



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL DE
HOJA DE TRES ESPECIES DE UN BOSQUE SOMETIDO
A CONTAMINANTES OXIDANTES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GOMEZ BERNAL JUAN MIGUEL

DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D. F.

Febrero, 2008





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

Quiero agradecer a mi tutor el Dr. Guillermo Laguna Hernández por haberme aceptado a realizar la tesis y por su enseñanza en el área de la estructura vegetal y de la ultraestructura celular, a mi comité tutorial las doctoras Alicia Enriqueta Brechú Franco e Irma Aurora Rosas Pérez, por su orientación durante el desarrollo de la investigación, a la Dra. Olga Margarita Echeverría. Al Dr. Ricardo Torres Jardón y al M. C. Víctor Corona Nava y Esparza por su orientación en la presentación del presente trabajo. Reconozco la oportunidad que me dió el Dr. Sergio Rafael Silvestre Cevallos Ferríz de realizar las fotomicrografías en su laboratorio y a sus alumnos Carlos Castañeda y Emilio Estrada. A la Dra. Silvia Espinosa Matías por las micrografías de Microscopio Electrónico de Barrido. Al Dr. Luis Felipe Jiménez García por la utilización de su laboratorio para el procesamiento de los cortes finos y a Reina Lara Martínez por el procesamiento de los mismos y su observación al Microscopio Electrónico de Transmisión y a todas aquellas personas que me apoyaron durante la maestría.

Agradezco a la UNAM por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios y al apoyo económico de CONACyT.



DEDICO ESTA TESIS

A mi esposa Esther Aurora Ruiz Huerta, por todo el apoyo recibido durante la tesis de maestría. A mis dos hijos hermosos Gloria Maria y Juan Manuel, por el impulsarme a terminarla. Y a todas aquellas personas que de algún modo me ayudaron a terminar este trabajo.



INDICE

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	5
1. Formación de contaminantes fotoquímicos	5
2. Niveles críticos para ozono (AOT40)	10
3. Sintomatología causada por la contaminación atmosférica	12
IV. OBJETIVOS	17
V. MATERIAL Y MÉTODO	18
V.1. AREA DE ESTUDIO	18
V.1.1. DESCRIPCIÓN DEL DESIERTO DE LOS LEONES	18
V.1.2. PARQUE NACIONAL MIGUEL HIDALGO Y COSTILLA	21
V.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO	23
a) <i>Abies religiosa</i> (HBK.) Schltdl. et Cham.	23
b) <i>Baccharis conferta</i> HBK	25
c) <i>Buddleia cordata</i> HBK.	26
V.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	27
1.- Colecta de las hojas	27
2.- Procesamiento del material	29
a) Técnica de Paraplast	29
b) Técnica de Epon	31
c) Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido	32
d) Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35



1.	Daños estructurales	35
1.1.	Microscopia electrónica de barrido	35
1.1.1.	<i>Abies religiosa</i>	35
1.1.2.	<i>Baccharis conferta</i>	37
1.1.3.	<i>Buddleia cordata</i>	39
1.2.	Microscopia óptica	42
1.2.1.	<i>Abies religiosa</i>	42
1.2.2.	<i>Baccharis conferta</i>	46
1.2.3.	<i>Buddleia cordata</i>	49
2.	Daños ultraestructurales	52
2.1.	<i>Abies religiosa</i>	52
2.2.	<i>Baccharis conferta</i>	56
2.3.	<i>Buddleia cordata</i>	61
	VII. CONCLUSIONES	67
	VIII. BIBLIOGRAFÍA	72



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del ozono en la troposfera: química, balance y procesos relacionados.	9
Figura 2. Niveles críticos de ozono (AOT40) para los años 2004 y 2005 en la estación de monitoreo atmosférico Cuajimalpa.	11
Figura 3. Localización del Parque Nacional Desierto de los Leones y del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla.	19
Figura 4. Planta de <i>Abies religiosa</i> (Kunth) Schltld. et Cham.	24
Figura 5. Planta de <i>Baccharis conferta</i> Kunth.	25
Figura 6. Plantas de <i>Buddleia cordata</i> Kunth (Tepozán).	26
Figura 7. Selección del material procesado de <i>Abies religiosa</i> .	27
Figura 8. Selección del material procesado de <i>Baccharis conferta</i> .	28
Figura 9. Selección del material procesado de <i>Buddleia cordata</i> .	28
Figura 10. Hoja de <i>Abies religiosa</i> de un año de edad. MEB	36
Figura 11. Hoja de <i>Baccharis conferta</i> . MEB	38
Figura 12. Hoja de <i>Buddleia cordata</i> . MEB	40
Figura 13. Hoja de <i>Abies religiosa</i> de un año de edad. MO	45
Figura 14. Hoja de <i>Baccharis conferta</i> . MO	48
Figura 15. Hoja de <i>Buddleia cordata</i> . MO	50
Figura 16-18. Hoja de <i>Abies religiosa</i> de un año de edad. MET	53-55
Figura 19-22. Hoja de <i>Baccharis conferta</i> . MET	57-60
Figura 23-26. Hoja de <i>Buddleia cordata</i> . MET	62-65



INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Reactivos colorantes y detección de compuestos.	31
Cuadro 2. Tipo y Grado de daños visibles con MEB en las tres especies de plantas estudiadas en el Desierto de los Leones y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares.	41
Cuadro 3. Tipo y Grado de daños visibles con Microscopio óptico (MO) en las tres especies de plantas estudiadas en el Desierto de los Leones.	51
Cuadro 4. Tipo y Grado de daños visibles con MET en las tres especies de plantas estudiadas en el Desierto de los Leones.	66



RESUMEN

La atmósfera de las grandes ciudades puede contener una gran variedad de contaminantes gaseosos o particulados potencialmente dañinos a los humanos, a las plantas, y a los animales. Los efectos de contaminantes atmosféricos y sus productos de reacciones fotoquímicas secundarias no están limitadas a las áreas donde se generan, sino más bien a las áreas viento abajo, donde se acumulan. La Ciudad de México es una de las regiones más contaminadas en el mundo, en la que, los oxidantes fotoquímicos tales como el ozono, son reconocidos como uno de los problemas más importantes de la contaminación atmosférica. El ozono en las plantas causa daño en las hojas, e intensifica el decline del bosque en altas altitudes como las montañas en donde se localiza el Parque Desierto de los Leones en el suroeste del Valle de México. Los síntomas visibles por contaminación atmosférica oxidante en árboles de *Abies religiosa* en este parque incluyen la pérdida de follaje, disminución de la copa, daño severo foliar, y moteo clorótico tanto en hojas jóvenes como en maduras.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el daño a nivel de la estructura y los cambios celulares en las hojas de *Abies religiosa* (HBK.) Schltld. et Cham, *Baccharis conferta* HBK. y *Buddleia cordata* HBK del Parque Nacional Desierto de los Leones, el cual se encuentra sometido a estrés por contaminantes oxidantes. Así mismo se compararon estos síntomas con aquellas especies presentes en el bosque del Parque Nacional Miguel Hidalgo (ININ) expuesto a índices bajos de contaminación atmosférica, para diferenciar los síntomas por causas bióticas o abióticas.

Los síntomas a escala microscópica se evaluaron en hojas incluidas en preparaciones de Paraplast y resina epóxica que se procesaron por métodos convencionales e histoquímicos. Algunas muestras se seleccionaron para Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y de Transmisión (MET) para determinar con un mejor detalle la estructura externa de las hojas y los cambios finos en la estructura celular.

La evaluación primaria a simple vista de la estructura externa de la hoja de todas las especies estudiadas en el Desierto de los Leones, mostró puntuaciones o manchas de color pardo o el blanqueado y la necrosis de algunas partes de la superficie de la misma. Fue posible asociar estos signos con cambios observados en la estructura celular de las hojas, tales como muerte celular en el mesófilo (acumulación de sustancias fenólicas tales como lignina) y necrosis. Las

observaciones en MEB mostraron una descutinización severa en todas las especies, así como cambios en la forma y número de tricomas en *Baccharis conferta* y en *Buddleia cordata*. El análisis de la ultraestructura demostró que los daños a nivel celular son graduales, en un principio mayores en las vacuolas y cloroplastos y menores en citoplasma y en las mitocondrias.

Los estudios con microscopía óptica, MEB y MET en muestras del bosque del ININ no mostraron evidencia de daños severos en ninguna de las tres especies seleccionadas, lo que se relaciona con las mediciones de los niveles bajos de contaminación atmosférica. La combinación de los resultados histológicos e histoquímicos con la información disponible de la calidad del aire en el Desierto de los Leones, sugieren que hay una asociación entre los daños celulares observados y los agentes oxidantes del aire.

SUMMARY

The atmosphere of big cities may contain a variety of gaseous and particulate air pollutants potentially harmful to humans, plants, and animals. The effects of air pollutants and their secondary photochemical reaction products are not limited to those areas where they were generated, but they can be extended to downwind areas, where they accumulate. Mexico City is well known as one of the more polluted regions in the world in which the photochemical oxidants, such as ozone, are recognized as one of the most important air pollution problems. Ozone causes damage to leaves of many plants and enhances the declining of sensitive forest trees in high altitude mountains where located in the Desierto de los Leones Park (DLP) in the southwest of the Mexico's Valley. Visible oxidant air pollution symptoms in *Abies religiosa* trees in this park include lost of foliage, thinning of the crown, severe foliar injury, and chlorotic mottle in both young and mature leaves.

The objective of this research work was to assess the structure and cellular changes on leaves of *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham, *Baccharis conferta* HBK. and *Buddleia cordata* HBK. Of the Desierto de los Leones park national, the who be undergo air pollution stress. Likewise compared this symptoms with those species current in the Miguel Hidalgo Park National (ININ) exposed to minimum indexes of atmospheric contamination, so that the symptoms for causes biotic or abiotic.

The symptoms to microscopic scale were evaluated in leaves included in preparations of Paraplast and resin epoxic that were processed by conventional methods and histochemicals. Some samples were processed for Scanning Electronic Microscopy (MEB) and of Transmission (MET) to determine with a better detail the external structure of the leaves and the fine changes in the cellular structure.

The primary evaluation at first sight of the external structure of the leaf of all the species studied in the DPL, it showed punctuations or stains of brown color or the one whitened and the necrosis of some parts of the surface of the same one. It was possible to associate these signs with changes observed in the cellular structure of the leaves, such as cellular death in the mesophyll (accumulation of substances phenolics such as lignin) and necrosis. The observations in MEB showed a severe descutinization in all the species, as well as changes in the form and number of

trichoms in *Baccharis conferta* and in *Buddleia cordata*. The ultrastructure demonstrated that the damages at cellular level are gradual, in a bigger principle in the vacuole and chloroplasts and smaller in cytoplasm and in the mitochondria.

The studies with optic microscopy, MEB and MET in samples of the forest of the ININ didn't show evidence of severe damages in anyone of the three species choose, what belongs together with the mensurations of the levels low of atmospheric contamination. The combination of the results histologic and histochemicals with the available information of the quality of the air in the DLP, they suggest that there is an association between the observed cellular damages and the agents oxidizers of the air.

III. INTRODUCCIÓN

1. Formación de contaminantes fotoquímicos

En ciudades con alta densidad demográfica, como es el caso de la Ciudad de México, D. F., y su zona metropolitana, es fácil percibir el fenómeno de la contaminación atmosférica. Sin embargo, la sola apreciación no basta, es necesario evaluar de manera cuantitativa la calidad del aire, midiendo los niveles en que se presentan espacial y temporalmente los contaminantes atmosféricos, e incluso determinando su potencial de afectación a fin de poder entender la dinámica de su formación, el alcance de sus efectos y en consecuencia la forma de establecer mejores estrategias de control.

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en cantidades que pueden ser: perjudiciales para la vida, afectar estructuras y materiales a escala local, y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas a escala global. Las actividades que producen emisión de contaminantes atmosféricos incluyen desde fogatas y la combustión de madera hasta la industrialización y urbanización de las grandes ciudades (Vallejo et al., 2003).

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales. Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios se encuentran en la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o por actividades del humano. Son ejemplos el monóxido de carbono (CO), el dióxido de carbono (CO₂) y el dióxido de azufre (SO₂), el dióxido de nitrógeno (NO₂), el plomo (Pb) Los contaminantes secundarios son los que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen

contaminantes primarios, por ejemplo el ozono (O_3) que es formado a partir de emisiones de óxidos de nitrógeno ($NO_x = NO + NO_2$) y los compuestos orgánicos volátiles (COVs) en presencia de luz solar, y los sulfatos que son formados a partir del SO_2 y otros radicales orgánicos (Vallejo et al., 2003). Las partículas suspendidas que abarcan tamaños $DE < 100$ micrómetros (PST) y las partículas menores de 10 micrómetros de diámetro (PM_{10}) también son contaminantes del aire.

De los contaminantes secundarios el contaminante por mucho, más importante y persistente es el O_3 , indirectamente producido principalmente por la actividad humana dentro de la troposfera, siendo diferente al producido en forma natural en la estratosfera.

Hay ciertos factores que influyen en los altos niveles de O_3 observados en varios lugares del mundo. Dentro de estos se puede mencionar: la elevada producción de óxidos de nitrógeno (NO_x) por los procesos de combustión, la cantidad y reactividad de los COVs por la actividad antropogénica y biogénica, la elevada radiación solar y las características peculiares de la atmósfera con la orografía local, de entre otros.

El ozono es un gas reactivo presente en la troposfera en el rango de partes por billón (ppb). Su fuerte capacidad oxidativa lo hace un importante componente en la química troposférica y una amenaza a la integridad de los materiales, incluyendo organismos vivos. El conocimiento de los niveles de ozono son de gran interés en relación a la calidad de aire en intramuros y extramuros, en la resistencia de materiales de construcción, en la ocurrencia de desordenes en la respiración humana y en la alteración de ciertas funciones de las plantas.

La concentración de O₃ troposférico es variable en escalas espaciales locales e incluso temporales, por que se forma y destruye en tasas que dependen en las condiciones y la abundancia relativa de sus precursores con respecto a sus sumideros que también son variables. Algo del ozono estratosférico es adicionado ocasionalmente, pero la fotoquímica *in situ* controla ampliamente la abundancia del ozono troposférico. El O₃ es producido y destruido simultáneamente a través del ciclo fotoquímico ya bien reconocido y a través de una variedad de interacciones con otros componentes atmosféricos y de origen biogénico (Figura 1).

Un amplio rango de concentraciones de ozono, de décimas a centésimas de ppb, existen simultáneamente en la troposfera en cualquier momento. Las altas concentraciones de ozono son usualmente asociadas con las emisiones de los precursores (NO_x y COVs) en áreas urbanas y son después encontradas viento abajo de las zonas de emisión. Áreas más remotas pueden llegar a presentar concentraciones elevadas de O₃ durante el verano e invierno. En algunos lugares el ozono presenta un patrón de concentración diario y anual que refleja la presencia y los cambios de los precursores y los sumideros, así como de los cambios naturales en el clima (Monk, 2000; Ribas y Peñuelas, 2004). El patrón diurno típico muestra un mínimo temprano por la mañana y un máximo poco después del mediodía. La amplitud de este patrón varía estacionalmente, con valores mas altos en verano y reducida en invierno cuando la capacidad de producción fotoquímica es más baja.

La interacción de la troposfera baja con extensiones de vegetación da por resultado una remoción de ozono de la atmósfera substancial por medio de reacciones que llevan a la oxidación de componentes intrínsecos de las plantas. Este proceso de remoción es, hasta cierto grado, controlado por las características de intercambio turbulento de la troposfera baja y muy ampliamente por las propiedades físicas y químicas de la superficie terrestre (receptores).

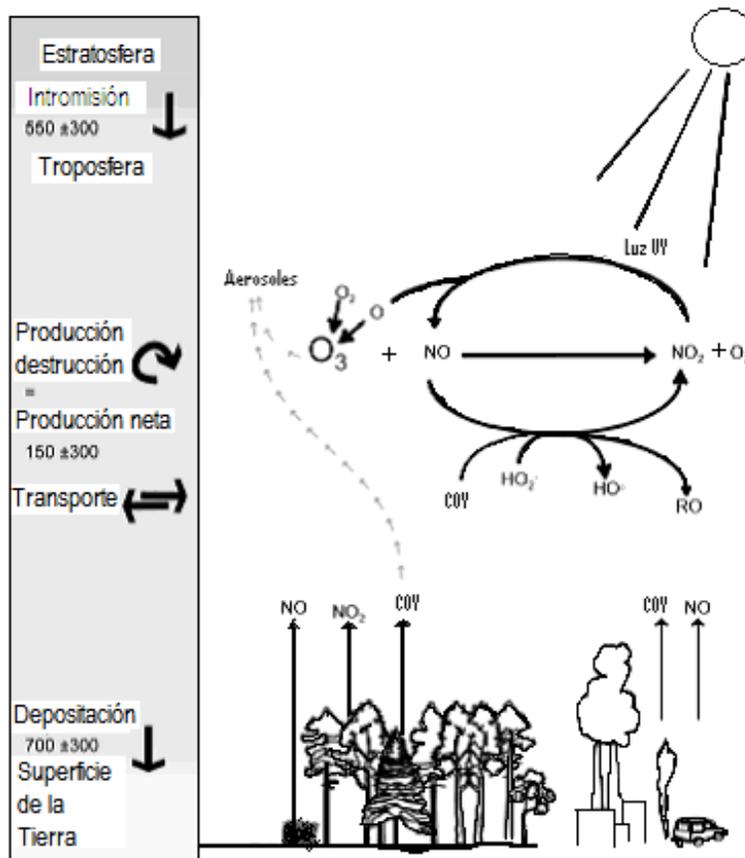


Figura 1. Esquema general del ozono en la troposfera: química, balance y procesos relacionados. La producción *in situ* conduce a la formación fotoquímica de O_3 en la presencia de NO_x y de compuestos orgánicos volátiles (COV) tanto de origen natural como antropogénico. Los procesos químicos entre O_3 , NO_x y HO_x incluyen ciclos de fotólisis de NO_2 a NO , y la reacción de NO con O_3 para dar NO_2 . En la presencia de COVs, ocurre una remoción adicional de NO y el efecto combinado lleva a una producción neta de O_3 . En cambio, el O_3 puede reaccionar directamente con COVs, particularmente con los de origen biológico. Esta reacción contribuye en la formación de aerosoles. En la ausencia de luz, la reacción química en fase gaseosa es dominada por las reacciones de remoción del O_3 tales como la oxidación de NO a NO_2 y después a NO_3 . Otras reacciones de remoción incluyen la oxidación de COVs. Los óxidos de nitrógeno emitidos del suelo pueden resultar también en un consumo significativo de ozono. Los valores del balance mostrados (columna de la izquierda) son en $Tg\ año^{-1} \pm$, y son un resumen de los resultados de varios modelos, incluyendo la incertidumbre asociada (Lelieveld y Dentener, 2000).

2. Niveles críticos para ozono (AOT40)

Las necesidades de determinar los efectos del ozono en la vegetación, y de un desarrollo en las políticas de control internacionales para reducir las exposiciones a ozono se están basando en los efectos de los contaminantes, por eso se empezó a definir los niveles críticos para ozono que producen Efectos desfavorables en cultivos y en la vegetación natural. El concepto de usar AOT (exposición acumulada sobre un umbral) para definir exposiciones a largo tiempo se demuestra para especies de importancia económica. El usar 40 ppb como una concentración umbral es dado por una gran cantidad de experimentos tanto de campo como de laboratorio y con diferentes condiciones controladas, aunque hay que realizar estudios en áreas extensas, dado que no se ha podido extrapolar métodos de cámaras a cielo abierto en bosques y asociarlo a variaciones espaciales atmosféricas y en condiciones ambientales naturales, los cuales pueden afectar la captación de ozono.

Se propuso el modelo AOT40 que es un nivel crítico para periodos largos de altas concentraciones de ozono la cual es una acumulación del mismo en un umbral de 40 ppb para bosques. Este índice de exposición, es calculado como la suma de las diferencias entre las concentraciones horarias de ozono y 40 ppb para cada hora cuando la concentración supere este umbral y en horas diurnas (radiación total $> 50 \text{ W/m}^2$). Dentro de los niveles críticos de periodos largos se establece un valor para el índice AOT40 de 10000 ppb/h en un periodo de 6 meses y usando horas diurnas (8 horas) para bosques (Kärenlampi y Skärby, 1996). Los seis meses son tomados por el crecimiento de las plantas y que se podrían considerar los meses de abril a septiembre.

Los cálculos de los valores críticos de ozono en los años 2004 y 2005 para obtener los índices AOT40 del Desierto de los Leones, se muestran en la figura 2. Como puede observarse estos

valores están por arriba de los umbrales establecidos tanto para el año 2004 (37809.64) como para el 2005 (51421.02). Además, se puede observar que en el 2005 se supera ampliamente este umbral cinco veces y casi cuatro para el año anterior. Este hecho puede estar produciendo efectos negativos sobre los diferentes tipos de vegetación del lugar y tener muchas repercusiones medioambientales en el mismo.

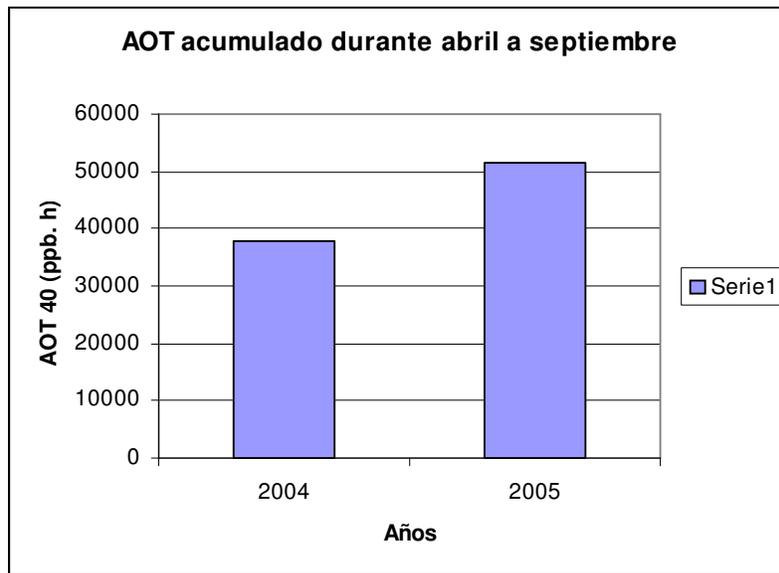


Figura 2. Niveles críticos (AOT 40) para los años 2004 y 2005 en la estación de monitoreo atmosférico Cuajimalpa.

3. Sintomatología causada por la contaminación atmosférica

La importancia del efecto de contaminantes secundarios como el ozono en los diferentes ecosistemas del país, se nota en los bosques cercanos a las grandes ciudades, como es el caso de la Cuenca del Valle de México, la cual es claramente afectada en los bosques del sur y suroeste de la Ciudad de México.

Estos efectos son descubiertos en el bosque del Parque Nacional Desierto de los Leones a principios de los 80's, siendo el principal causante de estos contaminantes el ozono. Así el ozono puede combinarse con otros contaminantes atmosféricos dando un efecto sinérgico (Ashmore y Bell, 1991). Este efecto del ozono ha causado la pérdida del arbolado en el parque, mostrando cambios en el paisaje del mismo, observándose como un "cementerio" (Alvarado-Rosales y Hernández-Tejeda, 2002).

El ozono es un contaminante atmosférico fitotóxico que causa mucho daño en la vegetación como es el daño foliar, la disminución del crecimiento de la planta, la productividad y la calidad de los cultivos (Krupa y Kickert, 1989; Schenone et al., 1992; Heagle et al., 1998).

La exposición a ozono, el tipo de suelo y las condiciones ambientales, la resistencia genética de las plantas expuestas, y su estado de desarrollo en el tiempo de exposición, determinan la respuesta de la planta al ozono. Estas respuestas pueden tener un alcance de daño visible foliar agudo o crónico (Krupa y Manning, 1988), así los síntomas crónicos implican daño en el tejido (Nussbaum et al., 2000), y el daño agudo significa muerte del tejido.

El daño visible es ocasionado por una alteración en la estructura celular que se refleja en la superficie de la hoja como un cambio en color principalmente (Healt, 1975). Debido a que el ozono entra a la hoja a través de los estomas por mecanismos de difusión molecular (Krupa, 1999) y por la cutícula, la lesión inicial se produce en las células guardas y que se extiende a las células cercanas a éstas, causando la reducción en la fotosíntesis (Karnosky et al., 1996; Oksanen y Saleem, 1999) y en el incremento de la senescencia foliar, volviéndola prematura.

Los cambios microscópicos en el interior de la estructura de las agujas de las coníferas han sido ampliamente estudiados (Kärenlampi, 1986; Sutinen, 1987b; Evans y Leonard, 1991; Zobel y Nighswander, 1991; Maier-Maercker y Koch, 1992; McQuattie y Schier, 1993; Anttonen et al., 1995, 1996; Holopainen et al., 1996), y los efectos de estrés natural y antropogénico son relativamente bien conocidas (Holopainen et al., 1992; Sutinen y Koivisto 1995; Fink, 1999). Algunos de estos cambios muestran alta especificidad a ozono, y son frecuentemente reportados para tener valor de diagnóstico (Sutinen et al., 1990; Holopainen et al., 1996; Kainulainen et al., 2000; Utriainen y Holopainen, 2001a). Asimismo, los métodos microscópicos son usados con éxito para evaluar con mayor certidumbre la salud del bosque en el campo (Soikkeli y Touvinen, 1979; Meyberg et al., 1988; Hafner et al., 1989; Wulff et al., 1996a; Kukkola et al., 1997; Alvarez et al., 1998).

Estos efectos son conferidos también a la respuesta hipersensitiva (RH) y a la iniciación de la muerte celular programada (MCP), estos efectos conducen a las lesiones visibles en el follaje (Altimir, 2006). Después de la alteración de los estomas, el daño se propaga al mesófilo (Dugger y Ting, 1970a, b; Evans y Ting, 1974a; Warner, 1994; Alvarez, 1996; Evans y Miller 1972a, b; Evans y Leonard, 1991).

Este tejido contiene a los cloroplastos, en los cuales el ozono induce cambios inespecíficos como: la acumulación de agregados lipídicos (Anttonen y Kärenlampi, 1996) o el aumento en el número de plastoglobuli (Sutinen y Koivisto, 1995), estos cambios son característicos del efecto del ozono en las coníferas, y en los cloroplastos, como son: 1) una disminución en su tamaño (Sutinen, 1986a, 1987b; Sutinen et al., 1990; Anttonen et al., 1996; Holopainen et al., 1996; Anttonen y Kärenlampi, 1996), 2) oscurecimiento y granulación del estroma (Sutinen, 1986a, 1987a, b; Sutinen et al., 1990; McQuattie y Schier, 1993; Anttonen et al., 1996; Anttonen y

Kärenlampi, 1996; Holopainen et al., 1996; Utriainen et al., 2000; Utriainen y Holopainen, 2002), 3) un avance gradual de estos cambios en los cloroplastos de la capa de células externas hacia la capa de células internas (Sutinen, 1987a; Sutinen et al., 1990) y 4) un aumento del tamaño de los granos de almidón (McQuattie y Schier, 1993; Wellburn y Wellburn, 1994; Kivimäenpää, 2003).

De esta manera la clorosis está asociada con el deterioro de los cloroplastos (Sutinen, 1987b; McQuattie y Schier, 1993; Anttonen et al., 1995, 1996; Holopainen et al., 1996), reduciéndose el contenido de clorofila en las células afectadas. Estas lesiones dan aumento a manchas cloróticas o moteado (Treshow, 1984) y son comunes en pino, en el cual el mesófilo no está diferenciado (Davis y Wood, 1972). Los fenoles están presentes en cloroplastos y vacuolas de estas plantas, exponiendo a los fenoles a oxidación enzimática. Este proceso puede ser inducido por ozono (Howell y Kremer, 1973).

La mayoría de los estudios microscópicos se han enfocado en la estructura de los cloroplastos, porque la calidad de los efectos del ozono se ha visto primero en ellos (Holopainen et al., 1996; Sutinen, 1987b; Sutinen et al., 1990), y porque el ozono disminuye la fotosíntesis (Wallin et al., 1990). Sin embargo, antes de las alteraciones relacionadas al ozono ocurridas en el cloroplasto en las agujas del abeto de noruega, el número de peroxisomas y de mitocondrias aumentan, que se consideran como signos de defensa celular contra las acciones del estrés oxidativo (Kivimäenpää et al., 2003). La degeneración e hipertrofia de los peroxisomas, la desintegración de las mitocondrias y el citoplasma (Holopainen et al., 1996; Sutinen, 1987b; Sutinen et al., 1990) han estado reportadas a lo largo del daño, cuando las alteraciones en los cloroplastos se han desarrollado. Se ha reportado que el ozono aumenta el número de vacuolas citoplasmáticas (Anttonen y Kärenlampi, 1996; Kivimäenpää et al., 2003). Los cambios en los peroxisomas

pueden servir como un indicador inicial en la estructura por el impacto del ozono, cuando se conocen los efectos de varios contaminantes en estos organelos. Sin embargo, la estructura de los peroxisomas puede ser también simple como para buscar características de cambios cualitativos para varios factores de estrés.

Cuando aumentan las concentraciones de ozono o el tiempo de exposición, en el caso del abeto de Noruega, la endodermis y el tejido del haz vascular son afectados después del mesófilo. Las células endodermales podrían tener pequeños cloroplastos con estromas densos y granulares (Sutinen, 1987b; Sutinen et al., 1990), y la acumulación de almidón en el mismo (Kivimäennpää et al., 2003) y también en pino alepo (Wellburn y Wellburn, 1994). En el tejido vascular el rompimiento de los organelos, la desintegración del citoplasma, la acumulación de compuestos densamente teñidos y el colapso de las células han sido estudiados (McQuattie y Schier, 1993; Sutinen, 1987b; Sutinen et al., 1990; Wellburn y Wellburn, 1994). La separación del plasmalema está descrita en la vegetación con exposición crónica de ozono y otros contaminantes atmosféricos, y es frecuentemente encontrada en los eventos de exposición aguda (Thomson et al., 1996). En el diagnóstico del daño por ozono, el estudio de estos tejidos puede revelar daño por largo tiempo de exposición, y varios efectos del estrés por ozono, cuando el mesófilo está ya desintegrado.

IV. OBJETIVOS

- Determinar los cambios estructurales en las hojas de *Abies religiosa*, *Buddleia cordata* y *Baccharis conferta*, de bosques sometidos a diferentes niveles de estrés por contaminantes oxidantes atmosféricos.
- Analizar los cambios celulares en hojas de *Abies religiosa*, *Buddleia cordata* y *Baccharis conferta*, en las áreas de estudio.
- Establecer los cambios estructurales y celulares que sirvan como marcadores de daño temprano y crónico asociados a contaminantes oxidantes.

V. MATERIAL Y MÉTODO

V.1. AREA DE ESTUDIO

V.1.1. DESCRIPCIÓN DEL DESIERTO DE LOS LEONES

Se estudiaron plantas de los Bosques del Parque Nacional Cultural y Recreativo Desierto de los Leones (DL) que se localiza en la región central de la República Mexicana, al suroeste de la Cuenca de México. El DL pertenece a la unidad geomorfológica Sierra de Las Cruces, que forma parte del sistema montañoso denominado Eje Neovolcánico Transversal a una altitud entre 2,600 a 3,700 m.s.n.m. (Cantoral, 1986). De acuerdo al plano oficial de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, el DL cuenta con una superficie de 1,866 ha y se localiza entre latitud norte $19^{\circ}15'20''$ y $19^{\circ}19'40''$ y longitud oeste $99^{\circ}17'40''$ y $99^{\circ}19'40''$. El DL se ubica al surponiente de la Ciudad de México, dentro de las delegaciones Cuajimalpa de Morelos y Álvaro Obregón, en el Distrito Federal (Figura 3).

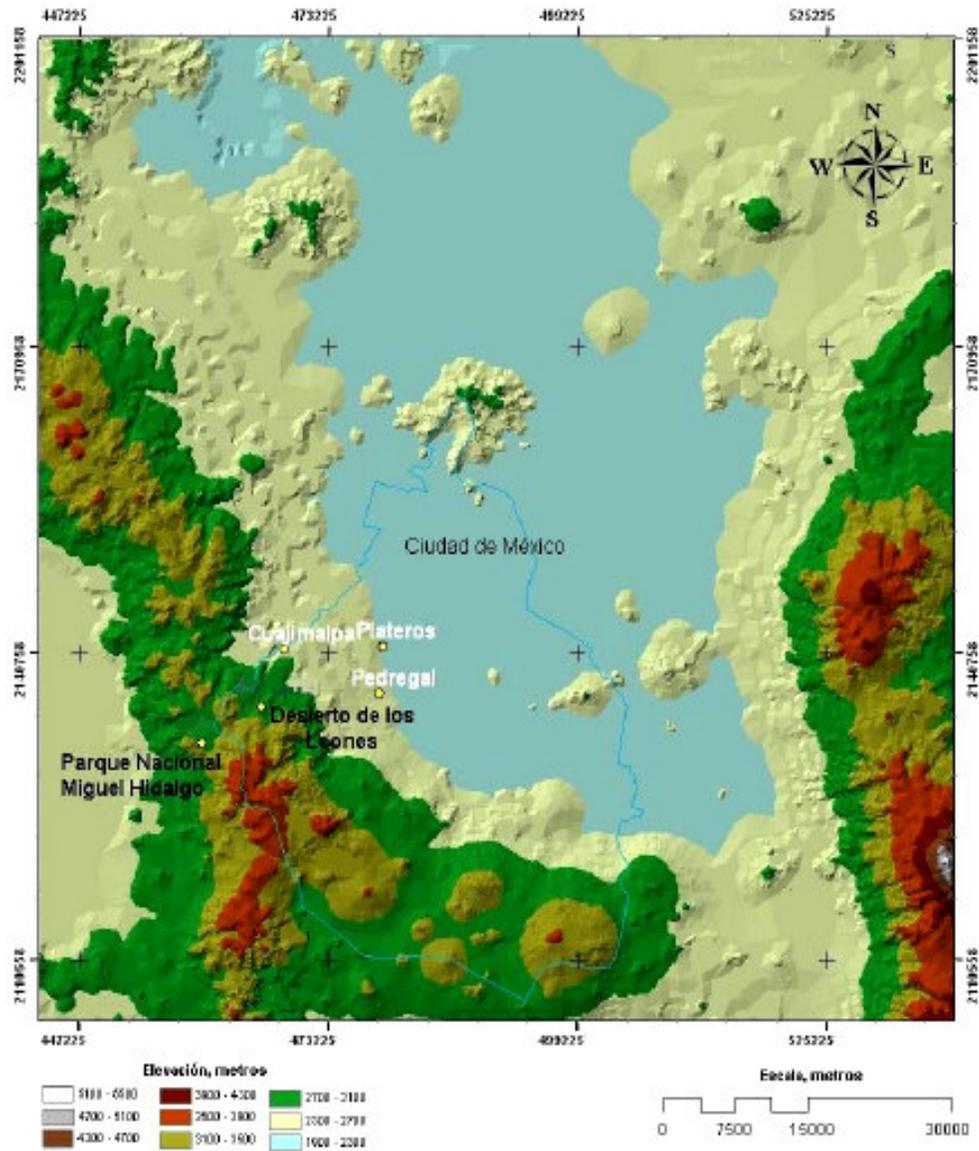


Figura 3. Localización del Parque Nacional Desierto de los Leones y del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla.

Con base en la clasificación de Köppen, modificada por García (1988), el tipo de clima para el Desierto de los Leones corresponde a C(W2) W (b')ig, que equivalen a: templado, con lluvias en verano, precipitación invernal, con respecto al total es menor de 5%, Forma parte del grupo más húmedo de los subhúmedos, isotermal, la diferencia de temperatura entre el mes más cálido y el mes más frío es menor a 5°C. La precipitación total anual varía entre 1400 y 1900 mm, correspondiendo a los meses de junio, julio y agosto la mayor frecuencia y abundancia de las lluvias.

Según el INEGI (1993), en el Parque atraviesan dos isotermas: una en la porción norte de 10AC; y la otra, en la porción centro-sur de 8AC. En la porción sur del Parque pasa una isoyeta de 1,500 mm. El Servicio Meteorológico Nacional (SARH, 1982) reporta ocho ambientes climáticos en el Parque Nacional.

El DL se encuentra dentro de la Región Mesoamericana de Montaña, formando parte de la provincia florística de las serranías meridionales, a la cual se adscribe el Eje Volcánico Transversal. Esta provincia incluye las elevaciones más altas de México, así como muchas áreas montañosas aisladas, cuya presencia propicia el desarrollo de muy numerosos endemismos (Rzedowski, 1978). Localmente, el Parque Nacional se localiza dentro de lo que Rzedowski et al. (2001) llamaron el Valle de México.

El tipo de vegetación se determinó con base en la clasificación de Rzedowski (1978), el cual es: Bosque de *Abies religiosa*.- Este bosque se ubica en la parte central del Parque, por arriba de los 3,000 msnm, donde la especie dominante es *Abies religiosa*. Se encuentra acompañado, principalmente, por *Garrya laurifolia*, *Salix paradoxa* y *Buddleia cordata*, en el estrato arbóreo bajo. En el estrato arbustivo se encuentran *Baccharis conferta*, *Senecio angulifolius*, *S. platanifolius*, *S. barba-johannis*, entre otras. En el estrato herbáceo se pueden encontrar *Acaena elongata*, *Sigesbeckia jorullensis*, *Alchemilla procumbens*, entre otras. Generalmente, en la Cuenca de México este tipo de vegetación se encuentra en laderas de cerros o cañadas protegidas contra la acción de vientos fuertes e insolación, aunque no es raro encontrarla en el Parque, en las cimas de los cerros pequeños. Así mismo, existen macromicetos como *Lactarius salmonicolor*, *Tylopilus* sp., *Morchella* spp., *Inocybe geophyla*, *Hebeloma fastibile*, entre otros.

V.1.2. PARQUE NACIONAL MIGUEL HIDALGO Y COSTILLA

Como bosque de comparación con el DL, se estudiaron especies de bosque localizadas dentro de las instalaciones del ININ (Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares), el cual está ubicado en el Municipio de Ocoyoacac, Edo. Méx. El ININ queda incluido dentro del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla conocido como "La Marquesa", el cual es una de las más importantes áreas ecológicas protegidas con cerca de mil hectáreas (Figura 3). El parque nacional Miguel Hidalgo y Costilla está ubicado en la parte central del Estado de México abarcando parte de los municipios de Ocoyoacac, Lerma y Huixquilucan. Cuenta con una extensión de 1,760 hectáreas y fue decretado como parque nacional en 1936. Este parque cuenta con una superficie boscosa de 70%, dentro del cual se hallan importantes elevaciones que van de los 3,000 a los 3,800 m.s.n.m.. el resto de la superficie del parque está conformado por lomeríos, llanos, claros boscosos y el área de la laguna de Salazar. Sus coordenadas son entre los 99°19'40" y 99° 23'35" longitud oeste y 19°15'20" y 19°19'20" de latitud norte.

La provincia fisiográfica a la cual pertenece es el sistema Neovolcánico Transmexicano, enclavado en la Sierra de las Cruces. Presenta dos tipos de clima: a) templado, con verano fresco, temperatura media anual entre 12 y 18°C y b) semifrío, con verano fresco, temperatura media anual entre 15 y 18°C, en invierno con una temperatura media menor de 10°C (SARH, 1993).

La especie dominante dentro del ININ es *Abies religiosa* con la presencia de especies aisladas como son: *Pinus moctezuma*, *Pinus teocote*, *Quercus sp.*, *Salix cana*, *Buddleia cordata*, *Baccharis conferta*, *Prunus serotina ssp. capili*, *Senecio salignus*, *Senecio cinerarioides*, *Eupatorium sp.*, *Stevia sp.*, *Muhlebergia macroura* y *Festuca toluensis*. La temperatura

media anual en esta zona es 10.2 °C, La temperatura del año más frío 9°C y temperatura más calurosa 12.3 °C. (período comprendido de 1976-1991). La precipitación anual promedio es de 1,154.8 mm., la precipitación del año más seco 546.5 mm y la precipitación del año más lluvioso 1,495.2 mm (Semarnap, 1999). El clima es templado subhúmedo (Cb(W2)(w)) con lluvias en verano.

V.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

a) *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham.

Es una planta del orden Coniferales y de la familia Pinaceae, se describe como un árbol de 35 a 45 m de altura, con tronco de 1 a 1.50 m de diámetro; ramas extendidas o ligeramente ascendentes y verticiladas, que se acortan gradualmente hasta formar una copa cónica. La corteza externa de color café-rojizo, grisácea, con pequeñas placas irregulares, de 1 a 5 mm de

grosor; corteza interna de color rojizo y de 6 a 7 mm de grosor. Las ramillas son colgantes, comúnmente opuestas en cruz, de color que varía del castaño oscuro al moreno violáceo, más o menos hirsutas, sobre todo cuando jóvenes. Hojas alternas dispuestas en espiral, lineares, derechas o algo falcadas, subdísticas, torcidas en la base, de 20 a 30 mm de largo por 1.5 mm de ancho; ápice agudo y córneo, de color verde oscuro en el haz y glaucas en el envés. Yemas ovoides u ovales de 6 a 10 mm, de color amarillento y protegidas por brácteas delgadas. Planta monoica, con inflorescencias masculinas en las ramillas laterales, oblongas y romas, de 12 a 14 mm de largo por 5 mm de ancho, de color violáceo, al principio protegidas por mucha resina. Las inflorescencias femeninas se desarrollan hacia la cima del árbol, en forma de conillos subcilíndricos de 7 cm de largo con las brácteas rojizas de margen rasgado, blanco y translúcido, y llevan en el centro una banda longitudinal. Conos solitarios, erguidos, cilíndrico-oblongos, romos, rara vez cortamente oblongos, resinosos, casi sésiles o con pedúnculos de 5 a 9 mm; color violáceo a moreno violáceo con la edad, miden de 10 a 16 cm de largo por 4 a 6 cm de ancho. Escamas casi uniformes, cuneadas, de 28 a 35 mm de largo por 12 a 28 mm de ancho, ápice redondeado y entero; bordes laterales eroso-denticulados. Brácteas espatuladas, exertas y reflejadas, sobresaliendo de 8 a 10 mm, morenas, rasgadas en su parte superior con una punta triangular aguda. Semilla cuneado-oblonga, ovoide u oblonga, aguda en la base, comprimida resinosa de 9 a 10 mm de largo por 5 mm de ancho, lisa de color castaño brillante; ala lateral amplia, oblicua, suave, delgada, quebradiza, de color castaño claro de 22 a 25 mm de largo por 10 a 15 mm de ancho, redondeada hacia adentro y con el borde externo finamente eroso. La edad a la que florece y fructifica oscila entre los 23 y 27 años, y se encuentra formando bosques entre los 2600 y 3600 msnm, solo o junto con especies de *Pinus* y *Alnus*. Habita zonas de alta humedad principalmente sobre cañadas o exposiciones húmedas y regularmente en suelos profundos (Figura 4) (Rzedowski J., 1978; Mabberlev D. J., 1993; Flores M. A. Consulta personal).



Figura 4. Bosque de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. et Cham.

b) *Baccharis conferta* HBK

Baccharis conferta pertenece a la familia de las compuestas (Asteraceae) que comprende unas 20,000 especies de plantas distribuidas por todo el mundo, pero principalmente en las regiones templadas y subtropicales, comúnmente se le conoce como “yerba del carbonero”. Las compuestas son en su mayoría hierbas anuales, aunque también se pueden encontrar arbustos y árboles. Por su estructura floral y por su composición química, se considera la familia más evolucionada de todas las dicotiledóneas. *Baccharis conferta* (Figura 5) es un arbusto hasta de 2 m de altura, dioicos con las hojas alternas, dentadas, las flores son numerosas con cabezuelas unisexuales. Las flores femeninas con el ovario abortado. Las flores masculinas con las corolas filiformes. Receptáculo plano, alveolado, con los bordes dentados de los alveolos. Anteras con la base obtusa. Los aquenios comprimidos, con diez costillas. El vilano constituido de pelos que son plumosos hacia el ápice. Las cabezuelas corimbosas en el extremo de las ramas. Corolas amarillentas, blanquecinas y rojizas. 250 a 300 especies en toda la América. Es una especie de hábito terrestre, crece en bosque de encino, pino, pino-encino, otras coníferas y otras latifoliadas, se desarrolla de los 1850 a los 3025 msnm y una pendiente aproximada de 40° (Reiche, 1963).



Figura 5. Planta de *Baccharis conferta* Kunth.

c) *Buddleia cordata* HBK.

Buddleia cordata pertenece a la familia Buddleiaceae con 1 género y 100 especies comúnmente conocida como "Tepozán". Es un arbusto o árbol de 4 a 6 metros de alto, con hojas largamente pecioladas, que miden de 10 a 15 cm de largo, tienen un pecíolo largo y son anchas en su base y delgadas en la punta. Las hojas son de color verde claro en el haz y blancas o grisáceas por el envés, debido a la presencia de numerosos vellos finos o tricomas. Sus flores son amarillas y aromáticas, con cáliz de cuatro divisiones. Corola con el tubo corto, en forma de rueda o de campana, de cuatro divisiones. Estambres cuatro, insertos en la garganta del tubo corolar, con los filamentos cortos. Ovario bilocular. Estilo corto. Óvulos numerosos. El fruto es una cápsula, deshiscente en dos valvas bífidas. Semillas pequeñas numerosas. Las flores son pequeñas, organizadas en panículas dicótomas. Se encuentra en México y en Guatemala. Crece en bosques de pino-encino y otras latifoliadas alrededor de los 2050 y 3000 msnm (Figura 6) (Reiche, 1963).



Figura 6. Plantas de *Buddleia cordata* Kunth (Tepozán).

V.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1.- Colecta de las hojas

El estudio se realizó con las especies de *Abies religiosa* (HBK.) Schltdl. et Cham., *Baccharis conferta* HBK y *Buddleia cordata* HBK para el caso del Desierto de los leones y del ININ se colectó el 30 de agosto del 2004 y el 24 de septiembre del 2004; para los análisis comparativos se colectó de nuevo, pero solamente en el Desierto de los Leones el día 13 y 14 de julio del 2005 y con los siguientes métodos:

Para la toma de muestras en el caso de *Abies religiosa* se procedió a coleccionar ramas de un año, las hojas se cortaron en tres formas: la base, la mitad y el ápice de la hoja, para localizar mejor los tipos de daños a nivel microscópico (Figura 7). Después se procedió a su fijación inmediatamente después del corte de las hojas, para seguir el procedimiento de histología respectivo.

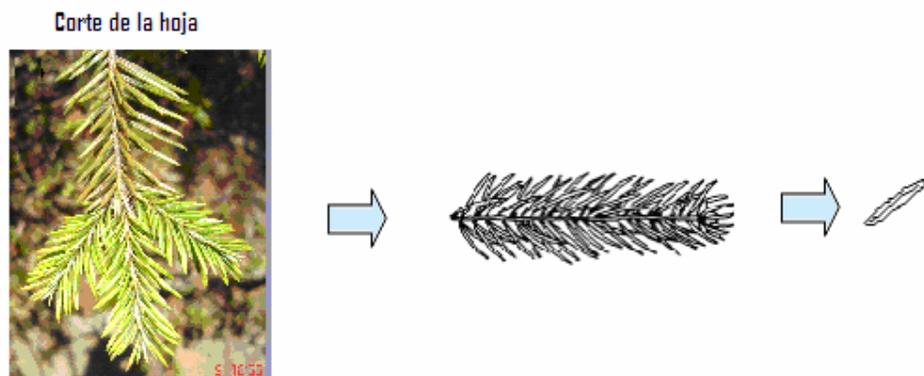


Figura 7. Selección del material procesado de *Abies religiosa*.

Para *Baccharis conferta* se procedió a cortar las hojas en pequeños trozos al azar (Figura 8). Después se procedió a su fijación, inmediatamente después del corte de las hojas para seguir la metodología respectiva.



Figura 8. Selección del material procesado de *Baccharis conferta*.

En *Buddleia cordata* se cortaron hojas al azar (Figura 9). Después se procedió a su fijación inmediatamente después del corte de las hojas, para proseguir con los procedimientos respectivos.



Figura 9. Selección del material procesado de *Buddleia cordata*.

2.- Procesamiento del material

a) Técnica de Paraplast (López et al., 2005)

Se procesó con un fijador preparado (EMS, # 15934) por 12 horas, y se enjuagaron con una solución de buffer de fosfatos 0.1 M. Se realizó una deshidratación gradual con alcoholes al 30, 50, 70, 85, 96 y 100%, permaneciendo 15 minutos dos veces, con la solución al 70% se dejaron las muestras toda la noche y se realizó otro cambio por 15 minutos. Se infiltró cada una de las muestras en bolsitas hechas con gasa y se etiquetaron, y en seguida las bolsitas se infiltraron en paraplast fundida. Una vez en paraplast se dejaron un día en la estufa a 62.5 °C aproximadamente. Esta operación se realizó una vez más. Después se incluyó en moldes de tubos de aluminio, de acuerdo al tamaño de las muestras. El paraplast se fundió en una parrilla y se mantuvo líquida a 62° C, mientras se incluían a las muestras, con el fin de que éstas adquirieran la misma temperatura y evitar la formación de burbujas. Una vez incluidas se dejó solidificar el paraplast a temperatura ambiente en los moldes. Se desmoldaron las muestras y se procedió a cortar en un microtomo rotatorio American Optical.

Antes de empezar a cortar, se enfrió la cuchilla del microtomo. Se limpiaron los portaobjetos para colocar los cortes. Para la preparación del baño: se colocó agua destilada en el “baño de flotación”, y se calentó a 52 °C aproximadamente, que es la temperatura óptima para que estiren bien los cortes y no se funda el paraplast. Se agregó sólo un poco de gelatina (aproximadamente 1 gr.) para que los cortes se pegaran a los portaobjetos.

Se colocó el portamuestras en el microtomo y se orientó la pirámide, utilizando los tornillos laterales para moverla de izquierda a derecha y los de abajo para orientarla hacia arriba o abajo,

se acomodó el bloque de paraplast a manera que su parte inferior quedara paralela al filo de la cuchilla para obtener cortes uniformes. Se decidió cuál sería el grosor del corte y se puso en el microtomo, se han trabajado cortes de entre 10 y 12 μm . La cuchilla y la pirámide de paraplast se mantuvieron frías durante todo el proceso de corte, utilizando para ello bolsitas con hielo que se colocaron muy próximas a la cuchilla y a la pirámide; la cuchilla se limpió constantemente con un pincel y con una gasa de abajo hacía arriba para no dañar el filo, eliminando impurezas que pudiesen alterar la forma del corte.

Los cortes se colocaron en los portaobjetos en series de cuatro a cinco, dependiendo el tamaño del tejido. Con un lápiz de punta metálica se puso el número de muestra en una orilla del portaobjetos y se colocaron en una canastilla dentro de la estufa a no más de 50 °C. Se desparafinó con xileno en tres ocasiones, así como alcohol absoluto también se realizó en tres ocasiones; después se colocaron en alcohol de 90%, y se tiñó con colorante Safranina y Verde Rápido (Cuadro 1). Las muestras se colocaron en safranina un día. Se lavó la safranina con agua corriente durante 15 a 20 minutos. Se deshidrató con una serie de alcoholes en el orden siguiente: alcohol al 50%, 60%, 70%, 80%. Se hizo una segunda tinción con colorante verde rápido, en este paso se dejó solamente tres segundos e inmediatamente se introdujo en un primer frasco con alcohol absoluto, después se pasó a un segundo frasco también con alcohol absoluto, y a un tercero para quitar todo el colorante que sobró. Se pasó a aceite de clavo, el cual tiene como función diferenciar los colorantes de tinción de las muestras. Finalmente, se lavó en un primer frasco con xileno y posteriormente a un segundo frasco con xileno. Se puso resina de montaje en el cubreobjetos para su observación.

Para la técnica doble de ácido peryódico-reactivo de Schiff (APS) y azul negro de naftol, se desparafinó y se procedió con la rehidratación en una serie de alcoholes en el orden siguiente:

100% (dos cambios), 96%, 70%, 50%, 25% y agua, luego se aplicó ácido peryódico durante 15 minutos, se lavó con agua y se aplicó reactivo de Schiff durante 15 minutos, se procedió a lavar con agua y también con ácido acético al 2% durante 1 minuto. Se enjuagó con agua, se deshidrató hasta alcohol del 96% y se aplicaron unas gotas de azul negro de naftol en alcohol del 96%. Se enjuagó con butanol y se pasó a xilol durante 3 minutos, se montó en resina para su observación. El fotomicroscopio utilizado fue Olympus AX70 en campo claro.

Colorante	Reacciones
Safranina-verde rápido	Identificación de estructura celular. Se tiñe de rojo la cromatina y la lignina, de violeta el citoplasma y de verde la celulosa
Ácido peryódico-schiff (APS)	Detección de polisacáridos insolubles, que se tiñen de rosa pùrpura.
Azul negro de naftol	Localización de proteínas que se tiñen de azul.
Rojo "O" de aceite	Lípidos insolubles, se tiñen de rojo.
Tetraóxido de osmio "OsO ₄ "	Evidenciar compuestos fenólicos (antocianinas, taninos, o-difenoles y o-diquinonas).
Azul de toluidina	Identificación de estructura celular.

Cuadro 1. Reactivos colorantes y detección de compuestos.

b) Técnica de Epon (Mollenhauer y Totten, 1971)

Después de la fijación en glutaraldehido se postfijaron en una solución fijadora de osmio al 2%, se taparon herméticamente y se dejaron por dos horas bajo una campana, luego se retiró la solución de osmio con la pipeta Pasteur y se lavaron tres veces con solución buffer de fosfatos 0.1 M con cambios de 15 minutos. Se realizó una deshidratación gradual con alcoholes al 30, 50, 70, 85, 96 y 100%, permaneciendo 15 minutos dos veces, con cada solución, en la de 70% se dejaron las muestras toda la noche y se realizó otro cambio por 15 minutos cuando se continuó. Se agregó óxido de propileno dos veces con cambios de 15 minutos cada uno. Se preparó la mezcla A de Epon que es PolyBed y DDSA; y la mezcla B que es PolyBed y NMA y se le agregó el catalizador DMP. 30. Esta mezcla AB + catalizador se mezcló con óxido de propileno en proporciones de 2:1, 1:1 y 1:2, las muestras estuvieron dos días en cada mezcla en refrigeración.

Se ambientaron y se incluyeron las muestras en la mezcla AB + catalizador a 60°C en una estufa. Para realizar los cortes semifinos se usó el ultramicromoto LEICA RMC MT998 y cuchillas de vidrio LEICA EMKMR2, a las cuales se les colocó maskintape alrededor formando una tina, a la cual se le puso barniz para evitar la salida de agua, los cortes se recogieron con un asa de metal y se pusieron en un portaobjetos, éstos se colocaron en una parrilla caliente para adherir los cortes al portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina y se llevó a cabo la observación de las muestras. El fotomicroscopio utilizado fue un Olympus AX70 en campo claro. Los bloques con material interesante para su observación al microscopio electrónico de transmisión se separaron y se dejaron pendientes.

c) Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (Bozzola y Russell, 1991)

Se realizó los pasos de la técnica de Epon hasta dejar las muestras en alcohol al 100%. Así los cortes se colocaron en bolsas de papel seda sumergidas en alcohol puro, y luego en el momento de desecar estas bolsitas con la muestra se traspasaron nuevamente a alcohol puro. La desecación se realizó en un desecador de punto crítico BAL-TEC CPD030. La desecación consiste en sustituir el alcohol por CO₂ líquido, llevar al CO₂ al punto crítico en el cual se transforma en gas sometiéndolo a una temperatura de 36.1 °C y una presión de 1070 lb/pg² para que el CO₂ se mantenga líquido y el alcohol es necesario para enfriar la cámara en donde se encuentran las muestras controlando la presión. Una vez eliminado el alcohol, se induce la desecación al punto crítico llevando al CO₂ a la temperatura crítica para transformarlo de la fase líquida a la gaseosa. El CO₂ es eliminado muy lentamente y sustituido por aire. Una vez que la cámara en donde están las muestras alcanza una presión normal, las muestras se retiran para ser recubiertas con metal lo más pronto posible. Eventualmente se conservan en las bolsitas de papel seda y dentro de un desecador que contenga sílica gel. Una vez desecados, los cortes se

montaron en soportes de aluminio, al cual se pegaron con cinta de carbón y enseguida se llevó a recubrimiento con oro en una evaporadora de oro (DESK II). Este procedimiento consiste en colocar una capa de oro sobre la muestra, esto hace que permita la conducción y la recuperación de electrones secundarios, retrodispersos y otras emisiones cuando las muestras son sometidas al flujo de electrones en el microscopio de barrido. El recubrimiento se hace al vacío con la participación del argón. Las muestras recubiertas se mantienen en un ambiente seco colocándolas en un desecador de vidrio. Las muestras así procesadas estarán listas para ser observadas. Los cortes de hojas recubiertos fueron observados en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5310LV.

d) Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (Mollenhauer y Totten, 1971)

Los bloques con material interesante observado en cortes semifinos se recuperaron y se prepararon para cortes ultrafinos, que se colocaron en las rejillas de cobre de 150 mesh cubiertas con formvar. Para realizar los cortes ultrafinos a 50 nm se utilizó el ultramicrotomo LEICA EM UC6, los cuales se contrastaron con acetato de uranilo alcohólico por 10 minutos y luego en acetato de uranilo acuoso por 10 minutos esto en una cámara húmeda y oscura. Posteriormente se enjuagó con aproximadamente 50 ml de agua destilada y se colocó en citrato de plomo por 10 minutos en presencia de grageas de hidróxido de sodio para capturar el CO₂ de la atmósfera y se procedió a enjuagar con agua destilada y posteriormente a su observación en el microscopio electrónico de transmisión.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Daños estructurales

1.1. Microscopia electrónica de barrido

1.1.1. *Abies religiosa*

Las observaciones en MEB demostraron que la superficie de las células epidérmicas de las hojas de un año del Desierto de los Leones, presentó degradación en la cutícula y en algunas células (Figura 10). Estos signos se dieron en forma progresiva en la misma hoja, encontrando en la zona basal un mayor daño, respecto a la parte media y al ápice, tanto en el haz como en el envés. En el envés se observó que tapones de cutina, se encuentran en la cavidad de los estomas y en las hojas que tuvieron descutinización se notaban algunas cavidades sin ellos (Figura 10C).

La vegetación del Desierto de los Leones que está expuesta a una larga exposición de contaminantes oxidantes tienen cambios en su estructura como lo reportan otros autores, en bosques con diferente vegetación (Günthardt-Goerg, 1986; Karku y Huttunen, 1986). La degradación de la cutícula observada en las muestras de *Abies religiosa* en el Desierto de los Leones proporciona un método de detección de los efectos de la contaminación atmosférica como ha sido propuesto por Fowler et al., (1980) y Godzik, (1982)), también por lo que se observó como una ligera descutinización en las hojas de *Abies* de un año del ININ (Figura 10 B y D).

Los daños observados al MEB en la base de la hoja de *Abies religiosa* de un año del Desierto de los Leones demostraron una descutinización grave (Figura 10 C), en comparación con la parte media de la hoja del ININ (Figura 10 D).

La disminución del espesor cuticular y la reducción en la superficie de la cera que se observaron claramente en las muestras de *Abies religiosa* del Desierto de los Leones (Figura 10 A y C), coincide con lo reportado por Garrec y Kerfourn (1989) y Percy et al., (1992) para otras especies. Y comparados con las muestras del ININ, se aprecia que éstas tienen el daño apenas perceptible (Figura 10 B y D), lo cual corresponde a las observaciones de las micrográficas ópticas donde se observa la disminución del espesor cuticular (Figura 13). Este hallazgo permite un diagnóstico rápido de daño al observar muestras de hojas al MEB y aún al microscopio estereoscópico.

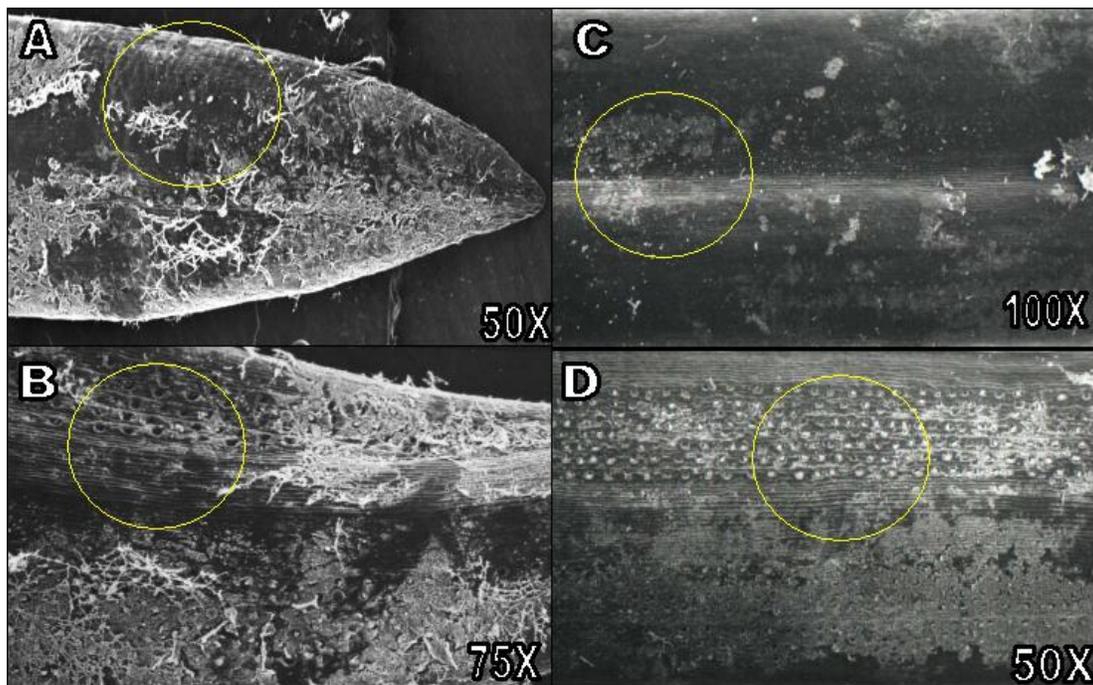


Figura 10. *Abies religiosa* de un año de edad. Del DL. A) Parte apical de la hoja, donde se muestra la descutinización de la misma (círculo), así como la presencia de hifas (flecha) 50X; B) Parte del envés en la base de la hoja en la cual se muestra la ausencia de los tapones de cutina y la descutinización de la misma (círculo), 75X. Del ININ. C) Zona donde hay descutinización ligera en la región media de la hoja (círculo), 100X; D) Se observa la presencia de tapones de cutina y ligera descutinización en la región media de la hoja (círculo), 50X.

1.1.2. *Baccharis conferta*

Los daños observados al MEB en las hojas de *Baccharis conferta* del Desierto de los Leones demostraron la pérdida de cutícula y el deterioro de tricomas glandulares en el haz de la misma y en el envés la pérdida de los tricomas glandulares y la descutinización, así como la presencia de hifas en ambos lados (Figura 11 A y B), en el caso del ININ se notaron los mismos síntomas pero en grado menor como se observa en la figura 10 C y D.

Se observó que en las hojas de *Baccharis conferta* del Desierto de los Leones hubo la pérdida de tricomas glandulares (Figura 11). Los daños presentes en las hojas de *Baccharis conferta* concuerdan con los que se encontraron en otras especies de la vegetación del parque, como en: *Cupressus lusitanica*, *Senecio barba johannis*, *Quercus rugosa*, *Juniperus*, *Nicotiana glauca*, entre otras. Las plantas de *Baccharis* y otras arbustivas presentaron un daño en las hojas que es mayor en las que se encuentran cercanas a la base del arbusto y gradualmente menor hacia el ápice del mismo y del centro hacia afuera. Este daño concuerda con algunos de los reportados en estudios de daño visible en diferentes especies de plantas (Vollenweider y Günthardt-Goerg, 2005).

En las hojas de *Baccharis conferta* del ININ se observó una descutinización ligera pero la presencia de hifas tanto en el haz como en el envés, lo cual puede deberse a la mayor humedad y sombra del bosque (Figura 11).

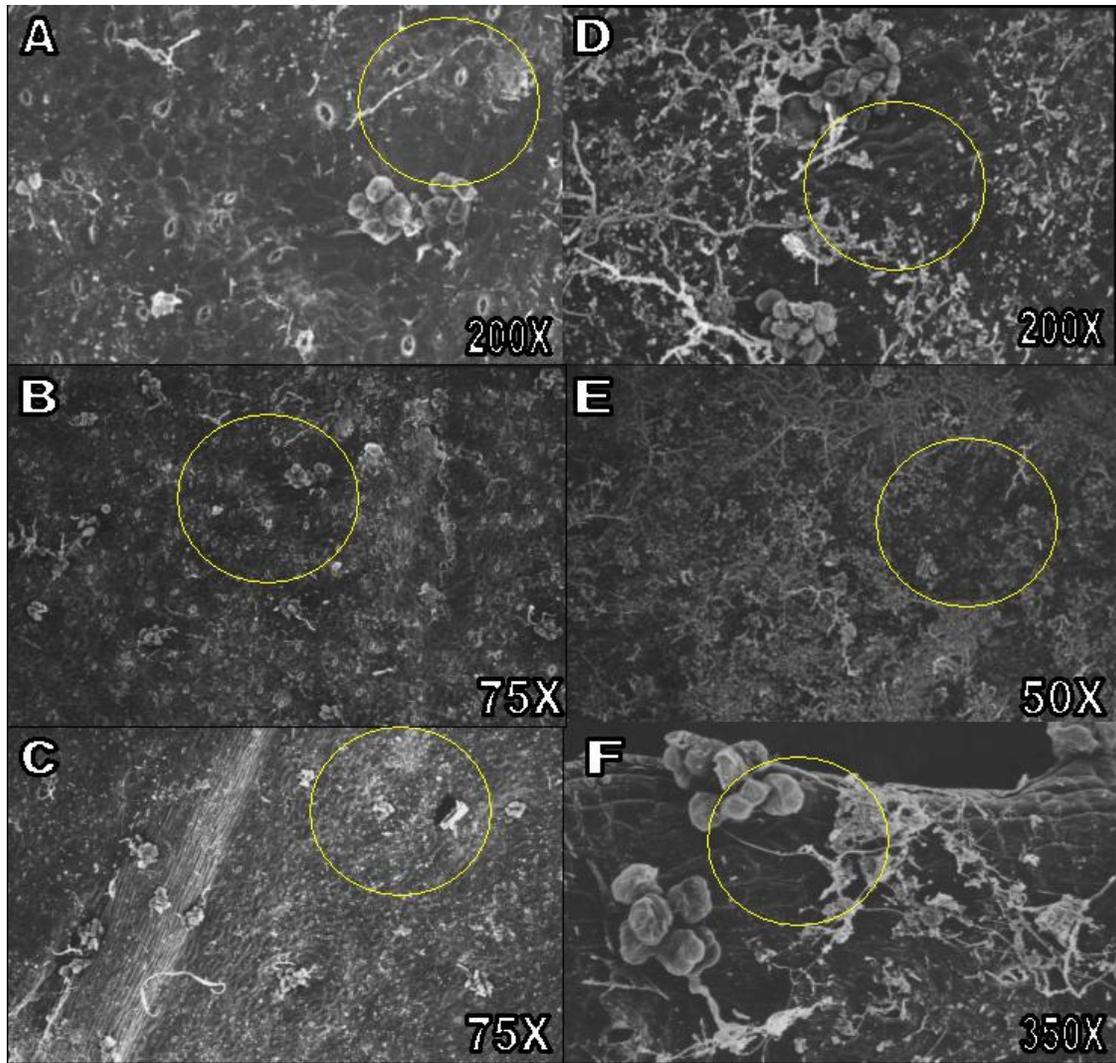


Figura 11. Hoja de *Baccharis conferta*. Del DL. A) Se muestra la descutinización de la hoja, la presencia de tricomas glandulares y la apertura de estomas en el haz (círculo), 200X; B) Zona de descutinización con tricomas glandulares en el haz de la hoja (círculo), 75X. C) Zona de descutinización en el envés de la hoja, así como la presencia de tricomas glandulares y hifas (círculo), Del ININ. D) Descutinización del haz de la hoja con abundancia de hifas (círculo), 200X; E) Descutinización de la hoja en el haz de la hoja y la presencia de hifas (círculo), 50X. F) Se muestra la zona de descutinización del envés de la hoja y los tricomas glandulares (círculo), 350X.

1.1.3. *Buddleia cordata*

En *Buddleia cordata* las observaciones mostraron la presencia de canales de secreción en la región de la base del haz de la hoja (Figura 12). Se encontraron tricomas glandulares y estelados, en las dos caras de la hoja, siendo numerosos en el envés de la misma, en donde se encontraron también a los tricomas candelariformes y estomas hundidos. En el Desierto de los Leones la descutinización de la epidermis en el envés y la pérdida de tricomas permitió la observación más clara de los canales de secreción (Laticíferos). La reducción de tricomas fue más evidente en los candelariformes y en algunas zonas se notó una ruptura en la epidermis del envés en la parte media de la hoja (Figura 12 D), lo cual correspondió con lo observado en microscopía óptica.

En el caso de *Buddleia cordata* del ININ no se observaron daños relevantes, sólo una ligera descutinización y en la región media de la hoja se notó una reducción de tricomas glandulares en el envés de la misma en comparación con la región de la base (Figura 12)

En la porción media de la hoja de *Buddleia cordata* del Desierto de los Leones se notaron la pérdida de tricomas estelados en el haz de la misma en comparación con las muestras del ININ, esto se repitió en el envés de la hoja principalmente en el Desierto de los Leones donde los candelariformes fueron los que se encontraban en menor número (Figura 12).

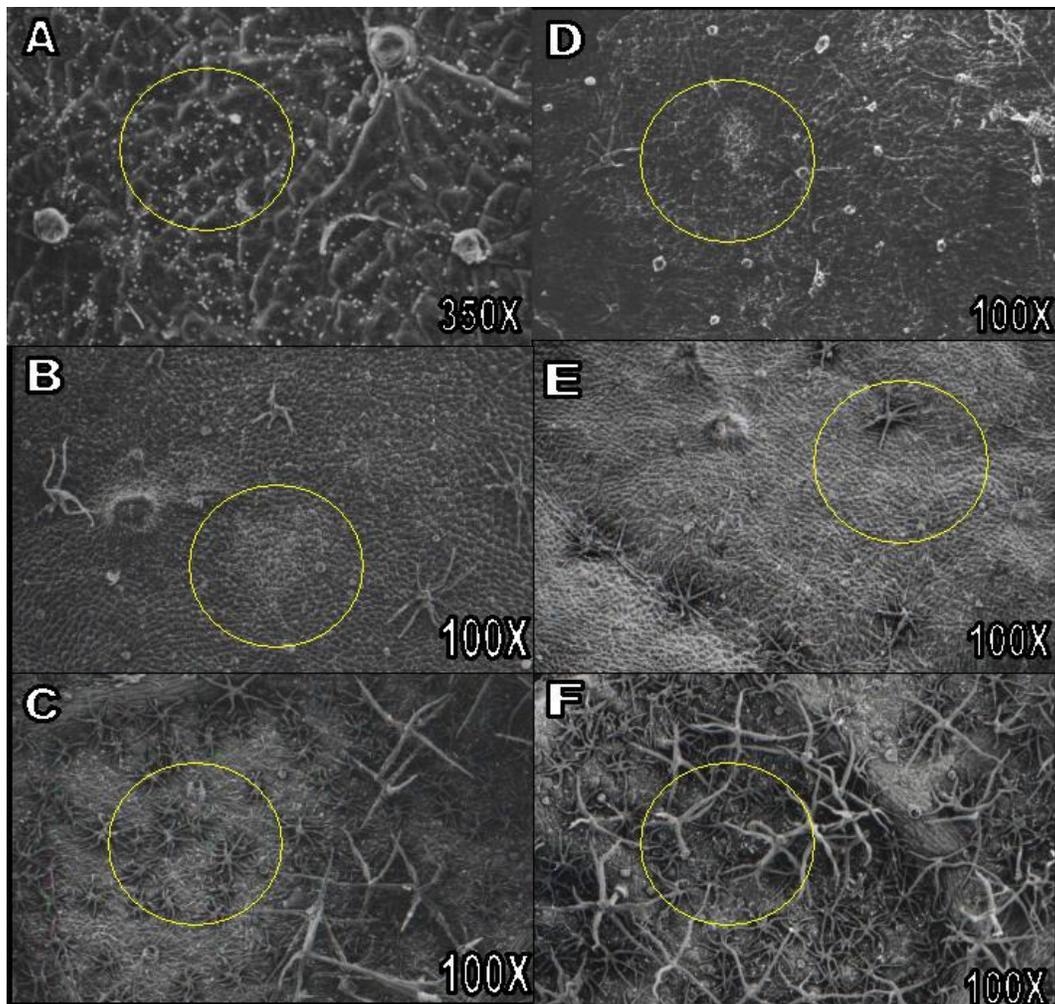


Figura 12. Hoja de *Buddleia cordata*. Del DL. A) Zona de descutinización con tricomas glandulares (círculo), 350X; B) Descutinización de la hoja con tricomas estelados atrofiados (círculo), 100X; C) El círculo muestra una zona donde se observa ausencia de tricomas candelariiformes, 100X. Del ININ. D) Zona donde se observa descutinización y tricomas glandulares y estelados (círculo), 100X; E) Se observa un tricoma estelado en buen estado (círculo), 100X; F) Se observa una distribución uniforme de los tricomas candelariiformes (círculo), 100X.

Tipo de daño	Grado de daño estructural (MEB)						Reportes relacionados con los tipos de daño
	ININ			Desierto de los Leones			
	<i>Abies religiosa</i>	<i>Baccharis conferta</i>	<i>Buddleia cordata</i>	<i>Abies religiosa</i>	<i>Baccharis conferta</i>	<i>Buddleia cordata</i>	
Descutinización	*	*	*	***	**	**	Fowler et al., 1980; Godzik, 1982; Tukey, 1984; Riding y Percy, 1985; Baker y Hunt, 1986; Garrec y Kerfourn, 1989; Percy et al., 1992;
Daños en el estoma	*	-	-	***	-	*	Tuovinen et al., 1999.
Perdida de tricomas candeliformes y estelados	-	-	*	-	-	**	
Perdida de tricomas glandulares	-	*	*	-	**	**	

Cuadro 2. Tipo y Grado de daños visibles con MEB en las tres especies de plantas estudiadas en el Desierto de los Leones y en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Grado de daño ligero (*), medio (**), severo (***), – (no presenta).

1.2. Microscopia óptica

1.2.1. *Abies religiosa*

En *Abies religiosa* del Desierto de los Leones en la región media de la hoja se observó una acumulación de taninos en las células del parénquima en empalizada y en las del parénquima esponjoso, algunas de éstas sin contenido celular (Figura 13).

En los cortes transversales de las hojas de *Abies religiosa* se apreció que la epidermis se encontraba engrosada, y algunas células del floema estaban colapsadas. Otros signos de daño en *Abies religiosa* incluyeron una reducción drástica en el citoplasma junto a una acumulación de compuestos fenólicos en la vacuola; principalmente en las células del parénquima en empalizada, lo que concuerda con lo encontrado por Alvarado-Rosales et al., (1993). La acumulación progresiva de estos compuestos está asociada con la necrosis de esas áreas (Figura 13).

El parénquima en empalizada es el primer tejido que es alterado. El daño puede involucrar plasmolisis y necrosis (Figura 13). El primer síntoma anatómico es una alteración celular con la separación del plasmalema de la pared celular, y la degradación del protoplasto. Estas alteraciones se notaron en *Abies religiosa* (Figura 13), lo cual se ha descrito para la vegetación con exposición aguda a ozono y otros contaminantes atmosféricos (Thomson et al., 1966).

Se observó un incremento de espesor de las paredes celulares epidérmicas y la lignificación de las mismas, lo que puede proporcionar una barrera a la captación de ozono y la protección más eficiente contra el daño, al limitar el flujo de ozono a través de la superficie. La acumulación de

lignina observada en la pared celular de las hojas de *Abies religiosa* mostró ser una barrera al ozono que protege al plasmalema y al contenido interno de las células (Moldau, Bichele y Hube, 1998; Sandermann et al., 1998) (Figura 13).

En la región media de las hojas de *Abies religiosa* provenientes del Desierto de los Leones, se observaron células del parénquima esponjoso sin contenido celular, con un depósito rojo de lignina (Figura 13). De acuerdo a Sutinen y colaboradores (1990), estos eventos son resultado de la contaminación por ozono y cada uno de ellos tiene su origen en cambios en la permeabilidad del plasmalema. En el caso particular de este estudio, se puede suponer que las alteraciones celulares de *Abies religiosa* que involucran al protoplasma y al plasmalema son causadas por contaminantes oxidantes atmosféricos y que las células de parénquima en empalizada son las primeras en sufrir daño debido a la exposición de las mismas a la radiación solar.

Los daños en las células del mesófilo, se caracterizaron por la degradación del citoplasma, incluyendo los cloroplastos, lo que derivó en el cambio de color a tonalidades blanquecinas en la hoja en forma de puntos ó manchas. Se ha sugerido que los metabolitos inducidos por el ozono dan lugar a un estrés endógeno, que subsecuentemente, se expresa como daños visibles en las hojas. El ozono activa la biosíntesis de lignina (Alvarado-Rosales et al., 1993) y la acumulación de la misma, lo cual resulta en modificaciones de la pared celular (Figura 13). Tales características resultantes de la exposición al ozono se pueden considerar como marcadores a largo plazo (Schneiderbauer et al., 1995; Langebartels et al., 1998). Considerando lo anterior, se puede asumir a *Abies religiosa* como bioindicador a largo plazo. Esto también puede corresponder a la forma de vida y a las características de las hojas, *Abies religiosa* posee una densa capa de cutícula, muchos

antioxidantes y la forma acicular de la hoja y la distribución de los estomas en el envés, así como la condición de los mismos la hacen más resistente a cargas de ozono continuas.

En *Abies religiosa* del Desierto de los Leones los compuestos fenólicos observados en los tejidos dañados de la hoja son en forma de cristales densos y reticulares que llenan la vacuola y como depósitos en la pared celular de células necrosadas, como lo observó Alvarez (1996) en sus estudios en el Desierto de los Leones (Figura 13).

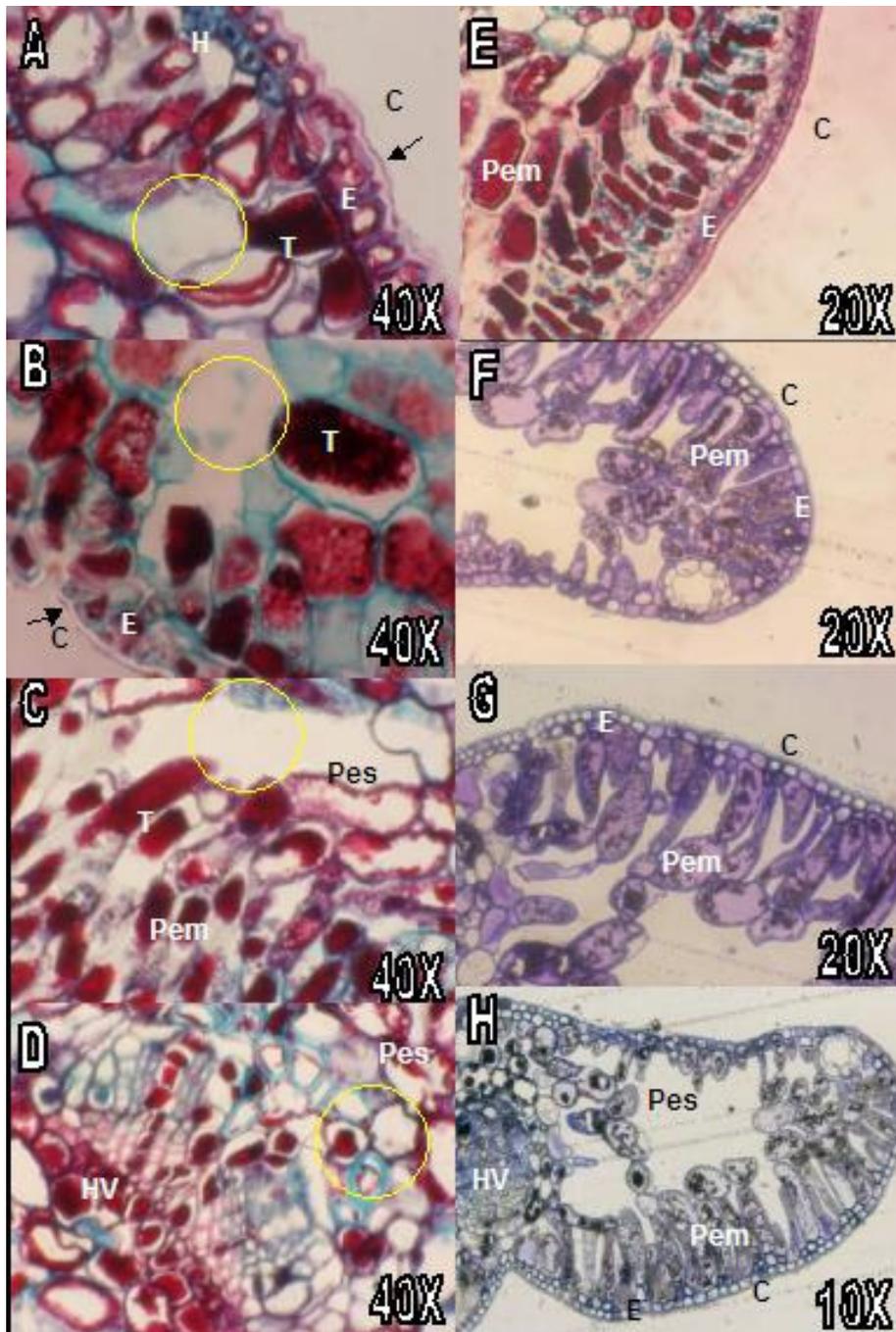


Figura 13. *Abies religiosa* de un año de edad en un corte de la región media. DL, A) Se observa pérdida de taninos en algunas células, engrosamiento de las paredes y adelgazamiento de la cutícula; B) Se observa acumulación de taninos en las células de parénquima en empalizada y esponjoso, así como adelgazamiento de la cutícula (círculo). C) Algunas células del parénquima esponjoso sin contenido celular (círculo). D) Células del parénquima esponjoso y del haz vascular central sin contenido celular (círculo), 40X, corte transversal en parafina, SVR. ININ, E, F, G y H) No muestran alteración celular en los diferentes tejidos de la hoja, 20X, 20X, 20X y 10X, respectivamente, corte transversal en parafina, SVR; Epon, Azul de Toluidina. E (Epidermis), C (Cutícula), H, (Hipodermis), T (Taninos), Pem (Parénquima en empalizada), HV (Haz Vascular), Pes (Parénquima esponjoso).

1.2.2. *Baccharis conferta*

Los daños observados con microscopía óptica en las hojas de *Baccharis conferta* del Desierto de los Leones fueron generalmente en la periferia de los haces vasculares y extendiéndose hacia el mesófilo con acumulación de lignina (Figura 14). También fue mayor en la cara adaxial, notándose como acumulaciones de lignina y necrosis celular en algunas zonas.

Los cortes transversales y paradermales de hojas de *Baccharis conferta* mostraron daños en la periferia de los canales laticíferos (Figura 14). En las hojas de *Baccharis* se observaron también daños en los estomas de la cara adaxial, en las células oclusivas que mostraron presencia de compuestos fenólicos y de algunas hifas en la cavidad estomática (Figura 14).

Los daños por contaminantes oxidantes en las hojas de *Baccharis conferta*, pueden derivar de la alta producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en respuesta de la planta por eliminar la gran concentración de ozono, ya que se ha reportado que los peróxidos forman radicales libres (Logan et al., 1981), y causan alteraciones en el metabolismo celular. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede ser usado para identificar el estado fotoquímico de la atmósfera, debido a su efecto potencial de daño (Claiborn et al., 1993). Estas modificaciones son mayores en los extremos de las hojas, provocando alteraciones en los tejidos del mesófilo y propiciando la ruptura de la hoja (Figura 14).

Los daños en *Baccharis conferta* son diferentes a los descritos para *Abies*, pues en el primero aunque hay una degradación del protoplasto se mantiene la pared celular lignificada, en cambio en éstos la pared se colapsa y se presenta un desprendimiento del tejido.

Los daños crónicos fueron similares a los síntomas que se desarrollan en el proceso de envejecimiento natural, sin embargo, la senescencia foliar prematura es una consecuencia primaria de daño por ozono (Günthardt-Goerg y Vollenweider, 2006).

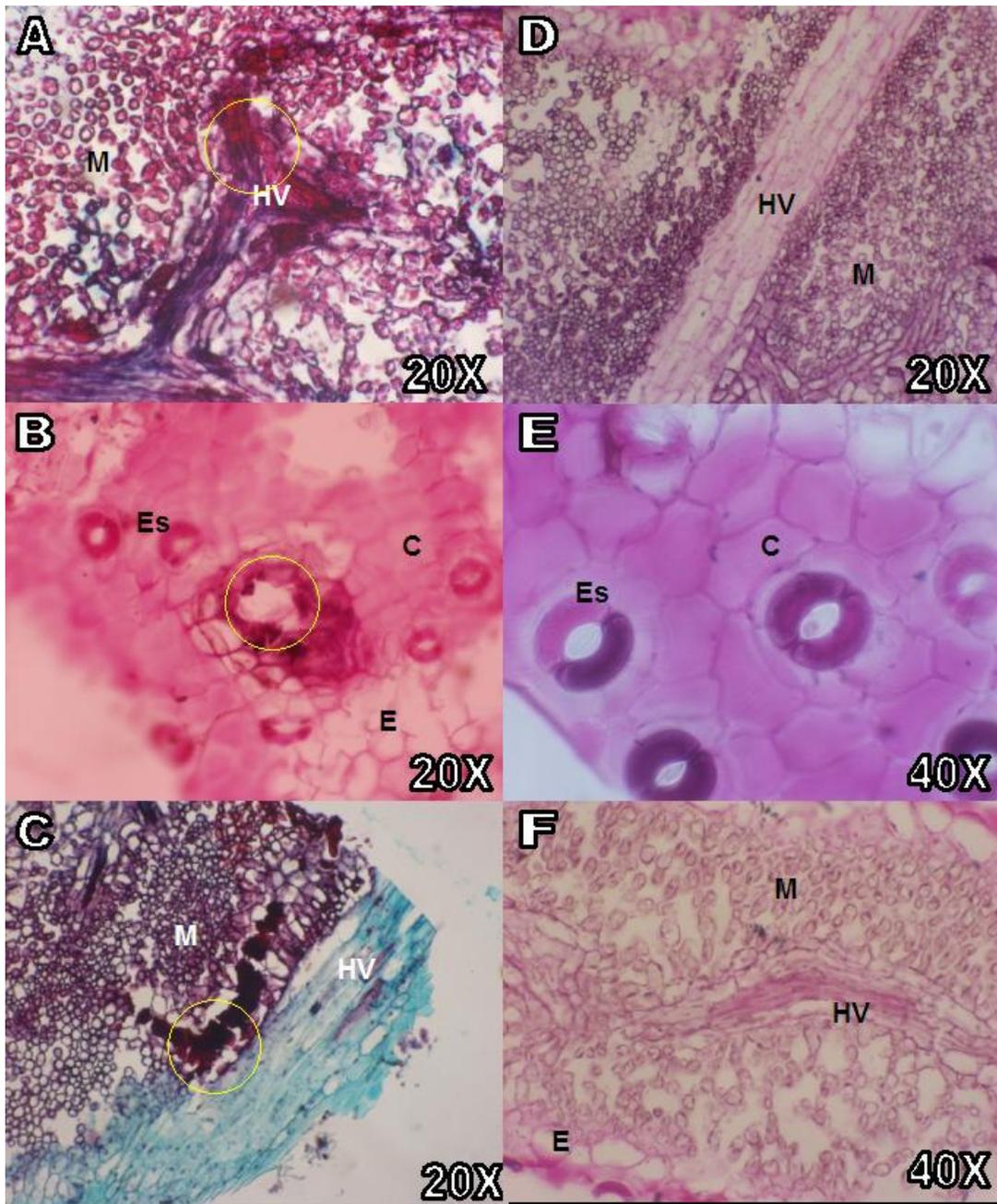


Figura 14. Hoja de *Baccharis conferta*. Cortes paradermales en parafina. DL. A, B y C) Daños en la periferia del haz vascular (círculo), A y C) 20X, SVR y B) 20X, APS. ININ, D, E y F) Los cortes no muestran cambios en el mesófilo ni en la periferia del haz vascular, D 20X, E y F 40X APS. HV (Haz Vascular), M (Mesófilo).

1.2.3. *Buddleia cordata*

En la hoja de *Buddleia cordata* del Desierto de los Leones se notaron signos visibles de daño progresivo desde la base hasta el ápice dependiendo de la edad. En zonas de primer contacto como son: la cutícula, la epidermis y parte del mesófilo en la cara adaxial de la hoja se observaron cambios en su estructura (Figura 15), también se observaron daños en las cavidades estomáticas de la hoja de lado abaxial notándose el inicio de alteraciones en el mesófilo, así como en la periferia del haz vascular central y en un extremo de la hoja (Figura 15).

Estos resultados concuerdan con los de Lucas et al., (1993) que establecen que hojas con células de mesófilo diferenciadas en parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, los síntomas de daño son conspicuas en el lado adaxial, aunque en el caso de tepozán también se encontró daño en la cara abaxial.

Los daños en *Buddleia cordata* del Desierto de los Leones muestran la misma secuencia de daño que en las otras especies estudiadas: desde la base hasta el ápice de la hoja, desde la base de la planta hasta su punta y de adentro hacia afuera de la cobertura de la copa, lo que está en relación con la edad de las hojas y de la planta.

Los síntomas de daño tales como necrosis, la pérdida de carbohidratos, y la producción de compuestos fenólicos, que son manifestados en árboles maduros, son mucho más severos en hojas de árboles jóvenes, proponiendo que los árboles menores de 5 años de edad de *Abies religiosa* del Desierto de los Leones son más sensibles a estrés oxidativo, que los árboles adultos. Esto también se puede asignar a formas de vida arbustiva y menores de un año como es el caso de *Baccharis conferta* y *Buddleia cordata* del Desierto de los Leones.

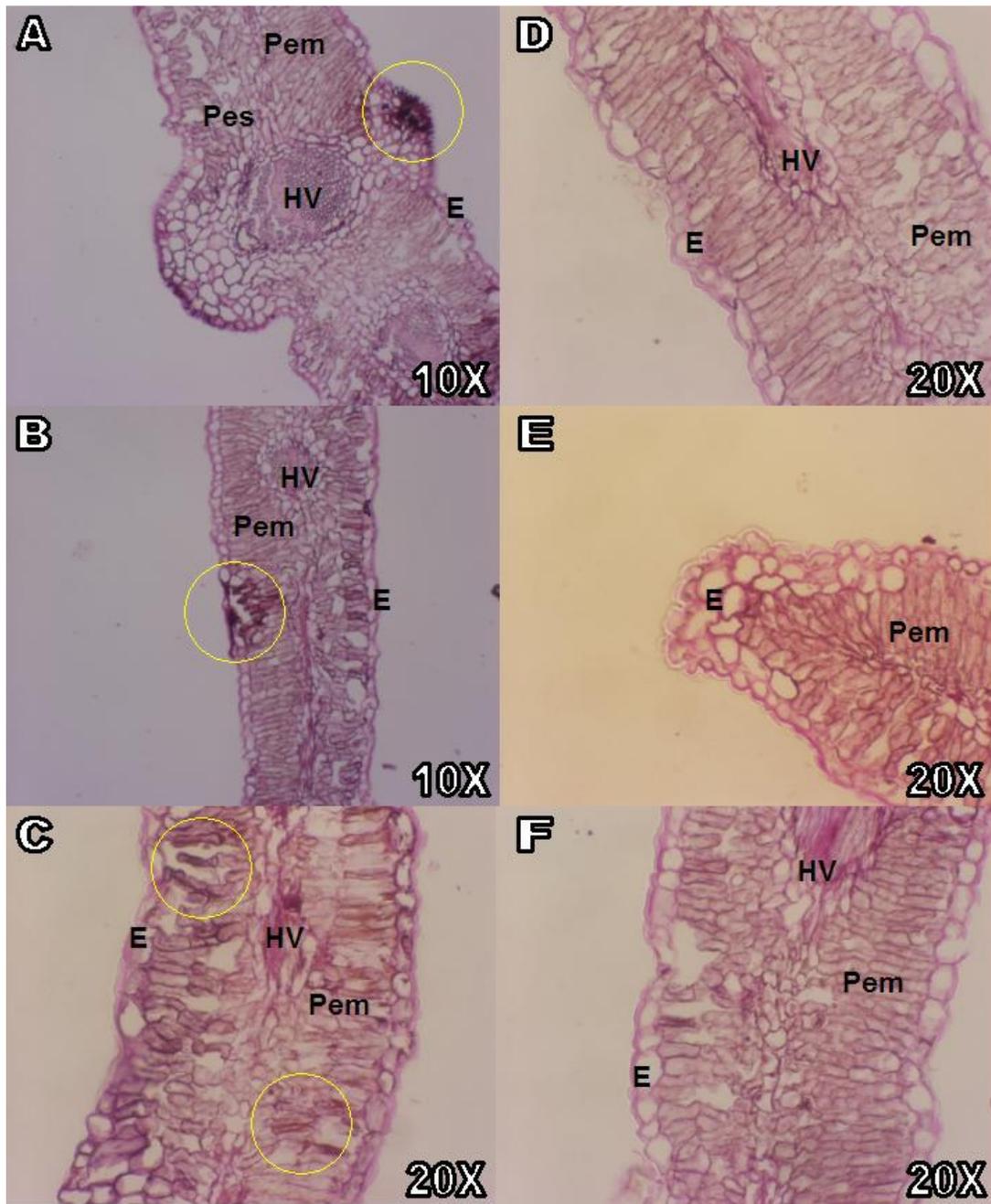


Figura 15. Base de la hoja de *Buddleia cordata*. DL. A, B y C) Se muestra el daño en la epidermis y parte del mesófilo del haz de la hoja (círculo), APS. ININ, D, E y F) No se notan daños en la epidermis, el haz vascular y el parénquima en empalizada, se nota una ligera irregularidad en la cutícula, sin que se tiña, APS. Corte transversal. E (Epidermis), Pem (Parénquima en empalizada), HV (Haz Vascular), Pes (Parénquima esponjoso).

Nivel	Tipo de daño estructural interno (MO)						Reportes relacionados con los tipos de daño
	Desierto de los Leones			ININ			
	<i>Abies religiosa</i>	<i>Baccharis conferta</i>	<i>Buddleia cordata</i>	<i>Abies religiosa</i>	<i>Baccharis conferta</i>	<i>Buddleia cordata</i>	
Cutícula	***	**	*	-	-	-	Fowler et al., 1980; Godzik, 1982; Garre y Kerfourn 1989; Percy et al., 1992; Tuovinen et al., 1999.
Epidermis	***	*	***	-	-	-	Günthardt-Goerg et al., 1993; Moldau et al., 1998; Pääkkönen et al., 1998; Sandermann et al., 1998.
Hipodermis	***	-	-	-	-	-	Moldau et al., 1998; Sandermann et al., 1998.
Parénquima en empalizada	***	**	**	-	-	-	Dugger y Ting, 1970a, b; Evans y Ting 1974a; Alvarado-R et al., 1993; Lucas et al., 1993; Warner, 1994; Alvarez, 1996; Alvarez et a., 1998; Günthardt-Goerg y Vollenweider, 2006.
Parénquima esponjoso	***	***	**	-	-	-	Sutinen et al., 1990; Lucas et al., 1993.
Haz vascular	*	***	*	-	-	-	Wellburn y Wellburn, 1994.

Cuadro 3. Tipo y Grado de daño visible con Microscopio óptico (MO) en las tres especies de plantas estudiadas en el Desierto de los Leones. Grado de daño ligero (*), medio (**), severo (***), – (no presenta).

2. Daños ultraestructurales

2.1. *Abies religiosa*

En *Abies religiosa* del Desierto de los Leones en hoja de un año las células del parénquima en empalizada muestran la degradación de mitocondrias en el citoplasma, la alteración de la organización de los tilacoides y de los granos de almidón en los cloroplastos, así como diferentes estados de condensación de los taninos en las vacuolas (Figura 16).

La degradación también se notó en el núcleo de algunas células. La organización de los taninos de las vacuolas pasó de compacto a reticular y laxo, lo que corresponde con diferentes etapas de degradación en el citoplasma. Se observaron peroxisomas en relación a los taninos en las etapas más avanzadas de degradación y el estroma de los cloroplastos con plastoglobuli claros y algunos cloroplastos sin membranas (Figura 16).

Se notó un aumento del tamaño de los granos de almidón que está asociado a la disfunción de los cloroplastos como fue reportado para otras coníferas (McQuattie y Schier, 1993; Wellburn y Wellburn, 1994; Kivimäenpää, 2003), pero no se encontró daño alguno en el haz vascular como lo reportan McQuattie y Schier, 1993 y Wellburn y Wellburn, 1994.

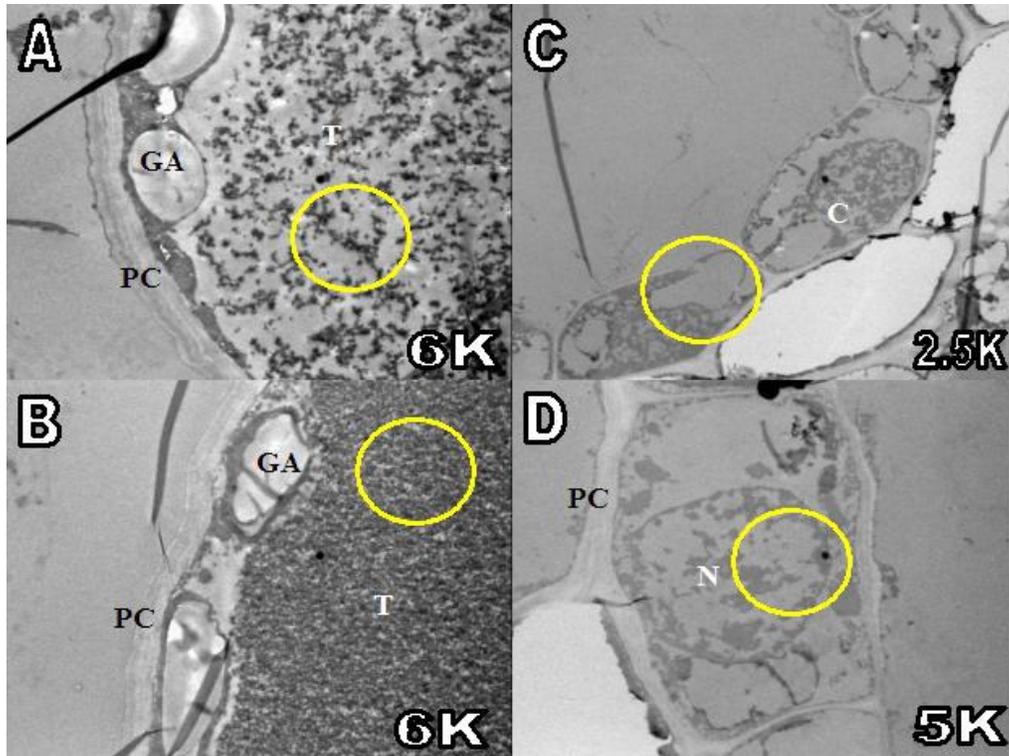


Figura 16. *Abies religiosa* de un año de edad. A y B) Células de parénquima en empalizada que muestran degradación de cloroplastos con grandes granos de almidón y diferentes estados de condensación de taninos en vacuola (círculo), 6K. C y D) Células de parénquima en empalizada muestra a los cloroplastos y núcleo en avanzado estado de degradación, 2.5K y 5K, respectivamente. T (Taninos), PC (Pared celular), GA (Granos de almidón), C (Cloroplasto), N (Núcleo).

En el haz vascular no se encontraron alteraciones notorias en las diferentes células, se observan engrosamientos de pared de las traqueidas que son característicos (Figura 17).

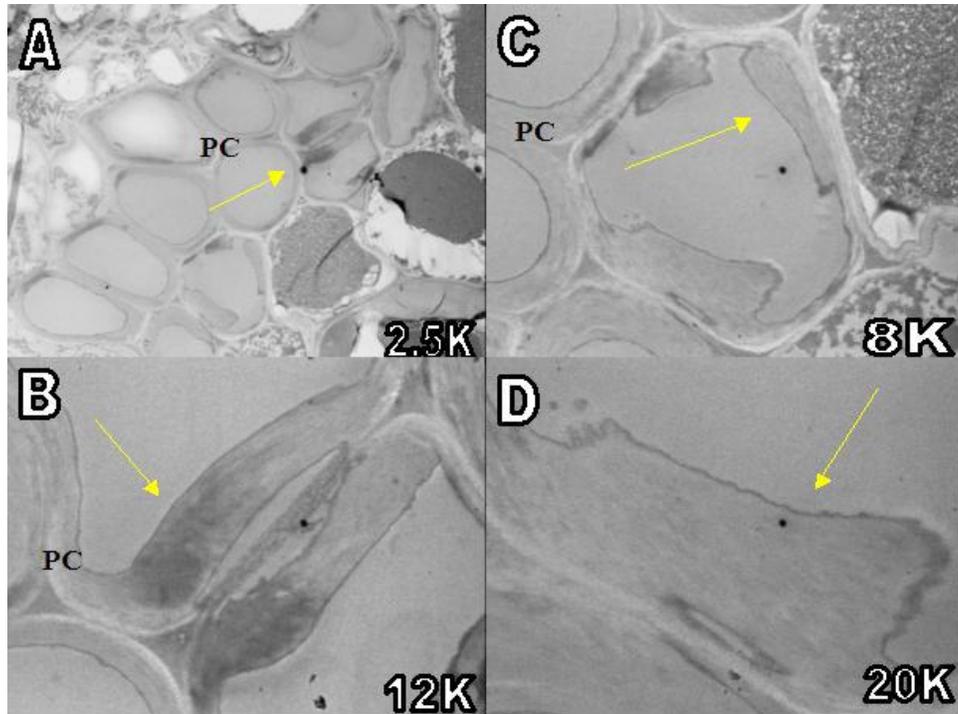


Figura 17. *Abies religiosa* de un año de edad. A, B, C y D) Componentes del haz vascular en estado normal, se observa traqueidas con los engrosamientos de pared característicos (flecha), 2.5K, 12K, 8K, 20K respectivamente. PC (Pared celular).

Las células del mesófilo mostraron menos daño, con la vacuola con taninos condensados, el núcleo en buen estado y sólo los cloroplastos en diferentes estados de degradación (Figura 18 E), algunos están íntegros con plastoglobuli claros (Figura 18).

Los cambios estructurales por efecto agudo de ozono incluyen la elongación y la desorganización de los cloroplastos, un incremento del depósito de taninos en las vacuolas y una disminución en la formación de almidón, pero en daño crónico se reporta la degradación de los taninos tomando un aspecto reticular o granular y en el caso de los cloroplastos la acumulación de grandes granos de almidón (Figura 18) (Karenlampi, 1986; Fincher J., y Alscher R., 1992).

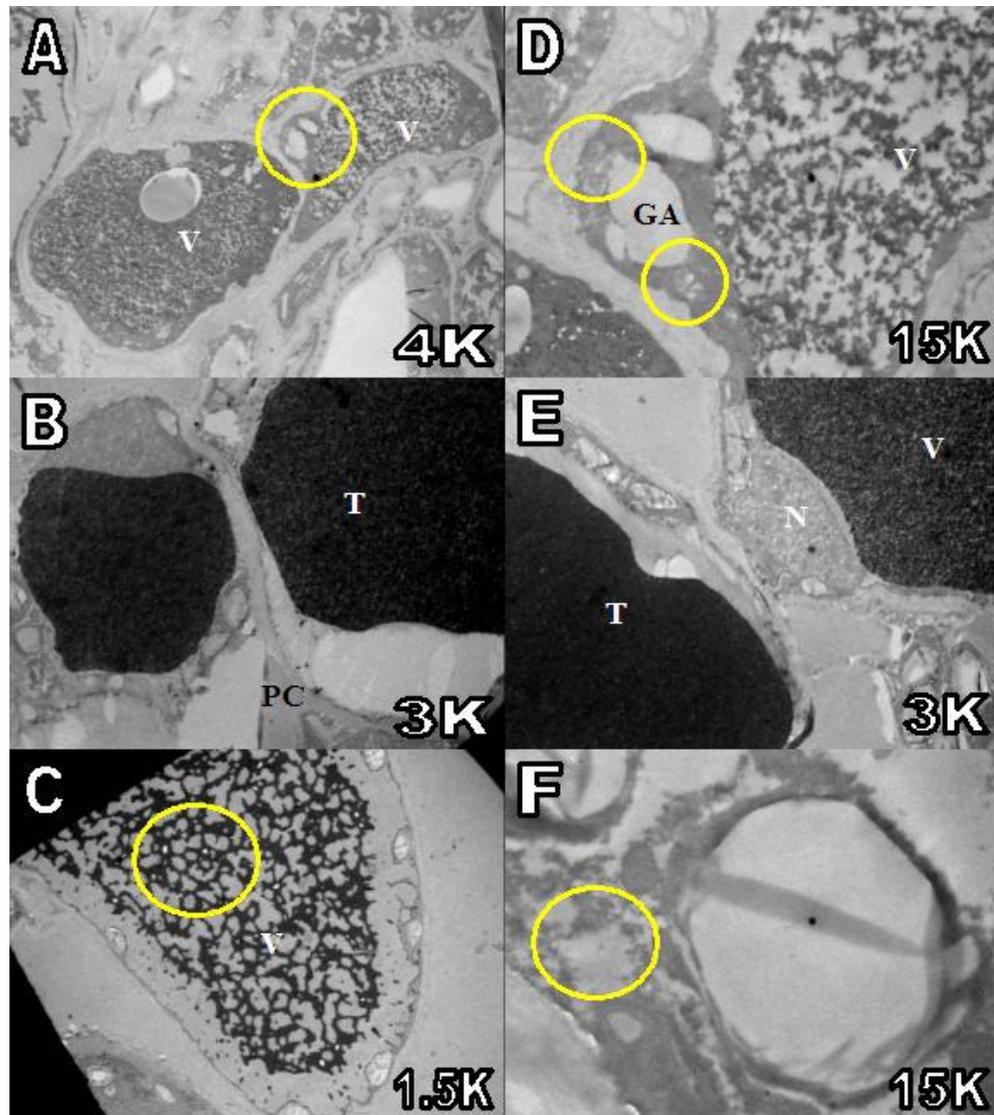


Figura 18. *Abies religiosa* de un año de edad. Células del mesófilo A) diferente estado de condensación de taninos y se observan plastoglobuli claros, 4K; B) Taninos condensados, se nota el citoplasma con partes sin contenido celular, 3K; C) El círculo muestra taninos en forma reticulada, se observa cloroplastos degradados con grandes granos de almidón 1.5K; D) Los círculos muestran plastoglobuli claros y grandes granos de almidón en el cloroplasto, la vacuola con taninos en una condensación laxa, 2.5K, E) Taninos en diferente condensacion, se observa el núcleo y algunos cloroplastos con diferente nivel de degradación, 3K y F) Se observan grandes granos de almidón con degradación en el cloroplasto (círculo), 15k. V (Vacuola), T (Taninos), N (Núcleo), PC (Pared celular), GA (Granos de almidón).

2.2. *Baccharis conferta*

En hojas de *Baccharis conferta* del Desierto de los Leones la clorosis observada está asociada con el deterioro de los cloroplastos y la reducción del contenido de clorofila en las células afectadas (Figura 19). Estas lesiones observadas corresponden a manchas cloróticas o al moteo como se observó en las hojas de las tres especies estudiadas del Desierto de los Leones, y como se ha reportado en otros trabajos (Alvarez et al., 1998; Alvarado-R et al., 1993). En el caso de especies latifoliadas las manchas por daño por contaminantes oxidantes presentan un patrón característico ¿Cuál? DECIRLO (Vollenweider y Günthardt-Goerg, 2006), observado en *Baccharis*.

Se observó en algunas células alteraciones a nivel de vacuola y cloroplastos, y en otras células las mitocondrias también presentan signos de degradación. En las vacuolas se observaron cuerpos lamelares con diferentes grados de complejidad lo cual indica un proceso de degradación de organelos por hidrólisis autofágica (Álvarez, 1996), observándose en algunas porciones en el límite de la vacuola y el citoplasma, junto con organelos en diferentes etapas de degradación (Figura 20).

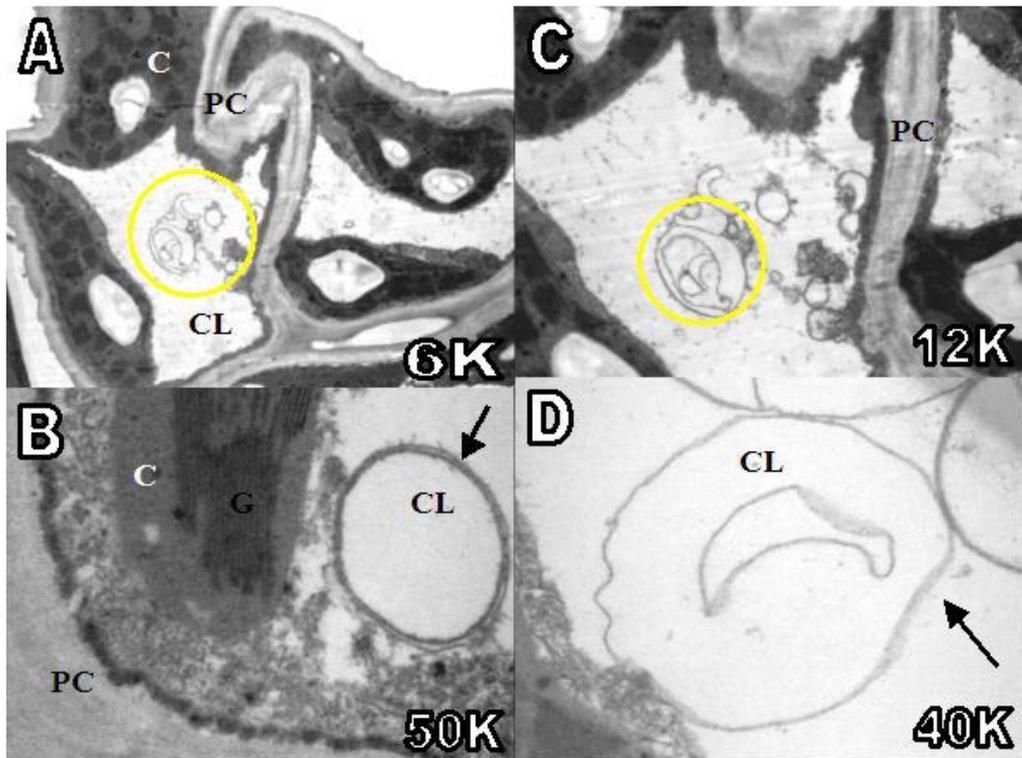


Figura 19. Hoja de *Baccharis conferta*. A) Células con vacuolas en las que se observa cuerpos lamelares con diferentes grados de complejidad (círculo), se observan cloroplastos con los grana en forma circular, 6K; B) Célula del mesófilo, el citoplasma y cloroplasto están en degradación formando cuerpos lamelares (flecha), 50K; C) Célula del mesófilo con cuerpos lamelares en diferentes grados de complejidad (círculo) y los organelos en proceso de degradación en el límite de la vacuola y el citoplasma, 12K; y D) Aumento de un conjunto de cuerpos lamelares junto a citoplasma (flecha), 40K.

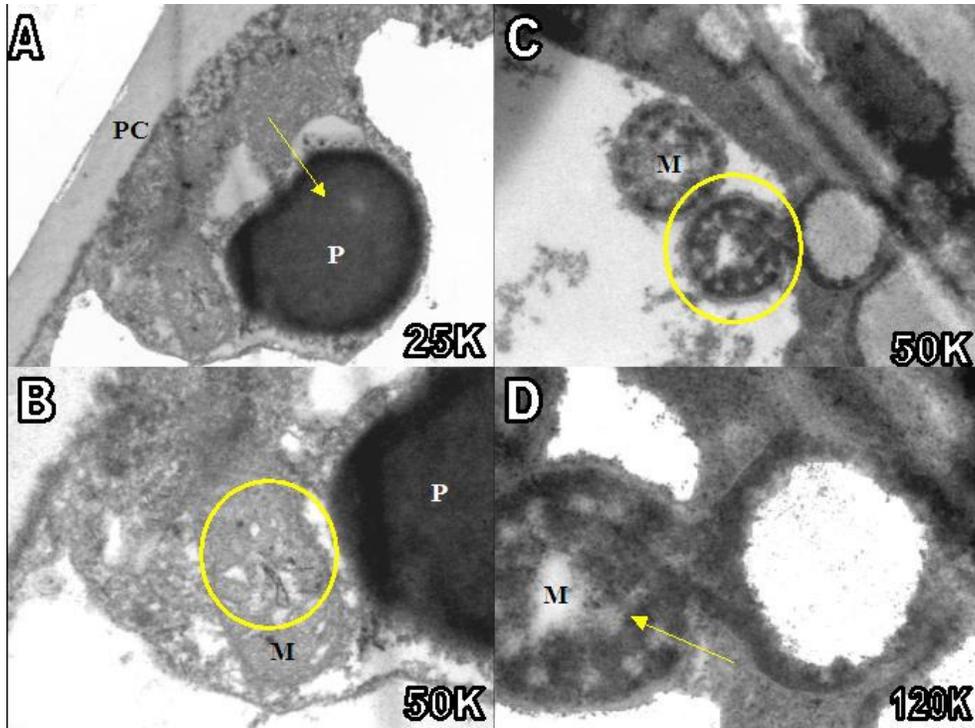


Figura 20. Hoja de *Baccharis conferta*. A y B) Mitocondria en fase de degradación (círculo) junto a un cuerpo denso que puede ser un peroxisoma producto de la exposición a oxidantes atmosféricos (flecha), 25K y 50K respectivamente; C y D) Mitocondrias dentro de la vacuola en proceso de degradación (círculo y flecha), 50K y 120K respectivamente. PC (Pared celular), M (Mitocondria), P (Peroxisoma).

Algunos cloroplastos mostraron una organización normal en sus tilacoides, el estroma y los granos de almidón, sin embargo, otros mostraron diferentes signos de daño entre ellos la presencia de cuerpos circulares a nivel de los grana que no correspondieron al apilamiento de tilacoides sino que aparentan una organización del estroma en forma globular en íntima relación con los tilacoides y no mostraron granos de almidón (Figura 21).

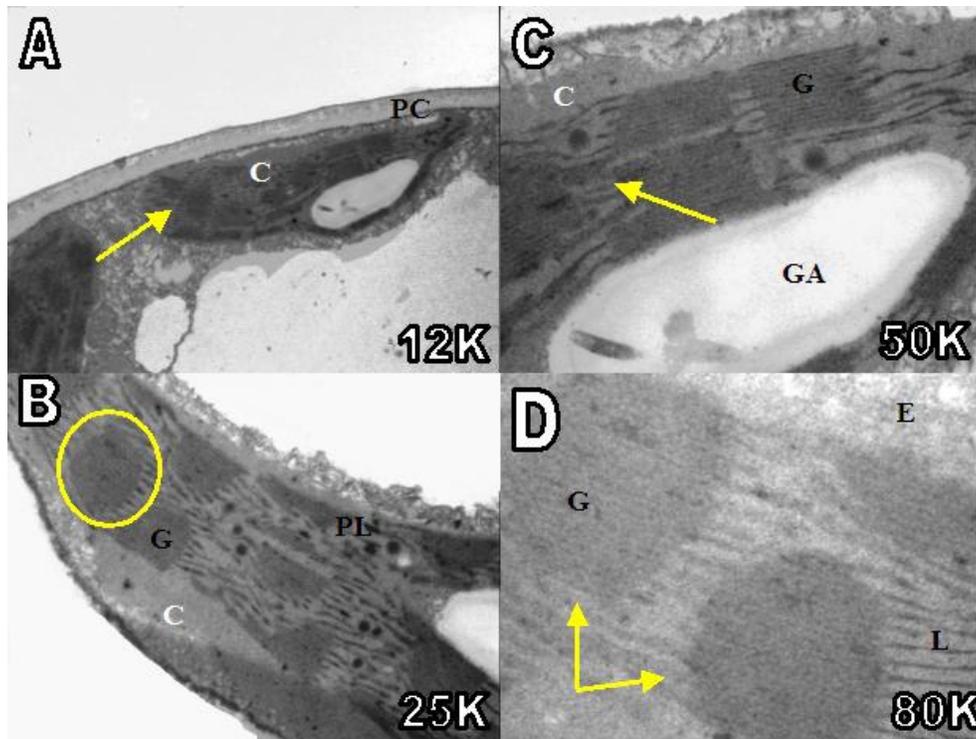


Figura 21. Hoja de *Baccharis conferta*. A) Cloroplasto con grana en forma circular (flecha) y con grano de almidón 12K; B) Ampliación de un grana circular en un cloroplasto que presenta plastoglobuli (círculo), 25K; C) Acercamiento a un cloroplasto en el cual se observan los grana con sus lamelas en forma normal y presenta plastoglobuli alrededor de los mismos, se nota un grano de almidón (flecha), 50K; D) Acercamiento de unos grana en forma circular (flechas), 80K. C (Cloroplasto), PC (Pared celular), G (Grana), GA (Grano de almidón), PL (Plastoglobuli), L (Lamelas).

En una célula se observó cloroplastos que presentaron puntos de fusión de membrana con mitocondrias, lo que puede representar una interacción directa de sus metabolismos, como sucede en la fotorespiración, Rodríguez-García y Sievers (1977) reportan estos puntos de comunicación entre cloroplastos y retículo endoplásmico en *Silla non-scripta* (Figura 22).

Las mitocondrias resisten más el efecto de los contaminantes oxidantes porque son las menos alteradas en las células en las que se notaron cambios en los cloroplastos y aun en aquellas células en las que se observó mitocondrias en contacto con vacuola, la degradación no era todavía tan profunda como en cloroplastos (Figura 22).

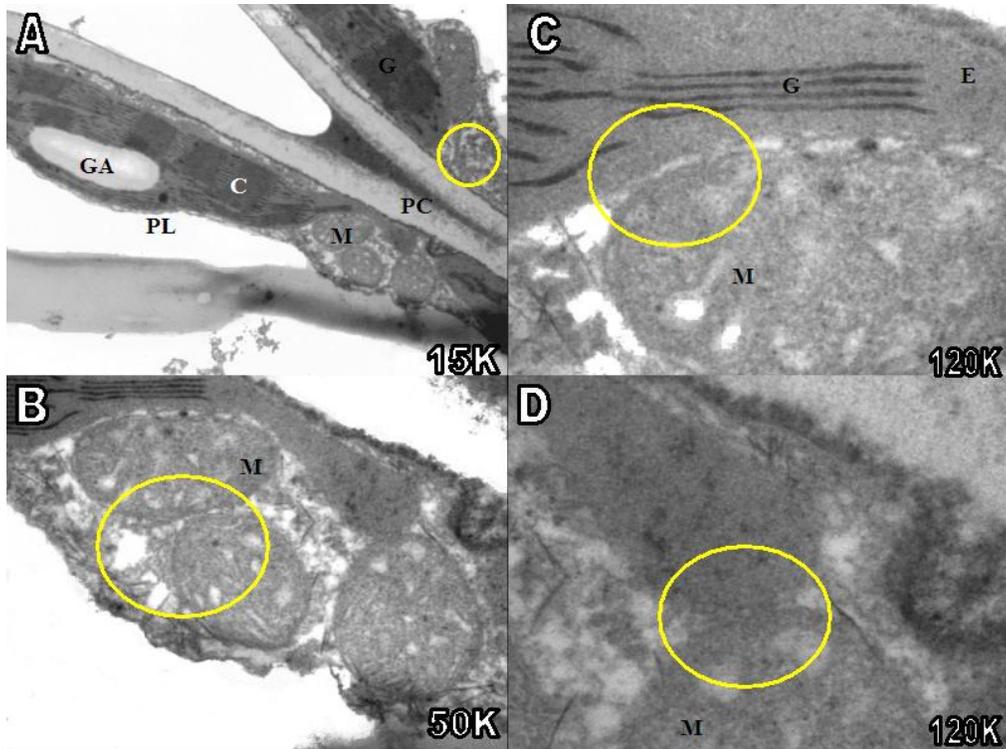


Figura 22. Hoja de *Baccharis conferta*. A, B, C y D) Se observa la fusión de membranas de cloroplasto con mitocondrias y entre éstas (círculo), 15K, 50 K, 120K y 120K respectivamente. GA (Grano de almidón), PL (plastoglobuli), C (Cloroplasto), M (Mitocondria), PC (Pared celular), G (Grana), E (Estroma).

2.3. *Buddleia cordata*

En *Buddleia cordata* (Tepozán) del Desierto de los Leones, los signos de daño aparecen más en las vacuolas que en el resto del citoplasma. Es frecuente encontrar cuerpos lamelares de diferentes formas y tamaños aun en células en las que se observan los cloroplastos y las mitocondrias en buen estado. En algunas células se observaron cloroplastos dentro de la

vacuola con principios de degradación, en otras los cloroplastos aparecen con cuerpos circulares densos en las zonas que corresponderían a los grana, similar a los observados en *Baccharis*, pero se distinguen los tilacoides del material denso que forma esos cuerpos globulares, dando la impresión de que se forman por la condensación del estroma en esos puntos, por efecto de daño y como consecuencia de inicio de degradación. En otros cloroplastos se observó la presencia de cuerpos globulares densos en los granos de almidón, que puede corresponder a lípidos condensados. En otros cloroplastos se observó la acumulación de plastoglobuli en un extremo de los mismos. También se observan alteraciones importantes en mitocondrias como es la separación notoria de la membrana interna y por lo tanto la pérdida de la organización de crestas o pliegues mitocondriales. Se observaron células íntegras en su citoplasma pero con las vacuolas presentando cuerpos lamelares y granulares en diferentes estados de organización. Se observó un cuerpo multilamelar cercano al citoplasma en fase de degradación. Sin embargo, el núcleo en buen estado con su nucleolo ambos sin signos de degradación (Figura 23).

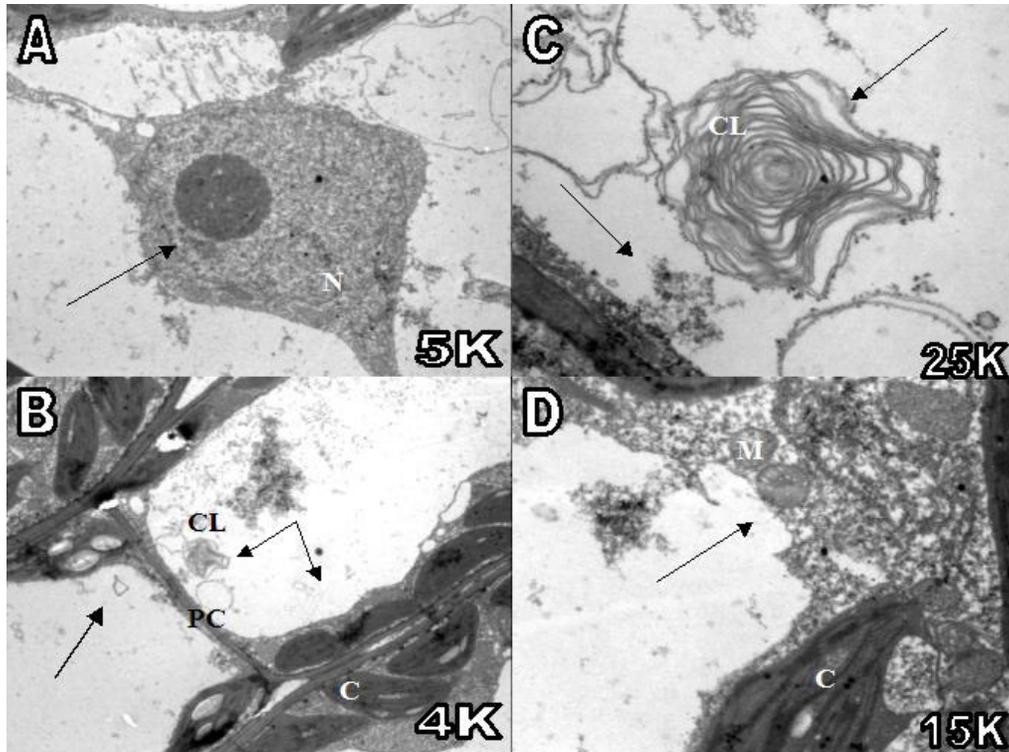


Figura 23. Hoja de *Buddleia cordata*. A) Núcleo con nucleolo sin signos de degradación (flecha), 5K; B) Células con cuerpos lamelares densos en la vacuola y citoplasma integro, 4K; C) Cuerpo multilamelar cercano a citoplasma en fase de degradación (flechas), 25K; D) Citoplasma vecino a vacuola en inicio de degradación (flecha), cloroplasto con plastoglobuli y un pequeño grano de almidón y mitocondrias en diferentes fases de degradación, 15K. N (Núcleo), CL (Cuerpo lamelar), PC (Pared celular), C (Cloroplasto), M (Mitocondria).

En otras células se observó daño avanzado el cual es notorio en el contenido de las vacuolas y la condensación de plastoglobuli en un extremo de los cloroplastos y algunos mostrando granos de almidón con lípidos condensados, un núcleo en degradación en una de las células, con nucleolo degradado y con un aumento de región fibrilar en su parte central (Figura 24).

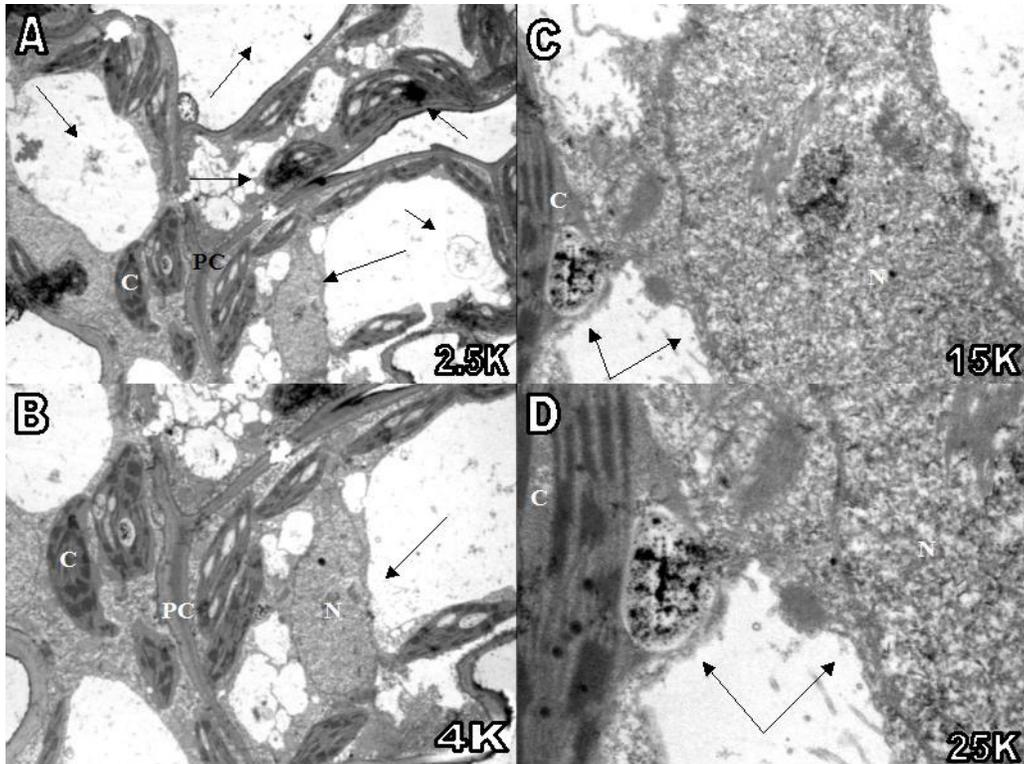


Figura 24. Hoja de *Buddleia cordata*. A) Células con daño avanzado notorio en el contenido de las vacuolas y condensación de plastoglobuli en el extremo de los cloroplastos (flechas), 2.5K; B) Detalle de una de las células con un núcleo en degradación, se nota en los cloroplastos grana en forma circular y acumulación de granos de almidón (flecha), 4K; C) Núcleo sin nucleolo y con aumento de región fibrilar, se observa en el cloroplasto un gran grano de almidón (flecha), 15k; D) Grano de almidón con lípidos condensados (flecha), 25K. C (Cloroplasto), PC (Pared celular), N (Núcleo).

Se observaron cloroplastos en diferentes fases de degradación con grana en forma circular y los tilacoides densos y gruesos, al igual que una interfase también gruesa. En otros se notó poca presencia de plastoglobuli y las lamelas de los grana no están presentes (Figura 25 A y B).

En esta especie también se encontró que las mitocondrias son las últimas que muestran daño evidente, notándose buen estado de las crestas y su doble membrana, sólo algunas en proceso de degradación junto con el citoplasma en fase de degradación (Figura 25 C y D).

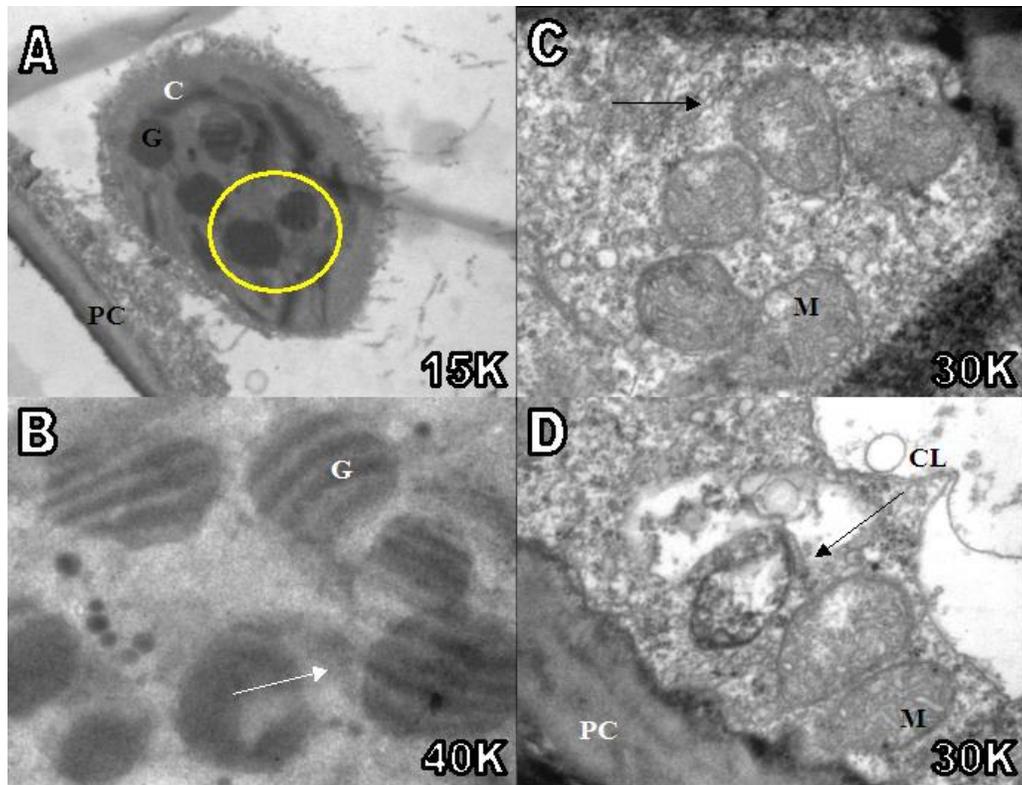


Figura 25. Hoja de *Buddleia cordata*. A y B) Cloroplasto en degradación que muestra grana de forma circular con los tilacoides densos y gruesos (círculo) y una interfase también gruesa (flecha), 15K y 40K; C) Conjunto de mitocondrias en buen estado (flecha), 30K; D) Conjunto de mitocondrias en proceso de degradación (flecha), 30K. C (Cloroplasto), G (Grana), M (Mitocondria), CL (Cuerpo lamelar), PC (Pared celular).

La formación de cuerpos lamelares en las vacuolas es abundante en diferentes células, así como la presencia de restos de organelos en degradación, observándose algunos cuerpos multilamelares y peroxisomas vecinos al citoplasma de células con un gran daño (Figura 26). Esta degradación corresponde a una autólisis la que se nombra autofagia, por que los organelos y citoplasma son introducidos a la vacuola y degradados. Los residuos de esta degradación se organizan en capas de tipo membrana produciendo los cuerpos lamelares, cuando la degradación es total se involucra también a la pared celular, por lo que queda espacios que en conjunto se nota en la hoja como orificios o partes vacías.

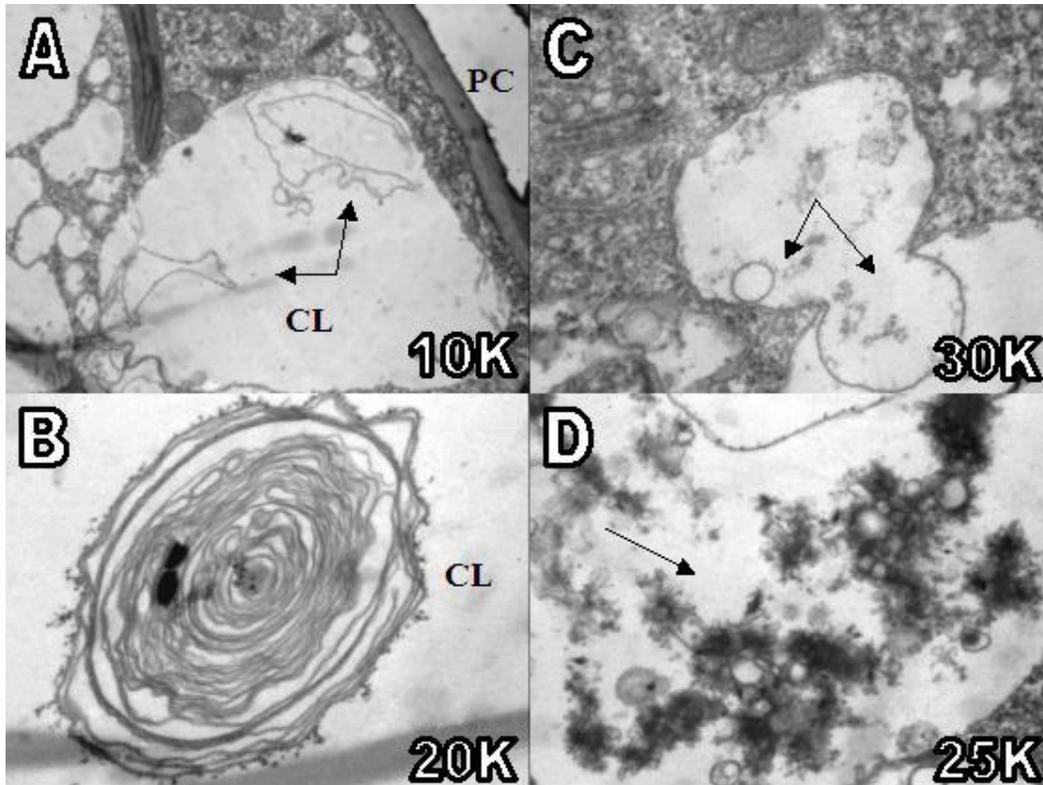
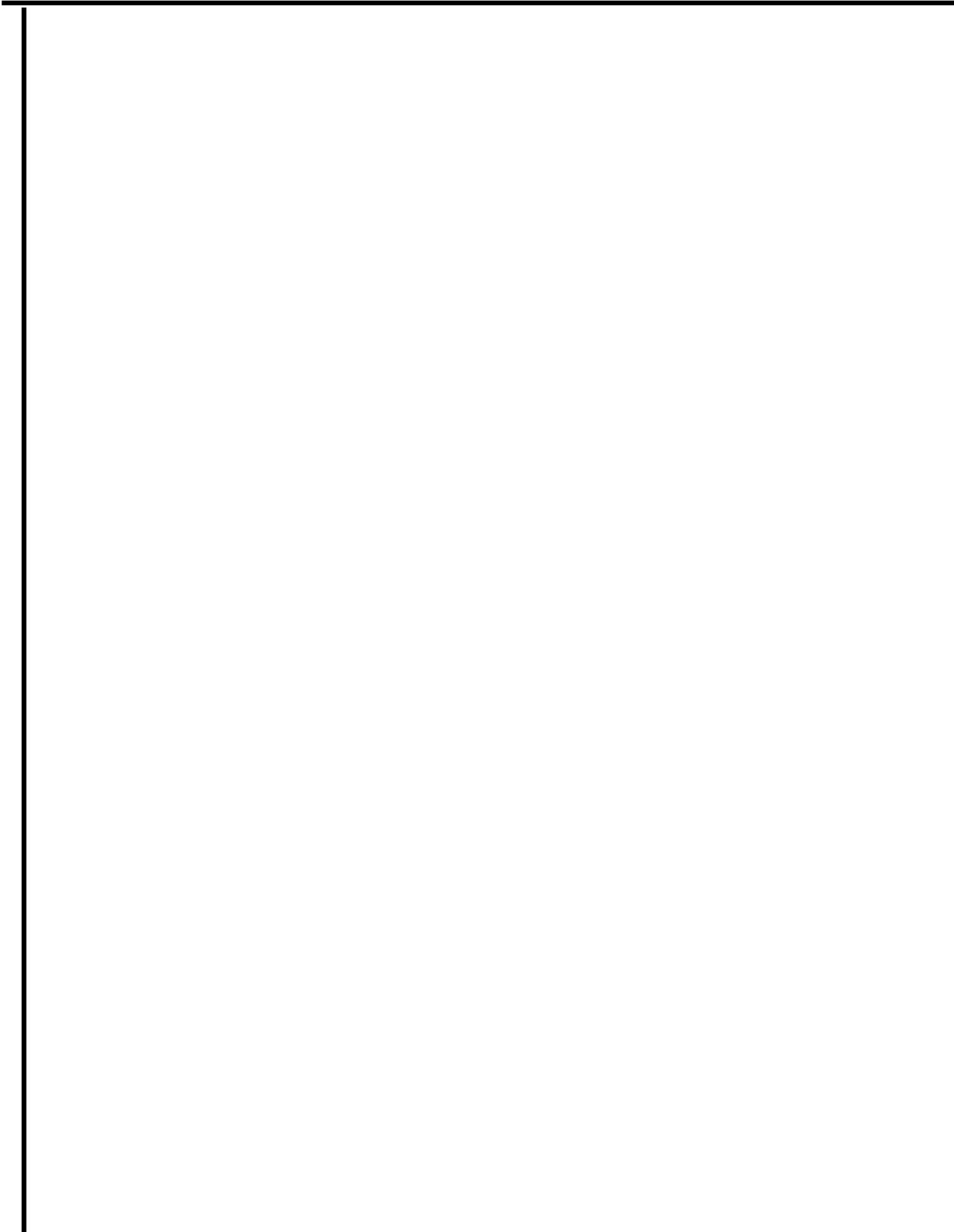


Figura 26. Hoja de *Buddleia cordata*. A) Cuerpos lamelares en una célula en fase de degradación (flechas), se observa un cloroplasto sin grana, 10K; B) Cuerpo multilamelar con restos del citoplasma, 20K; C) Formación de cuerpos lamelares en una parte de una célula en contacto con citoplasma (flechas), 30K; D) Restos del citoplasma en degradación (flecha), 25K. PC (Pared celular), CL (Cuerpo lamelar).



III. CONCLUSIONES

Abies religiosa: Desierto de los Leones y Parque Nacional Miguel Hidalgo

Las observaciones morfológicas con el microscopio electrónico de barrido mostraron la descutinización en las hojas, principalmente en la base de la misma, en comparación con las del Parque Nacional Miguel Hidalgo en las cuales también se percibió una ligera descutinización, pero en las hojas de mayor edad.

Este daño puede significar una alteración en el metabolismo de lípidos en las células epidérmicas y del parénquima en empalizada.

Los daños estructurales fueron principalmente pérdida de la cutícula, el engrosamiento de la pared celular de las células de los parénquimas en empalizada y esponjoso, con la acumulación de compuestos fenólicos como la lignina. En zonas con mayor daño se observó la desintegración del citoplasma, permaneciendo las paredes celulares lignificadas, lo que corresponde al moteo visible en las hojas.

Los cambios ultraestructurales se observaron principalmente en los cloroplastos en los cuales se percibió que los granos de almidón son muy grandes, en algunos con material lipídico denso, la desorganización de los grana y el estroma y el cambio en densidad de los plastoglobuli.

Esto puede ser la causa de la disfunción de los cloroplastos y la clorosis o el blanqueo de las hojas.

Las mitocondrias presentaron diferentes niveles de degradación paralelos a los cambios observados en las vacuolas, en donde los taninos presentes se encontraron con diferentes estados de condensación. Siendo los últimos en degradarse.

Baccharis conferta del Desierto de los Leones y Parque Nacional Miguel Hidalgo

Los daños morfológicos observados con el microscopio electrónico de barrido fueron principalmente la descutinización con pérdida de tricomas, con respecto a las muestras del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla.

Los daños estructurales se notaron principalmente en el mesófilo de la hoja con la presencia de lignina en las paredes, esto se pudo apreciar tanto en la zona de los haces vasculares como en la de los canales laticíferos, con algunas zonas vacías.

Los daños ultraestructurales se observaron en algunas porciones en el límite de la vacuola y del citoplasma con diferentes etapas de degradación de los organelos, en relación con la formación de cuerpos lamelares con diferentes niveles de complejidad.

Las mitocondrias presentaron alteraciones menos profundas que los cloroplastos en las muestras observadas.

Los cloroplastos presentaron cuerpos circulares a nivel de los grana, que los interpretamos como una organización del estroma en forma globular en íntima relación con los tilacoides y no mostraron granos de almidón. Esto representa una diferencia importante entre *Abies religiosa* y las especies latifoliadas.

Algunos cloroplastos presentaron puntos de fusión de membranas con las mitocondrias y entre ellos, lo que puede representar una interacción directa de sus metabolismos, en relación con la fotorespiración.

Buddleia cordata (Tepozán) del Desierto de los Leones y el Parque Nacional Miguel Hidalgo

Los daños observados en el microscopio electrónico de barrido mostraron descutinización, pérdida de tricomas glandulares, estelados y candelariformes, colapso de estomas en las hojas del Desierto de los Leones con respecto a las hojas del Parque Nacional Miguel Hidalgo y Costilla.

Los daños estructurales de las hojas del Desierto de los Leones fueron en el mesófilo de la hoja cercano a los haces vasculares, en las cavidades estomáticas y en los márgenes de las mismas, presentándose como acumulación de compuestos fenólicos y en algunas zonas como necrosis.

Los daños ultraestructurales de las hojas de tepozán del Desierto de los Leones mostraron cambios más evidentes en las vacuolas, en las que se mostró la degradación de organelos colindantes entre citoplasma y tonoplasto y una cantidad variable de cuerpos lamelares en diferentes estados de organización, producto de la degradación de organelos.

Los cloroplastos mostraron cambios principalmente en los grana y en el estroma representados por las zonas globulares densas que en los cortes aparecieron como círculos entre los tilacoides y el estroma.

Las mitocondrias mostraron daño solamente en etapas avanzadas de degradación.

Las hojas responden al ozono en diferente forma dentro de sus tejidos, debido a la estructura de las mismas y a su edad. Por esta razón *Abies religiosa* se podría tomar como un bioindicador de contaminación oxidante a largo plazo o para daño crónico, *Baccharis conferta* para mediano plazo y *Buddleia cordata* a corto plazo o daño agudo, dado que esta planta presentó un mayor indicio de daños visibles, estructurales y ultraestructurales.

Los daños visibles se mostraron desde puntuaciones blanquecinas, amarillas ocre hasta zonas necróticas, como moteado, que corresponde a la necrosis en la hoja principalmente en la cara adaxial, siendo mayor en la base y disminuyendo hacia el ápice de la misma en *Abies religiosa*.

Los daños visibles partieron de puntuaciones blanquecinas con una descutinización marcada en el envés de la hoja, en las especies latifoliadas y se observó pérdida de tricomas y alteración en la estructura de los estomas y un área mayor de daño.

Esta sintomatología provocada por las alteraciones celulares descritas, provoca una senectud precoz y una vulnerabilidad mayor a factores ambientales bióticos y abióticos de la vegetación del bosque sometido a contaminantes oxidantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Altimir, N. 2006. The ozone transfer between atmosphere and vegetation. A study on Scots pine in the field. *Dissertationes Forestales*. 28:1-54.
- Alvarado R. D., De Bauer J. L., y Galindo A. J. 1993. Decline of sacred fir (*Abies religiosa*) in a forest park south of Mexico City. *Environmental Pollution*. 80: 115-121.
- Alvarado-Rosales, D. Hernández-Tejeda, T. 2002. Decline of Sacred Fir in the Desierto de los Leones National Park. En: Urban Air Pollution and Forest, Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. Fenn, M. E. De Bauer, L. I., Hernández- Tejeda, T. (Eds). Springer-Verlag New York, Inc. pp. 243-260.
- Alvarez D. 1996. Determinación de alteraciones a nivel citológico e histoquímico en *Abies religiosa* (H.D.K.) Cham & Schl. del Desierto de los Leones del D. F. y su relación con el ozono. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Alvarez D., Laguna G., Rosas I., 1998. Macroscopic and microscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near Mexico City. *Environmental Pollution*. 103: 251-259.
- Anttonen S. Kärenlampi L. 1996. Slightly elevated ozone exposure causes cell structural changes in needles and roots of Scots pine. *Trees-Structure and Function* 10: 207-217.
- Anttonen S., Herranen J., Peura P., Kärenlampi L. 1995. Fattyacids and ultrastructure of ozone-exposed Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) needles. *Environmental Pollution* 87: 235-242.
- Anttonen S., Sutinen M.-L. Heagle A. S. 1996. Ultrastructure and some plasma membrane characteristic of ozone-exposed loblolly pine needles. *Physiologia Plantarum* 98: 309-319.
- Bozzola J.J., y Russell L. D. 1991. Electron microscopy: Principles and techniques. Jones and Bartlett Publisher, Inc. USA. 560 p.
- Cantoral, H., M. 1986. Comunidades liquénicas epifitas en *Abies religiosa* (H.B.K.) Cham & Schl., como indicadores de contaminación atmosférica en el Parque Cultural y Recreativo "Desierto de los Leones". Tesis de Biólogo. Escuela de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.
- Claiborn, C. S., et al., 1993. Transport and fate of reactive trace gases in Red Spruce Needles. 1. Uptake of gaseous hydrogen peroxide as measured in controlled chamber flux measurements. *Environmental Science Technology* 27: 2585-2592.

- Davis D. D., y Wood F. A. 1972. The relative susceptibility of eighteen coniferous species to ozone. *Phytopathology*. 62: 14-19.
- Dugger W. M., Jr. y Ting, I. P. 1970a. Air pollution oxidants-Their effects on metabolic processes in plants. *Annu. Rev, Plant Physiol*. 21: 215-234.
- Dugger W. M., Jr. y Ting, I. P. 1970b. Physiological and biochemical effect of air pollution oxidants on plants. *Recent Advan. Phytochem*. 3: 31-58.
- Evans L. S., y Leonard M. R. 1991. Histological determination of ozone injury symptoms of primary needles of giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum* Bucch.). *New phytol*. 117: 557-564.
- Evans L. S., y Miller P. R. 1972a. Ozone damage to ponderosa pine: a histological and histochemical appraisal. *American Journal of Botany*, 59: 297-304.
- Evans L. S., y Miller P. R. 1972b. Comparative needle anatomy and relative ozone sensitivity of four pine species. *Canadian Journal of Botany* 50: 1067-1071.
- Evans L. S., y Ting I. P. 1974. Ozone sensitivity of leaves; relationship to leaf water content. Gas transfer resistance, and anatomical characteristics. *American Journal of Botany* 61: 592-597.
- Fink S. 1999. Pathological and regenerative plant anatomy. Berlin: Gebruder Bornträger.
- Flores M. A. Consulta personal. Acervo Cultural del Instituto de Investigaciones Biológicas. Laboratorio de Botánica. UAEM.
- García E. 1988. "Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (Para adaptarlo a la República Mexicana)". México.
- Garrec J. P y Kerfourm C. 1989. Effects of acid rain and ozone on permeability of isolated cuticles to water and ions: Implication for the forest decline phenomenon. *Environmental and Experimental Botany* 29: 215-228.
- Günthardt-Goerg M. S. 1996. Different responses to ozone of tobacco, poplar, birch, and alder. *Plant Physiology* 148: 207-214.
- Günthardt-Goerg M. S., Vollenweider, P., 2006. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 1: 1-22.
- Hafner L., Endler W., Wendinger R. y Weese G. 1989. Ultrastructural studies on the needles of damaged Scotch pine trees from forest dieback areas in West Berlin. *Aquilo Series Botanica* 27: 7-14.

- Heagle A. S., Miller J. E., Pursley W. A. 1998. Influence of ozone stress on soybean response to carbon dioxide enrichment: III Yield and seed quality. *Crop Science*. 38: 128-134.
- Heath R. L. 1975. Ozone. In Mudd and Kozlowski (eds). Responses of plants to air pollution. Academic Press, INC. New York, Chapter 3: 23-95.
- Holopainen T., Anttonen S., Palomäki V., Kainulainen P., Holopainen J. K. 1996. Needle ultrastructure and starch content in Scots pine and Norway spruce after ozone fumigation. *Canadian Journal of Botany* 74: 67-76.
- Holopainen T., Anttonen S., Wulff A., Palomäki V., Kärenlampi. 1992. Comparative evaluation of the effects of gaseous pollutants, acidic deposition and mineral deficiencies: structural changes in the cells of forest plants. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 42: 365-398.
- Howell R. K., Kremer D. F. 1973. The chemistry and physiology of pigmentation in leaves injured by air pollution. *Journal Environmental Quality*, 2:1626-1629.
- Jensen W. A. 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Kainulainen P., Utriainen J., Holopainen J. K., Oksanen J., Holopainen T. 2000. Influence of elevated ozone and limited nitrogen availability on conifer seedlings in open-air fumigation system: effects on growth, nutrient content, mycorrhiza, needle ultrastructure, starch and secondary compounds. *Global Change Biology* 6: 345-355.
- Kärenlampi L. 1986. Relationship between macroscopic symptoms of injury and cell structural changes in needles of Ponderosa pine exposed to air pollution in California. *Ann. Bot. Fennici*. 23: 255-264.
- Karku M., Huttunen S. 1986. Erosion effects of air pollution in needle surfaces. *Air Water Soil Pollution* 31: 417-423.
- Karnosky D. F., Gagnon Z. E., Dickson R. E., Coleman M. D., Lee E. H. y Isebrands J. G. 1996. Changes in growth, leaf abscission, and biomass associated with seasonal tropospheric ozone exposures of *Populus tremuloides* clones and seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 26: 23-37.
- Kivimäenpää M., Sutinen S., Karlsson P. E. y Sellén G. 2003. Cell structural changes in the needles of Norway spruce exposed to long-term ozone and drought. *Annals of Botany* 92, 779-793.
- Krupa K., Kickert R. 1989. The greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, Carbon Dioxide (CO₂), and ozone (O₃) on vegetation. *Environmental Pollution*, 61: 263-396.

- Krupa S. V. 1999. *Polución, Población y Plantas*. Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México.
- Krupa S. V., Manning W. 1988. Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution*, 126: 375-379.
- Kukkola E., Huttunen S., Bäck J., Rautio P. 1997. Scots pine needle injuries at subarctic industrial sites. *Trees*, 11: 378-387.
- Langebartels C., Heller W., Führer G., Lippert M., Simons S. y Sandermann H. Jr. 1998. Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41: 62-72.
- Lelieveld J., Dentener F. J. 2000. What controls tropospheric ozone?. *Journal of Geophysical Research* 105: 3531-3551.
- Liechty O. H., Mroz D. G. y Reed D. D. 1993. Cation and anion fluxes in northern hardwood throughfall along an acidic deposition gradient. *Can. J. Forest Res.* 23: 457-467.
- Lin X. et al. 1991. A case study of ozone production in a rural area of central Ontario. *Atmospheric Environment*, 26: 311-324.
- Logan, J. A., et al., 1981. Tropospheric chemistry. Global perspective. *Journal of Geophysical Research* 86: 7210-7254.
- Lucas P. W., et al., 1993. Needle chlorosis in sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral contents pigmentation and ascorbic acid. *New Phytol.* 124: 264-275.
- Mabberley D. J. 1993. *The plant book. A portable dictionary of the higher plants*. 2a, ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Maier-Maercker U. y Koch W. 1992. The effect of air pollution on the mechanism of stomatal control. *Trees* 7: 12-25.
- Matussek R., Güntharst-Goerg M. S., Saurer M. y Keller T. 1992. Seasonal growth, $\delta^{13}\text{C}$ in leaves and stem, and phloem structure of birch (*Betula pendula*) under low ozone concentrations. *Trees*. 6: 69-76.
- McQuattie C. J. y Schier G. A. 1993. Effects of ozone and aluminum on pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings: Needle ultrastructure. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 1375-1387.
- Meyberg M., Lockhausen J. y Kristen U. 1988. Ultrastructural changes in the mesophyll cells of spruce needles from a declining forest in northern Germany. *European Journal of Forest Pathology* 18: 169-175.

- Moldau H., Bichele I., Hübe K. 1998. Dark-induced ascorbate deficiency in leaf cell walls increases plasmalemma injury under ozone. *Planta*, 207: 60-66.
- Mollenhauer H. H., y Totten C. 1971. Studies on seeds. I. Fixation of sedes. *Journal of Cell Biology*. 48: 387-394.
- Monks P. S. 2000. A review of the observations and origins of the spring ozone maximum. *Atmospheric Environment* 34: 3545-3461.
- Oksanen E. y Saleem A. 1999. Ozone exposure results in various carry-over effects and prolonged reduction in biomass in birch (*Betula pendula* Roth). *Plant, cell and environment*. 22: 1401-1411.
- Oksanen H., Haikio E., Sober J. y Karnosk D. F. 2003. Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* 161: 791-799.
- Percy K. E., Jensen K. F. y McQuattie C. J. 1992. Effects of ozone and acidic fog on red spruce needle epicuticular wax production, chemical composition, cuticular membrane ultra-structure and needle wettability. *New Phytologist* 122: 71-80.
- Piqueras A., Olmos E., Martínez-Solano J. R. y Hellín E. 1999. Cd-induced oxidative bursts in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research* 31: 33-38.
- Puckett L. J. 1990. Time and pH-dependent leaching of ions from deciduous and coniferous foliage. *Can J. Forest Res.* 20: 1779-1785.
- Ribas A., Peñuelas J. 2004. Temporal patterns of surface ozone levels in different habitats of the North Western Mediterranean basin. *Atmospheric Environment* 38: 985-992.
- Rodríguez-García M. I., y Sievers A. 1977. Membrane contacts of the endoplasmic reticulum with plastids and with the plasmalemma in the endothecium of *Silla non-scripta*. *Cytobiologie, European Journal of Cell Biology* 15: 85-95.
- Rzedowski G. C. de, Rzedowski J. y Colaboradores, 2001. "Flora Fanerogámica del Valle de México". 2ª Ed., Instituto de Ecología, A.C. y CONABIO, Michoacán, México.
- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. México, D. F.: Editorial Limusa, S. A.
- Sandermann, H., 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3: 47-50.
- Sanz M. J., Calatayud V. y Calvo E. 2000. Spatial pattern of ozone injury in Aleppo pine related to air pollution dynamics in a coastal mountain region of eastern Spain. *Environmental pollution* 108: 239-247.

- Schenone G., Botteschi G., Fumagalli I., Montinaro F. 1992. Effects of ambient air pollution in open-top chambers on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) I. Effects on growth and yield. *New Phytologist*, 122: 689-697.
- Schneiderbauer A., Back E., Sandermann H. y Ernst D. 1995. Ozone and European beech. *New Phytologist* 130: 225-230.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH), 1982. "Registros del Servicio Meteorológico Nacional 1954-1982". Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México.
- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). 1999. Estadísticas del Medio Ambiente México: Informe de la situación general en materia de equilibrio y protección al ambiente 1997-1998. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI) y SEMARNAP, p. 708-727.
- Soikkeli S., y Touvinen T. 1979. Damage in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce in two industrial environments in central Finland. *Annals Botany Fennici*, 16: 50-64.
- Sutinen S, Koivisto L. 1995. Microscopic structure of conifer needles as a diagnostic tool in the field. In: Munawar M, Hänninen O, Roy S, Munawar L, Kärenlampi L, Brown D, eds. Bioindicators of environmental health. Amsterdam: SPB Academic Publishing. 73-81.
- Sutinen S, Skärby L, Wallin G, Sellden G. 1990. Long-term exposure of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open-top chambers. II. Effects on the ultrastructure of needles. *The New Phytologist* 115: 345-355.
- Sutinen S. 1986a. Effects of ozone on the ultrastructural of needles of pine, *Pinus silvestri*, and spruce, *Picea abies*. Proceedings of a workshop on direct effects of dry and wet deposition on forest ecosystems-in particular canopy interactions. *Air Pollution research report* 4: 167-170.
- Sutinen S. 1987a. Cytology of Norway spruce needles I. changes during ageing. *European Journal of Forest Pathology* 17: 65-73.
- Sutinen, S. 1987b. Ultrastructure of mesophyll cells in and near necrotic spots on otherwise green needles of Norway spruce. *European Journal of Forest Pathology* 16: 379-384.
- Thomson W W., Dugger W. M. Jr., Palmer R. L. 1966. Effects of ozone on the fine structure of the palisade parenchyma cells of bean leaves. *Canadian Journal of Botany* 44: 1677-1682.
- Treshow M. 1984. Diagnosis of air pollution effects and mimicking symptoms. En: Treshow (Ed.) Air pollution and plant life. John wiley and sons Ltd. Chichester, UK.

- Utraiainen J., Holopainen T. 2001a. Nitrogen availability modifies the ozone responses of Scots pine seedlings in an open-field system. *Tree Physiology* 21: 1205-1213.
- Utraiainen J., Holopainen T. 2002. Responses of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings to limited phosphorus fertilization and treatment with elevated ozone concentrations. *Scandinavian Journal of Forest Research* 17: 501-510.
- Utraiainen J., Janhunen S., Helmisaari H. S., Holopainen T. 2000. Biomass allocation, needle structural characteristic and nutrient composition in Scots pine seedling exposed to elevated CO₂ and O₃ concentrations. *Trees-Structure and Function* 14: 475-484.
- Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermosillo G. A., Márquez F. M. y Cárdenas M. 2003. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México* 139: 57-63.
- Vollenweider P. 2006. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* 140: 562-571.
- Vollenweider P. y Günthardt-Goerg M. S. 2005. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution*, 137: 455-465
- Vollenweider P., Ottiger M. y Günthardt-Goerg M. S. 2003a. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environmental Pollution* 124: 101-118.
- Wallin G., Skärby L. y Selldén G. 1990. Long-term exposure of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open-top chambers I. Effects on the capacity of net photosynthesis, dark respiration and leaf conductance of shoots of different ages. *New Phytologist* 115: 335-344.
- Wellburn F. A. M. y Wellburn A. R. 1994. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* 45: 607-614.
- Wulff A., Ahonen J. y Kärenlampi L. 1996. Cell ultrastructural evidence of accelerated ageing of Norway spruce needles in industrial areas. *New Phytologist* 133: 553-561.
- Zobel A. y Nighswander E. J. 1991. Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles after spraying with sulphuric acid: a possible bioindicator of air pollution. *New Phytologist*. 117: 565-574.