude a proteger a los otros tipos celulares de un posible daño por ozono o de otros agentes aéreos.
- El muestreo anual permitió observar que la actividad metabólica expresada en concentración de almidón es similar entre localidades.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, D. H. y T. A. Bernal. 1988. Influencia del descortezador *Pseudohylesinus variegatus* en la muerte de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Alvarado, R. D. 1989. Declinación y muerte de oyamel (*Abies religiosa*) en el sur del Valle de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México.
- Alvarado, R. D., G. Elizalde, M. L. de la Isla de Bauer y T. Hernández. 1987. Declinación y muerte del bosque de oyamel en el sur del Valle de México: estudios dendrológicos. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Morelia, Michoacán.
- Álvarez, D. E. 1996. Determinación de alteraciones a nivel citológico e histoquímica en *Abies religiosa* Schl. et Cham. del Desierto de los Leones DF y su relación con el ozono. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Álvarez, D., I. Rosas y G. Laguna. 1998. Macroscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near México City. *Environmental Pollution* 103: 251-259.
- Bazzas, F. A. 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 167-196.
- Bennet, J. P., P. Rassat, P. Berrang y M. Karnosky. 1992. Relationships between leaf anatomy and ozone sensitivity of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. and *Prunus serotina* Ehrh. *Environmental Experimental Botany* 32: 31-41.

- Bernal-Salazar, S. I. 2004. El papel de las variables ambientales y los contaminantes atmosféricos en la actividad cambial. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.
- Bernal-Salazar, S. I., T. Terrazas y D. Alvarado. 2004. Impact of air pollution on ring width and tracheid dimension in *Abies religiosa* in the Mexico City basin. *IAWA Journal* 25: 205-215.
- Bravo-Alvarez, J. y R. Torres-Jardón. 2002. Air pollution levels and trends in the Mexico City metropolitan area. In F. Fenn, L. I. de Bauer y T. Hernández-Tejeda (eds). *Urban air pollution and forests: resources at risk in the Mexico City air basin*. Springer-Verlag, New York. 122-159 Pp.
- Bussotti F., E. Gravano, P. Grossoni y C. Tani. 1998. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytologist* 138: 469-479.
- Callaham, R. Z. 1964. La investigación de procedencia; estudio de la diversidad genética asociada a la geografía. *Unasylva* 18: 40-48.
- Cervantes, S. M. A. 1986. Variación morfológica en semillas, efecto de la temperatura en la germinación y crecimiento de plántulas de 53 familias de 6 procedencias de *Pinus tecunumannii* Eguiluz et Perry. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.
- Chappelka, A. H. y P. H. Smith. 1995. Predisposition of trees by pollutants to low temperatures and moisture stress. *Environmental Pollution* 87: 105-117.

- Eguiluz, P. T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, UNAM. México. Ed. Limusa, México.
- Günthard-Goerg, M. S., P. Schmutz., R. Matyssek, C. Scheidegger y T. Keller. 1993. Differentiation and structural decline in the leaves and bark of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees: Structure and Function* 7: 104-114.
- Gutman, M. y W. Feucht. 1991. A new method for selective localization of flavan-3-ols in plant tissues involving glycolmethacrylate embedding and microwave irradiation. *Histochemistry* 96: 83-86.
- Hernández, T. y L. I de Bauer. 1984. Evolución del daño por gases oxidantes en *Pinus hartwegii* y *P. montezumae* var. *Lindleyi* en el Ajusco, D. F. *Agrociencia* 56: 183-194.
- Kangasjärvi, J., J. Talvinen, M. Utriainen y R. Karjalainen. 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell and Environment* 17: 783-794.
- Krywl, M., J. Hom, A. Bytnerowicz y K. E. Percy. 1994. Deposition of gaseous nitric acid and its effects on foliage of Ponderosa Pine (*Pinus ponderosa* L.) seedlings. 16th international Meeting for specialists in air pollution effects on forest ecosystems. Canada.

- Lance, E. S. y L. R. Michael. 1991. Histological determination of ozone injury symptoms of primary needles of giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum* Bucch). *New Phytologist* 117: 557-564.
- Madrigal S. X. 1964. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel, *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl et Cham en el Valle de México. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Madrigal, S. X. 1967. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et. Cham.) en el Valle de México. INIF. Boletín Técnico No. 18.
- Madrigal, S. X. 1982. Claves para la identificación de las coníferas del estado de Michoacán. INIF. No. 58.
- Manzanilla, B. H. 1974. Investigaciones epidométricas y silvícola en bosques mexicanos de *Abies religiosa*. Dirección General de Información y Relaciones Públicas. SAG. México.
- Martínez, M. 1948. Los pinos mexicanos. 2ª Ed. Botas. México.
- Martínez, M. 1963. Las pináceas mexicanas. UNAM. México.
- McLaughlin, S. B. y G. E. Taylor. 1981. Relative humidity: Important modifier of pollutant uptake by plants. *Science* 211: 167-169.

- McLaughlin, S. B., K. R. McConathy, D. Denver y K. L. Mann. 1982. Effects of chronic air pollution stress on photosynthesis, carbon allocation, and growth of white pine trees. *Forest Science*: 28: 60-69.
- Media Cybernetics. 1997. Image Pro Plus, Reference Guide. Versión 3.1 for Windows. Maryland.
- Muñiz, V. R. 1987. Los insectos en el bosque de oyamel del Desierto de los Leones. IV Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal, Durango, México.
- Pearce, R. B. 1996. Effects of exposure to high ozone concentrations on stilbenes in sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) bark and on its lignification response to infection with *Heterobasidium annosum* (Fr.) Bref. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 48: 117-129.
- Percy, K. E., C. R. Krause y K. F. Jensen. 1990. Effects of ozone and acid fog on red needle epicuticular wax ultrastructure. *Canadian Journal of Forestry Research* 20: 117-120.
- Percy, K. E., K.F. Jensen y C. J. McQuattie. 1992. Effects of ozone and acid fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane and needle wettability. *New Phytologist* 122: 71-80.
- Ruzin, E. S. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press. New York.
- Rzedowski, J. 1978. *La vegetación de México*. Ed. Limusa, México.

- Rzedowski, J., G. Vela y S. X. Madrigal. 1977. Algunas consideraciones acerca de la dinámica de los bosques de coníferas en México. *Ciencia Forestal* 2: 15-35.
- Shobe, W. R. y N. R. Lersten. 1967. A technique for clearing and staining gymnosperm leaves. *Botanical Gazette* 128: 150-152.
- Tingey, T. D., G. Wilhour y C. Standley. 1976. The effect chronic ozone exposures on the metabolic content of ponderosa pine seedlings. *Forest Science* 22: 234-241.
- Vázquez, S. J. 1987. El saneamiento y la limpia forestales en el Desierto de los Leones. COCODER-DDF. México.
- Vázquez, S. J., E. W. Barret y E. Little Jr. 1962. Consideraciones generales sobre coníferas mexicanas. En FAO-INIF. Seminario y viaje de estudio de coníferas Latinoamericanas. Pub. Esp. No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México.
- Wellburn, F. A. M. y A. R. Wellburn. 1994. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis*. *Journal of Experimental Botany* 45: 607-614.
- Wright, J. W. 1976. Introduction to forest genetics. Academic Press. New York.