



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

ECOLOGÍA

Efecto de la lluvia ácida simulada sobre la anatomía foliar de *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) y *Fraxinus uhdei* (Oleaceae).

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VERÓNICA MONSERRAT RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX. ENERO DE 2018



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.

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de noviembre de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RODRÍGUEZ SÁNCHEZ VERÓNICA MONSERRAT** con número de cuenta **409087813** con la tesis titulada "**Efecto de la lluvia ácida simulada sobre la anatomía foliar de *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) y *Fraxinus uhdei* (Oleaceae)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. ESTELA SANDOVAL ZAPOTITLA**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Vocal: DR. ULISES YUNUÉN ROSAS LÓPEZ
Secretario: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ
Suplente: DRA. LAURA CALVILLO CANADELL
Suplente: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de enero de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos institucionales

Agradezco la oportunidad de pertenecer al Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, para realizar mis estudios de maestría.

La realización de la presente investigación se logró gracias al apoyo de la beca CONACYT para estudios de maestría, también se agradece el apoyo del Jardín Botánico del Instituto de biología, UNAM por las facilidades brindadas en el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, doy mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Estela Sandoval Zapotitla al brindarme la oportunidad de fungir como Tutora Principal de esta tesis. Extiendo mi gratitud a los miembros del Comité Tutor, las Doctoras Sonia Vázquez Santana y Silva Aguilar Rodríguez al aceptar participar en las condiciones que se desarrolló este estudio, siendo comprensivas y atentas a cualquier eventualidad referente al trabajo.

Agradecimientos a título personal

Este trabajo es fruto del esfuerzo conjunto de distintas personas a las que agradezco infinitamente su participación.

Agradezco al Dr. Ulises Y. Rosas López y la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, por los comentarios y aportaciones a este trabajo; así como el compartir sus conocimientos en las clases. También agradezco a la Dra. Laura Calvillo Canadell por sus valiosas observaciones y apoyo en el presente escrito.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por la participación en el procesamiento de muestras y toma de fotomicrografías en el microscopio electrónico de barrido.

Ahora ofrezco mi más sincero agradecimiento a todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico, desde que los conocí me sentí muy a gusto con el ambiente que se vive y respira en este lugar. Agradezco a la Biól. Bárbara Estrada por todo el apoyo en la preparación de los reactivos pero sobretodo los buenos momentos acompañadas de buena música. Gracias también a la Biól. Concepción Ramos por su asesoría y ayuda en el procesamiento de las muestras y por compartir breves pero agradables momentos por las tardes. También le reconozco gratamente al Biól. Gabriel Olalde por su asesoría sobre los sustratos para los árboles en el proceso de aclimatación.

Mi estancia hubiera sido muy aburrida sin la compañía de la Psic. Janeth Zamora Apanco, a la cual le agradezco las recomendaciones para realizar los cortes de las muestras y también por todas esas pláticas inmensamente interesantes que nos fortalecen a ambas y nos liberan de complejos, tu amistad ha sido de las mejores en esta etapa de mi vida, ¡Gracias! Y sé que aún tenemos camino por recorrer juntas.

Sin duda mi mayor salvador en muchas ocasiones es el Biól. Daniel Martínez Quezada, al cual estoy muy orgullosa de tener como asesor y amigo. Gracias por inspirarme a tener curiosidad hacia la anatomía vegetal y brindarme tu apoyo desde que llegue a

este laboratorio. Igualmente agradezco la amistad y confianza que me has brindado, los ratos a tu lado son siempre de risas, algunas locuras pero sobretodo sinceridad.

Tely, la cabeza de este armonioso equipo. No encuentro las palabras para expresar lo dichosa que me siento no sólo por tenerte como asesora; sino como amiga y una excelente guía que ha llegado a impulsar grandes cambios en mi vida. Y aquí está el fruto de nuestro esfuerzo, pero como lo hemos dicho antes, esto sólo fue el pretexto, deseo en un futuro cercano caminar juntas hacia el cambio que tanto anhelamos.

Continuando con las piezas clave de esta investigación, le hago una ovación y gran reconocimiento al M. en C. German Calva Vásquez, por permitirme procesar las muestras para el análisis de clorofilas; asimismo porque a pesar de tener muchas actividades que realizar siempre me ha ofrecido su apoyo académico pero también humano, ha sido un excelente padre académico que me hace sentir orgullosa, ya que se preocupa en formar profesionistas con criterio y principios que vean el panorama de solución a las necesidades que se presentan. Sé que aún falta mucho por hacer, pero creo que tenemos buenos resultados hasta ahora y ¡muchos pendientes por entregar! Ojalá algún día logre ser tan buena asesora y docente como usted. ¡Gracias!

Agradezco al Biól. Giovanni de Jesús Sánchez, por ser un apoyo muy importante en todo este proceso. Quién iba a imaginar que serías una persona tan cercana y especial, ¡Gracias infinitas! Sabes que siempre estaré para apoyarte aunque no sea de una manera dulce pero te aseguro que si con mucha sinceridad... Así que ya ponte las pilas y concluye esa etapa, veras que se abrirán más posibilidades.

Finalmente te agradezco a ti, por confabular a que todo esto fuera posible, no cabe duda que si no hubiera sido por tu causa yo me encontraría perdida, ahora entiendo que todo fue para bien y que sólo te toco jugar ese papel, muchas gracias Víctor.

Dedicatoria

Dedicado este logro a ese ser que me puso en este tiempo y lugar, que me permite vivir todas estas experiencias, que me hacen darme cuenta de lo afortunada que soy y lo hermoso que es la vida. ¡Gracias!

Malu, la mujer de mi vida.

Te dedico este esfuerzo en retribución a todo lo que haces por mí, también te agradezco por siempre levantarte conmigo sin importar el día o la hora, por apoyarme en todo aunque quizás no estés de acuerdo. No cabe duda que tengo la fortuna de tener a una excelente madre, que me ha enseñado a no rendirme jamás. Te amo y recuerda que siempre voy a estar a tu lado, pues es tiempo de que yo cuide de ti así como tú lo has hecho conmigo.

Gus, mi primer y mejor compañero de juegos.

Aquí está un logro más desbloqueado.

No hay palabras que expresen cuan feliz me hace ser tu hermana, porque así pude aprender de la persona más humana que conozco, que los sueños se logran cuando vienen desde el corazón y que no importa si todo parece estar en contra, la perseverancia y el amor son los mejores motores para hacer realidad cualquier cosa.

Gracias por tu apoyo no sólo en esta etapa sino en toda mi vida, eres el mejor hermano que puedo tener; la vida para ti será larga y dichosa porque te lo mereces. Sabes, no te extraño pues siempre te llevo en mi corazón que te ama y siente que eres feliz.

Jesús Manuel, mi espejo y maestro para experimentar lecciones vida.

Espero que esta meta también te sepa a victoria.

Dedico mi esfuerzo a tu persona, deseando que te haga sentir feliz y también que despierte en ti mucho amor, para que logres desvanecer esos sinsabores que guardas en tus bolsillos.

El día que decidas vaciarlos te darás cuenta que hay muchas experiencias y personas
con las cuales convivir.

De corazón deseo que con amor y perseverancia encuentres la llave para la fortuna, y
no hablo de dinero sino que de verdad encuentres la verdadera felicidad, para ello
sólo abre tu corazón y permite entrar a las personas que están esperando amarte así
como lo hago yo, con inmensidad y paciencia aguardando la hora de compartir la vida
contigo.

Gracias por estar a mi lado y apoyarme de la forma que tú sabes, te amo papá.
Sin tu presencia en mi vida no sería esta mujer en la que me he convertido.

Esteban, el compañero con quien he crecido y compartido algunas de las mejores
experiencias de mi vida.

Aquí esta, un logro más en el que te hice cómplice sin importarte si querías o no.
Tu apoyo y compañía en lo que hago siempre son el combustible para realizar las
cosas. Ese combustible llamado amor, la entrega de ambos, pero sobretodo la
confianza y complicidad que hemos obtenido al paso de los años.

Aunque seas un hombre de pocas palabras, sé que este logro te hace feliz.

Mi vida a tu lado ha sido la mejor elección, estoy convencida que no hay otro
cómplice mejor que tú.

Gracias por darme ánimo todas las ocasiones que tenía ganas de abandonar todo.

No olvides que pase lo que pase estaré ahí para hacerte la carga más ligera y
recordándote que eres capaz de lograr cualquier cosa que te propongas.

Y no olvides que eres el viento que aviva mi fuego, te amo.

Dedico este esfuerzo a esos dos ángeles que me acompañan en todo momento,
gracias por darme la fortaleza y recordarme que debo vivir día con día cada
experiencia con la mejor actitud y disfrutarla sin importar que cuan dura sea.

Ustedes me enseñaron a ser valiente y de espíritu fuerte, pero sobretodo lo
importante que es estar unida y en compañía de la familia, las amo Antonia y Meztli.

Las llevo siempre en el corazón.

[...] A pesar de cómo me sienta por dentro tengo que confiar en que todo va a estar bien, tengo que levantarme y ser más fuerte [...] No puedo rendirme [...] tengo que luchar, porque sé que al final, valdrá la pena [...]

Pale-Whitin temptation, The Silent Force 2004.



Índice

Abstract.....	1
Introducción.....	2
Objetivos.....	5
General.....	5
Particulares.....	5
Hipótesis	6
Antecedentes.....	7
<i>Lluvia ácida</i>	9
<i>La lluvia ácida y su interacción con las plantas</i>	11
Ingreso de sustancias a las hojas y daños ocasionados por la lluvia ácida en los tejidos foliares	13
Efecto de la lluvia ácida en la concentración de clorofilas.....	17
<i>Estudios previos sobre lluvia ácida en diversas especies vegetales</i>	23
<i>La lluvia ácida y sus precursores en la Ciudad de México y el área metropolitana</i>	26
Método.....	31
<i>Selección de especies</i>	31
Descripción general de la arquitectura foliar de las especies	31
<i>Ubicación taxonómica de las especies</i>	34
<i>Descripción botánica de las especies</i>	34
<i>Obtención y aclimatación de las especies</i>	39
<i>Fase experimental y recolecta de muestras</i>	39
<i>Fase de laboratorio- Procesamiento histológico de las muestras</i>	42

<i>Fase de gabinete-Observaciones anatómicas y obtención de datos</i>	43
Resultados.....	45
<i>Monitoreo de daños visibles en la superficie de la lámina</i>	45
<i>Descripción anatómica de las muestras observadas</i>	50
<i>Modificaciones en los patrones cuticulares de las láminas foliares</i>	58
<i>Modificaciones en tejidos internos de las láminas foliares por la aspersion de lluvia ácida</i> ..	64
<i>Análisis estadístico de variables anatómicas</i>	74
Análisis de varianza para caracteres cuantitativos	74
Prueba de t de student en las edades de <i>Liquidambar styraciflua</i>	84
Asociación de caracteres cualitativos con caracteres cuantitativos.....	85
<i>Cambios en la concentración de clorofilas</i>	89
Discusión.....	97
Conclusiones.....	108
Literatura citada	110
Anexo I. Procesamiento histológico.....	122
Anexo II. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	126
Anexo III. Salidas de los ANOVA para las variables anatómicas área del margen y área de la zona intercostal.....	127
Anexo IV. Salidas de los ANOVA para el contraste de los diversos tratamientos vs especies ..	133
Anexo V. Salidas de Análisis estadísticos de ANOVA de un factor y ANOVA robusta de un factor de Welch para las concentraciones de clorofila a y b en <i>L. styraciflua</i> y <i>F. uhdei</i>	142

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de formación de la lluvia ácida y el depósito seco. Modificado de Mohnen, 1988	8
Figura 2. Estructura típica de una hoja. Modificado de González, 2003.	12
Figura 3. Complejo colector de luz. Modificado de Díaz de la Guardia, 2010.	18
Figura 4. Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos. Modificado de Rodés y Collazo, 2006.	20
Figura 5. Membrana tilacoidal y el aumento en concentración de iones hidrógeno en el estroma. Modificado de Samartín, 2012.	22
Figura 6. Distribución espacial histórica del pH del agua de lluvia en la ZMVM (1990-2006) Tomado de Secretaría del Medio Ambiente, 2006. El color anaranjado indica zonas con lluvia ácida; el color amarillo indica zonas con lluvia "natural".....	29
Figura 7. Distribución del número de muestras en las que se detectó la presencia de lluvia ácida. Durante la temporada de lluvia se colectaron alrededor de 24 muestras por sitio. Tomado de Secretaría del Medio Ambiente, 2016.	30
Figura 8. Hoja de <i>Liquidambar styraciflua</i> se muestra la arquitectura foliar. Las flechas anaranjadas señalan las venas secundarias decurrentes; las flechas rosas señalan los retículos que forman las venas de 3er y 4to orden.	32
Figura 9. Foliolos de <i>Fraxinus uhdei</i> se muestra la arquitectura foliar. Las flechas anaranjadas señalan las venas secundarias decurrentes; las flechas rosas señalan los retículos que forman las venas de 3er y 4to orden. Se observan claramente la unión de las venas de segundo orden.	33
Figura 10. Ilustración botánica de <i>Liquidambar styraciflua</i> . Modificado de Flora de Norteamérica, 2017.	36
Figura 11. Ilustración botánica de <i>Fraxinus uhdei</i> A. rama con frutos; B. flor femenina; C. flor masculina, tomado de Rzedowski y Rzedowski, 2010.	38
Figura 12. Invernadero de experimentación.....	41

Figura 13. Estandarización para la toma de muestras. Izquierda <i>Fraxinus uhdei</i> , derecha <i>Liquidambar styraciflua</i>	41
Figura 14. Hojas sin daños visibles al término del experimento en tratamientos pH 3.8 y pH 5.6. <i>Liquidambar styraciflua</i> (a) y en <i>Fraxinus uhdei</i> (b)	45
Figura 15. Monitoreo de daño visible progresivo en las hojas de <i>Liquidambar styraciflua</i> en el tratamiento pH 2.5. Las flechas indican zonas con daño.....	47
Figura 16. Monitoreo de daño visible progresivo en los folíolos de <i>Fraxinus uhdei</i> en el tratamiento pH 2.5. Las flechas indican zonas con daño.	49
Figura 17. Vista superficial de epidermis en <i>Liquidambar styraciflua</i> . a) Superficie adaxial. b) Superficie abaxial. CC-células costales; CI-células intercostales. Microscopia de barrido.....	51
Figura 18. <i>Liquidambar styraciflua</i> . a) Estomas paracíticos en superficie abaxial. b) Tricomas simples unicelulares sobre una vena en la superficie abaxial. c) Tricoma simple unicelular sobre una vena en superficie abaxial. a-b Microscopia de barrido. c-campo claro. TSU-Tricoma simple unicelular.....	52
Figura 19. <i>Liquidambar styraciflua</i> . a) Mesofilo PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; Flecha-drusas. b) Mesofilo con presencia de drusas envueltas en células idioblásticas en el parénquima esponjoso, señalados en flechas. c) Mesofilo con presencia de contenidos celulares encerrados en círculo punteado; drusas indicadas con flecha. d) Vena media, C-colénquima. e) Acercamiento al haz vascular perifloemático; X-Xilema; F-Floema. Letras a, d, e-campo claro; letra b-luz polarizada; letra c-contraste de fases.....	53
Figura 20. Vista superficial de epidermis en <i>Fraxinus uhdei</i> . a) Superficie adaxial. b) Superficie abaxial. CC-células costales; CI-células intercostales. Microscopia de barrido.	55
Figura 21. <i>Fraxinus uhdei</i> . a) Estomas anomocíticos en superficie abaxial. b) Tricoma peltado en superficie adaxial. c) Tricoma simple pluricelular y tricoma peltado superficie abaxial. d) Tricoma simple pluricelular en superficie abaxial sobre una vena. a-c Microscopia de barrido. d-campo claro. TP-Tricoma peltado. TS-Tricoma simple pluricelular.....	56
Figura 22. <i>Fraxinus uhdei</i> . a) Mesofilo PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; HV-Haz vascular. b) Mesofilo con presencia de estilodios cerca de los haces vasculares, señalados en	

flechas. c) Vena media, presencia de tricomas simples pluricelulares (TS); C-colénquima. d) Acercamiento al haz vascular perifloemático; X-Xilema; F-Floema; E-Esclerénquima. Letras a, c, d-campo claro; letra b-luz polarizada..... 57

Figura 23. Modificaciones en patrones cuticulares en *Liquidambar styraciflua*. Grupo control a) superficie adaxial, b) superficie abaxial. Tratamiento con pH 5.6, se aprecia un mayor número de ceras epicuticulares c) superficie adaxial, d) superficie abaxial. Tratamiento con pH 3.8, e) superficie adaxial de 1 año f) superficie adaxial de 3 años. Las flechas indican ceras epicuticulares y células epidérmicas dañadas..... 59

Figura 24. Modificaciones en patrones cuticulares de *Liquidambar styraciflua* para el tratamiento con pH 2.5. 1 año(a, b); 3 años (c, d). a) superficie adaxial, acumulación de ceras y colapso celular; b) superficie abaxial, invaginación de células epidérmicas; c) superficie adaxial contraste entre tejido colapsado y sano; d) superficie abaxial, colapso celular y acumulación de ceras, algunos en forma de agregados. Las flechas indican daño en las células epidérmicas. 60

Figura 25. Modificación de patrones cuticulares en *Fraxinus uhdei*. Tratamiento control a) superficie adaxial, adelgazamiento cuticular en la base del tricoma peltado; b) superficie abaxial, presencia de ceras epicuticulares en forma de láminas, algunas se desprenden. Tratamiento con pH 5.6 c) superficie adaxial, adelgazamiento en la base del tricoma peltado, mayor número de ceras epicuticulares; d) superficie abaxial, desprendimiento de ceras epicuticulares. 62

Figura 26. Modificación de patrones cuticulares en *Fraxinus uhdei*. Tratamiento con pH 3.8 a) superficie adaxial, acumulación de ceras por las marcas de gotas ácidas; b) superficie abaxial, se conservan los patrones cuticulares. Tratamiento con pH 2.5 c) superficie adaxial, colapso de células epidérmicas y tricoma peltado, pérdida de cutina; d) superficie abaxial, las células no presentan daños. 63

Figura 27. Tratamiento a pH 5.6. *Liquidambar styraciflua*. a) Sección transversal del mesofilo (campo claro); b) Sección transversal del mesofilo con drusas en el parénquima esponjoso (polarización); c) Sección transversal del margen de la hoja con un ligero oscurecimiento celular en el vértice (campo claro); d) Sección transversal de vena media, acumulación de compuestos celulares en la cara abaxial (campo claro). a y b corresponden a *L. styraciflua* de tres años; c y d son fotomicrografías de *L. styraciflua* de un año 65

Figura 28. *Fraxinus uhdei*. Tratamiento con pH 5.6. a) Margen de un foliolo sin alteraciones (campo claro); b) Sección transversal del mesofilo, se observan contenidos celulares, la cutícula bien definida y un tricoma glandular peltado en la superficie abaxial, (contraste de fases); c) Sección transversal del mesofilo, haces vasculares y estilodios (luz polarizada); d) Sección transversal de vena media con presencia de tricoma peltado (Flecha verde) y tricomas simples pluricelulares (Flecha anaranjada) (campo claro)..... 66

Figura 29. Tratamiento con pH 3.8. Sección transversal de hoja de *Liquidambar styraciflua* a) Vena media sin alteraciones (campo claro); b) Mesofilo con gran cantidad de contenidos celulares, la cutícula se nota como una gran línea blanca (contraste de fases); c) Margen, comienzo de formación de protuberancia (campo claro); d, e, f, g, h) Secuencia de formación y desprendimiento de protuberancia celular con tejido dañado (campo claro)..... 67

Figura 30. Tratamiento con pH 3.8. *Fraxinus uhdei* a) Margen de un foliolo sin alteraciones anatómicas (campo claro); b) Vena media con presencia de tricomas no peltados, sin daños en los tejidos (campo claro); c) Mesofilo con desprendimiento de cutícula en superficie adaxial y tejido dañado en la base del tricoma peltado (flecha verde) (contraste de fases); d) Mesofilo con alteraciones en cutícula, rafidios abundantes (contraste de fases); e) Base de tricoma peltado con daño a nivel del parénquima en empalizada; f) Desprendimiento cuticular superficial de tricoma peltado, se observa la diferencia de patrones cuticulares en la base del tricoma con respecto al resto de la epidermis (MEB). Sección transversal en a-e. Vista superficial en f..... 68

Figura 31. Sección transversal de hoja de *Fraxinus uhdei* con presencia de daño. TP-Tricoma peltado; PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; HV-Haz vascular; TD-Tejido dañado (campo claro)..... 69

Figura 32. Tratamiento con pH 2.5 en *Liquidambar styraciflua*. a) Margen con daño, colapso del mesofilo (campo claro); b) Margen deformado (campo claro); c) Formación de tejido de cicatrización (campo claro); d) Zonas de cicatrización creadas por células engrosadas conteniendo el daño celular (campo claro); e) Mesofilo contrastante, tejido sano versus tejido colapsado (campo claro); f) Cutícula abaxial y pérdida total de los patrones cuticulares (MEB). Letras a y b corresponden a la edad de tres años; c, d, e y f corresponden a ejemplares de un año. Sección transversal (a-e). Vista superficial (f). Las flechas indican daño. C-Tejido cicatrizado..... 71

Figura 33. Tratamiento con pH 2.5 para <i>Fraxinus uhdei</i> . a) Margen con tejido alterado (campo claro); b) Mesofilo con vestigios de paredes celulares y epidermis colapsada (campo claro); c) Mesofilo con daño en extremo adaxial, la flecha indica el colapso de tejido epidérmico, deformación del haz vascular (campo claro); d) Acercamiento a un haz vascular (HV) atrofiado, las células aledañas presentan gran cantidad de compuestos celulares (campo claro); e) Inicio de daño por la base de un tricoma peltado abaxial (campo claro); f) Cutícula adaxial, desprendimiento de ceras (MEB). Secciones transversales (a-e). Vista superficial (f).	73
Figura 34. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	76
Figura 35. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años.....	77
Figura 36. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de <i>Fraxinus uhdei</i>	78
Figura 37. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento control	80
Figura 38. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 5.6.....	81
Figura 39. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 3.8.....	82
Figura 40. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 2.5.....	83
Figura 41. Extracto de maceración Acetona: Hexano (4:6) en hojas de <i>Liquidambar styraciflua</i> del tratamiento a pH 2.5.....	89
Figura 42. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los tratamientos control.....	91

Figura 43. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año.....	92
Figura 44. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años.	93
Figura 45. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de <i>Fraxinus uhdei</i>	94

Índice de tablas

Tabla 1. Investigaciones previas realizadas sobre el impacto de la lluvia ácida en diferentes especies vegetales	23
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Liquidambar styraciflua</i> y <i>Fraxinus uhdei</i> por Stevens, 2017.....	34
Tabla 3. Caracteres anatómicos evaluados	44
Tabla 4. Modelos de ANOVA de 1 vía para <i>Fraxinus uhdei</i> y <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 y 3 años con respecto a los tratamientos	74
Tabla 5. Análisis de varianza para el área del margen foliar (μm^2). Se contrasta el efecto de los tratamientos en las dos especies. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).	75
Tabla 6. Análisis de varianza para el área intercostal (μm^2). Se contrasta el efecto de los tratamientos en las dos especies. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).....	75
Tabla 7. Modelos de ANOVA de una vía para encontrar la especie más susceptible con respecto al nivel de acidez.....	79
Tabla 8. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del grupo control contrastadas con las especies: <i>Fraxinus uhdei</i> y <i>Liquidambar styraciflua</i> . El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).	80
Tabla 9. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del tratamiento a pH 5.6 contrastadas con las especies: <i>Fraxinus uhdei</i> y <i>Liquidambar styraciflua</i> . El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).....	81
Tabla 10. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del tratamiento a pH 3.8 contrastadas con las especies: <i>Fraxinus uhdei</i> y <i>Liquidambar styraciflua</i> . El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).....	82

Tabla 11. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del tratamiento a pH 2.5 contrastadas con las especies: <i>Fraxinus uhdei</i> y <i>Liquidambar styraciflua</i> . El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).....	83
Tabla 12. Prueba de t para área del margen (μm^2) de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 y 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos (Nivel de confianza 0.05).....	84
Tabla 13. Prueba de t para área intercostal (μm^2) de <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 y 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos (Nivel de confianza 0.05).....	84
Tabla 14. Correlación entre el área del margen y la formación de tejido cicatrizado en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año de edad.....	86
Tabla 15. Correlación entre el área del margen y la modificación de patrones cuticulares en <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año de edad.....	86
Tabla 16. Correlación entre el área del margen y la formación de tejido cicatrizado en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años de edad.....	87
Tabla 17. Correlación entre el área intercostal y la modificación de patrones cuticulares en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años de edad.....	87
Tabla 18. Correlación entre el área intercostal y la formación de tejido cicatrizado en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años de edad.....	88
Tabla 19. Correlación entre el área del margen y la modificación de patrones cuticulares en <i>Fraxinus uhdei</i>	88
Tabla 20. Descripción de los modelos de ANOVA de una vía para las concentraciones de clorofilas a y b.	90
Tabla 21. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en los tratamientos control. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).	91

Tabla 22. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).	92
Tabla 23. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en <i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Games-Howell en clorofila a y la prueba de Tukey para clorofila b).	93
Tabla 24. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en <i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).....	94
Tabla 25. Alteraciones anatómicas en los tratamientos con pH 3.8 y pH 2.5	96

Resumen

En la Ciudad de México son emitidas 324 toneladas de dióxido de azufre y 4,123 toneladas de óxidos de nitrógeno al año que interactúan con la humedad y radiación solar, debido a la topografía montañosa que rodea a la zona metropolitana se produce el estancamiento del aire, generando problemas como el ozono troposférico y la lluvia ácida.

Desde finales de los 80's existen reportes de precipitación ácida en la ciudad, pero hasta la fecha no existen documentos que proporcionen información sobre el impacto que este fenómeno tiene en el follaje de los árboles urbanos, por lo que esta investigación tuvo como objetivo determinar el daño anatómico foliar y la concentración de clorofila a y b de *Liquidambar styraciflua* y *Fraxinus uhdei*, que poseen hojas foliosas que hacen posible evaluar los impactos de diversos contaminantes y por ser especies frecuentes en las áreas verdes de la Ciudad de México.

Para desarrollar la investigación se obtuvieron árboles de 1 año en el caso de *Fraxinus uhdei*, para *Liquidambar styraciflua* fueron árboles de 1 y 3 años, a continuación se realizaron cuatro experimentos en los que se asperjaron soluciones de ácido sulfúrico con pH 2.5, 3.8 y 5.6, así como un tratamiento control con agua destilada.

Los resultados obtenidos muestran que para ambas especies a pH 5.6 no existen alteraciones anatómicas, a pH 3.8 únicamente se generan alteraciones en la cutícula, mientras que para el tratamiento a pH 2.5 se encontraron daños visibles en las hojas en forma de moteado clorótico y tejido necrosado. A nivel anatómico las lesiones halladas incluyen la destrucción de la cutícula, hasta el colapso celular del mesófilo, con excepción del haz vascular. Las zonas frecuentes de daño son las bases de tricomas, el espacio entre las venas y algunos márgenes de las hojas.

Liquidambar styraciflua mostró mayor sensibilidad durante la aplicación del ácido a pH 2.5, por lo que rápidamente presentó daños visibles; sin embargo a nivel anatómico se registraron dos mecanismos de respuesta a la acidez, la generación de tejido cicatrizado y la abscisión de tejido dañado en el margen, ambas respuestas generadas a la contención del daño. Finalmente se encontraron diferencias significativas en la concentración de las clorofilas a y b para los diversos tratamientos, mostrando una disminución en el grupo que se trató con mayor acidez.

Se concluye que los daños ocasionados en los tejidos foliares dependen del tiempo de exposición y la concentración de acidez aplicada. Entre menor sea el nivel de pH de las soluciones mayor será el daño ocasionado en los tejidos y pigmentos fotosintéticos sin importar la edad o la especie.

Abstract

In Mexico City, 324 tons of sulfur dioxide and 4,123 tons of nitrogen oxides are emitted it per year, these interact with humidity and solar radiation, due to the mountainous topography that surrounds the metropolitan area, air stagnation occurs, generating problems such as tropospheric ozone and acid rain.

Since the late 80's there are reports of acid precipitation in the city, but until today there are not documents that provide information about the impact this phenomenon has on the foliage of urban trees, so this investigation aimed to determine the damage foliar anatomy and the concentration chlorophyll a and b of *Liquidambar styraciflua* and *Fraxinus uhdei*. These species have leaves that make possible to evaluate the impacts of diverse pollutants also, they are frequent species in the green areas of the Mexico City.

To develop the research, we obtained 1-year old trees in the case of *Fraxinus uhdei*, for *Liquidambar styraciflua* were 1 and 3 year old trees, then four experiments were carried out in which solutions of sulphuric acid with pH 2.5, 3.8 and 5.6 were sprayed, as well as a control treatment with distilled water.

The results show that for both species at pH 5.6 there are no anatomical alterations, at pH 3.8 only alterations were generated it in the cuticle, while for the treatment at pH 2.5 visible damage was found in the leaves in the form of chlorotic flecking and necrotic tissue. At the anatomical level, the injuries found include the destruction of the cuticle, until the cellular collapse of the mesophyll, with the exception of the vascular bundle. The frequent areas of damage are the trichome bases, the space between the veins and some margins of the leaves.

Liquidambar styraciflua showed greater sensitivity during acid application at pH 2.5, so it quickly showed visible damage; however, at the anatomical level, two response mechanisms were recorded it to the acidity, the generation of scar tissue and the abscission of damaged tissue in the margin, both responses generated to contain the damage. Finally, significant differences were found, the concentration of chlorophylls *a* and *b* for the different treatments, showing a decrease in the group treated with greater acidity.

We conclude that the damages caused in the foliar tissues depend on the time of exposure and the concentration of acidity applied. The lower the pH level of the solutions, the greater the damage to tissues and photosynthetic pigments, regardless of age or species.

Introducción

Los asentamiento urbanos generan emisiones atmosféricas de carbón mineral, petróleo, nitrógeno y azufre, este último en su mayoría en forma de dióxido de azufre (SO_2), más del 90% de las emisiones son originadas en áreas industrializadas de todo el mundo. Estas sustancias originan fenómenos en las atmósferas circundantes a las ciudades, entre ellos se puede mencionar al ozono troposférico, smog fotoquímico, partículas suspendidas y episodios de depósito ácido (revisado en Wellburn, 1988).

El acelerado crecimiento en la población ha generado un aumento en el consumo de combustibles y emisiones, así como la creación de diversos productos metalúrgicos y químicos de uso doméstico e industrial. Por esta razón, las ciudades mantienen constantes episodios de contingencias, sobre todo en países en vías de desarrollo como lo es el caso de la ciudad de México.

Los factores orográficos de la Ciudad de México y sus alrededores potencializan la reactividad química atmosférica por la frecuencia e intensidad de las sustancias emitidas por la industria y el parque vehicular; al mismo tiempo a eventos periódicos y estacionales como las emisiones volcánicas del Chichonal (1984-1986) y el Popocatepetl (1995-2017) que aportan metano, dióxido de carbono, ácido sulfhídrico y vapor de agua (Calva, 2012).

Todo ello genera una sinergia que aumenta la radiación difusa y el calor sensible que en combinación con los vientos asegura que la vegetación urbana y del área del suelo

de conservación de la ciudad reciba una combinación química de más de 200 reacciones y como resultado final se generen aldehídos, cetonas, esterés y ácidos (Fenn *et al.*, 2002).

En la Ciudad de México se tienen reportes de lluvia ácida desde finales de los años ochenta (Bravo y Aguilar, 1984; Báez y Padilla, 1983; Ortiz, *et al.*, 1984; Alvarado y García, 1988; Peñaranda, 1988). Pero hasta la fecha no se tienen documentos publicados que caractericen o proporcionen información sobre el impacto que este fenómeno tiene en los árboles urbanos de esta ciudad; ni reportes que determinen cuál es el grado de susceptibilidad de las especies a los pH reportados en la lluvia que caen en la ciudad. Además de desconocer si existe algún impacto en la organización de sus tejidos foliares o se afecte la integridad de sus clorofilas que disminuyan la productividad de la fotosíntesis.

Existen diversas investigaciones experimentales en las que se observan los efectos causados por la lluvia ácida en distintas especies vegetales (Evans, 1984; Birdi *et al.*, 1987; Fuzhu *et al.*, 1994; Soukupová *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2005; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006). Estos estudios se desarrollaron en condiciones de laboratorio debido a que de esta forma se pueden observar directamente los efectos generados por este fenómeno sin la intervención de algún otro factor ambiental.

Los resultados obtenidos, reportan modificaciones en algunos órganos de las plantas, particularmente en las hojas (Amthor, 1984). Las principales alteraciones visibles en las

láminas se encuentran la deformación del margen y cambios de coloración, la aparición de lesiones en forma de manchas cafés y otras manchas con necrosis (Evans *et al.*, 1977).

A nivel anatómico se han reportado cambios en el grosor de la cutícula (Cape, 1986, Hull *et al.*, 1975), en la epidermis la deformación celular y oclusión de células estomáticas, pérdida de tricomas; en el mesofilo se ha reportado colapso celular total o parcia, formación de tejido cicatrizado. Así como cambios en el tamaño de los cloroplastos (Liu *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2016) y la concentración de clorofilas (Abouguendia y Baschak, 1987; Bamidele y Eguagie, 2015).

Por lo anterior, esta investigación pretende establecer cuáles son los daños ocasionados por la lluvia ácida en la anatomía foliar de *Liquidambar styraciflua* L. y *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh y los cambios en las concentraciones de las clorofilas *a* y *b*; ya que son especies con láminas anchas que favorecen la captación de lluvia además de ser frecuentes en la flora urbana de esta ciudad.

Objetivos

General

Determinar el daño anatómico foliar de árboles de 1 y 3 años de *Liquidambar styraciflua* y árboles de 1 año de *Fraxinus uhdei* generado por la lluvia ácida inducida en condiciones de invernadero bajo diferentes concentraciones de pH.

Particulares

- ♣ Monitorear los daños visibles en la superficie de las hojas durante el experimento.
- ♣ Describir la anatomía de las hojas de *Liquidambar styraciflua* y los folíolos de *Fraxinus uhdei*.
- ♣ Determinar los cambios en la cutícula de las láminas foliares resultado de los diversos tratamientos.
- ♣ Observar los daños anatómicos en las láminas de ambas especies causado por cada tratamiento.
- ♣ Establecer qué valor de pH es el que genera mayor daño en el tejido foliar.
- ♣ Encontrar cambios en la concentración de las clorofilas *a* y *b* en todos los tratamientos.
- ♣ Identificar la especie más tolerante a condiciones de acidez.

Hipótesis

La lluvia con un pH menor a tres genera daños en los tejidos vegetales y provoca disminución en la concentración de clorofilas. Por lo tanto, se espera encontrar diferencias en la severidad de daños y cambios en la concentración de clorofilas en árboles de dos especies, causados por lluvia simulada con soluciones ácidas a distintos pH en condiciones de invernadero.

Antecedentes

Debido al relieve que rodea a la ciudad de México se forma una cuenca alrededor de ésta, lo que propicia el estancamiento del aire favoreciendo problemáticas ambientales (Meza y Moncada, 2010), que generan cambios microambientales dentro de la urbe y afecta a todos los organismos que se encuentran dentro de ésta.

Las principales sustancias emitidas a la atmósfera y que se evalúan por el Sistema de Monitoreo Atmosférico de la ciudad de México son: el monóxido de carbono (CO), Partículas suspendidas ($PM_{2.5}$ y PM_{10}), compuestos orgánicos totales (COT), compuestos orgánicos volátiles (COV), amoníaco (NH_3), los óxidos de nitrógeno (NO_x) y el bióxido de azufre (SO_2). En el Inventario de emisiones (2014), se reportó un total de 696,513 toneladas* $año^{-1}$ de estos contaminantes.

Todas las sustancias mencionadas anteriormente siguen distintas rutas y mecanismos en la atmósfera, pueden permanecer en el aire desde un día hasta semanas y depositarse gradualmente en el suelo, cuerpos de agua o la vegetación a través de la vía seca o húmeda (Figura 1).

La deposición seca es el proceso mediante el cual las partículas y los gases se depositan por acción de la gravedad. En la deposición húmeda se eliminan los gases y partículas de la atmósfera por su interacción con la humedad presente en la misma,

depositándolos en la superficie de la biosfera por medio de la lluvia, la nieve, el rocío y la niebla. (Mohnen, 1988; Secretaría del Medio Ambiente, 2014).

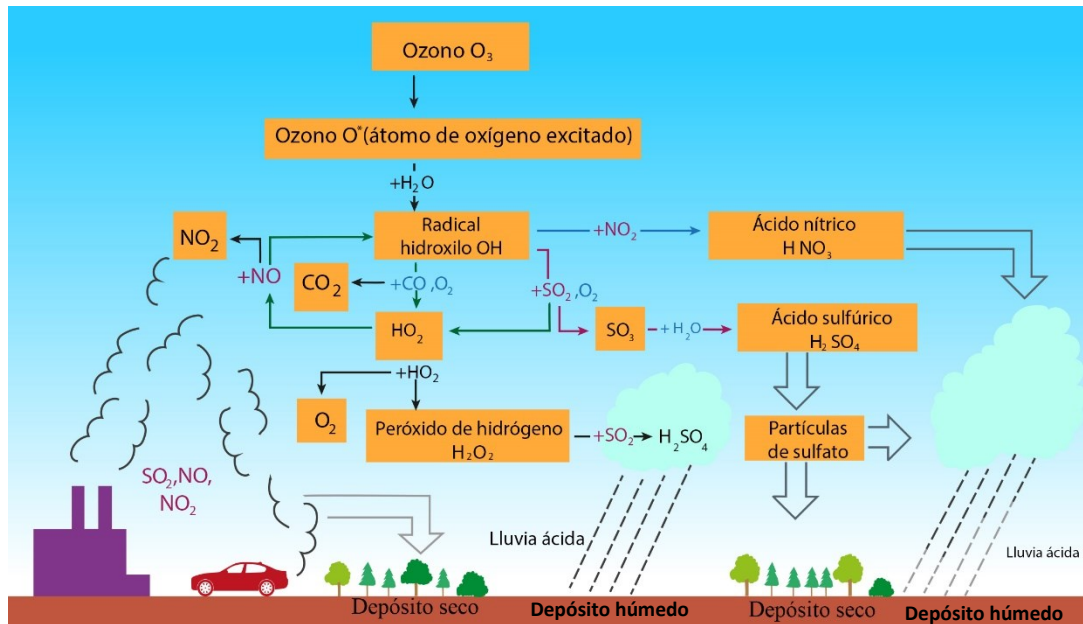


Figura 1. Proceso de formación de la lluvia ácida y el depósito seco. Modificado de Mohnen, 1988

El CO, los COV y los NOx emitidos a la atmósfera interactúan con la radiación solar para formar el ozono (O_3) troposférico, mientras que el dióxido de nitrógeno (NO_2) y el dióxido de azufre (SO_2) reaccionan con la humedad presente en el aire para formar sustancias ácidas como el ácido nítrico (HNO_3) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4) (revisado en Durham y Demerjian, 1986, Mohnen 1988, Fenn *et al.*, 2002).

El ácido sulfúrico y el ácido nítrico producido en la atmósfera urbana alteran la acidez del agua de lluvia; de tal forma que el depósito húmedo es un problema ambiental importante por los efectos que tiene en la vegetación dentro y fuera de la ciudad

(Tamm y Cowling, 1977; Evans, 1984; Adams y Page, 1986; SIMAT, 2015a, SIMAT, 2015b).

Lluvia ácida

Normalmente en las gotas de agua de las nubes se encuentra disuelto dióxido de carbono (CO_2) proveniente de la atmósfera, que al interactuar con el agua forma ácido carbónico (H_2CO_3) y se disocia en iones carbonato (CO_3^{2-}) lo cual hace que su pH sea de 5.6 (lluvia natural). Mientras que la lluvia ácida es aquella que posea un valor $\text{pH} < 5$. (Kotz *et al.*, 2008).

Se sabe que el potencial de hidrógeno (pH) es una medida de la acidez o alcalinidad en una disolución acuosa y tiene una escala que va de 0 a 14. El agua destilada tiene un valor de pH 7, mientras que las disoluciones ácidas tienen un pH menor a 7 y las alcalinas tienen un pH mayor (*Ibid*).

La lluvia ácida se forma cuando los óxidos de azufre y de nitrógeno son arrojados a la atmósfera, durante su transporte sufren transformaciones por la interacción con la humedad atmosférica, la radiación solar y el oxígeno, formando una serie de reacciones complejas (*Idem*) que originan ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido nítrico (HNO_3). Que finalmente son depositados en los ecosistemas urbanos, ecosistemas naturales o cuerpos de agua cercanos a las fuentes de origen.

En regiones donde no existe la actividad humana, la humedad atmosférica se ve expuesta a cantidades variables de ácidos de origen natural; de este modo las

precipitaciones tienen un pH de alrededor de cinco. Pero, en las regiones que se extienden alrededor de centros de actividad humana, y que pueden llegar a cientos de kilómetros, el pH de la precipitación es más bajo, entre 3.5 a 4.5 o aún menor (revisado en Wellburn, 1988, revisado en Mohnen, 1988; Minoura y Iwasaka. 1996).

En la revisión de Granados *et al.*, (2010) se divide la formación de la lluvia ácida en dos etapas:

Fotoquímica: Esta ocurre en fase gaseosa. El dióxido de azufre y el óxido de nitrógeno se oxidan a trióxido de azufre (SO₃) y dióxido de nitrógeno (NO₂), respectivamente [ecuación 1 y 2], gracias a la energía proporcionada por la radiación ultravioleta del Sol y por demás agentes oxidantes de la atmósfera.



Catalítica: Tiene lugar en fase líquida y consiste en la transformación del SO₃ y del NO₂, en ácido sulfúrico (H₂SO₄) [ecuación 3] y ácido nítrico (HNO₃) [ecuación 4], respectivamente por disolución acuosa, siendo catalizada la reacción principalmente por sales de hierro y de manganeso presentes en las gotas de agua. Parte de este ácido es neutralizado en la atmósfera por el amoníaco, originándose iones amonio

(NH₄⁺); el resto aparece disuelto en las gotas de lluvia, acidificándola, en forma de iones sulfato (SO₄²⁻), iones nitrato (NO₃⁻) y iones hidrógeno (H⁺).



La lluvia ácida y su interacción con las plantas

La deposición ácida en general, contribuye a la reducción del pH en ecosistemas terrestres y acuáticos. En el suelo el pH de la solución que rodea a las raíces influye en la disponibilidad de cationes y aniones para la absorción. En suelos alcalinos, la disponibilidad de P, Zn, Fe, Mn, Cu y B es muy bajo, mientras que en suelos ácidos, el crecimiento de la planta es principalmente limitado por concentraciones tóxicas de Al³⁺ y Mn²⁺ en la rizosfera (revisado en Marschner, 2012). Lo anterior permite entender que un aumento considerable de pH permite la movilización de metales tóxicos, especialmente del aluminio (revisado en Granados *et al.*, 2010, INECC, 2014) y que provoca una alteración en la absorción de nutrientes para el desarrollo de las plantas.

Por otro lado, la lluvia sea ácida o no entra en contacto directo con las plantas a través de su follaje, que puede sufrir alteraciones si las concentraciones de pH son muy bajas.

Dado las hojas son el órgano de las plantas que reciben directamente los efectos de la lluvia, será descrita de forma breve la estructura típica de una lámina foliar (Figura 2), la cual se divide en tres tipos de tejidos: el epidérmico, fundamental y vascular.

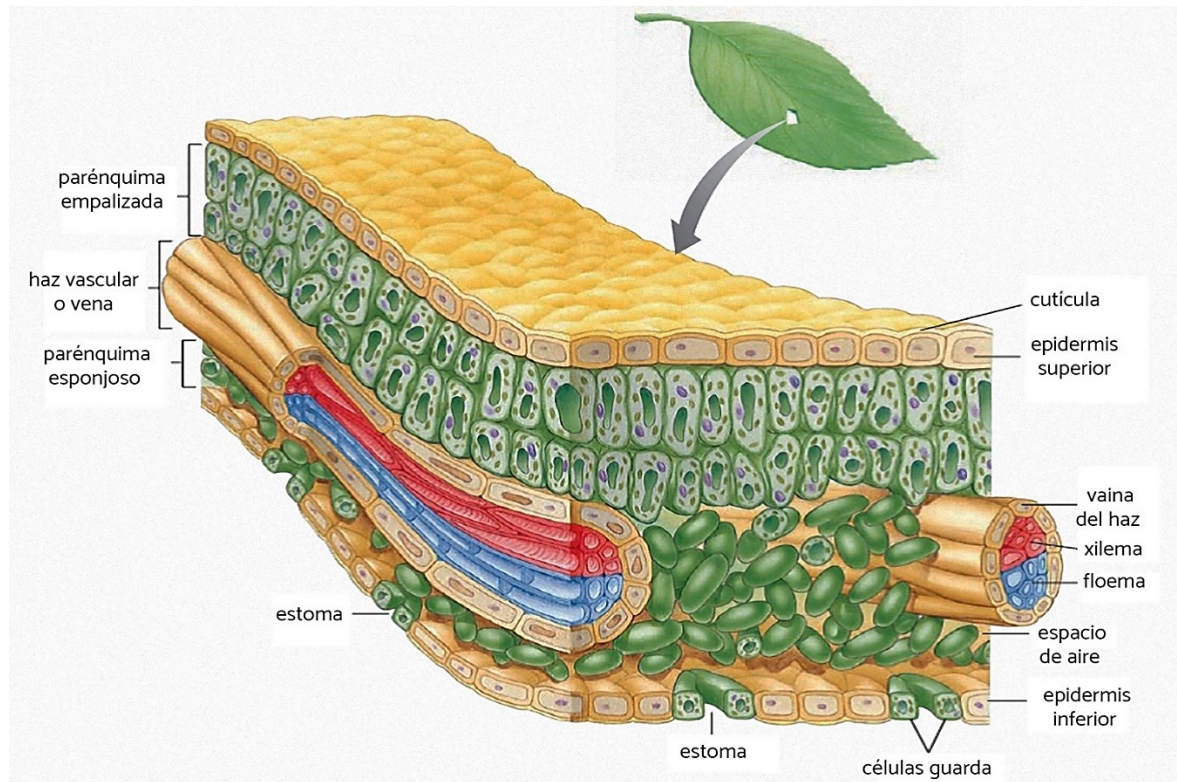


Figura 2. Estructura típica de una hoja. Modificado de González, 2003.

Recorriendo la estructura de la lámina de afuera hacia adentro, encontramos en primer lugar a la cutícula que es cubierta que rodea a toda la hoja y que interacciona directamente con el ambiente. Seguido del tejido epidérmico formado por células compactas sin cloroplastos, se distinguen dos tipos de epidermis, la superior o adaxial y la inferior o abaxial; en esta última generalmente se encuentran inmersos los

estomas, que son estructuras especializadas formadas por las células guarda que poseen cloroplastos y cuya función es el intercambio gaseoso (Freeman, 2009).

Por debajo de la epidermis se encuentra el tejido fundamental, también llamado mesofilo. Se diferencian dos tipos de células: las que se disponen forma paralela, llamadas parénquima en empalizada, y las que se disponen en forma muy irregular, dejando entre sí espacios intercelulares que en conjunto se le denomina parénquima esponjoso. Las células en empalizada tienen un gran contenido de cloroplastos y su principal función es realizar la fotosíntesis. En cambio, las células del parénquima esponjoso, están mucho más vinculadas con el transporte de los gases al interior y exterior de la hoja (*Ibid.*, p. 804).

Finalmente, el tejido vascular se compone a su vez de dos tejidos complejos llamados xilema y floema. El xilema lleva a cabo el transporte de agua e iones disueltos y se ubica hacia la superficie adaxial, mientras que el floema lleva a cabo el transporte de azúcares, aminoácidos, señales químicas y de otras sustancias; su ubicación es hacia la superficie abaxial (*Ibid.*, p. 806).

Ingreso de sustancias a las hojas y daños ocasionados por la lluvia ácida en los tejidos foliares

La primera estructura de la hoja que tiene contacto con las gotas de lluvia es la cutícula, la cual es originada por la secreción de las células epidérmicas y está organizada por una capa estructural de polímeros de $C_{16} - C_{18}$ de ácidos grasos y

glicerol denominada cutina (Kurst y Samuels, 2009). Las ceras epicuticulares son el segundo componente formado por ácidos alifáticos de cadena larga que crean una matriz, la cual puede presentar diversos patrones y formas de acuerdo a las condiciones propias de la especie y de la atmósfera circundante con la que interactúa (revisado en Riederer y Müller, 2006).

Se sabe que la cantidad y grosor de las ceras epicuticulares depende principalmente de las condiciones de temperatura, intensidad de la radiación solar y disponibilidad de agua (Medeiros *et al.*, 2017).

La lluvia sea ácida o no puede penetrar a través de capas de la cutícula o por medio del poro estomático para llegar al mesofilo de las hojas. Crafts (1961) postuló que la cutícula está perforada con microporos, éstos suelen ser numerosos en áreas especializadas como son las bases de tricomas, hidátodos o pelos glandulares (Dybing y Currier, 1961; Sargent y Blackman, 1962).

Las moléculas no polares que se depositan sobre la lámina, deben penetrar la cutícula a velocidades más rápidas que las de las moléculas polares (tales como iones inorgánicos y agua) debido a la naturaleza de la cutina y ceras epicuticulares de la cutícula (Norman *et al.*, 1950). Las moléculas polares pueden entrar preferentemente a la hoja a través de canales pectináceos que atraviesan la cutícula hasta la epidermis y son afines a estas moléculas (Roberts *et al.*, 1948; Linskens, 1950; Leonard, 1958).

Esto se evidencia dado que alrededor del 95% de todas las lesiones foliares, después de la exposición a la lluvia ácida simulada se producen cerca de las bases de los tricomas, a lo largo de las venas de la lámina, y alrededor de los estomas (revisado en Evans, 1984; revisado en Wellburn, 1988).

La acidez de una solución también puede afectar las tasas de penetración de la cutícula. En experimentos con aislados cuticulares de hojas de chabacano, las tasas de penetración de sustancias ácidas aumentaron con la acidez de la solución (Schönherr, 1976; Schönherr y Schmidt, 1979).

Adams (1982), demostró que las hojas de varias especies tienen diferentes capacidades amortiguadoras. El pH de las gotas de lluvia simulada (50 µl) de pH 5.6, 3.5 y 3.0, por lo general se incrementó durante el período de tiempo de 75 minutos de mediciones. Esto sugiere una interacción de las ceras y cutina con las sustancias ácidas que llevan las gotas de lluvia, que además generan modificaciones en la cutícula, lo que puede aumentar notablemente el grado de humectabilidad en la superficie de las hojas (Fogg, 1948).

Al existir modificaciones en la cutícula de las hojas, estas son más sensibles al recibir sustancias ácidas, que pueden influir en la degradación del mesófilo de las hojas y por lo tanto, afectar el desarrollo y vigorosidad de toda la planta.

Puesto que las sustancias ácidas aportan iones de H⁺ que pueden reemplazar una cantidad equivalente de algún nutriente, es decir, por cada equivalente de ácido es

extraída una cantidad similar de nutrientes $H^+ + H^+ = Ca^{2+}$ o $2K^+$ (revisado en Wellburn, 1988). Algunas investigaciones han demostrado que los niveles de acidez en las hojas influyen en la lixiviación de los nutrientes de las plantas (Wood y Bormann, 1974; Fairfax y Lepp, 1975; Evans *et al.*, 1980; Minoura y Iwasaka, 1996).

En todas las especies estudiadas los valores de pH muy bajos favorecen una rápida lixiviación de los cationes Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} en las hojas (revisado en Evans, 1984). Este reemplazo de H^+ por los nutrientes antes mencionados en algunas sustancias presentes en las células del mesofilo refleja daños a nivel interno y en la superficie de las hojas.

Se reporta que las lesiones producidas por la lluvia ácida simulada se originan principalmente en las hojas y las estructuras reproductivas (Gordon, 1972; Jonsson y Sundberg, 1972; Evans *et al.*, 1977, Evans *et al.*, 1978; Evans y Curry, 1979).

Otros efectos a la exposición a lluvia ácida simulada es la producción de agallas sobre la superficie foliar adaxial (Evans *et al.*, 1977, Evans *et al.*, 1978; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006), las agallas se producen a partir de la proliferación y ampliación anormal de células, estos efectos han sido encontrados en *Artemisia tilesii* Ledeb., *Phaseolus vulgaris* L. y *Spinacia oleracea* L. (Adams, 1982).

En la actualidad, casi todos los conocimientos acerca de las lesiones foliares visibles se deriva de la exposición de las plantas a lluvias ácidas simuladas, pues de esta manera se observan los daños específicos como consecuencia del tratamiento.

También se han llevado a cabo experimentos para clasificar la sensibilidad de las especies a la lluvia ácida simulada. En base a los efectos visibles en el follaje, se ha sugerido que el grado de sensibilidad de las plantas en un intervalo de mayor a menor es el siguiente: angiospermas y gimnospermas (Evans y Curry, 1979). Dentro de cada especie, la cantidad de lesiones visibles en la hoja parece referirse linealmente a la concentración de iones H^+ de la solución de lluvia simulada (revisado en Evans, 1982, Ashenden, 2002; Da Silva *et al.*, 2005).

El grado e intensidad de daño está asociado a la zona de las hojas que tiene contacto con el agua de lluvia (Percy y Baker, 1987). El daño también puede depender de la tasa de absorción de las sustancias.

La cantidad de agua absorbida por el follaje, a su vez depende de las características anatómicas de las hojas que varían entre especies y como consecuencia se puede determinar su sensibilidad a la precipitación ácida (Sargent y Blackman, 1962; revisado en Evans, 1984).

Efecto de la lluvia ácida en la concentración de clorofilas

La fotosíntesis es un proceso esencial para el desarrollo y mantenimiento de las plantas. El principal organelo encargado de realizar este proceso químico es el cloroplasto, que se encuentra principalmente en las células del parénquima empalizada de las hojas.

Los cloroplastos se componen de laminillas interiores (tilacoides), las cuales contienen moléculas como las clorofilas y carotenoides que tienen la capacidad de absorber energía radiante, que luego se utiliza para transferir electrones a través de compuestos ricos en energía (NADPH y ATP). Posteriormente se reduce el CO₂ para generar hidratos de carbono y la liberación de oxígeno (Díaz de la Guardia, 2010).

Para que el proceso fotosintético se desarrolle, la luz debe ser absorbida por las moléculas receptoras llamadas pigmentos o fotorreceptores que forman el complejo colector de luz. Las plantas poseen varios tipos de pigmentos; la clorofila que proporciona el color verde, los carotenoides que son de colores rojos o anaranjados y se encargan de proteger a las clorofilas, evitando su fotooxidación (Figura 3); las antocianinas son violetas o rojizas, dan color a las flores y los fitocromos que son importantes para la morfogénesis de las plantas (*Ibid*).

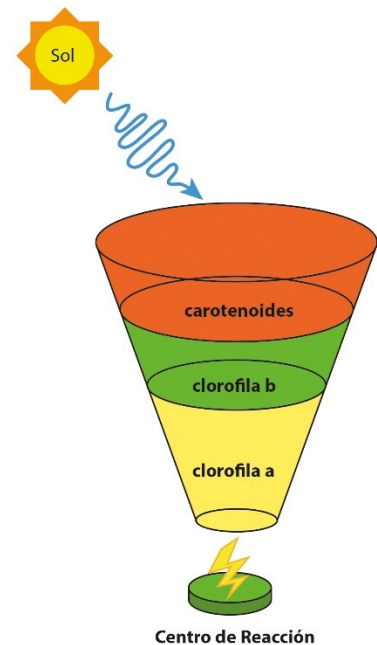


Figura 3. Complejo colector de luz.
Modificado de Díaz de la Guardia, 2010.

Al incidir los fotones de luz sobre un átomo de un pigmento, éste absorbe la energía del fotón incrementando la energía de sus electrones que la transfieren del orbital más próximo al núcleo del orbital más lejano. Dado que las moléculas de los pigmentos son complejas y poseen muchos electrones, cada uno de ellos puede absorber fotones

de distintas longitudes de onda y por lo tanto distinta energía (Azcon-Bieto y Talón, 2013).

La captación de distintas longitudes de onda (λ) en relación con la absorción (o absorbancia) de luz de un pigmento, se conoce como espectro de absorción. Cada pigmento posee máximos de absorción que permiten caracterizarlo o cuantificar la cantidad presente en alguna solución por unidad de peso o superficie de hoja (Díaz de la Guardia, 2010).

En la figura 4 se puede observar el espectro de absorción de diferentes pigmentos fotosintéticos, las clorofilas a y b absorben primordialmente luz de los campos azul-violeta y rojo del espectro. En la fotosíntesis, el electrón de la clorofila a que ha absorbido un fotón de la porción azul del espectro, pierde la energía extra en forma de calor y termina con igual energía que un electrón que ha sido energizado por un fotón de la porción roja del espectro (Murray, 2005).

Los carotenoides absorben longitudes de alta energía que se encuentran en la zona de morados y azules, es decir, son más eficientes en la captura de energía en estas longitudes para luego transmitir las a las clorofilas y disiparse en forma de calor (Azcon-Bieto y Talón, 2013).

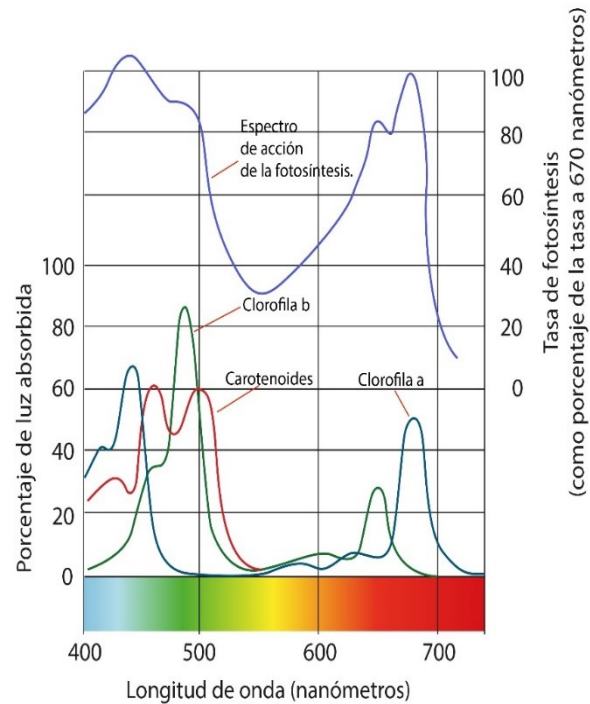


Figura 4. Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos. Modificado de Rodés y Collazo, 2006.

La relación de la fotosíntesis (captación de CO_2) con la longitud de onda empleada se denomina: espectro de acción de la fotosíntesis. En la figura 3 se observa que ambos espectros coinciden en lo referente a las longitudes de onda. Donde la eficiencia fotosintética es más alta y donde la absorción luminosa de los pigmentos es mayor, probando así que todos estos pigmentos participan en el proceso de la fotosíntesis.

Cuando las plantas son sometidas a tratamientos ácidos, se han reportado cambios en la eficiencia de la fotosíntesis (Velicova *et al.*, 1999; Giri *et al.*, 2013; Polishchuk *et al.*, 2016). En la revisión de Wellburn (1988) se menciona que la inhibición de la fotosíntesis es considerada uno de los primeros efectos del dióxido de azufre sobre las plantas y

por lo tanto, los cloroplastos son los primeros sitios donde se perciben los efectos del dióxido de azufre o por sustancias ácidas en solución acuosa.

El pH del estroma siempre es cercano a 7 y esto favorece la formación de iones sulfito por la ionización del sulfuro. Sin embargo, si el pH baja los compuestos de azufre entrarían más fácilmente como $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y todas las formas de dióxido de azufre podrían entrar como agentes oxidantes.

Si en el interior del tilacoide existen fluctuaciones del pH, éste comienza a hincharse, por lo que se da una desintegración general en la estructura de la grana (Liu *et al.*, 2015); inicialmente este fenómeno es reversible, aunque el tiempo de recuperación es proporcional a la dosis recibida.

Una vez que los ácidos entran en forma de iones al interior del tilacoide, se produce un cambio de pH en el lumen del mismo. Lo que desencadena una disipación de energía fotónica por las altas concentraciones de H^+ que se manifiesta en la extinción de la fluorescencia de la clorofila *a*, además de cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana tilacoidal (Velicova *et al.*, 1999; Polshchuk *et al.*, 2016).

Esta desnaturalización en la estructura del cloroplasto propicia el ensamblaje anormal de la enzima ATP_{asa} -cloroplasto y en consecuencia existe una disminución en el transporte de iones Mg^{2+} (Polshchuk *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2016).

Las reacciones que ocurren en las membranas de los tilacoides dependen del flujo de electrones inducido por el agua, que genera un gradiente de protones a través de la membrana que hace al estroma volverse más alcalino y al lumen más ácido (Figura 5).

Otra evidencia sobre la influencia en las fluctuaciones del pH es la inactivación de la enzima Ribulosa Bifosfato Carboxilasa Oxigenasa (RuBisCO) cuando los niveles de $\text{pH} < 7$, por lo que a valores menores podría disminuir en un 50% la fotosíntesis neta que afectaría el crecimiento de las plantas por la reducción en la eficiencia de fijación de carbono (revisado en Wellburn, 1988).

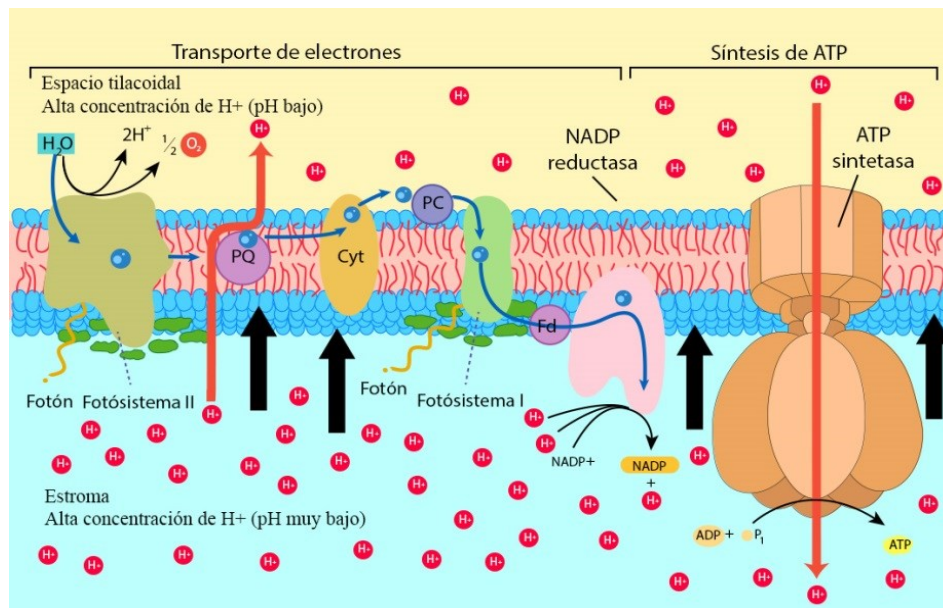


Figura 5. Membrana tilacoidal y el aumento en concentración de iones hidrógeno en el estroma. Modificado de Samartín, 2012.

Estudios previos sobre lluvia ácida en diversas especies vegetales

Son diversas las investigaciones que se han realizado sobre de la lluvia ácida, éstas abarcan distintos enfoques como puede verse en la tabla 1, sin embargo aún falta realizar un mayor número de investigaciones que describan los impactos generados por la acidez en las plantas que se desarrollan en ambientes urbanos.

Tabla 1. Investigaciones previas realizadas sobre el impacto de la lluvia ácida en diferentes especies vegetales

Autor	Especie	Familia	Tema de investigación
Evans <i>et al.</i> ; 1977	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Perturbaciones anatómicas
	<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	
Wood y Bormann, 1977	<i>Pinus strobus</i>	Pinaceae	Respuesta fisiológica
Evans y Curry, 1979	<i>Tradescantia sp.</i>	Commelinaceae	Anatomía de follaje
	<i>Pteridium aquilinum</i>	Dennstaedtiaceae	
	<i>Quercus palustris</i>	Fagaceae	
	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	
Troiano <i>et al.</i> ; 1982	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	Efectos en crecimiento
Rathier y Frink, 1984	<i>Nicotiana tacabum</i>	Solanaceae	Calidad y productividad de hoja
Neufeld <i>et al.</i> ; 1985	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Magnoliaceae	Daño foliar, anatomía
	<i>Platanus occidentalis</i>	Platanaceae	
	<i>Liquidambar styraciflua</i>	Altingiaceae	
	<i>Robina pseudo-acacia</i>	Fabaceae	
Harcourt y Farrar, 1989	<i>Raphanus sativus</i>	Brassicaceae	Crecimiento
	<i>Hordeum distichum</i>	Poaceae	
Huttunen <i>et al.</i> ; 1990	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	Formación de cristales, lixiviación

	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	de nutrientes
	<i>Betula tortuosa</i>	Betulaceae	
Turunen y Huttunen, 1991	<i>Pinus sylvestris</i>	Pinaceae	Efectos en la cutícula
	<i>Betula tortuosa</i>	Betulaceae	
Zobel y Nighswander, 1991	<i>Pinus nigra</i>	Pinaceae	Acumulación de compuestos fenólicos
	<i>Pinus resinosa</i>	Pinaceae	
Smalley <i>et al.</i> ; 1993	<i>Pyrus communis</i>	Rosaceae	Permeabilidad de cutículas aisladas Cambios en biomasa
	<i>Citrus x limon</i>	Rutaceae	
Dixon y Kuja, 1995	<i>Acer sccharum</i>	Sapindaceae	Crecimiento, nutrición, pigmentos fotosintéticos
	<i>Picea glauca</i>	Pinaceae	
Shan <i>et al.</i> ; 1995	<i>Pinus armandi</i>	Pinaceae	Contenido clorofila, asignación de C y biomasa
Smith <i>et al.</i> ; 1996	<i>Pinus armandi</i>	Pinaceae	Respuestas fisiológicas
Singh y Agrawal, 1996	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	Respuesta a la acidez
Stoyanova, 1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Anatomía
Stoyanova y Velikova, 1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Ultraestructura de cloroplasto
Velikova <i>et al.</i> ; 1997	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Características de fotosíntesis
Hogan, 1998	<i>Acer saccharum</i>	Sapindaceae	Crecimiento y fisiología
Shan, 1998	<i>Acer saccharum</i>	Sapindaceae	Germinación en suelo ácido
	<i>Acer rubrum</i>	Sapindaceae	
	<i>Betula lutea</i>	Betulaceae	
	<i>Tsuga canadensis</i>	Pinaceae	
	<i>Pinus strobus</i>	Pinaceae	
Houbao y Chuanrong, 1999	<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	Daño foliar, decline clorofila
	<i>Ligustrum lucidum</i>	Oleaceae	
	<i>Castanopsis fissa</i>	Fagaceae	
	<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	
		Sapindaceae	

	<i>Koelreuteria bipinnata</i>		
Fan y Wang, 2000	<i>Cinnamomum camphora</i> <i>Ligustrum lucidum</i> <i>Castanopsis fissa</i> <i>Koelreuteria bipinnata</i>	Lauraceae Oleaceae Fagaceae Sapindaceae	Germinación, daño foliar, contenido clorofila
Soukupová <i>et al.</i> ; 2002	<i>Picea abies</i>	Pinaceae	Cambios anatómicos e histológicos
Campos da Silva <i>et al.</i> ; 2005	<i>Eugenia uniflora</i> <i>Clusia hilariana</i>	Myrtaceae Clusiaceae	Anatomía
Da Silva <i>et al.</i> , 2005	<i>Gallesia intergrifolia</i> <i>Genipa americana</i> <i>Joannesia princeps</i> <i>Mimosa artemisiana</i> <i>Spondias dulcis</i>	Phytolaccaceae Rubiaceae Euphorbiaceae Mimosidae Anacardiaceae	Daño foliar, anatomía
Wand <i>et al.</i> ; 2005	<i>Bauhinia variegata</i> <i>Glycine max</i>	Fabaceae Fabaceae	Fotosíntesis
Lee <i>et al.</i> ; 2006	<i>Arabidopsis thailiana</i>	Brassicaceae	Necrosis, vías de señalización del ácido salicílico
Sant'Anna-Santos <i>et al.</i> , 2006	<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae	Daño foliar, anatomía
Liu <i>et al.</i> ; 2007	<i>Schima superba</i> <i>Pinus massoniana</i>	Theaceae Pinaceae	Respuestas de florescencia en clorofila y xantofilas
Kumari y Tomar, 2009	<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	Contenido clorofila, ácido ascórbico
Neves <i>et al.</i> , 2009	<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtaceae	Fotosíntesis
Ween <i>et al.</i> ; 2011	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Ultraestructura de cloroplasto
Kardel <i>et al.</i> ; 2012	<i>Alnus glutinosa</i> <i>Acer pseudoplatanus</i> <i>Betula pendula</i> <i>Quercus robur</i>	Betulaceae Sapindaceae Betulaceae Fagaceae	Permeabilidad de hojas

	<i>Sambucus nigra</i>	Axadaceae	
Chen <i>et al.</i> ; 2013	<i>Liquidambar formosa</i>	Altingiaceae	Respuesta fotosintética y antioxidantes
	<i>Schima superba</i>	Theaceae	
Mehreen <i>et al.</i> ; 2013	<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	Efecto morfológico y fisiológico
Shen <i>et al.</i> ; 2013	<i>Acacia mangium</i>	Fabaceae	Intercambio de cationes en el dosel
	<i>Dimocarpus longan</i>	Sapindaceae	
Tong y Zhang, 2014	<i>Castanopsis sclerophylla</i>	Fagaceae	Sensibilidad, crecimiento, fotosíntesis
	<i>Cinnamomum camphora</i>	Lauraceae	
	<i>Manglietia fordiana</i>	Magnoliaceae	
	<i>Pinus massoniana</i>	Pinaceae	
	<i>Elaeocarpus glabripetalus</i>	Elaeocarpaceae	
Bamidele y Eguagie, 2015	<i>Capsicum annum</i>	Solanaceae	Respuesta ecofisiológica
Liu <i>et al.</i> ; 2015	<i>Elaeocarpus glabripetalus</i>	Elaeocarpaceae	Florescencia de clorofila y efectos en crecimiento

La lluvia ácida y sus precursores en la Ciudad de México y el área metropolitana

La contaminación atmosférica en la ciudad de México y el área metropolitana es provocada principalmente por el consumo de combustibles fósiles en diferentes sectores, lo que genera en la atmósfera circundante la presencia de sustancias acidificantes como el dióxido de azufre (SO₂) y óxidos de nitrógeno (NO_x). Esto propicia la formación de compuestos ácidos que se acarrean y precipitan en la ciudad desde los años 80's (Bravo y Aguilar, 1984; Báez y Padilla, 1983; Ortiz, *et al.*, 1984; Alvarado y García, 1988; Peñaranda, 1988).

La Dirección de Monitoreo Atmosférico ha generado informes sobre las precipitaciones ácidas desde 1994, en este primer reporte se encontró que la zona suroeste alcanzó la mayor acidez con valores de pH 4.3 a 4.6; en contraste los intervalos de baja acidez de 5.6 a 6.6 unidades de pH fueron para la zona noreste.

Se sabe que la distribución de los niveles del pH del agua de lluvia se asocia estrechamente con las tasas de emisión, el tiempo atmosférico prevaleciente y el transporte de los precursores SO_2 y NO_x a lo largo de la ciudad.

Los valores bajos de pH reportados en la zona suroeste se asocian con la trayectoria del viento predominante en la ciudad y el área metropolitana. Los vientos siguen una trayectoria dominante con dirección norte - sur, con velocidades de mayor intensidad en la dirección noroeste - sureste de 2 a 3 $\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$ y vientos más débiles entre 1 y 2 $\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$ con dirección noreste – sureste (Secretaría del Medio Ambiente, 1994).

Para el informe del 2006, se realizó una distribución histórica que indica los patrones de distribución de las precipitaciones ácidas (Figura 6), el color anaranjado en los mapas indican las zonas con lluvia ácida. En los años 1998 y 2000 se observa un aumento en la acidez para toda la ciudad, esto fue consecuencia de la actividad volcánica del Popocatepetl, que se encuentra a 72 km al sureste de la Ciudad de México (Secretaría del Medio Ambiente, 2006).

Durante el 2015, en todos los sitios de recolecta se encontraron muestras con valores de pH que corresponden a lluvia ácida. En la Figura 7 se indican las zonas que

reportaron valores de $\text{pH} < 5.6$ y observa que el mayor número de episodios ácidos ocurrieron al sur y al poniente de la Ciudad. El valor mínimo de pH fue de 3.8 al sureste de la Ciudad de México, el sitio se ubica en una zona rural en donde predomina la actividad agrícola (Secretaría del Medio Ambiente, 2016).

La presencia de lluvia ácida en el suelo de conservación (área de 87,291 ha. al sur de la ciudad de México), puede tener efectos graves importantes en la salud de los bosques, en los cuerpos de agua que aún sobreviven en la región, además del impacto económico en las zonas de producción agrícola.

Sin embargo, no existen investigaciones que esclarezcan los efectos puntuales ocasionados por la lluvia ácida, sólo se sabe que los bosques de las sierras de Ajusco-Chichinautzin y de las Cruces se encuentran bajo un grave estrés provocado por los elevados niveles de ozono, durante la temporada seca y por la lluvia ácida en la temporada húmeda (Calva 2012).

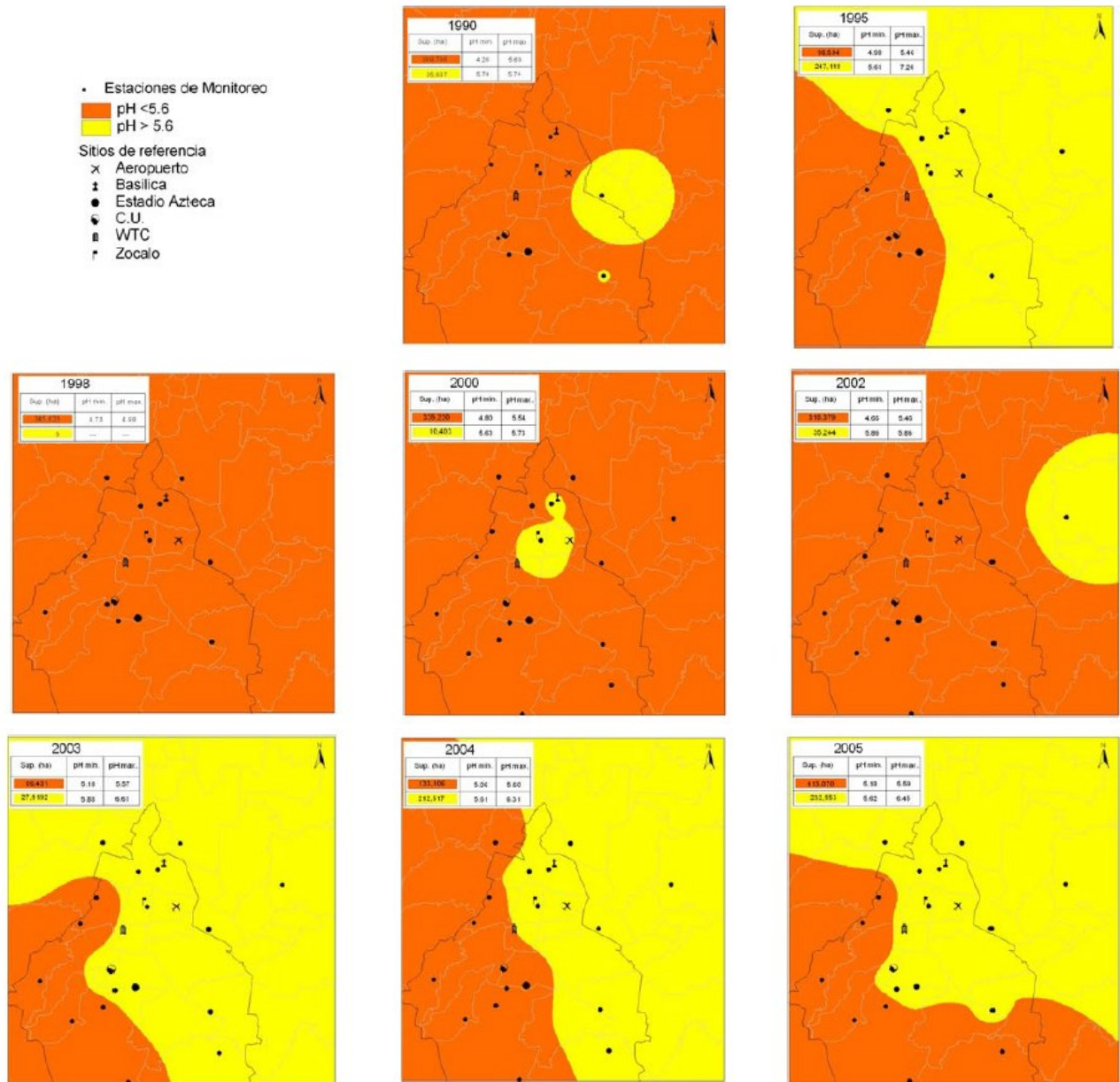


Figura 6. Distribución espacial histórica del pH del agua de lluvia en la ZMVM (1990-2006) Tomado de Secretaría del Medio Ambiente, 2006. El color anaranjado indica zonas con lluvia ácida; el color amarillo indica zonas con lluvia “natural”.

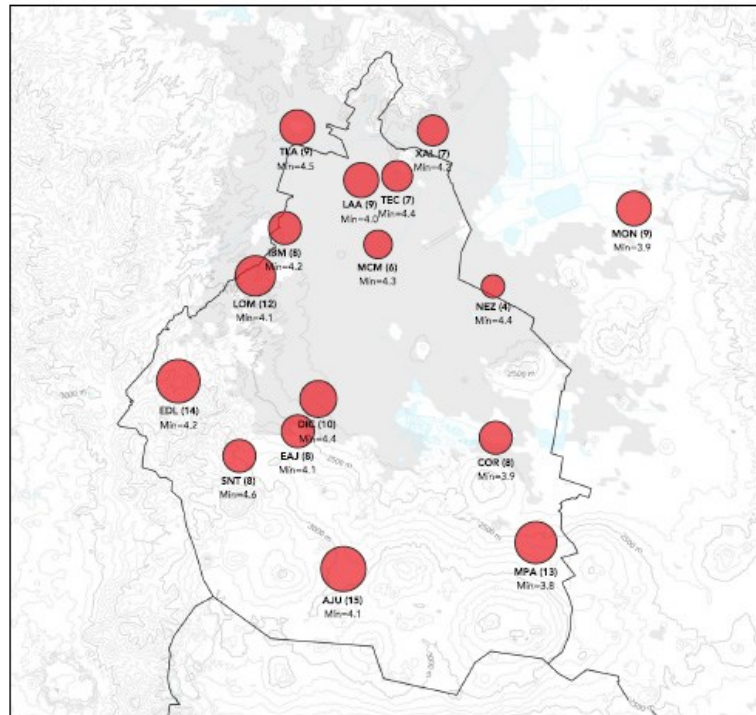


Figura 7. Distribución del número de muestras en las que se detectó la presencia de lluvia ácida. Durante la temporada de lluvia se colectaron alrededor de 24 muestras por sitio. Tomado de Secretaría del Medio Ambiente, 2016.

Método

Selección de especies

Se decidió elegir a *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua*, debido a que estas especies se reportan como frecuentes en los sitios arbolados de la Ciudad de México (Chacalo *et al.*, 2009). Además, ambas poseen una arquitectura foliar similar que será descrita a continuación, estas similitudes permiten establecer cuál de ellas es la especie más susceptible a generar alteraciones en su anatomía por efecto de la lluvia ácida.

Descripción general de la arquitectura foliar de las especies

Liquidambar styraciflua

Hojas simples y opuestas con peciolo marginal (Figura 8); lámina mesofila (4,500-18,225mm²) de acuerdo con Ellis *et al.*, (2009); lámina palmatilobada con base simétrica lobada y con ángulo reflejo; ápice recto y agudo; margen retuso cóncavo-convexo. Venación primaria palmeada decurrente con base actinodroma; venas secundarias mayores broquidódromas festoneadas, las venas de 3er y 4to orden forman retículos.

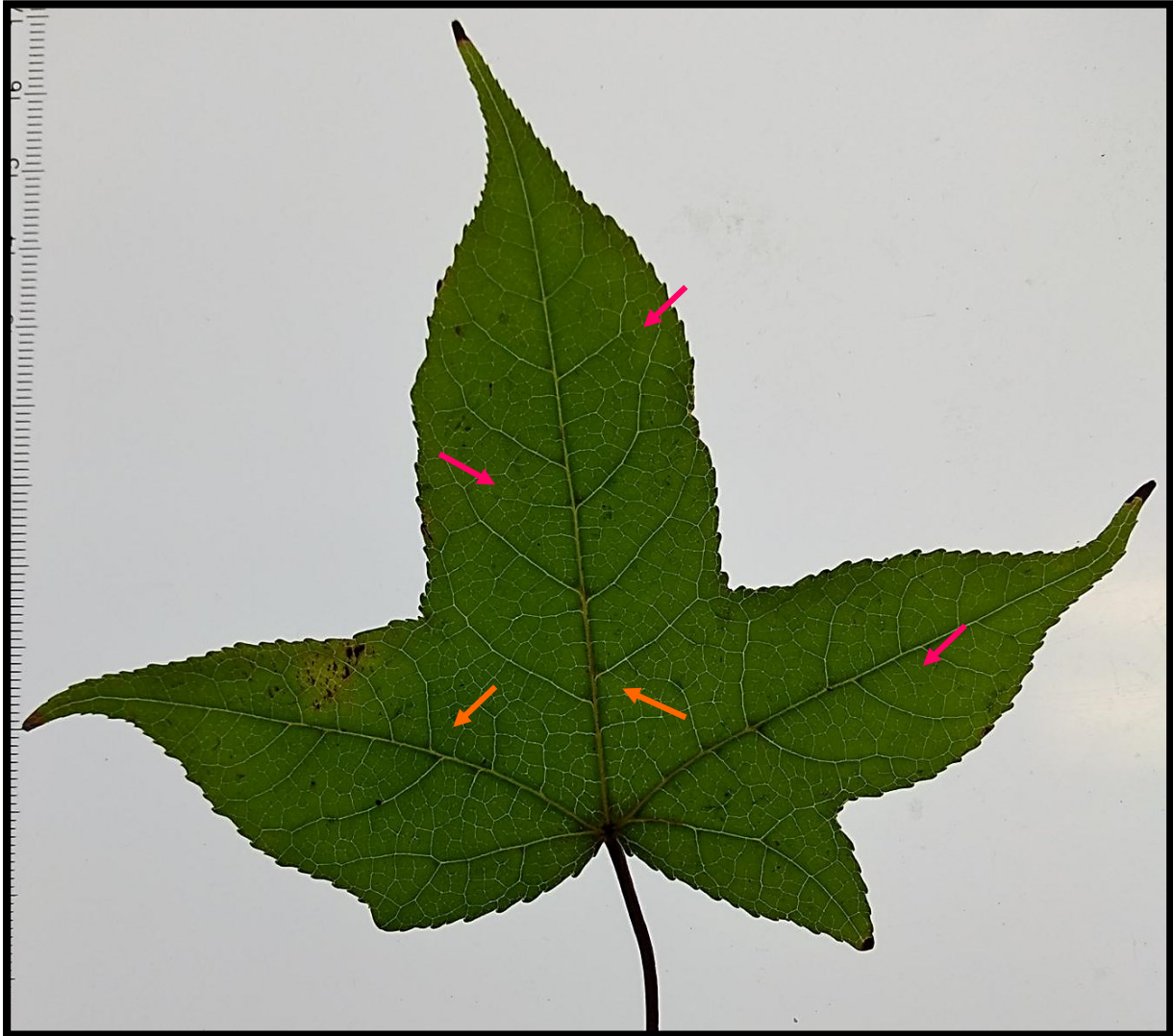


Figura 8. Hoja de *Liquidambar styraciflua* se muestra la arquitectura foliar. Las flechas anaranjadas señalan las venas secundarias decurrentes; las flechas rosas señalan los retículos que forman las venas de 3er y 4to orden.

Fraxinus uhdei

Hojas imparipinadas opuestas con peciolo marginal (Figura 9); foliolos microfílos (225-2,025mm²) de acuerdo con Ellis *et al.*, (2009); lamina entera elíptica y simétrica; base cuneada aguda; ápice recto y agudo; margen retuso cóncavo-recto. Venación primaria pinnada decurrente; venas secundarias mayores broquidódromas festoneadas, las venas de 3er y 4to orden forman retículos.

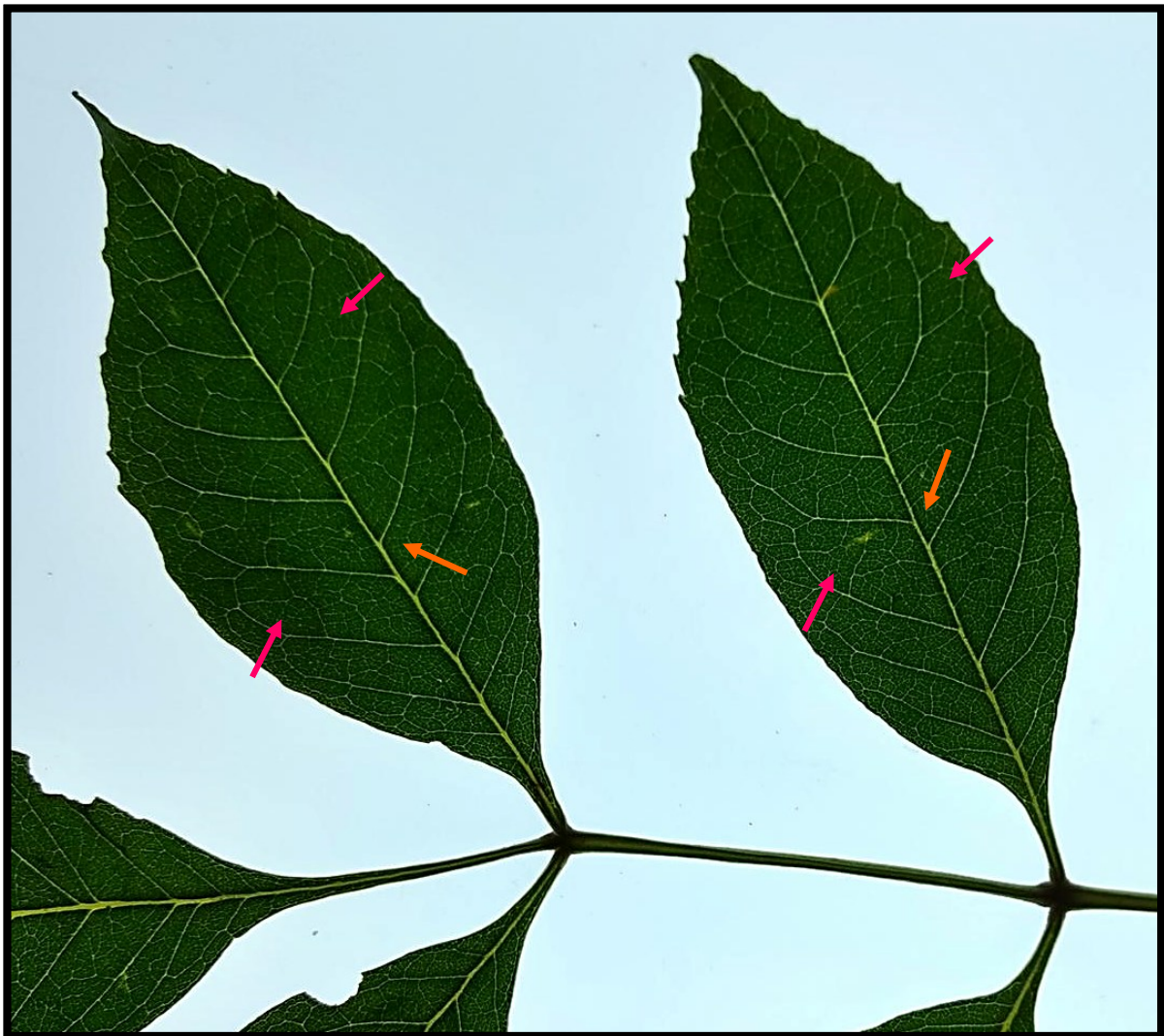


Figura 9. Foliolos de *Fraxinus uhdei* se muestra la arquitectura foliar. Las flechas anaranjadas señalan las venas secundarias decurrentes; las flechas rosas señalan los retículos que forman las venas de 3er y 4to orden. Se observan claramente la unión de las venas de segundo orden.

Ubicación taxonómica de las especies

En la tabla 2 se marca la ubicación taxonómica de cada especie, para realizar comparaciones con distintos trabajos similares que puedan compartir algunas familias.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Liquidambar styraciflua* y *Fraxinus uhdei* por Stevens, 2017.

Reino	Plantae	Plantae
Filo	Traqueophyta	Traqueophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Orden	Saxifragales	Lamiales
Familia	Altingiaceae	Oleaceae
Género	<i>Liquidambar</i>	<i>Fraxinus</i>
Especie	<i>styraciflua</i>	<i>uhdei</i>

Descripción botánica de las especies

Liquidambar styraciflua L.

Árbol monoico de hasta 41 m. de altura, de corteza externa fisurada; hojas (figura 10) con estípulas lineares-lanceoladas de 3-4 mm, caducas tempranas, dejando 2 cicatrices estipulares adaxialmente cerca de la base del pecíolo; pecíolos de 60-100 mm. La lámina de la hoja es palmeadamente lobulada, los lóbulos principales a veces también dentado-lobulados, miden de 7-19 × 4.4-16 cm; con superficies glabras, excepto las hojas jóvenes que son peludas en las venas y las venas axilares principales en la base con pelos simples persistentes de color marrón rojizo. Flores estaminadas en racimos pedunculados de 3-6 cm; perianto ausente; estambres 4-8 (-10) por flor,

150-176 (-300) por racimo, cayendo después de la antesis. Flores pistiladas sin perianto; sin hipanto con 5-8 estaminodios alrededor de los lóbulos del disco; ovario (1-) 2-lóculos; 2 estilos; estigmas curvos. Frutos capsulares globosos marrones en la madurez de 2.5-4 cm de diámetro (Incluidos estilos indurados). Semillas apicalmente aladas de 8-10 mm, marcadas con conductos de resina; semillas abortadas de color marrón de 1-2 mm, sin alas, irregulares, que se asemejan a aserrín (Flora de Norteamérica, 2017).

Esta especie ha sido empleada en la recuperación de terrenos degradados o desmontados o donde hubo actividad minera. Es muy apreciada como planta de ornato en avenidas, parques y jardines por la belleza de su follaje que en otoño se torna rojo-amarillento, escarlata, violáceo. En zonas no urbanas los árboles proporcionan alimento durante el invierno y refugio para el apareamiento de gran variedad de aves y mamíferos. Se ha comprobado que es una especie tolerante a diversos factores ambientales como el incremento de CO₂, también posee una tolerancia intermedia al ozono (las hojas pierden color y se necrosan) y a fluoruros. La lluvia ácida causa reducción significativa de raíces y biomasa de tallo, sin embargo es muy susceptible al ataque de roedores, insectos o plantas parásitas (CONABIO, 2017).

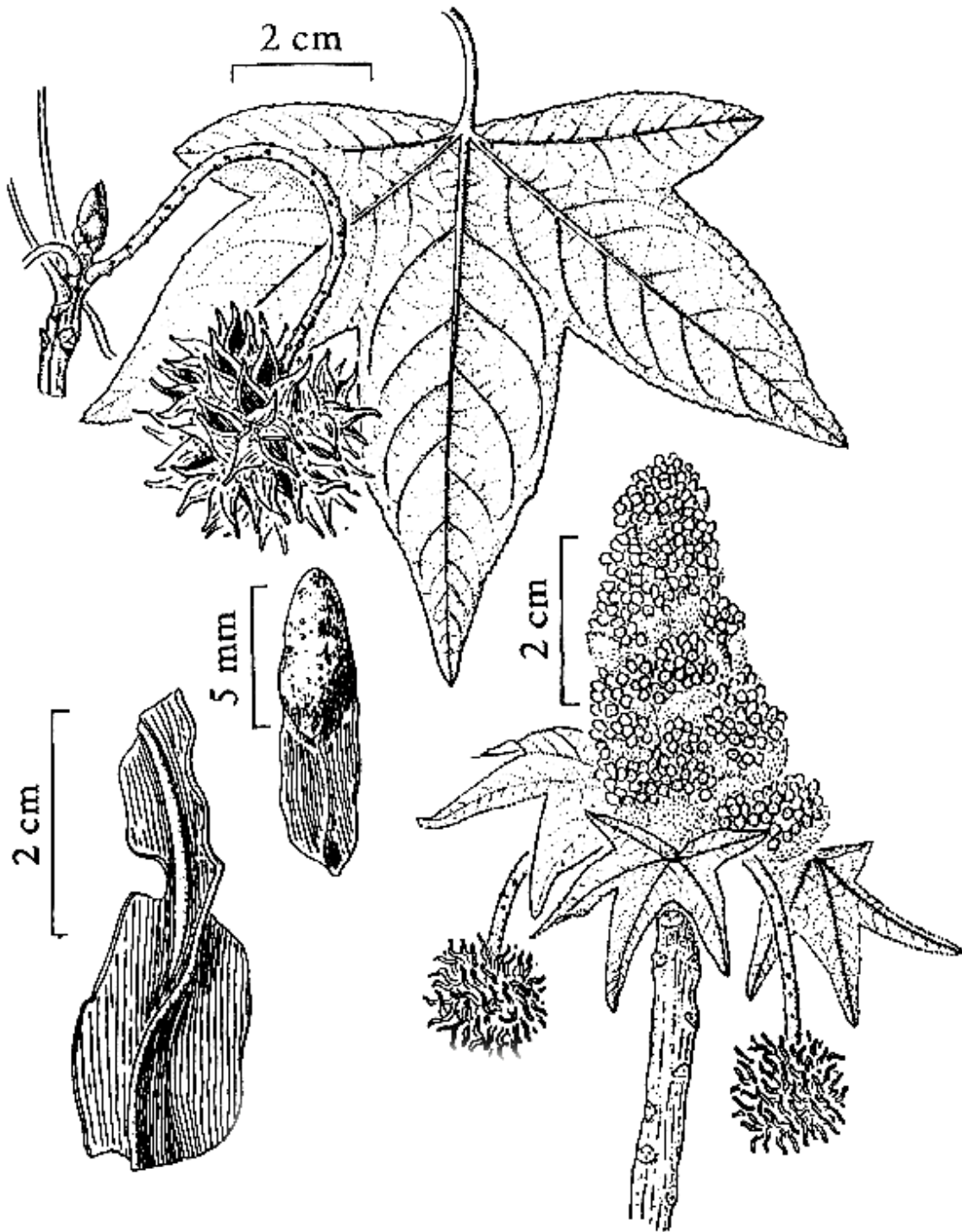


Figura 10. Ilustración botánica de *Liquidambar styraciflua*. Modificado de Flora de Norteamérica, 2017.

Fraxinus uhdei (Wenz.) Lingelsh

Árbol dioico de hasta de 25 m de alto, de corteza rugosa y estriada; hojas (figura 11) de 5 a 9 foliolos, casi sésiles a finamente peciolulados, lanceolados, oblongo-lanceolados o elípticos, de 5 a 15 cm de largo, de 1.5 a 5 cm de ancho, ápice largamente atenuado, bordes menudamente dentados o serrulados, base obtusa, redondeada o aguda, membranosos o algo engrosados, haz glabro, envés verde claro, generalmente algo pubérulo a lo largo de la nervadura media, pero glabro en el resto; panículas de 7 a 20 cm de largo, raramente más pequeñas, muy ramificadas, laxas o densas; flores con un diminuto cáliz tetradentado, pétalos ausentes, las flores masculinas con 2 estambres de 0.3 a 0.5 cm de largo, las femeninas con 1 pistilo de 0.4 a 0.7 cm de largo, estilo bífido; sámara de 2.5 a 4 cm de largo, con un pequeño cuerpo oscuro más o menos cilíndrico, de alrededor de 0.7 cm de largo, con un ala de alrededor de 0.5 cm de ancho, obtusa o algo emarginada en el ápice (Sánchez, 2010). Es una especie fácilmente adaptable de rápido y vigoroso crecimiento, vive de 80 a 100 años. Se ha utilizado para la recuperación de terrenos degradados o sitios donde hubo explotación minera. Es una especie de ornato distribuida ampliamente en avenidas, parques y jardines por la belleza de su follaje y sombra, siendo también el hogar y fuente de alimento para muchos pájaros. Ha sido reportada como sensible al ozono y susceptible al daño por insectos si se encuentra en condiciones de estrés hídrico (CONABIO, 2017).

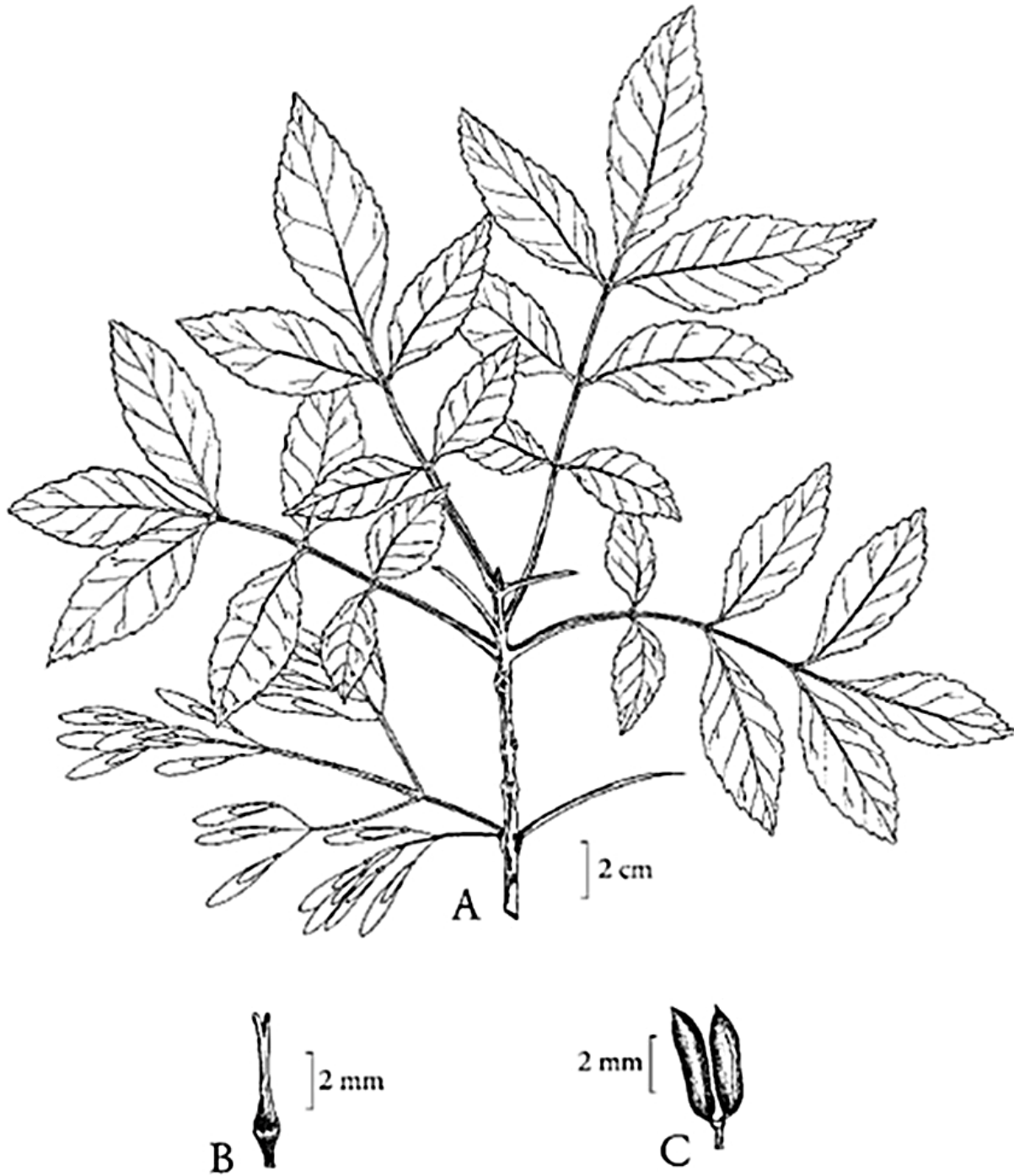


Figura 11. Ilustración botánica de *Fraxinus uhdei* A. rama con frutos; B. flor femenina; C. flor masculina, tomado de Rzedowski y Rzedowski, 2010.

Obtención y aclimatación de las especies

Una vez establecidas las especies de estudio, se procedió a solicitar la donación de 200 árboles a los Viveros de Coyoacán, donde se obtuvieron 50 árboles de fresno de un año con una altura de aproximadamente 80 cm y 75 árboles de liquidámbar de un año y 75 árboles de tres años, con una altura aproximada de 60 y 210 cm, respectivamente.

Los árboles fueron trasladados a la Unidad de Invernaderos de Investigación del Jardín Botánico del IB-UNAM (Figura 12), donde las plantas fueron aclimatadas durante tres meses con un promedio de humedad relativa del 88% y temperatura de 28.2°C, además se les administró fertilizante triple comercial (17% N, P, K). Al finalizar la etapa de aclimatación y con el fin de evitar efectos al sustrato de los árboles se colocó un recubrimiento con una película de acetato en la base de las macetas.

Fase experimental y recolecta de muestras

Para desarrollar la simulación de la lluvia ácida los árboles se distribuyeron en mesas que correspondían a cada uno de los tratamientos, 5 árboles de cada especie y en el caso de *L. styraciflua* de ambas edades. Enseguida se realizó el marcaje de 25 hojas/foliolos por cada especie y edad.

Se decidió utilizar ácido sulfúrico ya que los análisis de la composición de la lluvia reportan que la mayor proporción corresponde a sulfatos (Secretaría del medio Ambiente, 2016). El ácido fue llevado a soluciones con distintos niveles de pH.

La elección del pH de las soluciones corresponde a: los valores de la “lluvia natural” (pH 5.6), al reportado como valor mínimo (pH 3.8) en el Informe de Calidad del Aire 2015 (*Ibid*), un escenario (pH 2.5) con un aumento considerable de acidez y un tratamiento control con agua destilada.

El experimento se realizó durante dos semanas, con la aspersion total de 50litros*m⁻² de las soluciones antes descritas en seis aplicaciones cada tercer día. La cantidad asperjada equivale al promedio de precipitación de un mes reportado en la Ciudad de México para el 2014 (Secretaría del Medio Ambiente, 2015).

Veinticuatro horas después de la primera aplicación se comenzó el registro fotográfico de los efectos visibles en la superficie de las hojas asperjadas; dicho registro se continuó hasta el final del experimento. Al término de éste, y con el fin de realizar estudios anatómicos se recolectaron al azar, por un método de muestreo estratificado (Vivanco, 2006) cuatro hojas/ foliolos del marcaje realizado previamente en cada especie y edad de todos los tratamientos.

Para realizar los estudios anatómicos en el caso de *Fraxinus uhdei* se tomó el foliolo intermedio derecho de la fronda y se siguió la siguiente estandarización para ambas especies: la lámina foliar se dividió en tres en orientación transversal (Figura 13), luego se tomó una sección de aproximadamente 1 cm² de la mitad derecha de la lámina que incluyó el margen y otra sección donde se incluyó la vena media.

Bajo los mismos criterios se seleccionaron tres láminas por cada especie y edad de los tratamientos para la observación de cutículas por Microscopia Electrónica de Barrido

(MEB). También se tomaron diez láminas completas por cada especie y edad de los tratamientos para realizar la extracción de clorofila *a* y *b* y medir sus concentraciones por espectrofotometría.



Figura 12. Invernadero de experimentación



Figura 13. Estandarización para la toma de muestras. Izquierda *Fraxinus uhdei*, derecha *Liquidambar styraciflua*.

Fase de laboratorio- Procesamiento histológico de las muestras

Una vez recolectadas las muestras de las láminas, éstas se llevaron inmediatamente a procesos distintos. Las muestras para observaciones anatómicas se fijaron en FAA* (Formaldehído-Ácido acético-Alcohol-Agua) durante 24 h.; a continuación se lavaron a chorro de agua hasta eliminar todo el fijador y fueron llevadas a una deshidratación gradual con alcohol terbutílico* (ATB) por 24 h. en cada porcentaje, comenzando con ATB al 35% seguido de 50%, 60%, 70%, 85%, 95%, 100% y grado absoluto (*Para consultar la preparación de las soluciones ver el Anexo I).

A continuación las muestras fueron infiltradas poco a poco colocando escamas de parafina histológica cada 20 minutos, dentro de una estufa a 58°C hasta doblar el volumen de alcohol terbutílico. Luego fueron incluidas en el mismo medio para formar bloques de secciones transversales y ser cortadas a 15µm con el micrótopo de rotación American Optical 820. Después se realizó una tinción contrastante con safranina-verde rápido, se montaron en resina sintética y finalmente se etiquetaron como lo sugiere Sandoval *et al.*, (2005).

Las muestras destinadas a la observación de cutículas en MEB se sometieron al mismo proceso de fijación, pero la deshidratación gradual se llevó a cabo con etanol (30% 50%, 60%, 70%, 80%, 95% y absoluto) por 24 h. cada uno.

Después fueron secadas a punto crítico con CO₂ durante una hora con el equipo CPD K50 Mite, luego fueron montadas en porta muestras de aluminio con cinta conductora

de carbón y finalmente se cubrieron con oro por dos minutos a 20 $\mu\text{Å}$ con el equipo Quorum Q150R-TS. Posteriormente, se realizaron observaciones y la toma de 386 micrografías de ambas especies y los diferentes tratamientos; en un microscopio electrónico de barrido Hitachi SU1510, en el Laboratorio de Microscopia Electrónica del IB-UNAM.

Las hojas y folíolos reservados para las cuantificaciones de la clorofila *a* y *b* de todos los tratamientos se transportaron de inmediato al laboratorio; se maceraron en una solución solvente de acetona-hexano (4:6). Enseguida se realizaron mediciones de absorbancia a 645 y 663 nm como lo sugiere Nagata y Yamashita, (1992) utilizando un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D (Anexo II).

Fase de gabinete-Observaciones anatómicas y obtención de datos

Para la observación de las modificaciones anatómicas en cada especie y edad, se hizo la observación de secciones transversales en 465 preparaciones histológicas empleando un fotomicroscopio Axioskope Car Zeiss y se tomaron fotomicrografías en al menos 20 campos con los objetivos de 20x, 40x y 100x. Después se realizaron mediciones con el software libre Image-J de los caracteres anatómicos cuantitativos descritos en la tabla 3.

Para determinar las diferencias significativas entre los caracteres evaluados en los diversos tratamientos y las especies, así como establecer que especie, edad o tratamiento es el más afectado por la lluvia ácida simulada. Se realizaron pruebas de

normalidad (Test Shapiro-Wilk) a los datos de las mediciones y posteriormente análisis de varianza de un factor con el programa SPSS v24 (IBM). La características de los modelos serán explicados detalladamente en la sección de resultados.

Tabla 3. Caracteres anatómicos evaluados

Caracteres cuantitativos	Caracteres cualitativos
Sección transversal	
Área del margen	Modificación en patrones cuticulares
Área intercostal	Formación de tejido de cicatrización
Vista superficial de la lámina	
	Modificación en patrones cuticulares

Resultados

Monitoreo de daños visibles en la superficie de la lámina

En los tratamientos de pH 3.8 y pH 5.6 no se mostraron daños visibles en la superficie de las láminas de ambas especies, sólo se observaron manchas de secado de las gotas asperjadas (Figura 14).



Figura 14. Hojas sin daños visibles al término del experimento en tratamientos pH 3.8 y pH 5.6. *Liquidambar styraciflua* (a) y en *Fraxinus uhdei* (b)

En el tratamiento de pH 2.5 se encontraron daños en los márgenes y áreas intercostales, que fueron aumentando conforme avanzaba el experimento. A continuación se detallan las observaciones para ambas especies.

Al término de la primera aspersión *Liquidambar styraciflua* (Figura 15a) retuvo las gotas de lluvia en todas sus hojas y se atribuyó a las nervaduras recurrentes que favorecieron el estancamiento de las gotas ácidas.

Transcurridas 24 h de la primera aspersión del ácido, para los dos grupos de edades de *L. styraciflua* se observaron daños visibles en forma de manchas cafés redondeadas (Figura 15b y 15c), haciendo alusión a alguna gota acumulada en las hojas.

A la mitad del experimento (tercera aplicación) esta especie mostraba severos daños en todo el follaje de los árboles, mayormente en el margen y zonas intercostales en toda la lámina (Figura 15d). Conforme avanzó el experimento los daños en las aumentaron en número e intensidad; el tejido perdió turgencia y comenzó a secarse, las manchas aumentaron de tamaño y hubo un enroscamiento en el margen de algunas hojas (Figura 15e).

Al final de las aplicaciones más del 80% del follaje de los árboles reflejaba un deterioro considerable (Figura 15f) e incluso algunas hojas comenzaron a caer.

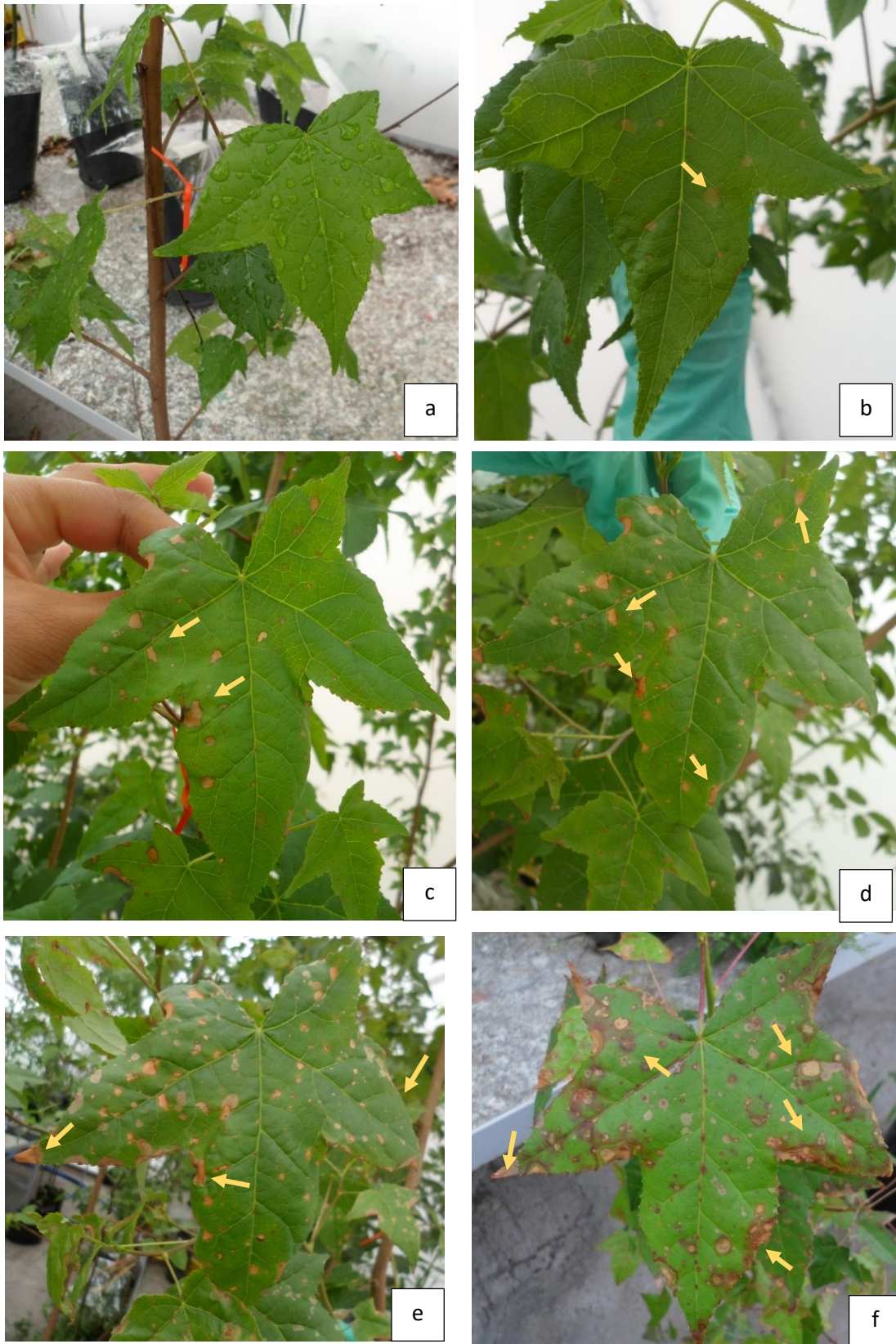


Figura 15. Monitoreo de daño visible progresivo en las hojas de *Liquidambar styraciflua* en el tratamiento pH 2.5. Las flechas indican zonas con daño.

Por otro lado, en *Fraxinus uhdei* al terminar la primera aspersion sus foliolos mostraron un rápido secado o barrido del agua, quedando algunas gotas solo en la vena media y margen (Figura 16a).

Al transcurrir 24 h de la primera aspersion, los foliolos mostraron una apariencia más cerosa (Figura 16b) y aparecieron daños visibles sólo en un árbol; en los foliolos aparecieron puntos cloróticos y con manchas de necrosis en zonas intercostales (Figura 16c).

Fue hasta la cuarta aspersion donde se presentaron daños en un mayor número de árboles, en forma de manchas de color café y algunas zonas necrosadas, además hubo un aumento de puntos cloróticos (Figura 16d, 16e).

Al término del experimento las manchas cafés aumentaron de tamaño, en algunos casos se observaron moteados amarillos en las zonas intercostales, arriscamiento en el margen y amarillamiento en los foliolos (Figura 16f).

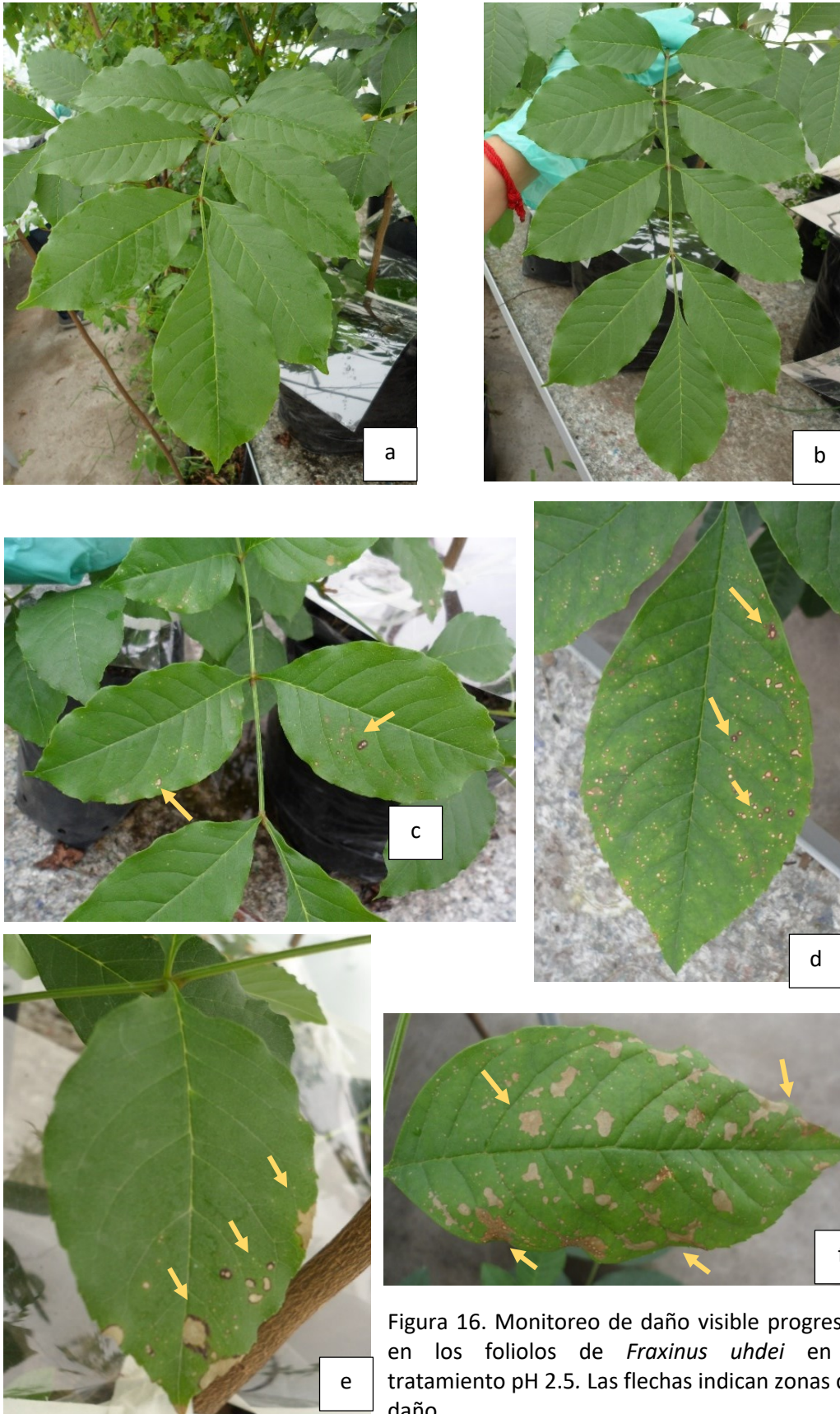


Figura 16. Monitoreo de daño visible progresivo en los folíolos de *Fraxinus uhdei* en el tratamiento pH 2.5. Las flechas indican zonas con daño.

Descripción anatómica de las muestras observadas

Para establecer qué tejidos foliares se dañaron en los tratamientos ácidos, se realizó una caracterización anatómica de ambas especies con el grupo control para tener una referencia de la organización de los tejidos sin ninguna alteración.

Liquidambar styraciflua

Vista superficial de la lámina. Las células epidérmicas son diferenciadas en costales e intercostales, las primeras son rectangulares y alargadas, paralelas a las venas y con paredes lineales, las células intercostales son irregulares, de diversos tamaños y con paredes anticlinales sinuosas en ambas caras (Figura 17a, 17b), su pared periclinal externa es lisa al igual que su cutícula. Posee estomas de tipo paracítico (Figura 18a) distribuidos en la superficie abaxial al mismo nivel de la epidermis, es una especie hipoestomática; posee tricomas simples unicelulares (Figura 18b, 18c) que se disponen sobre las venas.

Vista de transversal. Cuenta con un mesofilo dorsiventral (Figura 19a) su epidermis es uniestratificada, con células de mayor tamaño en la cara adaxial, posee dos estratos de células en el parénquima en empalizada y de cuatro a cinco estratos celulares de parénquima esponjoso: en este tejido se observan drusas en células idioblásticas (Figura 19b). Todo el mesofilo presenta una coloración violeta intenso debido a los contenidos celulares (Figura 19c).

El tejido vascular de la vena media tiene una organización de tipo anficribal o perifloemático (Figura 19d); hacia el extremo adaxial, la vena media se ve reforzada por dos o tres estratos de colénquima de tipo anular, como contenidos celulares se observan abundantes taninos en el floema y en el parénquima de la vena media y en el mesofilo de la lámina (Figura 19e).

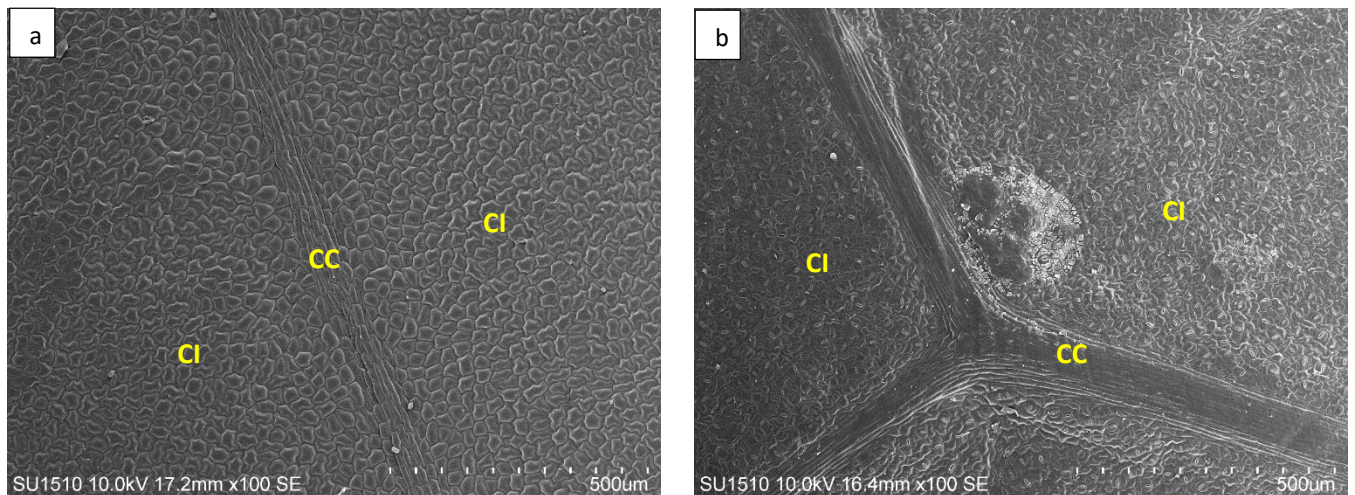


Figura 17. Vista superficial de epidermis en *Liquidambar styraciflua*. a) Superficie adaxial. b) Superficie abaxial. CC-células costales; CI-células intercostales. Microscopía de barrido.

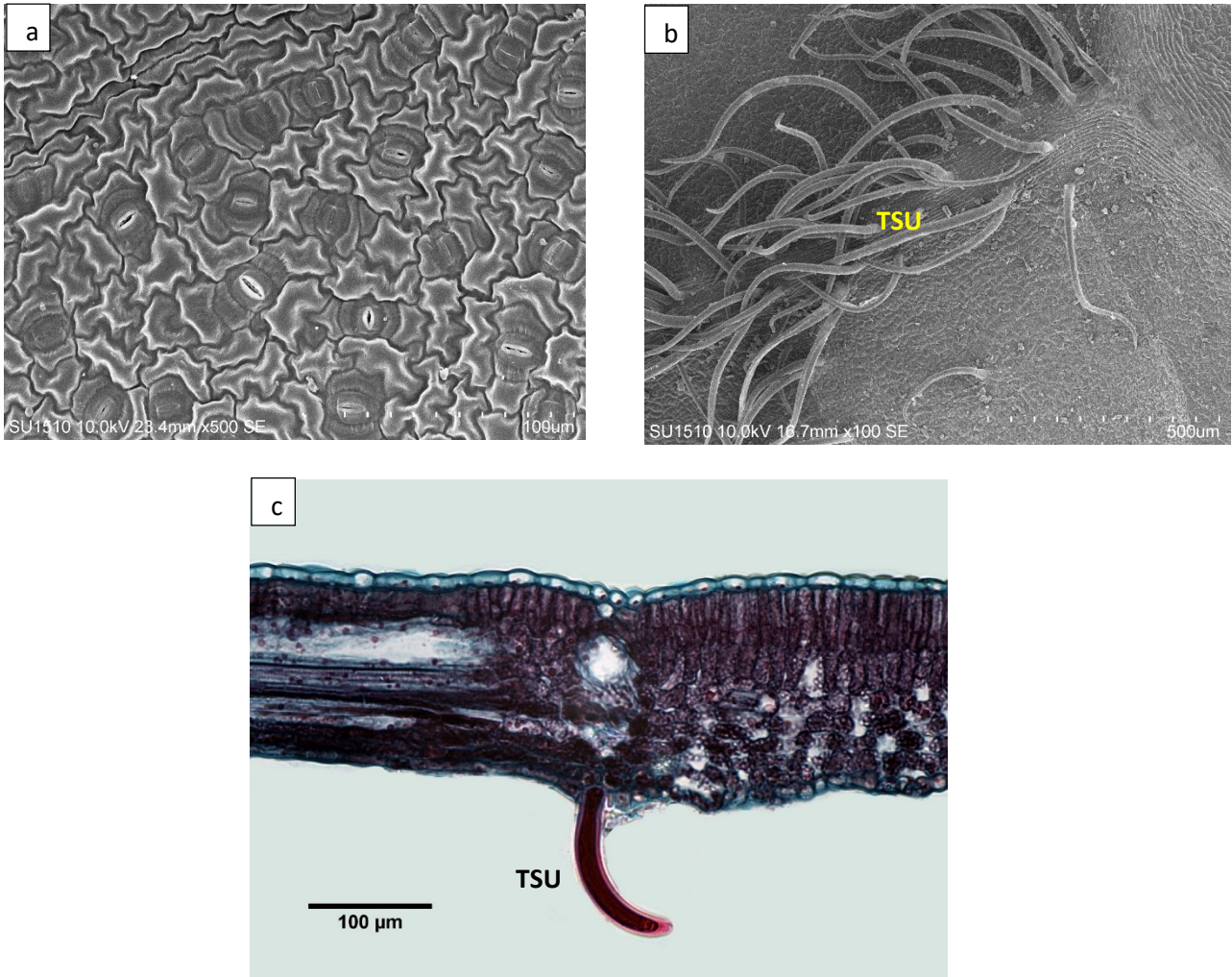


Figura 18. *Liquidambar styraciflua*. a) Estomas paracíticos en superficie abaxial. b) Tricomas simples unicelulares sobre una vena en la superficie abaxial. c) Tricoma simple unicelular sobre una vena en superficie abaxial. a-b Microscopia de barrido. c-campo claro. TSU-Tricoma simple unicelular

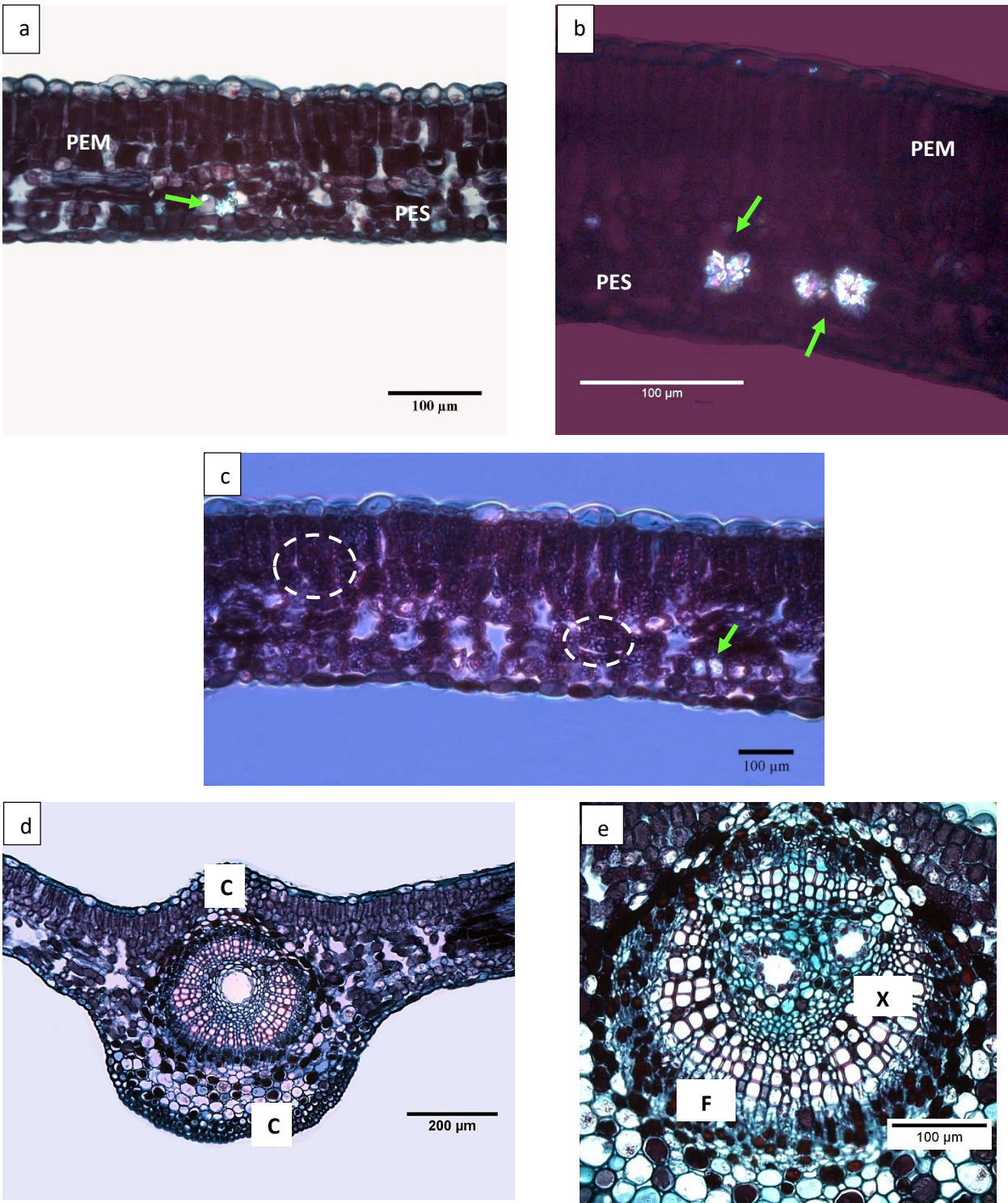


Figura 19. *Liquidambar styraciflua*. a) Mesofilo PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; Flecha-drusas. b) Mesofilo con presencia de drusas envueltas en células idioblásticas en el parénquima esponjoso, señalados en flechas. c) Mesofilo con presencia de contenidos celulares encerrados en círculo punteado; drusas indicadas con flecha. d) Vena media, C-colénquima. e) Acercamiento al haz vascular perifloemático; X-Xilema; F-Floema. Letras a, d, e-campo claro; letra b-luz polarizada; letra c-contraste de fases.

Vista superficial de la lámina. Las células epidérmicas se diferencian en costales e intercostales, las células costales son alargadas e irregulares, paralelas a las venas y con paredes anticlinales lisas; las células intercostales son de forma irregular y de diferentes tamaños y con paredes anticlinales sinuosas. Esta condición se presenta en ambas caras (Figura 20a, 20b), la cutícula tiene un patrón estriado. Especie hipostomática, los estomas son de tipo anomocítico y se disponen al mismo nivel de la epidermis (Figura 21a).

Posee tricomas peltados glandulares en ambas caras de la epidermis, sobresaliendo la cabezuela formada de cuatro a ocho células dispuestas perpendicularmente al pie unicelular corto (Figura 21b); también tiene tricomas simples pluricelulares, en la cara abaxial cerca de las venas (Figura 21c) y están formados de tres a cinco células (Figura 21d).

Vista transversal. El mesofilo es dorsiventral, con epidermis uniestratificada cuyas células son de mayor tamaño en la superficie adaxial, presenta de uno a dos estratos celulares de parénquima en empalizada hacia la cara adaxial y se observan de tres a cuatro estratos de células en el parénquima esponjoso hacia la cara abaxial (Figura 22a).

Algunas células del parénquima esponjoso poseen cristales en forma de estilodios (Figura 22b), que también se asocian a los haces vasculares. En la vena media hacia la superficie abaxial se encuentra tejido de parénquima y tiene uno a tres estratos de colénquima anular subepidérmico en ambas superficies (Figura 22c), el haz vascular

principal posee una con disposición concéntrica anficribal o perifloemático con una vaina de esclerenquima (Figura 22d).

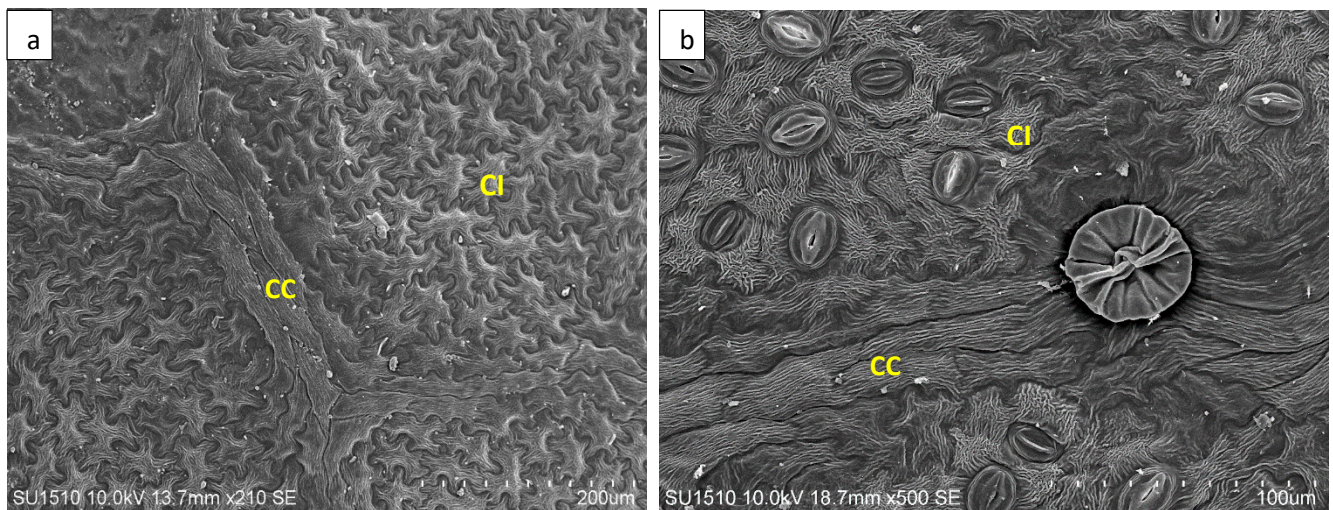


Figura 20. Vista superficial de epidermis en *Fraxinus uhdei*. a) Superficie adaxial. b) Superficie abaxial. CC-células costales; CI-células intercostales. Microscopia de barrido.

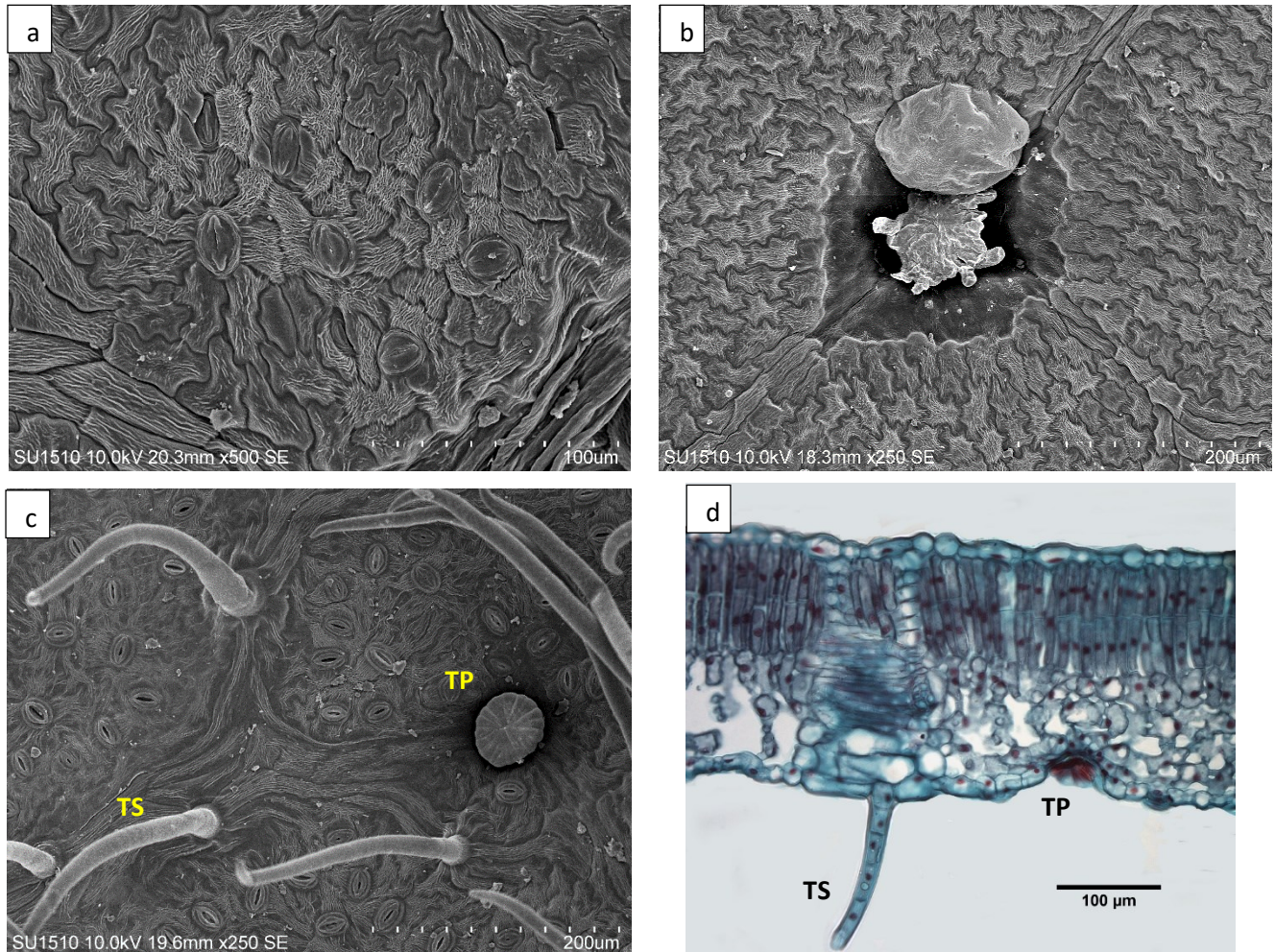


Figura 21. *Fraxinus uhdei*. a) Estomas anomocíticos en superficie abaxial. b) Tricoma peltado en superficie adaxial. c) Tricoma simple pluricelular y tricoma peltado superficie abaxial. d) Tricoma simple pluricelular en superficie abaxial sobre una vena. a-c Microscopía de barrido. d-campo claro. TP-Tricoma peltado. TS-Tricoma simple pluricelular.

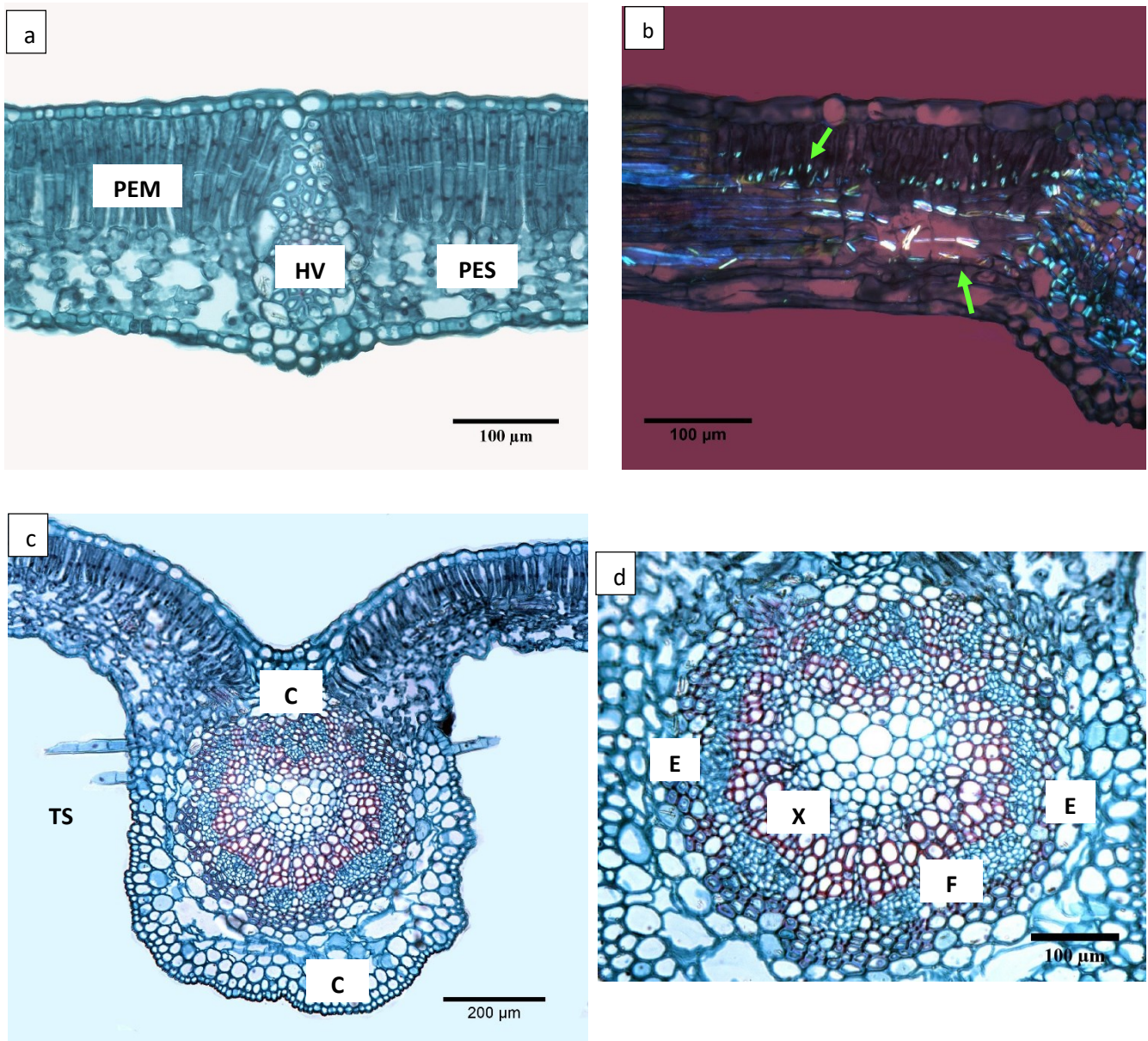


Figura 22. *Fraxinus uhdei*. a) Mesofilo PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; HV-Haz vascular. b) Mesofilo con presencia de estilodios cerca de los haces vasculares, señalados en flechas. c) Vena media, presencia de tricomas simples pluricelulares (TS); C-colénquima. d) Acercamiento al haz vascular perifloemático; X-Xilema; F-Floema; E-Esclerénquima. Letras a, c, d-campo claro; letra b-luz polarizada.

Modificaciones en los patrones cuticulares de las láminas foliares

En el tratamiento control se observó que *L. styraciflua* posee una cutícula lisa con la presencia de ceras epicuticulares formando pequeñas láminas o agregados (Figura 23a, 23b); para el tratamiento a pH 5.6 en algunas hojas se encontró mayor cantidad de ceras epicuticulares en diferentes zonas y en ambas caras de la lámina (Figura 23c, 23d).

En el tratamiento de pH 3.8 los individuos de un año en la superficie adaxial mostraron alteraciones a nivel de cutina y el colapso de las células epidérmicas. En ciertas zonas intercostales se encontraron ceras acumuladas (Figura 23e). En los individuos de 3 años en la superficie adaxial se hallaron acumulaciones de ceras que corresponden a las marcas de secado de las gotas ácidas (Figura 23); en las superficies abaxiales no se encontraron alteraciones.

Para el tratamiento de pH 2.5, en las muestras de hojas de 1 año mostraron daños en ambas superficies, observándose que la epidermis colapsó por completo en regiones intercostales (Figura 24a, 24b) y las ceras se acumularon alrededor de las áreas de daño. En las hojas de tres años las células mostraron pérdida de su turgencia ocasionado por el desgaste total de la cutícula (Figura 24c), la superficie abaxial mostró una mayor acumulación de ceras que la superficie adaxial (Figura 24d).

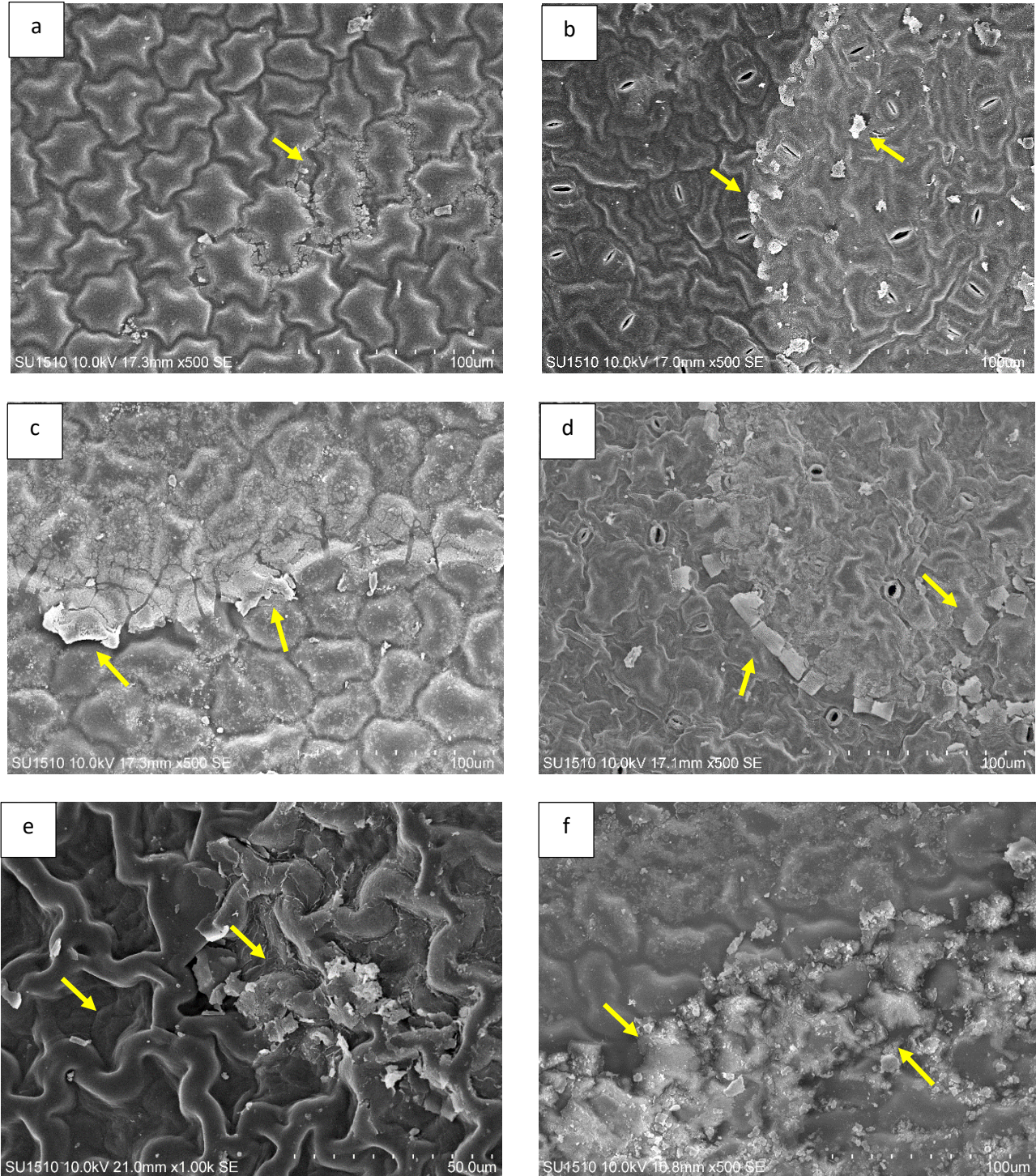


Figura 23. Modificaciones en patrones cuticulares en *Liquidambar styraciflua*. Grupo control a) superficie adaxial, b) superficie abaxial. Tratamiento con pH 5.6, se aprecia un mayor número de ceras epicuticulares c) superficie adaxial, d) superficie abaxial. Tratamiento con pH 3.8, e) superficie adaxial de 1 año f) superficie adaxial de 3 años. Las flechas indican ceras epicuticulares y células epidérmicas dañadas.

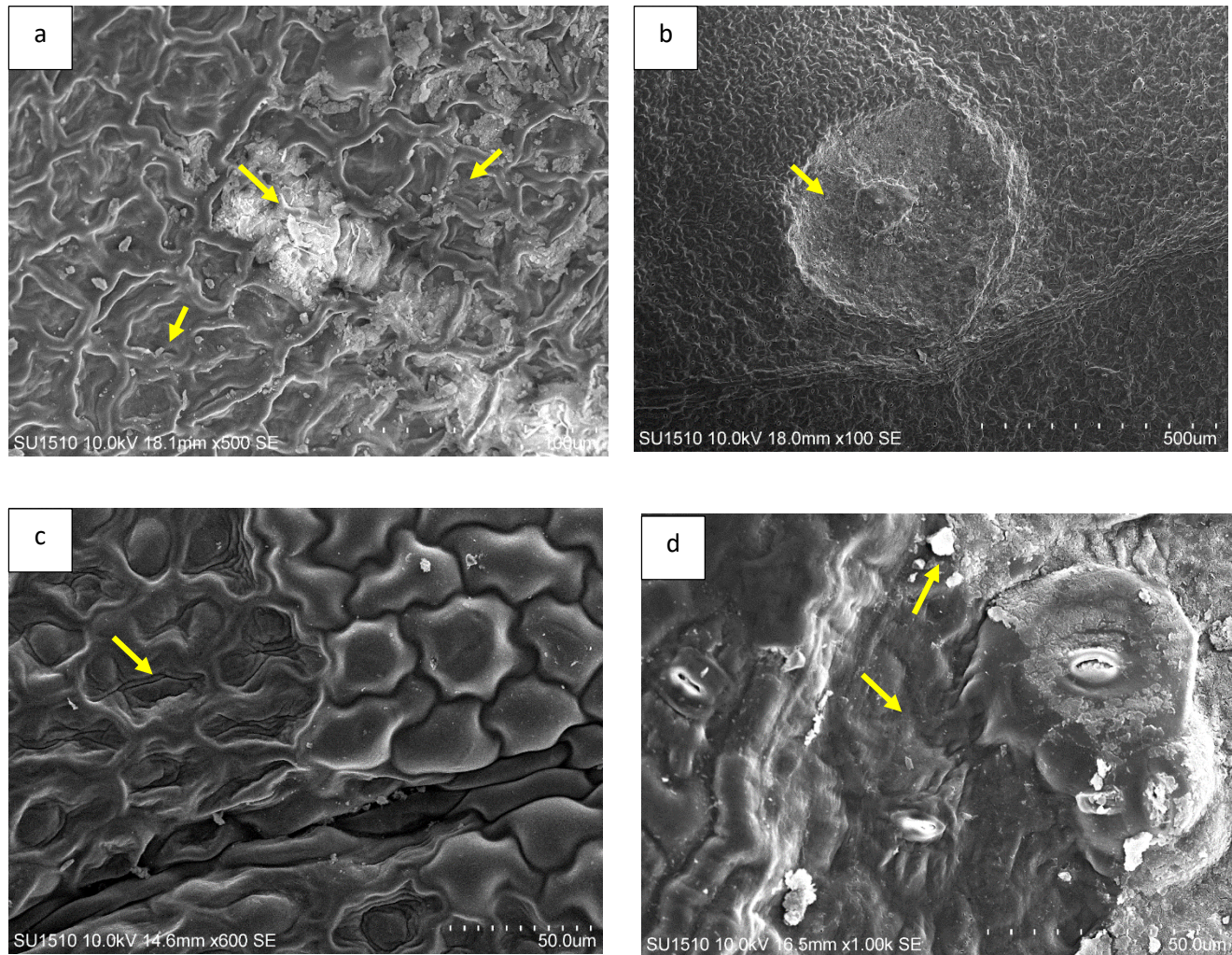


Figura 24. Modificaciones en patrones cuticulares de *Liquidambar styraciflua* para el tratamiento con pH 2.5. 1 año(a, b); 3 años (c, d). a) superficie adaxial, acumulación de ceras y colapso celular; b) superficie abaxial, invaginación de células epidérmicas; c) superficie adaxial contraste entre tejido colapsado y sano; d) superficie abaxial, colapso celular y acumulación de ceras, algunos en forma de agregados. Las flechas indican daño en las células epidérmicas.

Por otro lado, en *Fraxinus uhdei* se encontró que su cutícula posee un patrón estriado (Figura 25a, 25b), las ceras epicuticulares se mostraron en forma de láminas en ambas superficies; se observan abundantes tricomas peltados glandulares en ambas caras de la lámina, en estas zonas existe un adelgazamiento del recubrimiento cuticular.

En el tratamiento a pH 5.6 (Figura 25c, 25d) se conservan los patrones cuticulares. Sin embargo, en el tratamiento de pH 3.8 la superficie adaxial presentó una acumulación de ceras en las marcas de secado de las gotas ácidas (Figura 26a), pero la cara abaxial de la lámina conservó su estructura estriada de la cutícula y las paredes de las células epidérmicas (Figura 26b).

El tratamiento con mayor acidez (pH 2.5), en la cara adaxial existen cambios en la estructura de los tricomas peltados (Figura 26c), además se pierde la estructura estriada en porciones de la cutícula, mientras que para la superficie abaxial no mostró cambios (Figura 26d).

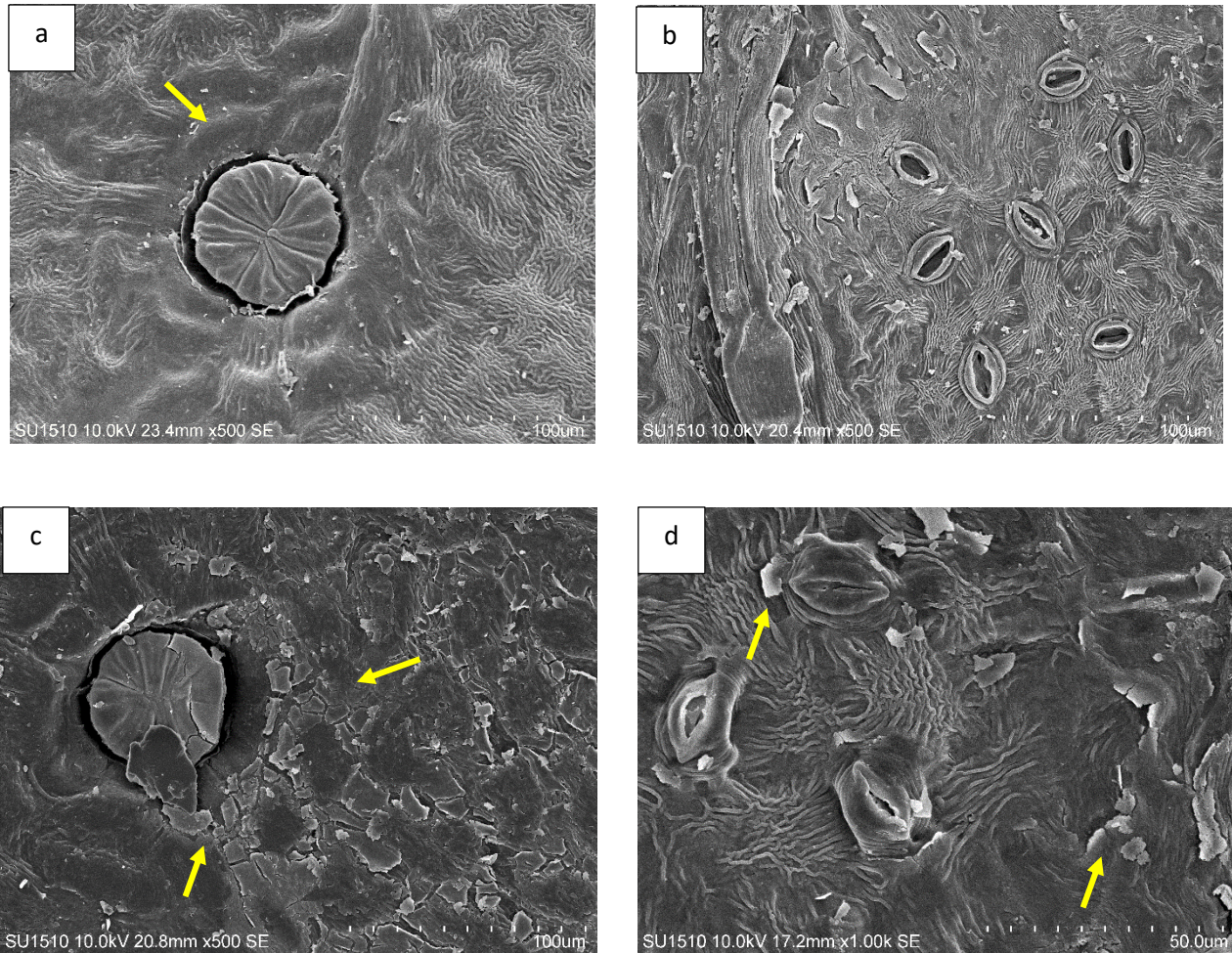


Figura 25. Modificación de patrones cuticulares en *Fraxinus uhdei*. Tratamiento control a) superficie adaxial, adelgazamiento cuticular en la base del tricoma peltado; b) superficie abaxial, presencia de ceras epicuticulares en forma de láminas, algunas se desprenden. Tratamiento con pH 5.6 c) superficie adaxial, adelgazamiento en la base del tricoma peltado, mayor número de ceras epicuticulares; d) superficie abaxial, desprendimiento de ceras epicuticulares.

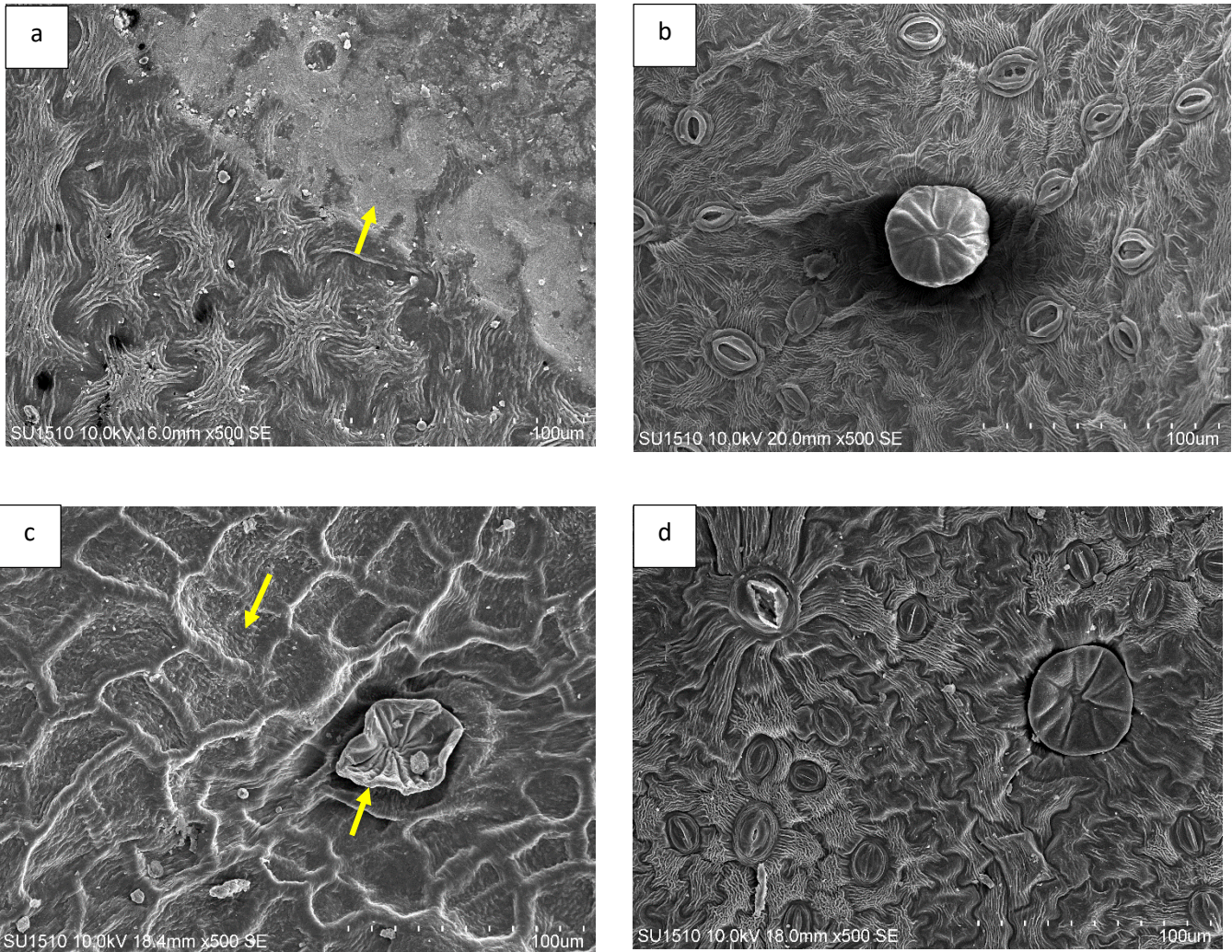


Figura 26. Modificación de patrones cuticulares en *Fraxinus uhdei*. Tratamiento con pH 3.8 a) superficie adaxial, acumulación de ceras por las marcas de gotas ácidas; b) superficie abaxial, se conservan los patrones cuticulares. Tratamiento con pH 2.5 c) superficie adaxial, colapso de células epidérmicas y tricoma peltado, pérdida de cutina; d) superficie abaxial, las células no presentan daños.

Modificaciones en tejidos internos de las láminas foliares por la aspersión de lluvia ácida

En el tratamiento con pH 5.6, que simula la lluvia natural, se conservaron intactas las estructuras anatómicas para ambas especies (Figura 27 y 28), únicamente se observaron ligeras modificaciones en la cutícula como se mencionó en el apartado anterior.

En el tratamiento con pH 3.8, en *L. styraciflua* (Figura 29) en ambas edades, el aumento de contenidos celulares se hizo notorio. Por otro lado, en los márgenes de las hojas con presencia de daño las células se tornaron más oscuras, en algunas muestras pudo observarse la desdiferenciación de células cercanas al margen, puesto que las células oscurecidas comenzaron a adquirir una forma ovoide y aumentaron de tamaño; finalmente se separaron del resto de la lámina (Fig. 29c-h).

Mientras que para *F. uhdei* se encontró evidencia de daño en la base de los tricomas peltados, lo cual puede haberse generado por el adelgazamiento cuticular en la base del tricoma mismo (Figura 30e, 30f).

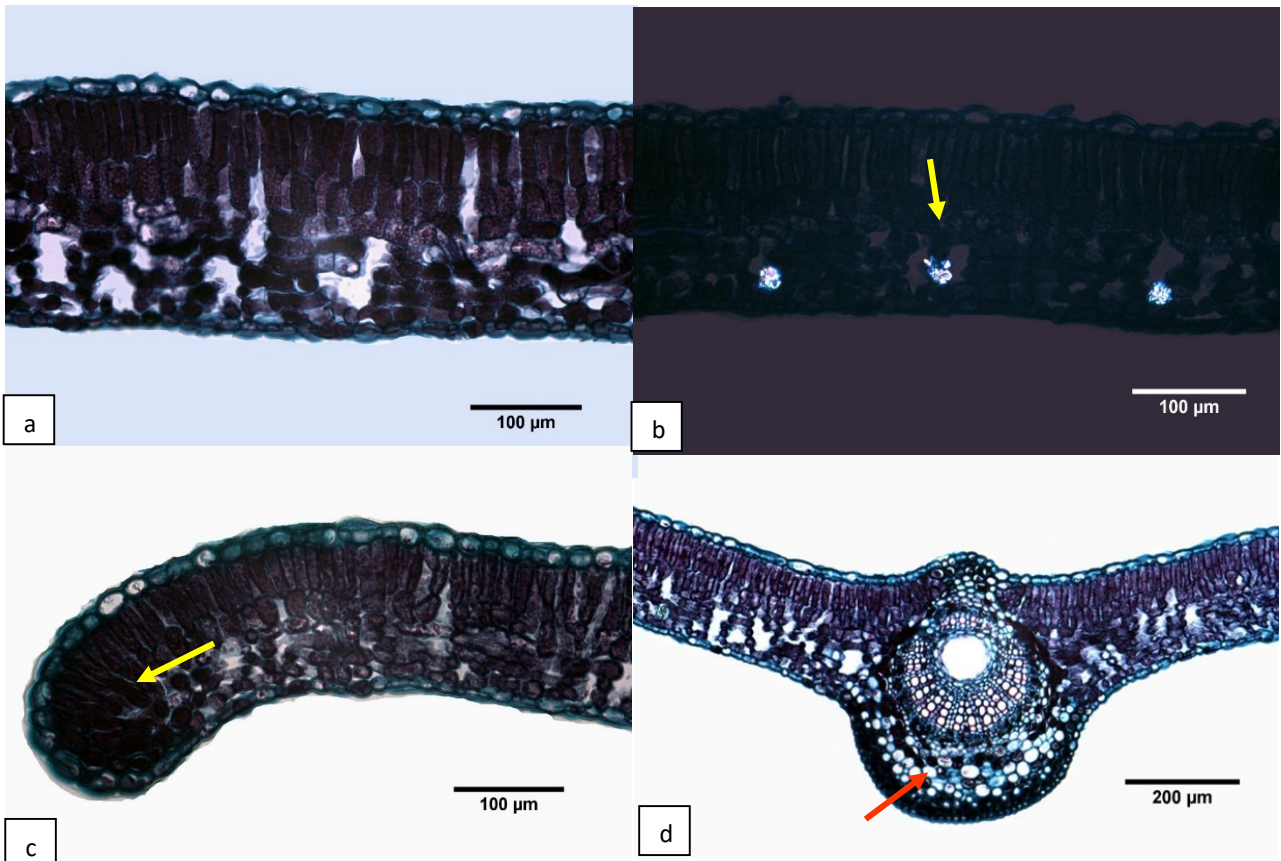


Figura 27. Tratamiento a pH 5.6. *Liquidambar styraciflua*. a) Sección transversal del mesofilo (campo claro); b) Sección transversal del mesofilo con drusas en el parénquima esponjoso (polarización); c) Sección transversal del margen de la hoja con un ligero oscurecimiento celular en el vértice (campo claro); d) Sección transversal de vena media, acumulación de compuestos celulares en la cara abaxial (campo claro). a y b corresponden a *L. styraciflua* de tres años; c y d son fotomicrografías de *L. styraciflua* de un año

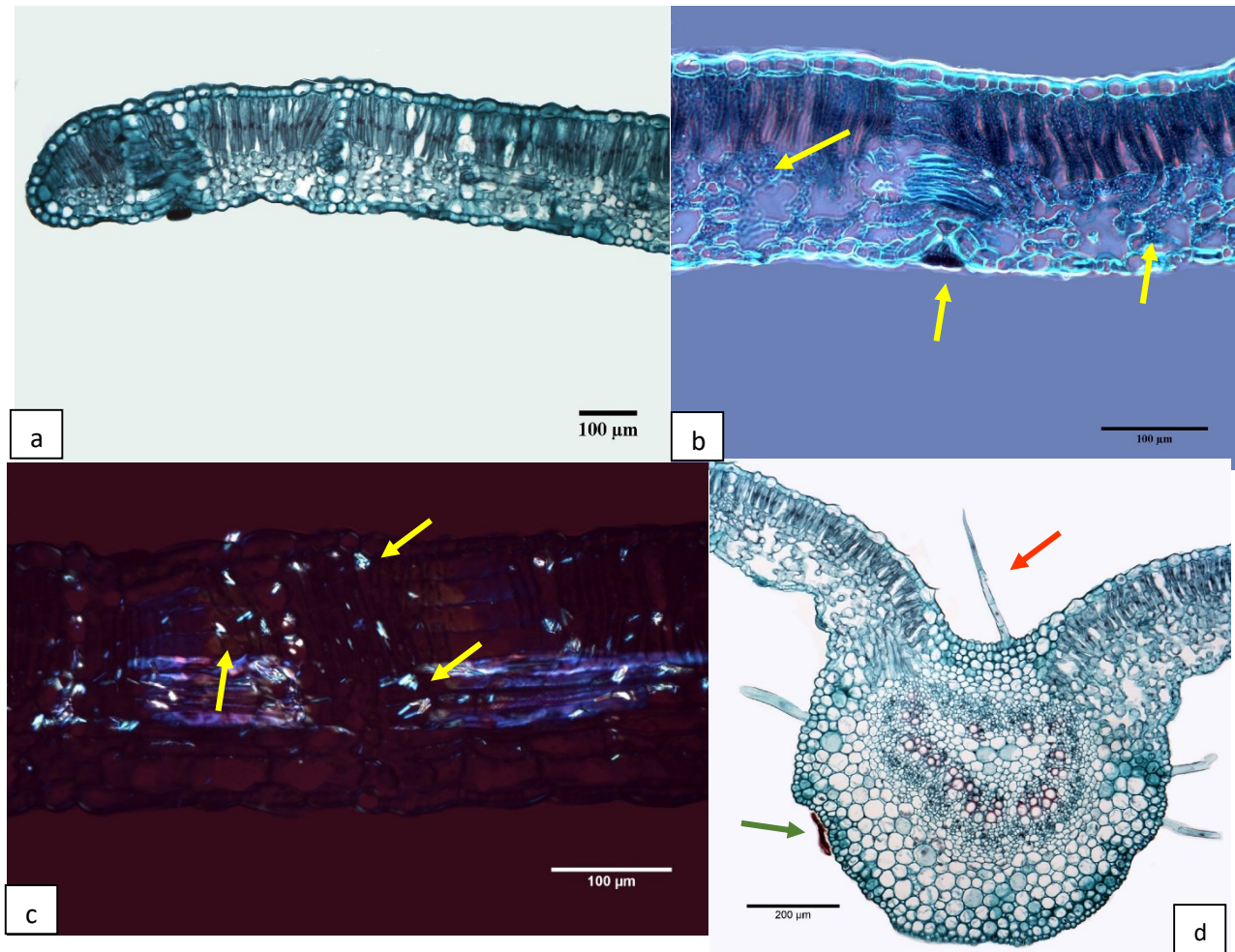


Figura 28. . *Fraxinus uhdei*. Tratamiento con pH 5.6. a) Margen de un foliolo sin alteraciones (campo claro); b) Sección transversal del mesofilo, se observan contenidos celulares, la cutícula bien definida y un tricoma glandular peltado en la superficie abaxial, (contraste de fases); c) Sección transversal del mesofilo, haces vasculares y estilodios (luz polarizada); d) Sección transversal de vena media con presencia de tricoma peltado (Flecha verde) y tricomas simples pluricelulares (Flecha anaranjada) (campo claro).

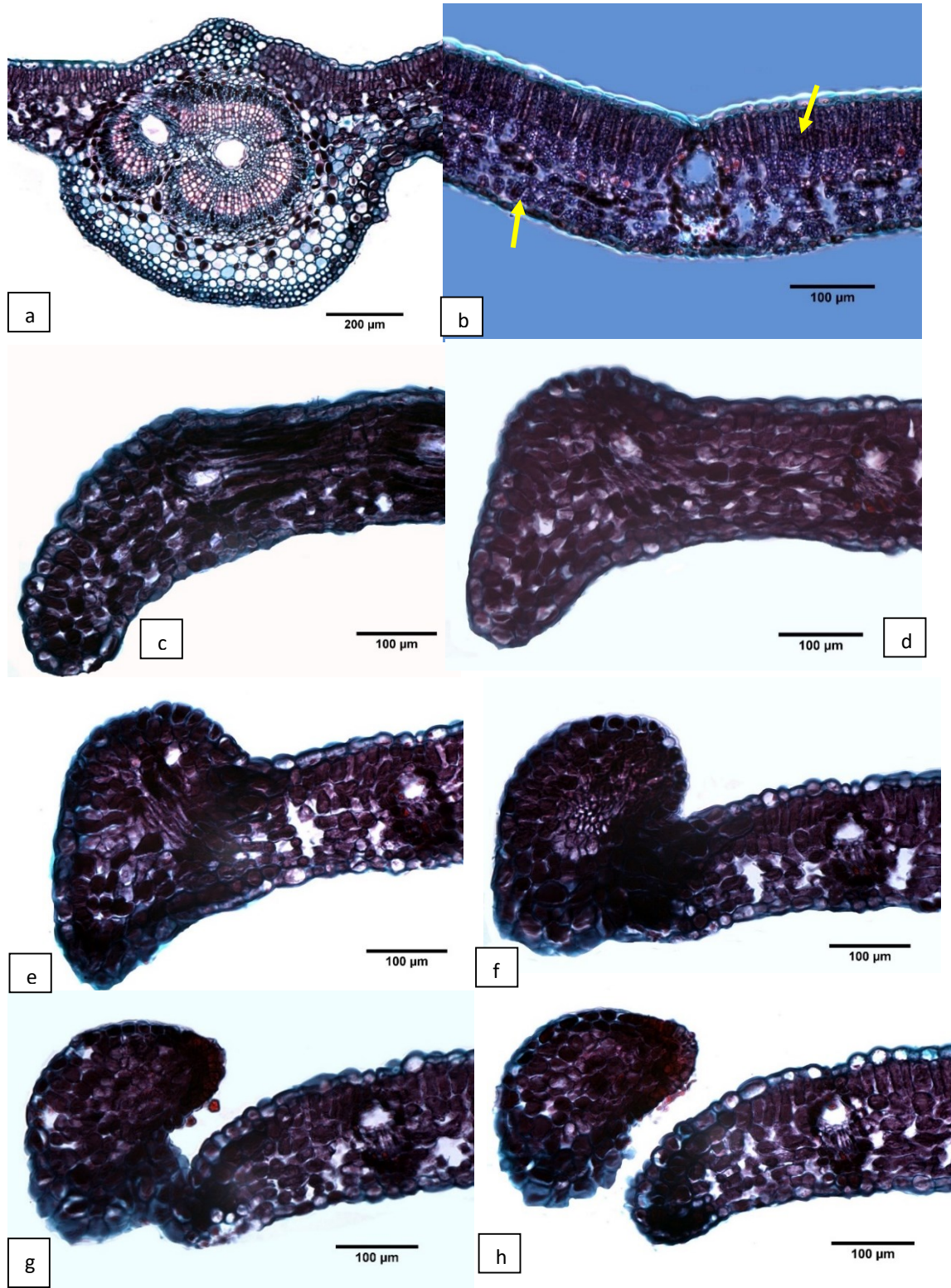


Figura 29. Tratamiento con pH 3.8. Sección transversal de hoja de *Liquidambar styraciflua* a) Vena media sin alteraciones (campo claro); b) Mesofilo con gran cantidad de contenidos celulares, la cutícula se nota como una gran línea blanca (contraste de fases); c) Margen, comienzo de formación de protuberancia (campo claro); d, e, f, g, h) Secuencia de formación y desprendimiento de protuberancia celular con tejido dañado (campo claro).

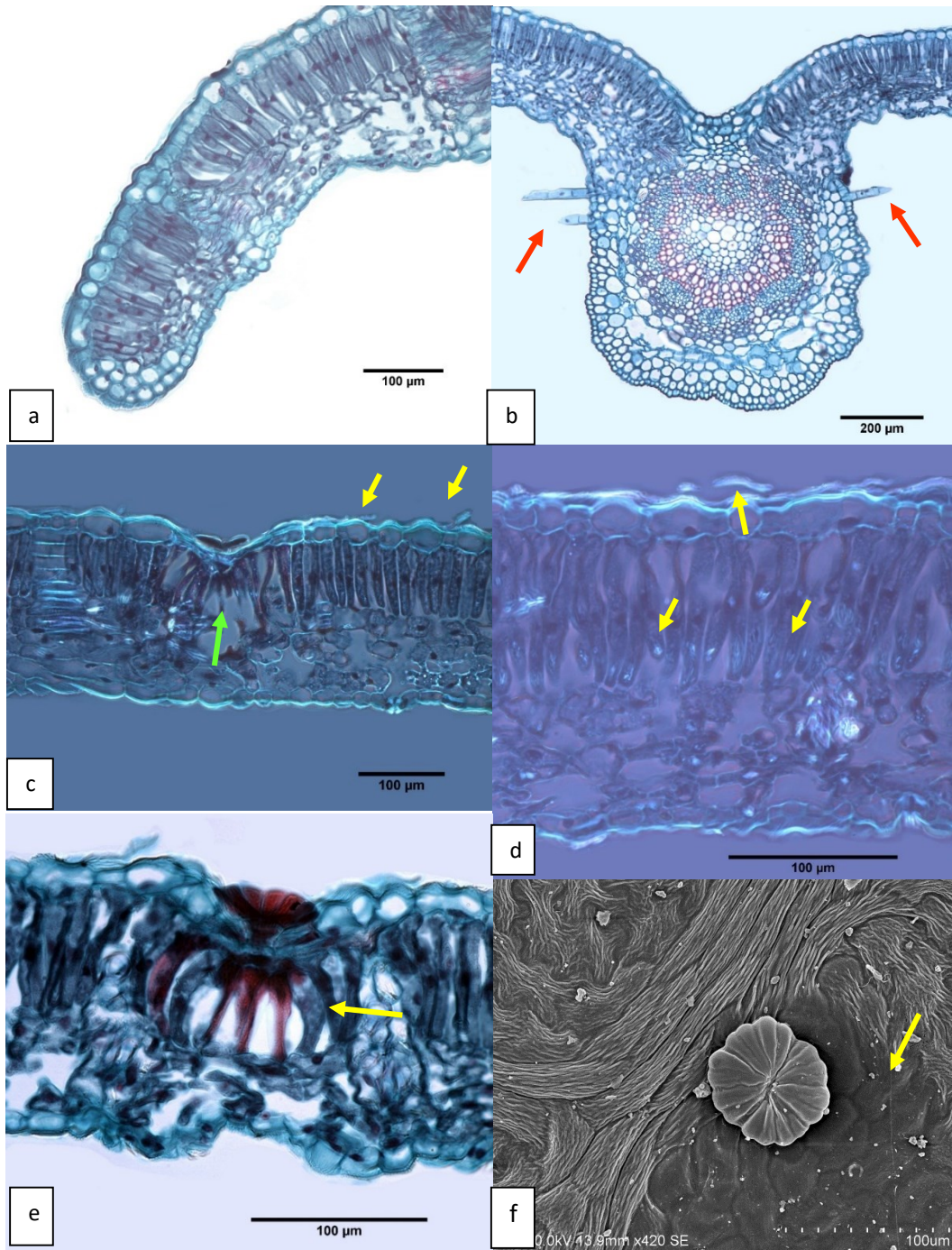


Figura 30. Tratamiento con pH 3.8. *Fraxinus uhdei* a) Margen de un foliolo sin alteraciones anatómicas (campo claro); b) Vena media con presencia de tricomas no peltados, sin daños en los tejidos (campo claro); c) Mesofilo con desprendimiento de cutícula en superficie adaxial y tejido dañado en la base del tricoma peltado (flecha verde) (contraste de fases); d) Mesofilo con alteraciones en cutícula, rafidios abundantes (contraste de fases); e) Base de tricoma peltado con daño a nivel del parénquima en empalizada; f) Desprendimiento cuticular superficial de tricoma peltado, se observa la diferencia de patrones cuticulares en la base del tricoma con respecto al resto de la epidermis (MEB). Sección transversal en a-e. Vista superficial en f.

En el tratamiento con pH 2.5, de manera general en ambas especies la acumulación de gotas ácidas en la superficie del follaje propició la degradación de la cutícula. Por lo que, las sustancias ácidas tuvieron una mayor permeabilidad hacia las membranas celulares, causando grandes alteraciones anatómicas. Estas superficies dañadas son fácilmente reconocibles por su color rojo intenso, el cual indica la presencia de sustancias ácidas que reaccionaron con la safranina.

Los daños encontrados en ambas especies ocurrieron zonas intercostales, en las bases de tricomas (Figura 31) y márgenes de las láminas. El mayor impacto lo recibió la superficie adaxial, debido a la posición que guardan las hojas dentro del árbol y a la orientación del follaje al recibir las aspersiones.

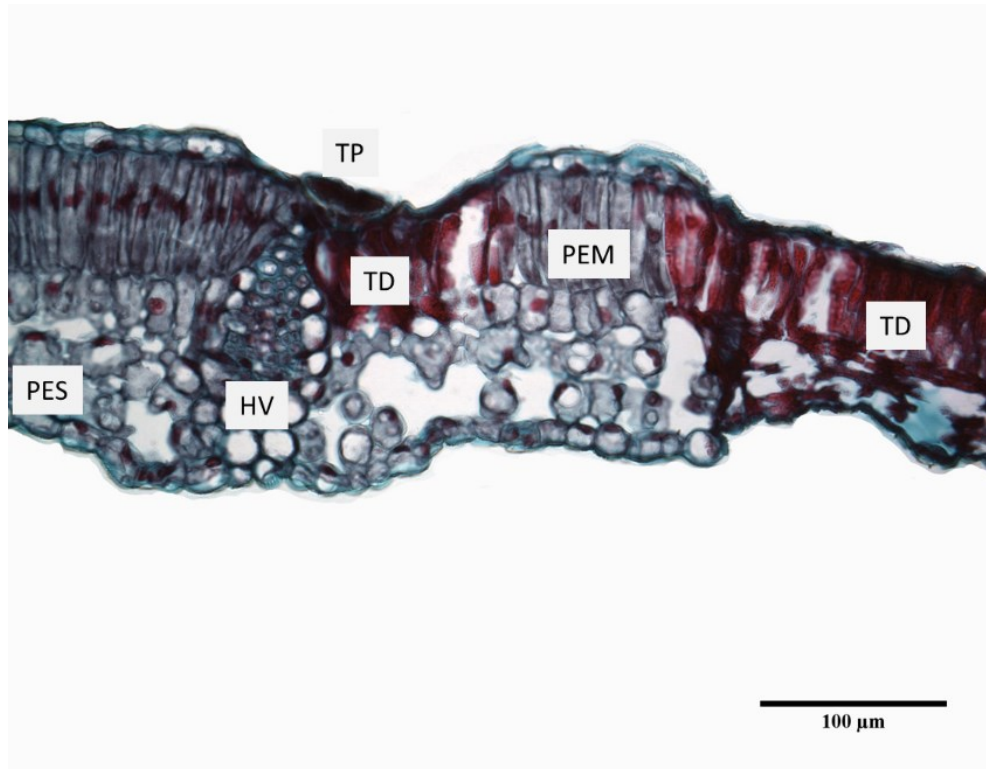


Figura 31. Sección transversal de hoja de *Fraxinus uhdei* con presencia de daño. TP-Tricoma peltado; PEM-Parénquima en empalizada; PES-Parénquima esponjoso; HV-Haz vascular; TD-Tejido dañado (campo claro).

La epidermis es el primer tejido en ser afectado, sus células se pierden totalmente lo cual ocasiona una invaginación hacia el mesofilo, que propicia el avance de las sustancias ácidas hacia su interior. Mientras las sustancias ácidas se abren paso las células del parénquima empalizado y esponjoso se van tornando rojas, para finalmente causar un colapso total de los tejidos y una disminución en el grosor de la lámina.

En *L. styraciflua* (Figura 32), las muestras de un año presentaron un mayor número de zonas afectadas que las muestras de tres años. Los daños se observaron en ambas superficies de la lámina.

De forma natural las células de esta especie son teñidas de un tono violeta oscuro, pero éste se intensificó en aquellas zonas donde se encontraba el tejido dañado. En ambas edades se detectaron dos mecanismos de respuesta al daño por lluvia ácida. En algunas zonas intercostales, las células aledañas a los sitios de mayor daño se engrosaron y suberizaron sus paredes celulares, de esta forma crearon cicatrices que impidieron el avance de las lesiones (Figura 32c, 32d). A nivel del margen y al igual que en el tratamiento a pH 3.8, las células formaron estructuras que sufrieron abscisión.

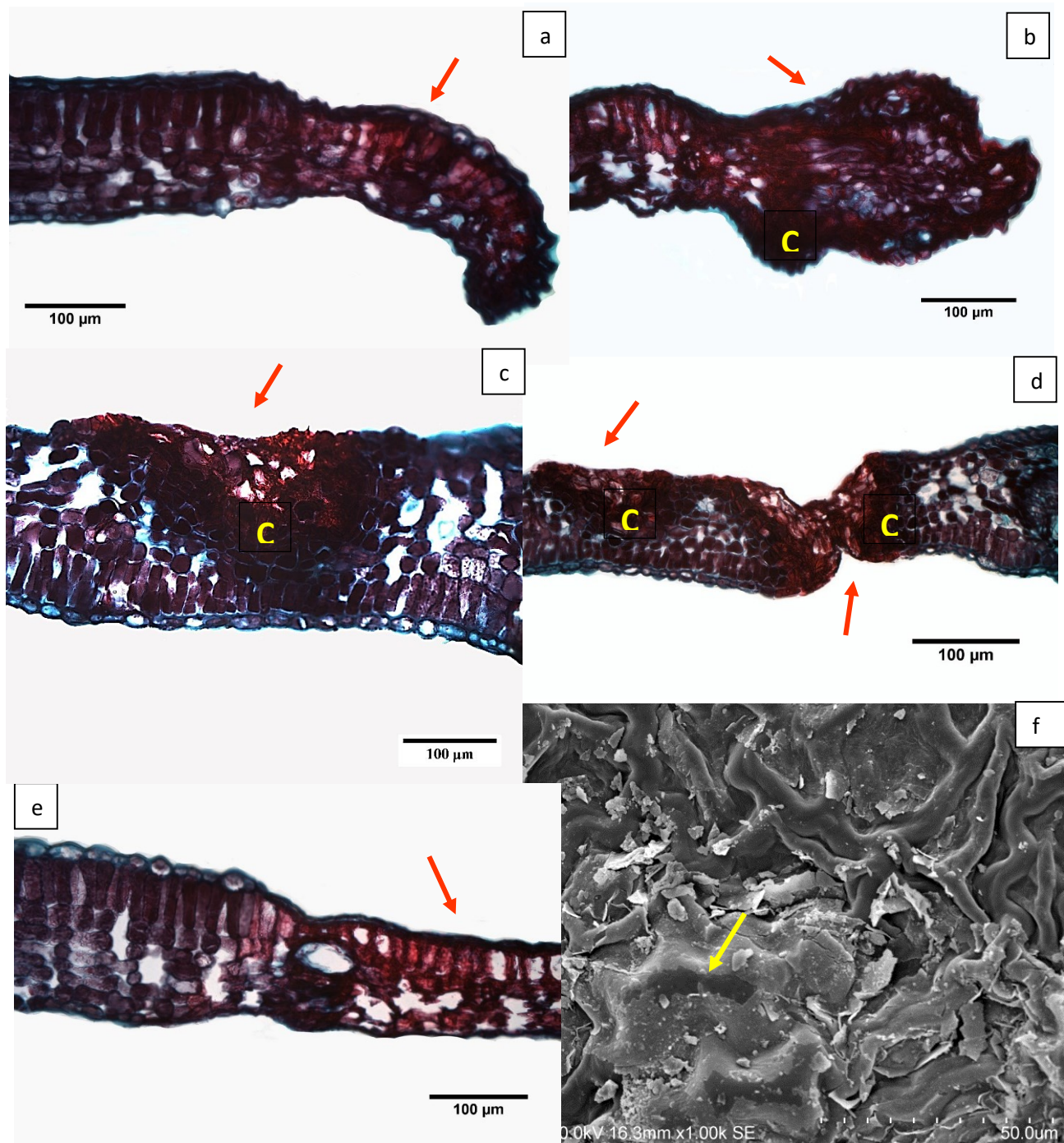


Figura 32. Tratamiento con pH 2.5 en *Liquidambar styraciflua*. a) Margen con daño, colapso del mesofilo (campo claro); b) Margen deformado (campo claro); c) Formación de tejido de cicatrización (campo claro); d) Zonas de cicatrización creadas por células engrosadas conteniendo el daño celular (campo claro); e) Mesofilo contrastante, tejido sano versus tejido colapsado (campo claro); f) Cutícula abaxial y pérdida total de los patrones cuticulares (MEB). Letras a y b corresponden a la edad de tres años; c, d, e y f corresponden a ejemplares de un año. Sección transversal (a-e). Vista superficial (f). Las flechas indican daño. C-Tejido cicatrizado.

Los daños causados en *F. uhdei* (Figura 33) se encontraron en un menor número de campos con respecto a *L. styraciflua*. En algunas zonas del margen, el mesofilo se encontró parcialmente colapsado (Figura 33a), mientras que en zonas intercostales las alteraciones observadas en algunos sitios muestran colapso parcial y total del mesofilo (Figura 33b).

Otras zonas intercostales muestran daños únicamente en el parénquima en empalizada (Figura 33c) cercano a los haces vasculares.

En esta especie se aprecia mejor la aparición de compuestos celulares, que van aumentando hasta llegar al tejido dañado (Figura 33d), estos compuestos aparecen en forma de manchas que van ocupando todo el espacio de las células hasta cubrirse totalmente de rojo.

Por la posición de los folíolos, algunos de ellos recibieron daño en la superficie abaxial justo en la base de tricomas peltados (Figura 33e), donde existe un adelgazamiento y desprendimiento de la cutícula (Figura 33f).

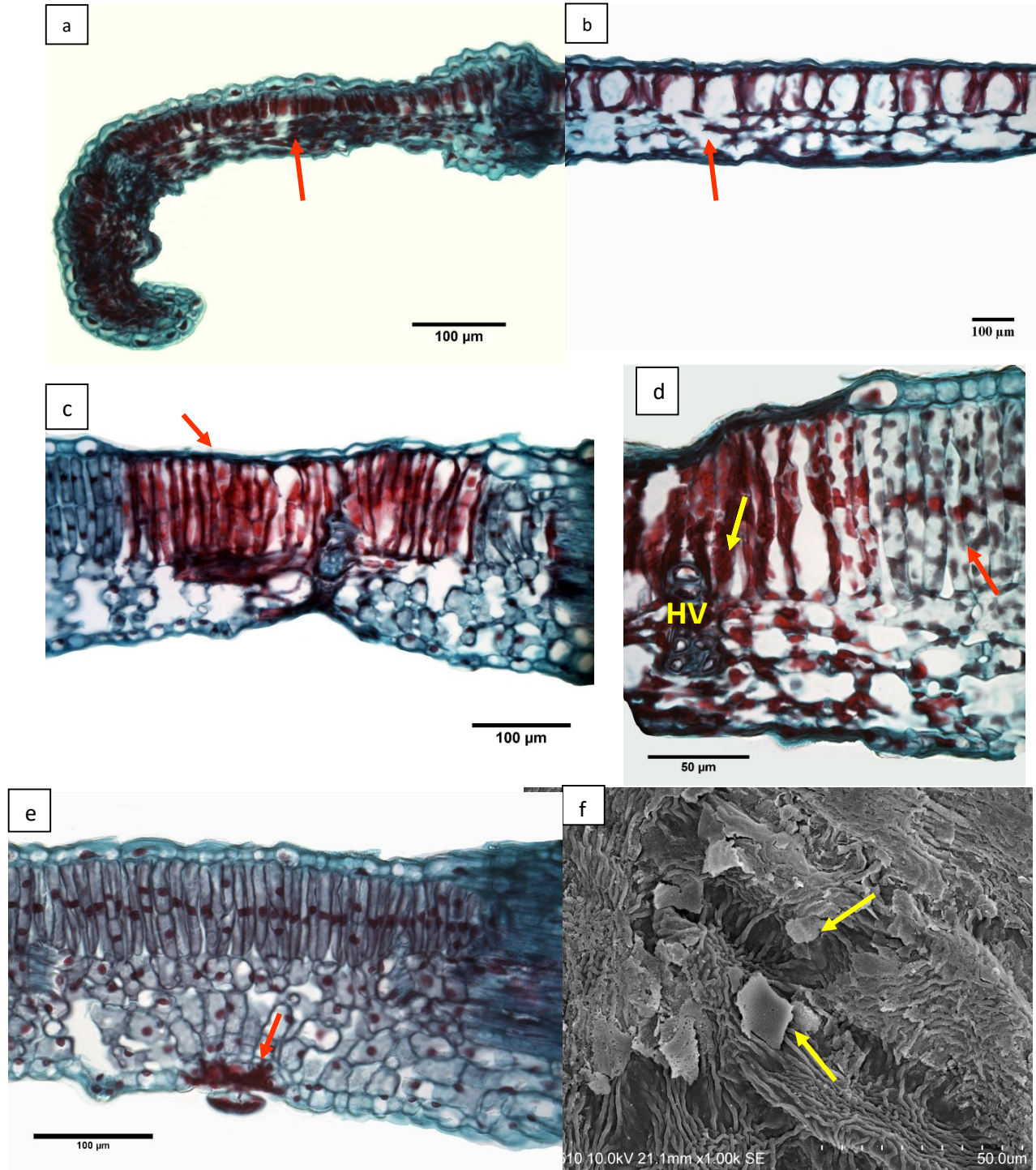


Figura 33. Tratamiento con pH 2.5 para *Fraxinus uhdei*. a) Margen con tejido alterado (campo claro); b) Mesofilo con vestigios de paredes celulares y epidermis colapsada (campo claro); c) Mesofilo con daño en extremo adaxial, la flecha indica el colapso de tejido epidérmico, deformación del haz vascular (campo claro); d) Acercamiento a un haz vascular (HV) atrofiado, las células aledañas presentan gran cantidad de compuestos celulares (campo claro); e) Inicio de daño por la base de un tricoma peltado abaxial (campo claro); f) Cutícula adaxial, desprendimiento de ceras (MEB). Secciones transversales (a-e). Vista superficial (f).

Análisis estadístico de variables anatómicas

Análisis de varianza para caracteres cuantitativos

Al mismo tiempo que se evaluaron los daños anatómicos se midieron los caracteres que aparecen en la tabla 3 (pág. 45), para realizar análisis que permitieran encontrar los grupos con diferencias significativas entre las especies y tratamientos.

Para ello se realizaron pruebas de ANOVA de un factor y ANOVA robusta de un factor de Welch en caso de no cumplirse la homogeneidad de varianzas.

En la tabla 4 aparecen desglosados los modelos aplicados a las variables de área del mesofilo y área intercostal evaluando la respuesta de la especie en cada tratamiento.

Tabla 4. Modelos de ANOVA de 1 vía para *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua* de 1 y 3 años con respecto a los tratamientos

Factor	Niveles
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	Control pH 5.6 pH 3.8 pH 2.5
<i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año	Control pH 5.6 pH 3.8 pH 2.5
<i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años	Control pH 5.6 pH 3.8 pH 2.5

En la tabla 5 y 6 se resumen los análisis por especies, se muestran las medias y las diferencias significativas entre cada grupo (Consultar Anexo III para ver los resultados de las pruebas a detalle).

Tabla 5. Análisis de varianza para el **área del margen** foliar (μm^2). Se contrasta el efecto de los tratamientos en las dos especies. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años
Control	11238.34 (2512.97)a	97575.00 (11238.34)a	92016.49 (5467.6)a
pH 5.6	6564.20 (1467.8)a	102787.67 (6564.2)a	91982.33 (8558.2)a
pH 3.8	19334.33 (4323.28)a	110132.61 (19334.33)a	90993.5 (3330)a
pH 2.5	21111.21 (4720.61)b	73807.04 (21111.21)b	82040.4 (14704.4)b
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.05$

Tabla 6. Análisis de varianza para el **área intercostal** (μm^2). Se contrasta el efecto de los tratamientos en las dos especies. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años
Control	98983.96 (14633.62)a	98983.96 (14633.62)a	95622.23 (8478.6)a
pH 5.6	105702.91 (11398.65)a	105702.91 (11398.65)a	93155 (4813)a
pH 3.8	19334.33 (26865.52)b	134396.92 (26865.52)b	93150.7 (9136)a
pH 2.5	67914.57 (11706.16)c	67914.57(11706.16)c	71156.51 (12207.26)b
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

Liquidambar styraciflua de 1 año de edad (Figura 34) presentó diferencias significativas en ambos caracteres. Para el área del margen se observan dos grupos, donde el

tratamiento de pH a 2.5 mostró una marcada diferencia, influenciado por los daños generados producto de la acidez que en algunos casos adelgazaron el margen después de haber perdido los aglomerados de células dañadas.

En el caso del área intercostal, el análisis mostró que existen tres grupos distintos. El primero corresponde al control y el tratamiento de pH a 5.6, esto se debe a que se conservó la integridad de los tejidos, el siguiente es el tratamiento de pH a 3.8 y finalmente el último grupo corresponde al tratamiento de pH a 2.5 con una media menor, pero con una alta dispersión de los datos producto del daño causado por la acidez.

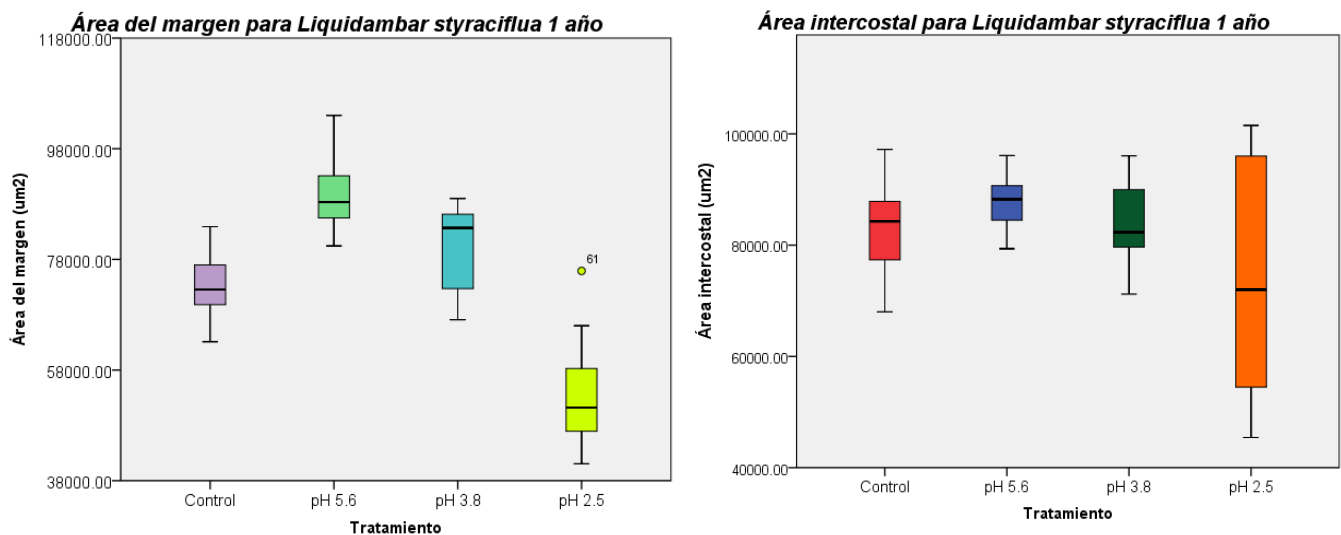


Figura 34. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de *Liquidambar styraciflua* de 1 año

Por otra parte, *L. styraciflua* de 3 años de edad (Figura 35) en ambos caracteres se presentaron diferencias en dos grupos; el tratamiento control, a pH 5.6 y pH 3.8 que son diferentes del tratamiento a pH 2.5, evidenciando que el grado de acidez repercute en la integridad de los tejidos en ambas zonas evaluadas.

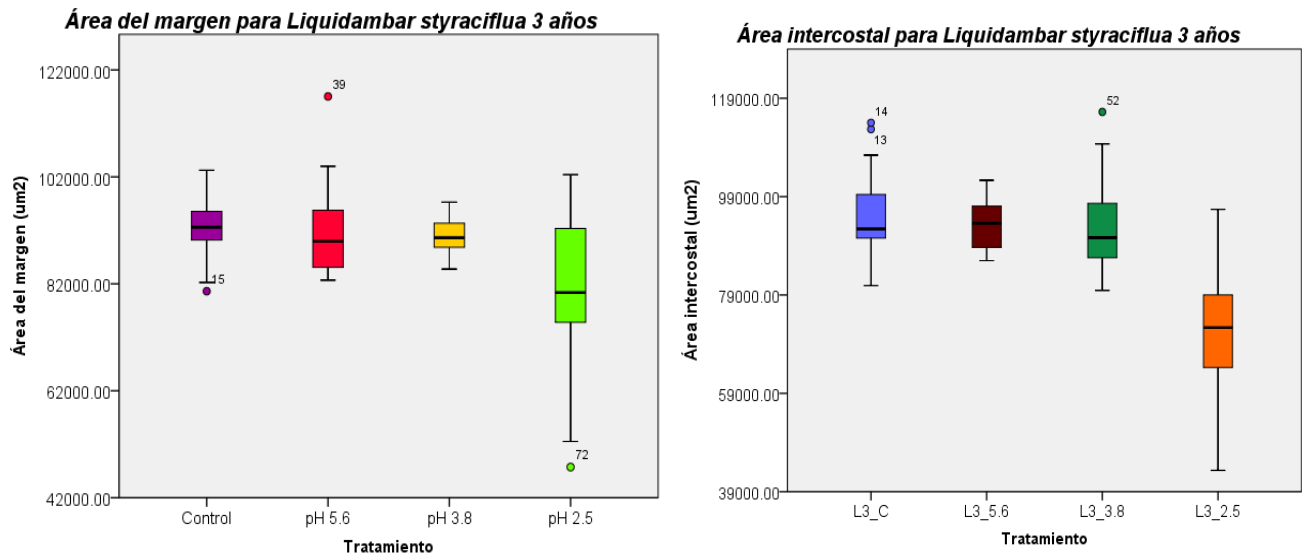


Figura 35. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de *Liquidambar styraciflua* de 3 años.

Los resultados obtenidos para *F. uhdei* (Figura 36) exponen que, en el área del margen se presentó la disminución de valores por la influencia de la acidez; siendo el tratamiento con pH 2.5 significativamente distinto a los demás grupos; mientras que para el área intercostal los grupos significativamente distintos se dividen en tres bloques, los tratamientos control y a pH 5.6, el tratamiento a pH 3.8 y el tratamiento a pH 2.5 que presenta las lesiones causadas por las gotas ácidas.

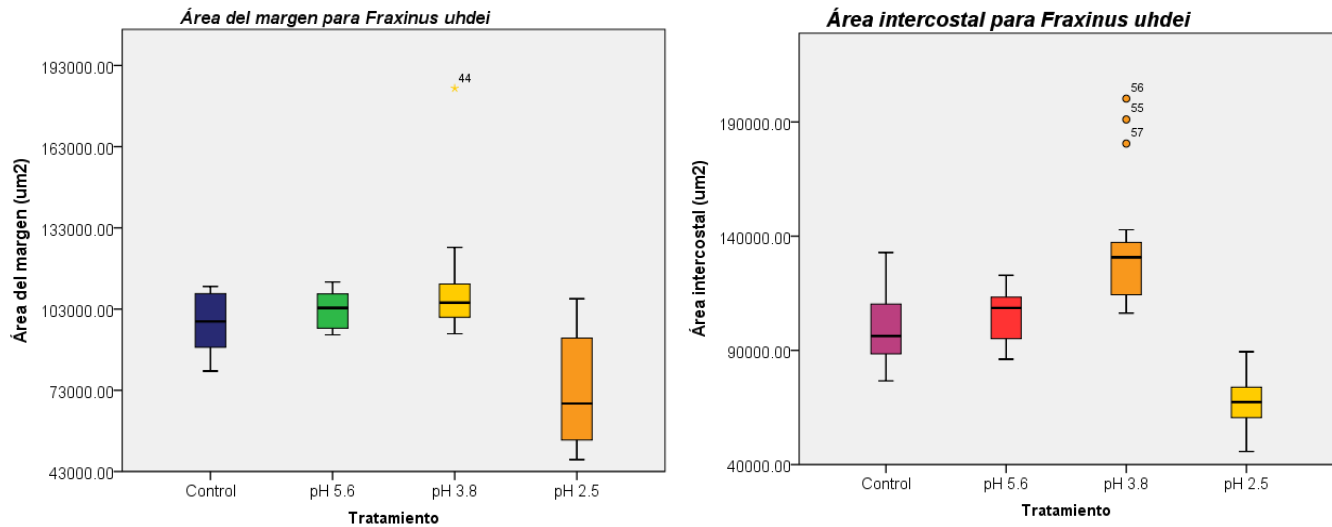


Figura 36. Diagrama de dispersión para las áreas de margen (Izquierda) y área intercostal (Derecha) de *Fraxinus uhdei*

Dado que uno de los objetivos de esta investigación fué el establecer qué valor de pH genera mayor impacto en el tejido foliar de las especies estudiadas, se realizó un contraste de la respuesta de cada especie y edad a los distintos tratamientos (los resultados detallados se pueden consultar en el Anexo IV). La tabla 7 desglosa el modelo utilizado en cada prueba.

Tabla 7. Modelos de ANOVA de una vía para encontrar la especie más susceptible con respecto al nivel de acidez

Factor	Niveles
Tratamiento control	<i>Fraxinus uhdei</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año <i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años
Tratamiento pH 5.6	<i>Fraxinus uhdei</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año <i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años
Tratamiento pH 3.8	<i>Fraxinus uhdei</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año <i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años
Tratamiento pH 2.5	<i>Fraxinus uhdei</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año <i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años

A continuación se presenta un resumen de los análisis, donde se indican cuáles grupos son significativamente diferentes.

Para el tratamiento control (Tabla 8 y Figura 37) en ambos caracteres se encontraron diferencias significativas entre *L. styraciflua* de 1 año con respecto a *F. uhdei* y *L. styraciflua* de 3 años, estas diferencias se deben al número de capas del parénquima en empalizada en las muestras observadas para *F. uhdei*.

Tabla 8. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del **grupo control** contrastadas con las especies: *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua*. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Área del margen	Área intercostal
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	97575 (11238.34)a	98983.96 (14633.62)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	73361.13 (5469.23)b	83716.18 (7958.08)b
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años	92016.49 (13000)a	95622.23 (8478.59)a
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

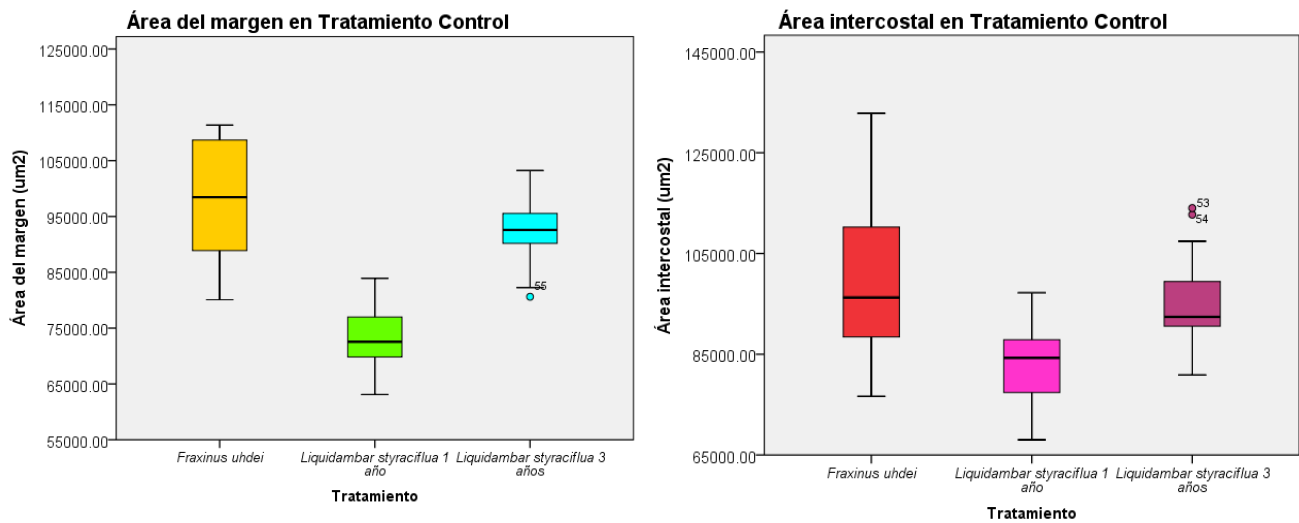


Figura 37. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento control

El tratamiento con pH 5.6 (Tabla 9 y Figura 38), mostró que existen diferencias significativas entre las especies para el área del margen, lo que indica que las secciones transversales analizadas mostraron ser homogéneas sin importar la edad de *L. styraciflua*. En el área intercostal, se encontró que todos los grupos son diferentes estadísticamente, pues existen diferencias en el número de hileras celulares del parénquima en empalizada.

Tabla 9. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del **tratamiento a pH 5.6** contrastadas con las especies: *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua*. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Área del margen	Área intercostal
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	102787.67 (6564.20)a	105702.91 (11398.65)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	89196.44 (5903.45)b	87718.84 (4245.62)b
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años	91982.33 (8558.17)b	93155.02 (4813.1)c
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

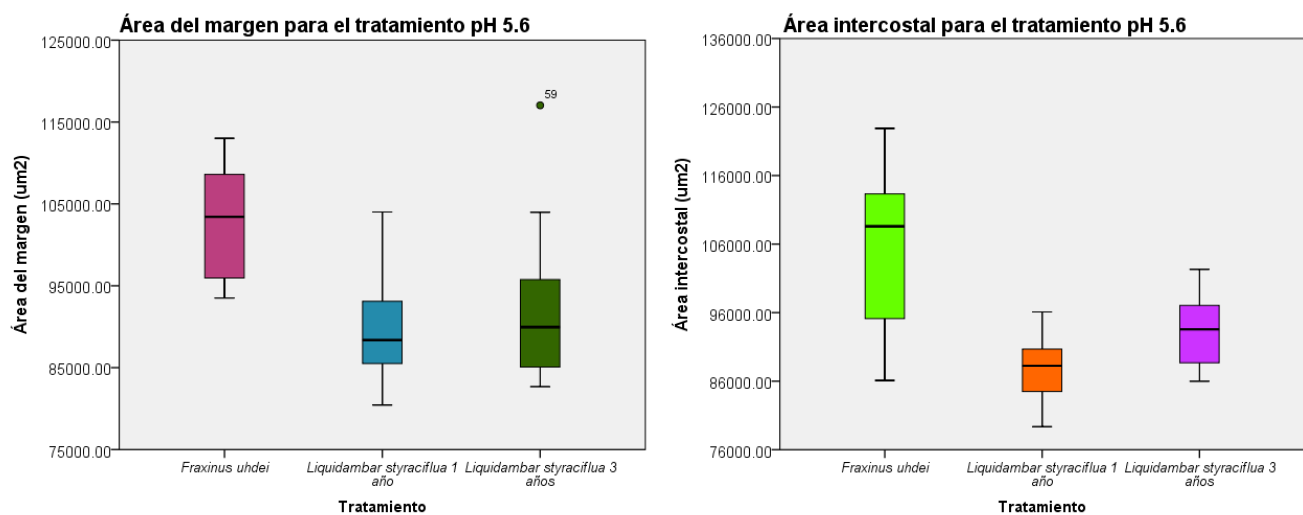


Figura 38. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 5.6

El tratamiento de pH 3.8, el cual que simula la concentración reportada para la Ciudad de México, mostró diferencias significativas para ambos caracteres (Figura 39); se puede observar en la tabla 10 que todos los grupos son distintos, estos resultados sugieren la variabilidad en tamaño de las hojas o folíolos dentro del árbol en ambas especies.

Tabla 10. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del **tratamiento a pH 3.8** contrastadas con las especies: *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua*. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Área del margen	Área intercostal
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	110132.61 (19334.33)a	134396.92 (26865.52)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	79816.9 (7615.32)b	83757 (7194.12)b
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años	90993.48 (3330.06)c	93150.7 (9136.1)c
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

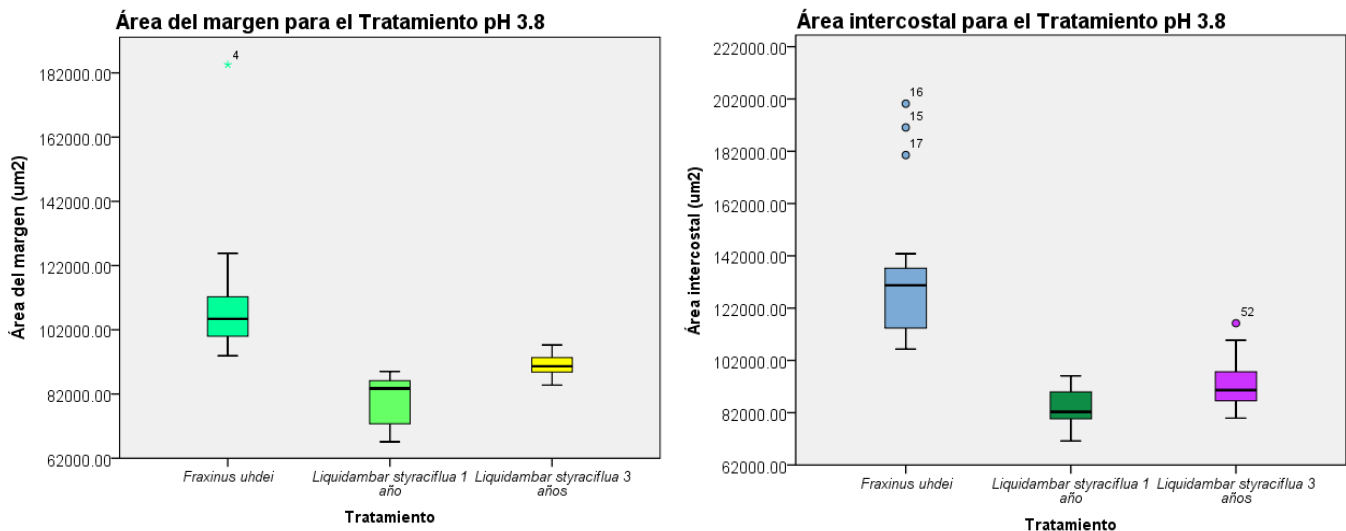


Figura 39. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 3.8

Finalmente en el tratamiento de pH 2.5 (Figura 40), las diferencias significativas (Tabla 11) para el área del margen, se encontró que *L. styraciflua* de 1 año fue el grupo significativamente distinto, reflejando una disminución en el área del margen debido a que presentó un mayor daño en sus tejidos. Al realizar el contraste para el área intercostal no se encontraron diferencias significativas, esto puede explicarse debido a que en esta zona de la lámina se favorece la acumulación de gotas ácidas que propician la aparición de daños en el mesofilo, lo que genera una disminución de su área sin importar la edad o especie de la que se trate.

Tabla 11. Análisis de varianza para las variables área del margen y área intercostal (μm^2) del **tratamiento a pH 2.5** contrastadas con las especies: *Fraxinus uhdei* y *Liquidambar styraciflua*. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Área del margen	Área intercostal
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	73807.04 (21111.21)a	67914.57 (11706.16)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	53406.10 (8490.1)b	73187.67 (19727.6)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años	82040.39 (14704.37)a	71156.51 (14907.8)a
Significancia	$p < 0.0001$	$p > 0.05$

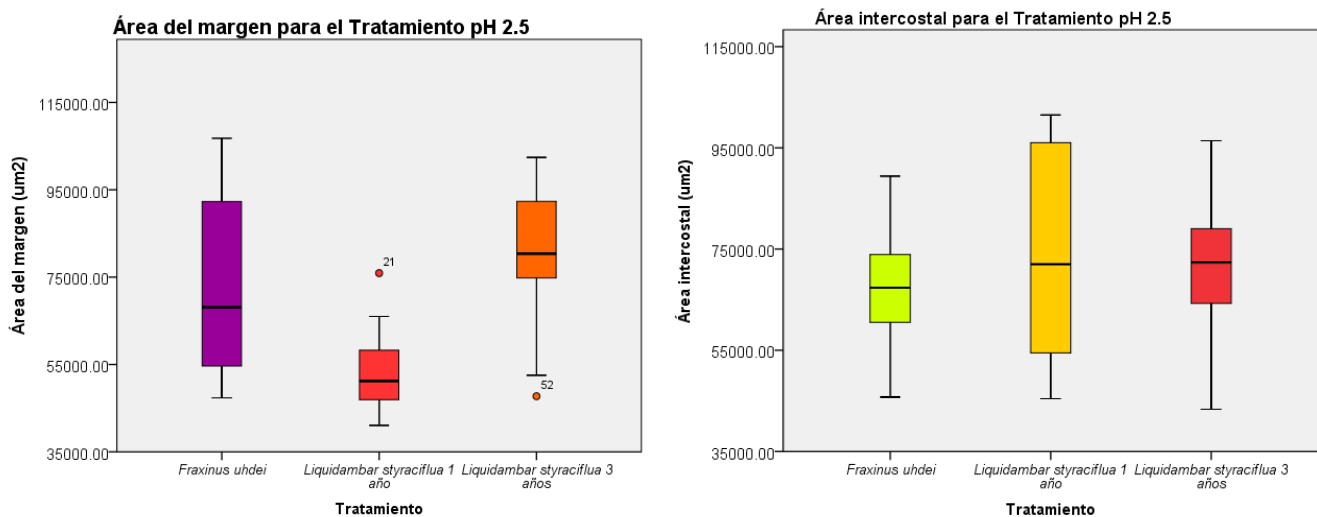


Figura 40. Diagrama de dispersión de las áreas del margen (Izquierda) y área intercostal (derecha) en el tratamiento de pH 2.5

Prueba de t de student en las edades de Liquidambar styraciflua

Para establecer si existen diferencias significativas entre las edades de *Liquidambar styraciflua* se realizó una prueba de *t* de student para muestras independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12 para el área del margen y la tabla 13 para el área intercostal.

Tabla 12. Prueba de t para área del margen (μm^2) de *Liquidambar styraciflua* de 1 y 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos (Nivel de confianza 0.05).

Edad	Tratamiento control	Tratamiento a pH 5.6	Tratamiento a pH 3.8	Tratamiento a pH 2.5
1 año	73361.13 (5469.23)a	89196.44 (5903.45)a	79816.90 (7615.32)a	53406.10 (8490.10)a
3 años	92016.50 (5467.60)b	91982.33 (8558.17)a	90993.48 (3330.06)b	82040.40 (14704.40)b
Significancia	$p < 0.0001$	$p > 0.05$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

Tabla 13. Prueba de t para área intercostal (μm^2) de *Liquidambar styraciflua* de 1 y 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos (Nivel de confianza 0.05).

Edad	Tratamiento control	Tratamiento a pH 5.6	Tratamiento a pH 3.8	Tratamiento a pH 2.5
1 año	83716.20 (7958.08)a	87718.90 (4245.62) a	83757.0140 (7194.12)a	73187.68 (19727.60)a
3 años	95622.23 (8478.60)b	93155.02 (4813.10)b	93150.70 (9136.10)b	71156.51 (12207.26)a
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p > 0.05$

Las diferencias significativas se encontraron en el tratamiento control, pH 3.8 y pH 2.5 en la variable área del margen, mientras que para el área intercostal las diferencias se dieron en el tratamiento control, pH 5.6 y pH 3.8. Debido a la variabilidad del tamaño de las hojas en el tratamiento a pH 5.6 del área del margen no se encontraron diferencias entre grupos de edades.

Por otro lado, en el tratamiento con mayor acidez (pH 2.5) para el área intercostal no se encontraron diferencias significativas. Esto se debe a que la morfología de la hoja se ve sometida a la interacción con las gotas ácidas por más tiempo, lo que ocasiona que en ambas edades a este nivel se alteren y se dañen los tejidos, en consecuencia se genera la disminución de sus áreas.

De manera general con esta prueba se puede decir que existen diferencias con respecto a los grupos de edades, donde claramente se observa que las muestras de 3 años poseen áreas más grandes. Pero que condiciones de alta acidez en las zonas lejanas al margen, los daños generados por las gotas ácidas son similares.

Asociación de caracteres cualitativos con caracteres cuantitativos

Para el caso de los caracteres nominales: modificación de patrones cuticulares transversal y el tejido de cicatrización fueron correlacionadas con los caracteres continuos de las áreas a fin de establecer su asociación para cada especie, puesto que cada una de ellas posee diferentes características anatómicas. Dadas las características de las variables a relacionar se utilizó el coeficiente Rho de Spearman de la paquetería de SPSS v24 (IBM).

En *L. styraciflua* de 1 año existen dos correlaciones significativas, una de ellas es la que existe en el área del margen y la formación de tejido cicatrizado con una asociación inversa (-0.269) (Tabla 14); la segunda asociación fue el área del margen con la modificación de patrones cuticulares (Tabla 15), en la existe un mayor coeficiente de

correlación (-0.384) sin embargo al igual que el caso anterior es una asociación negativa.

Tabla 14. Correlación entre el área del margen y la formación de tejido cicatrizado en *Liquidambar styraciflua* de 1 año de edad

			Área del margen	Cicatriz
Rho de Spearman	Área del margen	Coeficiente de correlación	1.000	-0.269*
		Sig. (bilateral)	.	0.016
		N	80	80
	Cicatriz	Coeficiente de correlación	-0.269*	1.000
		Sig. (bilateral)	0.016	.
		N	80	80

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 15. Correlación entre el área del margen y la modificación de patrones cuticulares en *Liquidambar styraciflua* 1 año de edad

			Área del margen	Modificación de cutículas
Rho de Spearman	Área del margen	Coeficiente de correlación	1.000	-0.384**
		Sig. (bilateral)	.	0.000
		N	80	80
	Modificación de cutículas	Coeficiente de correlación	-0.384**	1.000
		Sig. (bilateral)	0.000	.
		N	80	80

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

En el caso de *L. styraciflua* de 3 años de edad se obtuvo una asociación significativa entre el área del margen vs la presencia de tejido cicatrizado con una correlación inversa (-0.279) (Tabla 16); también se obtuvieron correlaciones significativas entre el área intercostal y la modificación de patrones cuticulares (-0.454) (Tabla 17), al mismo tiempo con la formación de tejido cicatrizado (Tabla 18), en ambos casos es asociación de -0.636.

Tabla 16. Correlación entre el área del margen y la formación de tejido cicatrizado en *Liquidambar styraciflua* de 3 años de edad

			Área del margen	Cicatriz
Rho de Spearman	Área del margen	Coefficiente de correlación	1.000	-0.279*
		Sig. (bilateral)	.	0.012
		N	80	80
	Cicatriz	Coefficiente de correlación	-0.279*	1.000
		Sig. (bilateral)	0.012	.
		N	80	80

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 17. Correlación entre el área intercostal y la modificación de patrones cuticulares en *Liquidambar styraciflua* de 3 años de edad

			Área de la zona intervenal	Modificación de cutículas
Rho de Spearman	Área de la zona intervenal	Coefficiente de correlación	1.000	-0.454**
		Sig. (bilateral)	.	0.000
		N	80	80
	Modificación de cutículas	Coefficiente de correlación	-0.454**	1.000
		Sig. (bilateral)	0.000	.
		N	80	80

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Tabla 18. Correlación entre el área intercostal y la formación de tejido cicatrizado en *Liquidambar styraciflua* de 3 años de edad

			Área intercostal	Cicatriz
Rho de Spearman	Área intercostal	Coefficiente de correlación	1.000	-0.636**
		Sig. (bilateral)	.	0.000
		N	80	80
	Cicatriz	Coefficiente de correlación	-0.636**	1.000
		Sig. (bilateral)	0.000	.
		N	80	80

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

La correlación significativa para *F. uhdei* es la existente entre el área del margen y la modificación de patrones cuticulares con una asociación de -0.516 (Tabla 19), es decir que si existe modificación en la cutícula el área del margen se ve disminuida.

Tabla 19. Correlación entre el área del margen y la modificación de patrones cuticulares en *Fraxinus uhdei*

			Área del margen	Modificación de cutículas
Rho de Spearman	Área del margen	Coefficiente de correlación	1.000	-0.516**
		Sig. (bilateral)	.	0.000
		N	80	80
	Modificación de cutículas	Coefficiente de correlación	-0.516**	1.000
		Sig. (bilateral)	0.000	.
		N	80	80

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Cambios en la concentración de clorofilas

Siguiendo el protocolo propuesto por Nagata y Yamashita (1992) se procesaron 10 muestras de hojas/foliolos por tratamiento para calcular la concentración de la clorofila *a* y *b* por espectrofotometría (Figura 41). A continuación, las ecuaciones que aparecen en el apéndice II fueron introducidas en Excel 2013 y se alimentaron con las lecturas de la absorbancia para obtener la concentración en $\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ de clorofila *a* y clorofila *b*. Posteriormente, se realizaron análisis de varianza bajo los modelos descritos en la tabla 20, con el fin de establecer la existencia de diferencias significativas entre los niveles de acidez para cada especie (Consultar Anexo V para ver a detalle los resultados de las pruebas).



Figura 41. Extracto de maceración Acetona: Hexano (4:6) en hojas de *Liquidambar styraciflua* del tratamiento a pH 2.5

Tabla 20. Descripción de los modelos de ANOVA de una vía para las concentraciones de clorofilas *a* y *b*.

Modelo	Factor	Niveles
Contrastar la concentración de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> por especie y edad	Tratamiento control	<i>Fraxinus uhdei</i> <i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año <i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años
	<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	Control pH 5.6 pH 3.8 pH 2.5
		<i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año
<i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años	Control pH 5.6 pH 3.8 pH 2.5	

El primer contraste realizado fue para los grupos control, con el fin de establecer si las concentraciones de clorofila *a* y clorofila *b* difieren entre ambas especies y o existe influencia en la edad de plantas de *Liquidambar styraciflua* (Figura 42). En la prueba realizada para la clorofila *a* se encontraron diferencias significativas, lo que señala que las muestras de *L. styraciflua* de tres años son distintas con respecto a los grupos de un año (Tabla 21). Ocurrió lo mismo para la clorofila *b*.

Tabla 21. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en los tratamientos control. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).

Especie	Clorofila a ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)	Clorofila b ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 1 año	1.20 (0.478)a	1.32 (0.433)a
<i>Liquidambar styraciflua</i> de 3 años	0.67 (0.503)b	0.43 (0.197)b
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	1.23 (0.395)a	1.67 (0.753)a
Significancia	$p < 0.019$	$p < 0.0001$

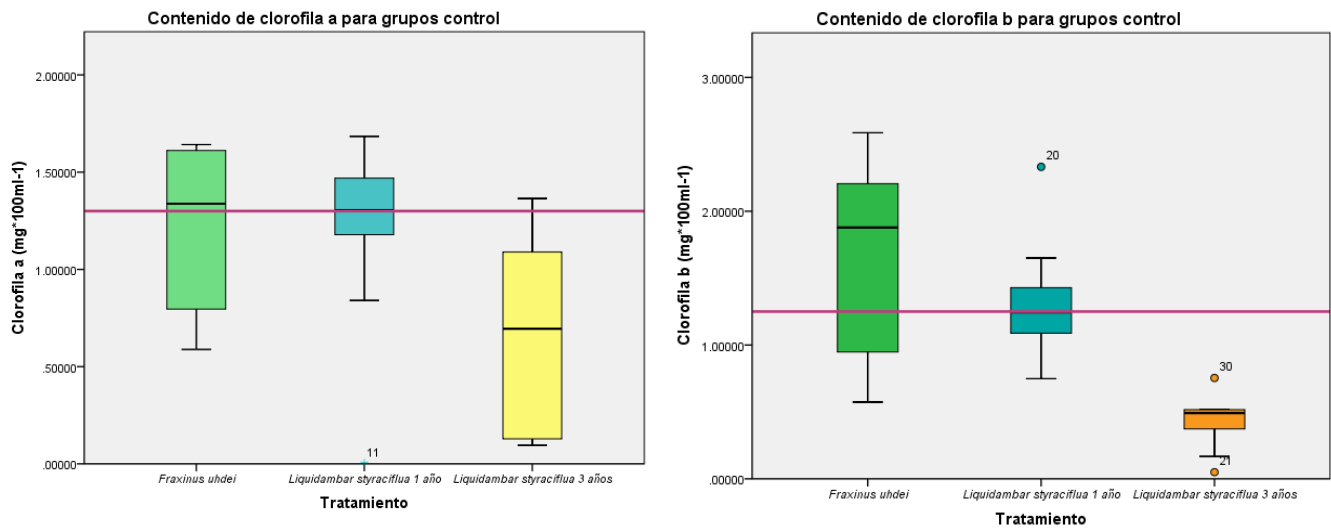


Figura 42. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los tratamientos control

En *L. styraciflua* de 1 año se encontraron diferencias significativas para ambas concentraciones de clorofila (Tabla 22). El grupo significativamente distinto en ambos casos es el tratamiento control el cual presenta una mayor concentración con respecto a los grupos experimentales como se puede apreciar en la figura 43.

Tabla 22. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en *Liquidambar styraciflua* de 1 año. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).

Tratamiento	Clorofila a ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)	Clorofila b ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)
Control	1.20 (0.478)a	1.32 (0.433)a
pH 5.6	0.47 (0.287)b	0.42 (0.213)b
pH 3.8	0.64 (0.309)b	0.44 (0.208)b
pH 2.5	0.47 (0.171)b	0.34 (0.120)b
Significancia	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$

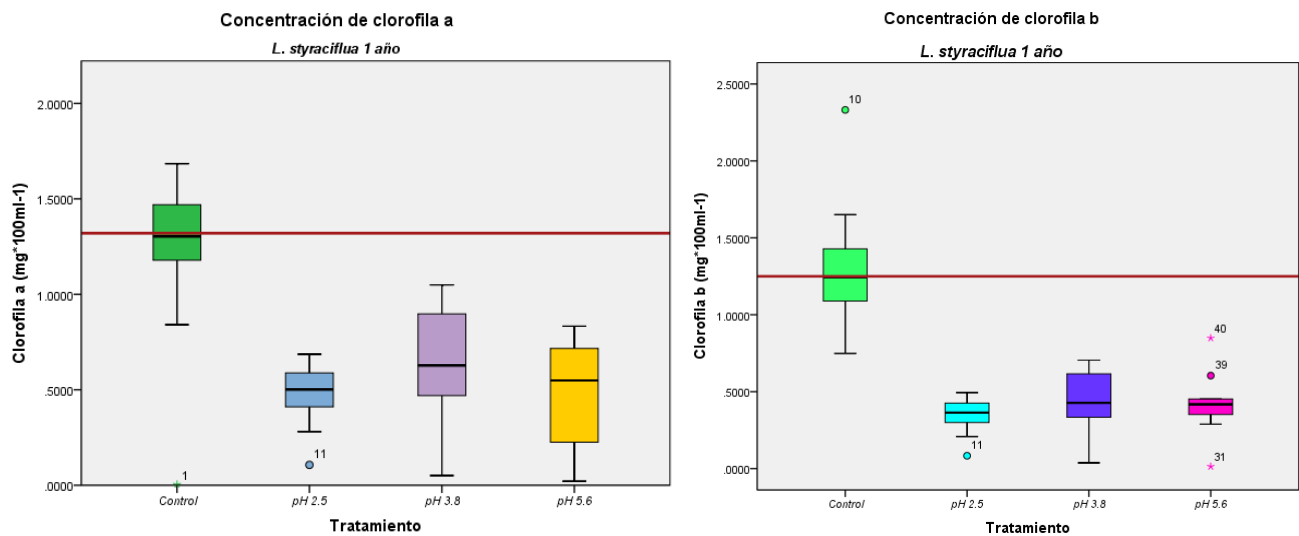


Figura 43. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de *Liquidambar styraciflua* de 1 año

Para el caso de *L. styraciflua* de 3 años de edad (Figura 44) no se encontraron diferencias significativas (Tabla 23) entre los diversos tratamientos.

Tabla 23. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en *Liquidambar styraciflua* de 3 años. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ para la prueba de Games-Howell en clorofila a y la prueba de Tukey para clorofila b).

Tratamiento	Clorofila a (mg*100ml ⁻¹)	Clorofila b (mg*100ml ⁻¹)
Control	0.67 (0.503)a	0.43 (0.197)a
pH 5.6	0.82 (0.591)a	0.40 (0.163)a
pH 3.8	0.78(0.377)a	0.53 (0.236)a
pH 2.5	0.42 (0.279)a	0.37 (0.198)a
<i>Significancia</i>	$p > 0.085$	$p > 0.143$

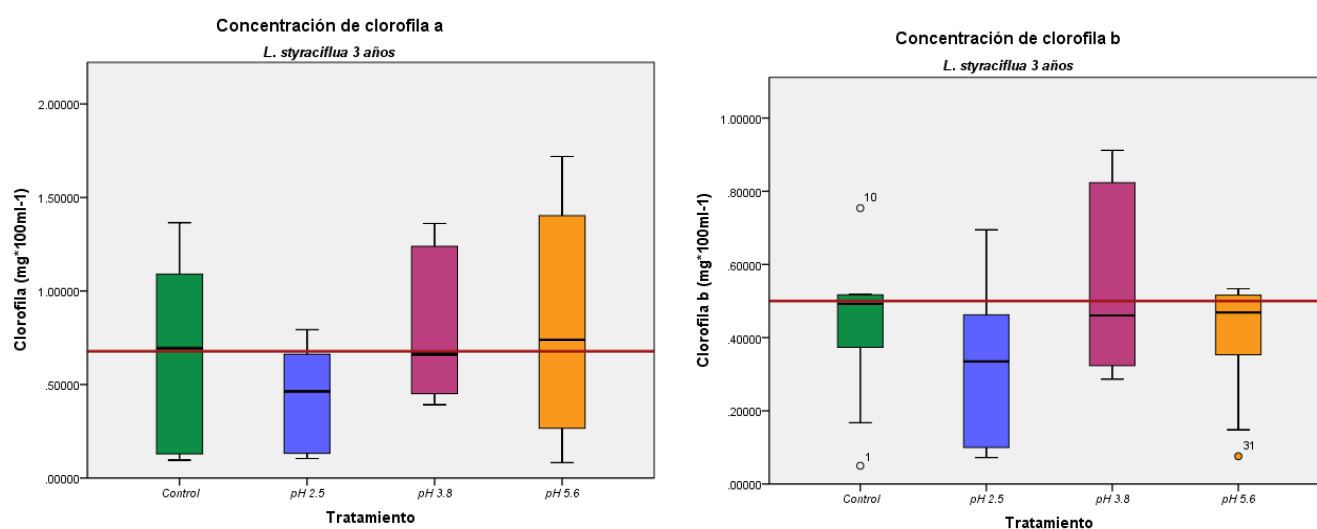


Figura 44. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de *Liquidambar styraciflua* de 3 años.

F. uhdei mostró diferencias significativas (Figura 45) en ambos casos; para la clorofila a la diferencia se encontró entre el grupo control y el tratamiento a pH 2.5; mientras que para la clorofila b todos los grupos experimentales son significativamente distintos al grupo control (Tabla 24).

Tabla 24. Efectos de la lluvia ácida simulada en los contenidos de clorofila a y b en *Fraxinus uhdei* de 1 año. El valor seguido de una letra diferente es porque son grupos significativamente distintos ($p < 0.05$ prueba de Tukey en clorofila a y la prueba de Games-Howell para clorofila b).

Tratamiento	Clorofila a ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)	Clorofila b ($\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$)
Control	1.23 (0.395)a	1.67 (0.753)a
pH 5.6	0.73 (0.466)a	0.37 (0.130)a
pH 3.8	0.72(0.607)a	0.31 (0.194)a
pH 2.5	0.68 (0.219)b	0.42 (0.125)b
<i>Significancia</i>	$p < 0.013$	$p < 0.0001$

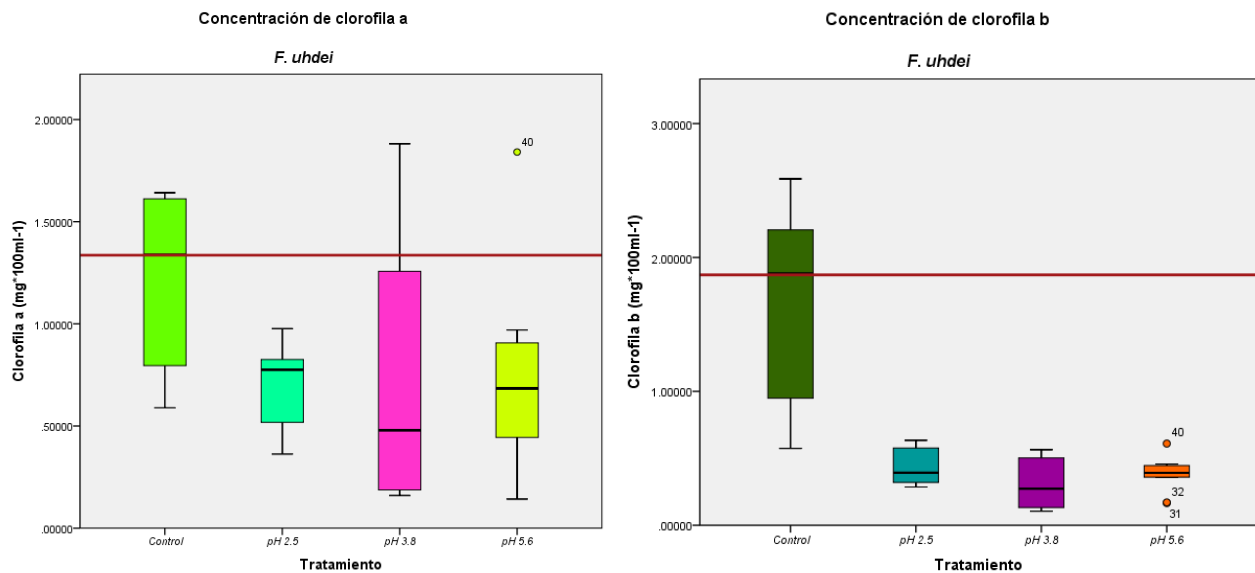


Figura 45. Diagramas de caja y bigote que muestran la dispersión de las concentraciones de clorofila a (gráfico izquierdo) y clorofila b (gráfico derecho) en los diversos tratamientos de *Fraxinus uhdei*

La diferencia en las concentraciones de los tratamientos control puede distinguirse por las distintas edades, puesto que los árboles de un año presentaron mayor concentración de clorofilas debido a la necesidad de fijar carbono que ocuparan para crecer y asegurar su supervivencia.

La especie *L. styraciflua* de 1 año y *F. uhdei* mostraron una marcada disminución en las concentraciones de ambas clorofilas en todos los tratamientos con respecto al grupo control, indicando que a esta edad poseen una alta sensibilidad a condiciones de acidez que podría verse reflejado en cambios de coloración de las hojas o folíolos y posibles disminuciones en la fotosíntesis.

En el caso de *L. styraciflua* de 3 años, no se encontró un cambio en las concentraciones en casi todos los tratamientos, a excepción del tratamiento con pH 2.5, en el cual se observaron ligeras disminuciones no significativas.

Los análisis realizados hacen notar que las disminuciones máximas de concentraciones se encuentran en el tratamiento a pH 2.5; para la clorofila *a* en *F. uhdei* su disminución fue del 45%, en *L. styraciflua* de 1 año el valor fue de 60% y en *L. styraciflua* de 3 años su disminución fue del 37%; mientras que para la clorofila *b* en *F. uhdei* el valor fue del 75%, para *L. styraciflua* el 74% y en *L. styraciflua* de 3 años del 26%.

En la tabla 25 se resumen las alteraciones anatómicas encontradas en ambas especies en esta investigación.

Tabla 25. Alteraciones anatómicas en los tratamientos con pH 3.8 y pH 2.5

Especie	Tratamiento a pH 3.8	Tratamiento a pH 2.5
<i>Fraxinus uhdei</i> de 1 año	Alteraciones en la cutícula y daño en el parénquima en empalizada en la base de un tricoma peltado	Formación de agregados de ceras epicuticulares y colapso de la cutícula. Colapso parcial y total del mesofilo. Aparición de compuestos celulares en tejidos cercanos al daño.
<i>Liquidambar styraciflua</i> 1 año	Generación de agregados de ceras epicuticulares, desprendimiento de cutícula y colapso de epidermis. Oscurecimiento celular. Abscisión de tejido dañado en el margen.	Aparición de agregados de ceras epicuticulares y colapso de la cutícula en algunas zonas; en otras áreas engrosamiento. Colapso parcial y total del mesofilo.
<i>Liquidambar styraciflua</i> 3 años	Formación de agregados de ceras epicuticulares. Oscurecimiento celular. Abscisión de tejido dañado en el margen.	Formación de tejido cicatrizado alrededor de zonas de daño. Abscisión de tejido dañado en el margen

Discusión

En el presente estudio se encontró de manera general, que la intensidad de daño en las hojas depende de la concentración de los ácidos asperjados; estudios realizados por Evans *et al.*, (1977); Baker y Hunt, 1986; Birdi *et al.*, (1987); Da Silva *et al.*, (2005); Sant'Anna-Santos *et al.*, (2006); mencionan que además los síntomas visibles aparecen cuando los niveles de acidez alcanzan un $\text{pH} < 3$ y el tiempo de exposición al ácido.

La aparición de daños visibles correspondió al tratamiento con valor pH de 2.5, en el que la mayoría de los puntos cloróticos o necróticos y lesiones en el follaje de los árboles se desarrollaron en la superficie adaxial. Éstos daños fueron causadas por la acumulación de las gotas acidas cerca de las venas, en los márgenes y las bases de tricomas. Además, un factor clave para la generación de estas lesiones fue la orientación de las hojas, como ya se ha mencionado para las especies vegetales estudiadas por Evans *et al.*, (1977); Abougueda y Baschak, (1987); Da Silva *et al.*, (2005).

Por otro lado, al término de las seis aplicaciones del experimento en el tratamiento con lluvia ácida a pH 2.5, se encontró que el 80% del follaje para ambas especies presentó lesiones. En la investigación de Evans y Lewin, (1981) con frijol pinto, se presentaron daños visibles después de cuatro exposiciones de lluvia ácida con un volumen total de 107 mm, con niveles de pH de 3.0, 2.7, 2.5, y 2.3, en las que se encontraron lesiones en el área de la hoja, que abarcan un porcentaje significativo de la superficie total foliar de aproximadamente 0,5%, de 2 a 3% de 5 a 10%, y de 10 al

15%, respectivamente, misma que refleja el aumento de daño en función a la acidez de la lluvia asperjada.

Los resultados obtenidos en este estudio para el tratamiento de pH 2.5 para ambas edades de *L. styraciflua*, se encontraron daños como el necrosamiento del tejido, manchas de daño color café en el área intercostal y algunos márgenes distorsionados, así como la abscisión temprana en las hojas. En el caso de especies arbóreas, Sant'Anna- Santos *et al.*, (2006) encontraron que en *Genipa americana* (Rubiaceae), con la aplicación de lluvia ácida simulada a un pH 3, se provocó la aparición de puntos necróticos en la superficie adaxial, 24 horas después de la primer aplicación. Neufeld *et al.*, (1985) reportaron entre otras especies que *L. styraciflua* bajo condiciones de pH 3 y 2, sufre un daño considerable en las hojas, que incluye la distorsión y necrosado de los márgenes.

En este caso, *F. uhdei* en el tratamiento a pH 2.5, las primeras apariciones de daño comenzaron con un moteado clorótico de color amarillo; que en algunos casos concluyó en la formación de tejido necrosado en espacios intercostales del foliolo. Mismos que aumentaron rápidamente después de la cuarta aplicación, cuando los ácidos penetraron con mayor facilidad a través de la cutícula y la epidermis. En otras investigaciones realizadas en *Ligustrum lucidum* (Oleaceae), que pertenece a la misma

familia de *F. uhdei* se ha encontrado que a un tratamiento con un pH 2, se provocaron daños que comenzaron por clorosis que va de amarillo a café en la zona intercostal, así como la aparición de necrosis marginal reportada por Houbao y Chuanrong, (1999) y el trabajo de Fan y Wang, (2000).

La especie *L. styraciflua* tiene un margen retuso cóncavo/convexo y venas decurrentes que sumadas al tipo de cutícula, favorecieron el tiempo de contacto debido a la acumulación de gotas ácidas. Por ello, en esta especie las lesiones fueron visibles 24 horas después de la primera aplicación y se intensificaron con el paso del tiempo. Adams y Hutchinson, (1984); Wellburn, (1988) y Kerstiens, (1997), encontraron que para el surgimiento de lesiones por lluvia ácida se genere y éstas se expandan, el tiempo de contacto de las gotas ácidas es determinante; esto también se ve influenciado por los factores morfológicos de las hojas (tipo de margen, tipo de venación, tamaño de las venas, distribución de venas, etc.), la humectabilidad de las mismas y su capacidad amortiguadora.

Para los tratamientos a pH 3.8 y pH 2.5, ambas especies mostraron alteraciones en las cutículas por la generación de cúmulos de ceras donde se concentraron las gotas ácidas. Medeiros *et al.*, (2017), explican que cuando un ácido fuerte, como el ácido sulfúrico, entra en contacto con la superficie de las hojas; éste es capaz de oxidar e hidrolizar los ésteres de las ceras y liberar algunos ácidos grasos de cadena larga de la matriz cerosa y formar agregados en la superficie foliar.

Por consiguiente, los cambios originados en la superficie de las láminas pudieron haber obtenido un carácter hidrofílico que aumentó la humectabilidad del follaje, haciéndolo más sensible a la pérdida de agua y al ingreso de sustancias ácidas como lo explicaron Fog, (1948); Baker y Hunt, (1986); Percy y Baker, (1987) y Marschner, (2012) en sus publicaciones.

La explicación del porque los daños causados por la lluvia ácida en el tratamiento a pH 2.5 se produjeron con mayor frecuencia en las bases de los tricomas de *Fraxinus uhdei*, se debe a que la cutícula es más laxa en estos sitios con relación al resto de la superficie de la lámina. Se sabe que en algunas especies existen poros cuticulares (Martin y Juniper, 1970) y estos poros son sitios donde la cutícula se encuentra más delgada por lo que ciertas sustancias penetran con mayor facilidad como lo reportó Evans *et al.*, (1977).

Los desprendimientos cerosos en el tratamiento control y de pH 5.6 se explican porque de forma natural la cutícula se encuentra en constante renovación debido a su interacción con el ambiente. También Hull *et al.*, (1975); Schönherr y Riederer, (1989) mencionan que de forma natural las ceras epicuticulares de las plantas se generan desprendimientos como una forma de renovación y conservar la integridad de la cutícula.

Baker y Hunt, (1986) sugirieron que la exposición prolongada a fuertes lluvias podría agotar sustancialmente la cutícula, incluso si se tratara de lluvias no ácidas; esto explica porque la mayoría de las muestras de ambas especies observadas en MEB mostraron

erosión de las ceras epicuticulares. Por otro lado, en el tratamiento a pH 2.5 la cutina se vio afectada en los sitios de contacto y acumulación de gotas ácidas; generando la formación de agregados amorfos y escamas, los cuales son producto de una mezcla de ceras secas y solubilizadas.

Es posible que a medida que el agua se evaporó de las gotas la concentración de ácido sulfúrico aumentara y finalmente se convirtió en una solución de ácido muy fuerte que ocasionó lesiones en el tejido epidérmico como encontraron Evans y Curry, (1979) en su investigación.

Entonces, los sitios con mayor cantidad de agregados cerosos son resultado de un contacto prolongado entre la gota ácida y la superficie de la lámina; particularmente en altos grados de acidez (pH 2.5), donde se generaron daños en las células epidérmicas, provocando el paso del ácido hacia el interior del mesofilo de las hojas de *L. styraciflua* y los folíolos de *F. uhdei*.

Cabe destacar que Hull *et al.*, (1975) y Medeiros *et al.*, (2017) afirman que la cutícula es un factor importante para la protección de los tejidos internos, así como para los pigmentos fotosintéticos; ya que se encarga de protegerlos de las longitudes de onda corta que provocan la fotoxidación.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de los daños comienzan por la superficie adaxial, en primer lugar causando colapso en las células epidérmicas, una vez que las sustancias ácidas logran penetrar hacia el mesofilo sufren interacciones con los contenidos celulares, propiciando lesiones internas. En los trabajos de Evans *et al.*,

(1977); Neufeld *et al.*, (1985); Houbao y Chuanrong, (1999); Fan y Wang, (2000), concluyeron que los daños en el tejido foliar interno se ocasionan cuando la concentración de acidez tiene un valor de pH menor a tres.

Las alteraciones celulares a nivel de los tejidos internos de las especies estudiadas en esta investigación se pueden clasificar en tres tipos: 1. La presencia de tejido necrosado, cuyas células poseen una coloración oscura; 2. El tejido donde sólo se observan las paredes celulares; que coincide con las investigaciones de Evans *et al.*, (1977); Evans y Curry (1979); Evans y Lewin, (1981) en las especies de *Phaseolus vulgaris* y *Helianthus annuus*, en tratamientos a bajos niveles de pH, y 3. Células suberizadas en *L. styraciflua* que forman cicatrices como barrera de protección al avance de la necrosis celular como lo reportaron Sant'Anna- Santos *et al.*, (2006) en *Genipa americana*.

Estos tipos de alteraciones se encontraron en el parénquima en empalizada y esponjoso para las dos especies estudiadas en el tratamiento de pH 2.5. Por otro lado, el tejido vascular no resultó afectado en ninguna especie, únicamente se encontraron daños cercanos a estos tejidos. Evans, (1980); Wellburn (1988) y Da Silva *et al.*, (2005), explican que en la superficie de la hoja las venas se encuentran en un relieve mayor al resto de la superficie foliar, lo que favorece el escurrimiento y acumulación de las gotas ácidas hacia zonas aledañas a los haces vasculares.

Todas las zonas afectadas en las estructuras foliares internas en el tratamiento a pH 2.5 para ambas especies, fueron teñidas intensamente por safranina, que es un colorante catiónico con afinidad a sustancias ácidas.

Da Silva *et al.*, (2005) encontraron que esta tonalidad se origina por el incremento de los contenidos celulares que actúan como mecanismos de defensa al estrés causado por la lluvia ácida. Para *L. styraciflua* expuesto al tratamiento de pH 3.8 se observó un aumento en los contenidos celulares, probablemente generados para la formación del tejido de cicatrización en los márgenes.

Zobel, (1996) y Vemerris y Nicholson, (2006), nombran a estos contenidos celulares como compuestos fenólicos, que son un mecanismo de respuesta ante el incremento de acidez celular o algún factor de estrés. Zobel y Nighswander, (1991) y Bikash, (2011), encontraron que estos compuestos son acumulados principalmente en la vacuola central de las células y se liberan hacia el citoplasma en caso de una alteración en los tejidos originados por algún factor ambiental o por patógenos.

Al existir una gran cantidad de sustancias ácidas en los tejidos de ambas especies en el tratamiento de pH 2.5, los compuestos fenólicos podrían haber causado el proceso de apoptosis celular (Lam *et al.*, 2000); puesto que en algunas de las secciones transversales analizadas se reconocieron los cambios paulatinos en las células.

Zobel y Nighswander, (1991) y Zobel, (1996), concluyen que algunas enzimas inducen la degradación del citoplasma, posteriormente desaparecen los organelos y finalmente se liberan los contenidos vacuolares que únicamente dejan algunos vestigios de paredes celulares, siendo una forma de prevención y contención de daños a factores de estrés; sin embargo, aún no existen trabajos que puntualicen las enzimas que participan en este proceso, así como sus rutas metabólicas desencadenadas por las altas concentraciones de acidez.; únicamente se han utilizado pruebas de histoquímica para revelar su presencia en los tejidos.

Por otro lado, cuando los niveles de acidez son tan altos que degradan las ceras epicuticulares e incluso la cutina, las sustancias ácidas entran en contacto con los cloroplastos de las células del parénquima empalizada; en consecuencia los pigmentos fotosintéticos sufren cambios en su estructura, que propician una disminución en sus concentraciones y eficiencia.

En esta investigación se cuantificaron las concentraciones de clorofila *a* y *b* con el fin de establecer la influencia de la acidez en los contenidos de estas clorofilas en las especies estudiadas. El análisis de contraste en los grupos control demostró que la concentración de ambas clorofilas disminuyó en *L. styraciflua* de tres años, mientras que *L. styraciflua* de 1 año y *F. uhdei* (de 1 año), presentaron mayor concentración de las clorofilas; esto podría explicarse debido a que las plantas de un año tienen la necesidad aumentar rápidamente su biomasa y talla para asegurar su sobrevivencia.

En los diversos tratamientos ácidos se encontró de manera general una disminución en la concentración de ambas clorofilas, siendo el tratamiento de pH 2.5 en el que ambas especies presentaron los menores valores de concentraciones.

En la investigación realizada por Shan (1998), encontró que si las plantas son sometidas a altos niveles de acidez, además de un tiempo prolongado; el incremento en los niveles de H^+ al interior de los cloroplastos del parénquima en empalizada, podrían reemplazar el átomo de Mg^{2+} de la molécula de la clorofila convirtiéndose en feofitina. En consecuencia, el espectro de absorción de la luz se vería modificado a las longitudes de onda de 535 y 606 nm. Por lo tanto, la degradación de las clorofilas genera una disminución de la fotosíntesis neta.

Se sugiere que en trabajos posteriores se realice la cuantificación de las concentraciones de feofitina, así como la fotosíntesis neta con el fin de interpretar si las clorofilas realmente se degradan y cómo puede afectarse la asimilación de carbono en las plantas.

La variabilidad encontrada en los tratamientos control, de pH 5.6 y de pH 3.8 para la comparación en el área del margen y el área intercostal, se explica por la heterogeneidad que mostraron las distintas muestras, es decir que existe una influencia por la composición de los tejidos y tamaño de las láminas analizadas.

En algunas mediciones los grupos control presentaban valores menores a los grupos experimentales. Esto se debe a que en algunas de las secciones transversales de los

tratamientos con pH 5.6 y pH 3.8 se encontraron dos hileras de parénquima en empalizada, aumentado así el área evaluada. Sin embargo, no resultaría conveniente seleccionar hojas con tamaños similares puesto que se estaría generando un sesgo en los datos obtenidos.

Por otro lado, se confirmó que los altos niveles de acidez (pH 2.5) generan una disminución en el área intercostal sin importar la especie o la edad.

Al realizar las pruebas para establecer diferencias significativas entre las edades de *Liquidambar styraciflua*, se encontró una diferencia en todos los tratamientos. Pero en algunos casos como el tratamiento de pH 5.6 para el carácter del área del margen, no se encontraron diferencias significativas y se atribuye a la variabilidad existente en las hojas.

Para el caso del tratamiento a pH 2.5, en el carácter del área intercostal se atribuye que los grupos de edades sean homogéneos porque las hojas interaccionan de manera similar con las gotas ácidas, lo cual se ve reflejado en la disminución del área por el daño causado a los tejidos sin importar la edad.

En los análisis de asociación se encontró que todos los caracteres evaluados tienen una relación contraria, puesto que si existe una modificación en los patrones cuticulares o hay presencia de tejido cicatrizado, el área del margen o el área intercostal se verán disminuidas como un reflejo de la acidez a la que sean sometidas las plantas.

Los mayores grados de asociación encontrados en los análisis corresponden al área intercostal vs la presencia de tejido cicatrizado en *L. styraciflua* de 3 años. Esto sugiere que si hay presencia de daño en los tejidos y se generan cicatrices, el valor del área intercostal de las hojas se verá disminuido, porque en esta zona es donde ocurre la mayor acumulación de las gotas ácidas.

La otra asociación moderada se encontró entre el área del margen y la modificación de cutículas en *F. uhdei*, indicando que si la estructura de la cutícula se ve afectada por una prolongada interacción a sustancias ácidas, se producirá una disminución en el área del margen de los folíolos de esta especie.

Finalmente, se ha establecido que los impactos causados por la lluvia ácida pueden producir alteraciones en los tejidos foliares y cambios en las concentraciones de clorofilas; por lo que se sugiere que los factores evaluados en este tipo de estudios abarquen aspectos morfológicos, anatómicos, histoquímicos y fisiológicos, como el monitoreo de la fotosíntesis neta y la tasa de transpiración.

Todo ello, con el fin de realizar una valoración que permita descubrir el potencial de especies arbóreas urbanas como bioindicadoras, en la presencia de lluvia ácida y su resistencia a otros contaminantes atmosféricos; para posteriormente realizar propuestas en la planeación y replantación de árboles adecuados en los parques urbanos, así como en camellones, plazas y alamedas.

Conclusiones

- ☼ Los impactos generados por la lluvia ácida en la anatomía foliar dependen de la concentración de acidez y el tiempo de exposición.
- ☼ Únicamente se presentaron daños visibles en el tratamiento de pH 2.5 para ambas especies, con la presencia de daños en forma de puntos necróticos y

cloróticos de color amarillo a café en los espacios intercostales, en las bases de tricomas y el margen de las láminas; así como el arriscamiento de los márgenes que fue más notorio en *L. styraciflua*.

- ⊗ La cutícula de ambas especies sufrió alteraciones al contacto con las gotas de ácido; estas alteraciones van desde ligeros desprendimientos hasta la formación de agregados de ceras epicuticulares. Los cambios fueron más notables en los tratamientos de pH 2.5 y en menor grado de pH 3.8 en ambas especies.
- ⊗ Se encontraron modificaciones en la organización de los tejidos foliares de ambas especies únicamente en el tratamiento de pH 2.5. Sufrieron alteraciones todos los tejidos, excepto los haces vasculares. La intensidad del daño se dio a distintos niveles, que van desde la pérdida de la cutícula, ligeras alteraciones celulares, generación de cicatrices y colapso celular total.
- ⊗ Las concentraciones de clorofilas *a* y *b* disminuyeron conforme aumenta el grado de acidez en ambas especies.
- ⊗ *Liquidambar styraciflua* es la especie más susceptible a la lluvia ácida simulada, sin embargo presenta mecanismos de respuesta tales como: la generación de cicatrices y la abscisión de tejido dañado.

- ☼ *Fraxinus uhdei* posee un patrón cuticular estriado que le permite tolerar condiciones tan ácidas (pH 3.8) como las precipitaciones reportadas para la Ciudad de México.

- ☼ Se recomienda que se continúen los estudios encaminados a encontrar especies tolerantes a atmósferas urbanas contaminadas para realizar una gestión en la planificación de las áreas verdes en las ciudades, que sirvan para mejorar la calidad del aire y las condiciones microambientales de las ciudades.

Literatura citada

- Abouguendia, Z. M. y Baschak, L. A. 1987. Response of two western Canadian conifers to simulated acidic precipitation. *Water, Air and Soil Pollution* 33: 15-22.
- Adams, C.M. 1982. The response of *Artemisia tilesii* to simulated acid precipitation. M.S. Thesis, Univ. of Toronto, Ontario.
- Adams, C. M. and Hutchinson. 1984. A Comparison of the Ability of Leaf Surfaces of Three Species to Neutralize Acidic Rain Drops. *The New Phytologist* 97(3):463-478.
- Adams, D. y Page, W. 1986. Acid deposition, environmental, economic and policy issues. Plenum Press, New York. 558 pp.

Alvarado F., García L., 1988. Estudio de la Lluvia Ácida en Corteza de Árbol como Indicador de Contaminantes en el Volcán "El Pelado", D.F. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma Metropolitana Plantel Xochimilco.

Amthor, J. 1984. Does acid rain influence plant growth? Some comments and Observations. *Environmental Pollution Series A* 36: 1-6.

Ashenden, T. W. 2002. Effects of wet deposited acidity. In Bell, J. N. B., Treshow, M. (Eds). *Air pollution and plant life*. Chichester, UK. John Wiley & Sons, Ltd.

Báez Q. P., Padilla H., 1983. Acid Rain Over Mexico City Valley and Surrounding Rural Areas. *Geofísica. Internacional*. vol. 25-2.

Baker, E. A. and Hunt, G.M. 1986. Erosion of waxes from leaf surfaces by simulated rain. *New Phytology* 102: 161-173.

Bamidele, J.F. y Eguagie, M.O. 2015. Ecophysiological response of *Capsicum annum* L. exposed to simulated acid rain. *Nigerian Journal. Biotechnology*. 3: 48-52.

Bikash, J. 2011. *Chemistry of phenolic compounds; State of the art*. Nova Science Publisher, Inc. New York. 263p.

Birdi, K. S.; Larsen, B.R. y Sánchez, R. 1987. Effects of simulated acid rain on the surface tension of selected leaves. *Colloid and Polymer Science* 265:262-266.

Bravo H., Aguilar A.S. 1984. Acid Precipitation in the Mexico Basin. Conferencia Técnica Sobre Climatología Urbana y sus Aplicaciones con Especial Referencia a las Zonas Tropicales. OMS, SMN, OMM. México, DF.

Calva, 2012. *Dendroquímica en estudios ecológicos y ambientales*. Editorial Académica Española. 176 pp.

Cape, J.N. 1986. Effects of air pollution on the chemistry of surface waxes of Scots Pine. *Water, Air and Soil pollution* 31:393-399.

Chacalo, A.; Corona, V. y Esparza, N. 2009. Árboles y arbustos para ciudades. Universidad Autónoma. Metropolitana, México, 600 pp.

CONABIO. 2017a. Fichas técnicas de árboles: *Fraxinus uhdei*. Consultado en agosto de 2017. www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/53-oleac1m.pdf

CONABIO. 2017b. Fichas técnicas de árboles: *Liquidambar styraciflua*. Consultado en agosto de 2017. www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/34-hamam1m.pdf

Crafts, A.S. 1961. The chemistry and mode of action of herbicides. Interscience Publishers, New York.

Da Silva, L., Alves, A; da Silva, E y Oliva, M. 2005. Effects of simulated acid rain on the growth of five Brazilian tree species and anatomy of the most sensitive species (*Joannesia princeps*). *Australian Journal of Botany* 53:789–796.

Díaz de la Guardia, M. 2010. Fisiología de las plantas. Segunda edición. Granada, España. 278 pp.

Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación. 1994. Programa Precipitaciones Ácidas En La Zona Metropolitana De La Ciudad De México. Informe anual 1994.

Durham, J. and Demerjian, K. 1986. Atmospheric acidification chemistry: A review. Pages 17-30 in Adams, D. and Page, W. (eds). Acid deposition: Environmental, economic and policy issues. Plenum Press, New York.

Dybing, C.D., y H.B. Currier. 1961. Foliar penetration by chemicals. *Plant Physiology* 36:169-174

Evans, L.S. 1977. A plant developmental system to measure the impact of pollutants in rainwater. *Journal. Air Pollution. Control Assoc.* 29:1145-1148.

Evans, L. S. 1980. Foliar responses that may determine plant injury by simulated acid rain. Pages 239-257 in T. Y. Toribara, M. W. Miller and P. E. Morrow (eds.), *Polluted rain. Twelfth annual Rochester international conference on environmental toxicity.* Plenum Publishing Co., New York.

Evans 1982. A review: Biological effects of acidic rain on vegetation. *Environmental and experimental botany* 22: 155-169.

Evans, L. 1984. Botanical aspects of acidic precipitation. *The botanical review.* 50(4):450-490.

Evans, L. S., N. F. Gmur and F. Da Costa. 1977. Leaf surface and histological perturbations of leaves of *Phaseolus vulgaris* and *Helianthus annuus* after exposure to simulated acid rain. *American Journal Botany* 64:903-913.

Evans, L. S., N. F. Gmur and F. Da Costa. 1978. Foliar response of six clones of hybrid poplar to simulated acid rain. *Phytopathology* 68: 847-856.

Evans, L. S and T. M. Curry. 1979. Differential responses of plant foliage to simulated acid rain. *American Journal Botany*66: 953-962.

Evans, L. S. and K. F. Lewin. 1980. Growth, development and yield responses of pinto beans and soybeans to hydrogen ion concentrations of simulated acid rain. *Environmental and experimental botany* 21: 102-113.

Evans, L. S and K. F. Lewin. 1981. Responses of leaves of *Phaseolus vulgaris* to simulated acid rain. *New Phytology*. 88:403-420.

Fairfax, F. A. and N. W. Lepp. 1975. Effect of simulated "acid rain" on cation loss from leaves. *Nature* 225: 324-325.

Fenn, M. E.; Bauer, L. I.; Zeller, K.; Rodríguez, C.; Hernández, T. 2002. Nitrogen and Sulphur deposition in the Mexico City Air Basin: impacts of Forest nutrient status and nitrate levels in drainage waters. In: Mark E. Fenn; L. I. De Bauer; Tomás Hernández-Tejeda (edits.). *Urban Air Pollution and Forests Resources at Risk in the México City Air Basin*. pp. 298-319. Springer-Verlag New York, Inc. Ecological Studies 156.

Flora de Norteamérica. 2017. *Liquidambar styraciflua*. Consultado el 10 de diciembre de 2107. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=220007687

Fogg, G.E. 1948. Adhesion of water to the external surfaces of leaves. *Discussion Faraday Society* 3: 162-169.

Freeman, S. 2009. *Biología*. Tercera edición. Pearson education, Madrid. 1391 p.

Fuzhu, Z.; Xiaofeng, Y. and Jinyang, Z. 1994. Effects of simulated acid rain on the injury and physiological responses of crops. *Journal of Environmental Sciences*. 6(1):87-92.

Granados, D.; López, G.F; Hernández, M.A. 2010. La lluvia ácida y los ecosistemas forestales. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 16(2): 187-206.

Giri, S.; Shrivastava, D.; Deshmukh, K and Dubey, P. 2013. Effect of Air Pollution on Chlorophyll Content of Leaves. *Current Agriculture Research Journal* Vol. 1(2), 93-98

Gordon, C.C. 1972. Short-long conifer needle syndrome. Interim Report to the Environmental Protection Agency.

González, C. 2003. La hoja. Consultado 11 de diciembre de 2017.
<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/LaPlantas/7777/LaHoja.html>

Hull, H.M.; Morton, H.L. and Wharre, J. R. 1975. Environmental influences on cuticle development and resultant foliar penetration. *The Botanical Review*, 41(4):421-452.

Huttunen, S.; Turunen, M. and Reinikainen, J. 1990. Scattered CaSO_4 crystallites on needle surfaces after simulated acid rain as an indicator of nutrient leaching. *Water, Air and Soil pollution* 54:169-173.

INECC, 2014. Lluvia ácida, Internet. Ciudad de México, México. Consultado 30-05-16.
<http://www.inecc.gob.mx/calair-informacion-basica/554-calair-lluvia-acida>.

INEGI, 2017. Información por entidad: Ciudad de México. Consultado 28-05-17.
<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/df/default.aspx?tema=me&e=09>

Jonsson, B. and R. Sundberg, 1972. Has the acidification by atmospheric pollution caused a growth reduction in Swedish forests? A comparison of growth between regions with different soil properties. In B. Bolin (ed.), *Supporting Studies to Air Pollution Across ational Boundaries. The impact on the environment of sulfur in air and precipitation. Sweden's case study for the United Nations conference on the human environment.* Royal Ministry of Foreign Affairs, Royal Ministry of Agriculture, Stockholm. 46 pp.

Kerstiens, G. 1997. Barrier properties of the cuticle to water, solutes and pest and pathogen penetration in leaves of plants grown in polluted atmospheres. In Yunus, M. and Iqbal, M. *Plant response to air pollution.* (pp 167-178). Chichester, England, John Wiley & Sons.

Kotz, J. C.; Treichel, P. M.; Townsend J. 2008 Química y Reactividad Química. Thompson. México. D. F. 234 pp.

Lam, E.; Fukuda, H. and Greenberg, J. 2000. Programmed cell death in higher plants. Springer, New York. 200 p.

Leonard, O.A. 1958. Studies on the absorption and translocation of 2,4-D in bean plants. Hilgardia 28:115-160.

Linskens, H. F. 1950. Quantitative Bestimmung der Benetzbarkeit von Blattoberflächen (La determinación cuantitativa de la humectabilidad de superficies de las plantas.) Planta 38: 591-600.

Liu, M.; Yi, L.; Yu, F. y Yin, X. 2015. Chlorophyll fluorescence characteristics and the growth response of *Elaeocarpus glabripetalus* to simulated acid rain. Photosynthetica 53:1-6.

Marschner, P. 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Tercera edición. Elsevier, 674p.

Martin, J. T. and B. E. Juniper. 1970. The cuticles of plants. St. Martin's Press, New York.

Medeiros, C.D.; Falcaõ, H. M.; Almeida-Cortez, J.; Santos, D.Y.A.C. and Santos, M. G. 2017. Leaf epicuticular wax content changes under different rainfall regimes, and its removal affects the leaf chlorophyll content and gas exchanges of *Aspidosperma pyrifolium* in a seasonally dry tropical forest. South African Journal of Botany, 111:267-274.

Meza M. y Moncada O. 2010. Las áreas verdes de la ciudad de México. Un reto actual. La planificación territorial y el urbanismo desde el diálogo y la participación. Actas del XI Coloquio Internacional de Geocrítica, Universidad de Buenos Aires.

Minoura, H.; Iwasaka, Y. 1996. Rapid change in nitrate and sulfate concentrations observed in early stage of precipitation and their deposition processes. *Journal of Atmospheric Chemistry* 24: 39-55.

Mohnen, A. 1988. The Challenge of Acid Rain. *Scientific American* 259: 30-38.

Murray, N. 2005. *Introducción a la botánica*, Pearson. 744 p.

Nagata M. y Yamashita I. 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Journal Japan society. For food science and technology* (Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi), 39(10), 925-928.

Norman, A. G., C. E. Minarik and R. L. Weintraub. 1950. Herbicides. *Annual review plant physiology* 1: 141-168.

Peñaranda L. F., 1988. *Precipitaciones Acidas: Metodología para su Caracterización y Estudio en la Ciudad de México*. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.

Percy, K.E. and Baker, E. A. 1987. Effects of simulated acid rain on production, morphology and composition of epicuticular wax and on cuticular membrane development. *New phytologist journal* 107:577-589.

Polishchuk, O.; Vodka, M.; Belyavskaya, N.; Khomochkin, A. and Zolotareva, E. 2016. The Effect of Acid Rain on Ultrastructure and Functional Parameters of Photosynthetic Apparatus in Pea Leaves. *Cell and tissue biology*. 10(3):250-257.

Riederer, M. and Müller, C. 2006. *Biology of the plant cuticle* Annual Plant Reviews, Vol. 23. Blackwell Publishing, UK. 444 pp.

Roberts, E. A., M. D. Southwick and D. H. Palmiter. 1948. A microchemical examination of McIntosh apple leaves showing relationship of cell wall constituents to penetration of spray solutions. *Plant physiology* 23: 557-559.

Rodés, R. y Collazo, M. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Prensa de las Ciencias, UNAM. 160 p.

Samartín, L. 2012. Cousas de bioloxía. Fase luminosa: fotofosforilación. Esquema en Z. Internet. Visitado en 25 de Octubre de 2017. <http://cousasdebioloxia.blogspot.mx/2012/03/fase-luminosa-fosforilacion-y-el-z.html?m=1>

Sánchez C., S. 2010. Oleaceae. En Rzedowski, G. y Rzedowski, J. Flora Fanerógamica del Valle de México. Volumen I. Edición Digital. CONABIO e Instituto de Ecología, A.C. 983 pp.

Sandoval, E.; Rojas, A.; Guzmán, C.; Carmona, L.; Ponce, R.; León, C.; Loyola, C.; Vallejo, M. y Medina, A. 2005. Cuadernos 38: Técnicas aplicadas a la anatomía vegetal. IBUNAM 58. 278 p.

Sant'Anna-Santos, B.; Campos da Silva, L.; Alves, A. y Aguiar, R. 2006. Effects of Simulated Acid Rain on Leaf Anatomy and Micromorphology of *Genipa americana* L. (Rubiaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology. 49(2):313-321.

Sargent, J. A. and G. E. Blackman. 1962. Studies on foliar penetration. 1. Factors controlling the entry of 2,4-dichloroacetic acid. Journal experimental botany 13: 348-368.

Shan, Y. 1998. Effects of simulated acid rain on *Pinus densiflora*. inhibition of net photosynthesis by the pheophytization of chlorophyll. Water, Air and Soil Pollution 103: 121-127.

Schönherr, J. 1976. Water permeability of isolated cuticular membranes: the effect of pH and cations on diffusion, hydrodynamic permeability and size of polar pores in the cutin matrix. Planta 128:113-126.

Schönherr, J. y Schmidt, HW. 1979. Water permeability of plant cuticles. Dependence of permeability coefficients of cuticular transpiration on vapor pressure saturation deficit. *Planta* 144:391-400.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México. 2006. La calidad del aire en la zona metropolitana del valle de México, 1986 – 2005. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo Atmosférico. México, D. F.

Secretaría del Medio Ambiente. 1994. Programa precipitaciones acidas en la zona metropolitana de la Ciudad de México, informe anual. Dirección general de prevención y control de la contaminación. México, D.F.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México 2014. Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2013. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo Atmosférico. México, D. F.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México 2015. Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2014. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo Atmosférico. México, D. F.

Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México. 2016. Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2015. Dirección General de Gestión de la Calidad del Aire, Dirección de Monitoreo Atmosférico. Ciudad de México.

Sehnepf, E. 1965. Licht- und elektronen mikroskopische Beobachtungen an den Trichom- Hydathoden von *Cicer arietinum*. *Ztschr. Pflanzen physiology* 53: 245-254.

Shriner, D.S., 1974, Effects of simulated rain acidified with sulfuric acid on host-parasite interactions. Ph.D. Dissertation, North Carolina State Univ., Raleigh, NC. 79 pp.

SIMAT (Sistema de Monitoreo Atmosférico). 2015a. Infografía Depósito atmosférico y lluvia ácida. Consultado 31 de Enero de 2016.

<http://www.aire.df.gob.mx/descargas/publicaciones/simat-infograma-deposito-atmosferico.pdf>

SIMAT (Sistema de Monitoreo Atmosférico). 2015b. Infografía Lluvia ácida y sus efectos. Consultado 31 de Enero de 2016. <http://www.aire.df.gob.mx/descargas/publicaciones/simat-cartel-lluvia-acida.pdf>

Soukupová, J.; Albrechtová, J.; Svobodová, H. y Opatrná J. 2002. Anatomical and histochemical changes of Norway spruce buds induced by simulated acid rain. *Biologia Plantarum* 45(1):77-84.

Stevens, P. F. 2017. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 consultado en 20 de diciembre de 2017. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

Sun, J., Hu, H., Li, Y., Wang, L., Zhou, Q., Huang, X. 2016. Effects and mechanism of acid rain on plant chloroplast ATP synthase. *Environmental science pollution research* DOI 10.1007/s11356-016-7016-3

Tamm, C. y Cowling, B. 1977. Acidic precipitation and forest vegetation. *Water, air and soil pollution* 7:503-511.

Velicova, V.; Tsonev, T. and Yordanov, I. 1999. Light and CO₂ responses of photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in bean plants after simulated acid rain. *Physiologia plantarum* 107: 77-83.

Vermerris, W. and Nicholson, R. 2006. *Phenolic compounds biochemistry*. Springer, The Netherlands. 284p.

Vivanco, M. 2006. *Muestreo estadístico. Diseño y aplicaciones*. Editorial Universitaria, Chile. 202p.

Wellburn, A. 1988. Air pollution and acid rain: the biological impact. Longman Scientific & Technical, UK. 274p.

Wood, T. and Bormann, F.H., 1974. The effects of an artificial acid mist upon the growth of *Betula alleghaniensis* British Environmental Pollution. 7:259-268.

Zobel, A. M. 1996. Phenolic compounds against in defence air pollution. In: Yunus, M. and Iqbal, M. (Eds.). Plant response to air pollution. Chincester John Wiley. pp. 241-266.

Zobel, A. and Nighswander, J.E. 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.

Anexo I. Procesamiento histológico

Preparación de soluciones empleadas en el procesamiento histológico de las muestras.

Fijación

FAA

(Para 100 ml)

Formaldehído (37-40%)	10 ml
Etanol (96%)	50 ml
Ácido acético glacial	5 ml
Agua destilada	35 ml

Deshidratación

Series de deshidratación a partir de alcohol butílico terciario (ABT) para 100ml.

ATB 100% (ml)	EtOH 100% (ml)	EtOH 95% (ml)	H ₂ O destilada (ml)	Concentración final (%)
5	0	30	65	35
10	0	40	50	50
15	0	45	40	60
20	0	50	30	70
35	0	50	15	85
55	0	45	0	95
75	25	0	0	100
100	0	0	0	absoluto

Tinción

Preparación de colorantes

Safranina "O" (IC 50240)

Safranina "O"	1 g
Metilcelosolve	50 ml
Etanol (96%)	25 ml
Agua destilada	25 ml
Acetato de sodio	1 g
Formaldehído (37%)	2 ml

Disolver la safranina en el metilcelosolve y agregar los reactivos en el orden marcado. Mezclar y filtrar la solución.

Verde rápido (grado reactivo, IC 42053)

Solución A

Verde rápido	4 g
Etanol absoluto	75 ml
Metilcelosolve	25 ml

Se disuelve el colorante en el etanol y se agrega el metilcelosolve

Solución B

Etanol absoluto	25 ml
Aceite de clavo	75 ml

Mezclar ambas soluciones y posteriormente filtrar la solución final.

Descripción del procesamiento histológico

1. **Fijación.** Las secciones de hoja deben ser de aprox. 1cm², se colocan en frascos con tapa hermética y se llenan con FAA por 24 h, posteriormente se realizan varios enjuagues con agua hasta eliminar el fijador del tejido.
2. **Deshidratación.** Se alcohol butílico terciario (ATB) en concentraciones de menor a mayor porcentaje, 35%, 50%, 60%, 70% 85%, 95%, 100% y dos cambios en ATB absoluto, cambio se realiza en 24 h. El frasco se llena hasta cubrir la muestra.
3. **Infiltración.** Este proceso debe llevarse a cabo dentro de una estufa a 60°C. Una vez que las muestras se encuentren en ATB absoluto, se agregan escamas de parafina histológica gradualmente aproximadamente cada 20 minutos hasta completar el doble del volumen original del recipiente con la muestra.
Cuando la parafina se haya fundido y mezclado con el ATB absoluto se destapa el frasco por al menos 48 horas para evaporar este último o se pueden realizar dos cambios (mínimo 24 h en cada uno) de parafina pura líquida.
4. **Inclusión.** Se coloca la muestra en una caja de papel (bond, encerado) a la que previamente se le ha llenado hasta el borde con parafina pura líquida (60°C). Con ayuda de pinzas se orienta la muestra para obtener las secciones transversales.
Este procedimiento debe realizarse rápidamente ya que la parafina comienza a solidificarse a temperatura ambiente.
5. **Cortes.** Los bloques de parafina se pegan en un taquete de madera y se etiquetan. Las muestras son cortadas 15 micras en el micrótopo de rotación American Optical 820. Los cortes se colocan en un baño de flotación (55°C) para que se extiendan y luego se acomodan en los portaobjetos hasta que se sequen.

6. **Desparafinación e hidratación.** Colocar los portaobjetos en canastillas metálicas o de vidrio e introducirlas en una estufa (60°C) por aprox. 30 minutos, hasta haber eliminado el exceso de parafina.
Sacar de la estufa y colocar de inmediato a la siguiente serie de hidratación: xilol absoluto (30 min.), solución de xilol-etanol absoluto 1:1 (30 min.), etanol 100%, 95%, 70%, 50%, 30% (5 min. cada uno).
7. **Tinción.** Se introducen las muestras en safranina "O" por 24 h. Luego se realizan dos lavados con agua destilada y se deshidratan nuevamente en una serie de etanol 30%, 50%, 70%, 95% (5 min. cada uno). Una vez deshidratados los tejidos se tinen con verde rápido (3 min.), después se hacen tres lavados de etanol absoluto (5 min.). Posteriormente para que los tejidos se aclaren se utiliza aceite de clavo (por mínimo 10 minutos.) y en xilol o citrisolv (por mínimo 10 minutos).
8. **Montaje.** Las muestras se montan en resina sintética y se secan en estufa (60°C) por una semana.
9. **Limpieza y etiquetado.** Las laminillas se limpian con ayuda de una navaja de un filo y etanol absoluto. Finalmente las muestras se etiquetan con el nombre de la especie, familia, estructura a observar, tipo de tinción, nombre de quien proceso la muestra y fecha.

Anexo II. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

El método propuesto por Masayasu Nagata e Ichiji Yamashita, (1992) permite la determinación simultánea de pigmentos (clorofila a, b, licopenos y β carotenos) por espectrofotometría a través de las siguientes ecuaciones, basadas en absorbancias a distintas longitudes de onda.

$$\text{Clorofila a (mg/100ml)} = 0.999A_{663} - 0.0989A_{645}$$

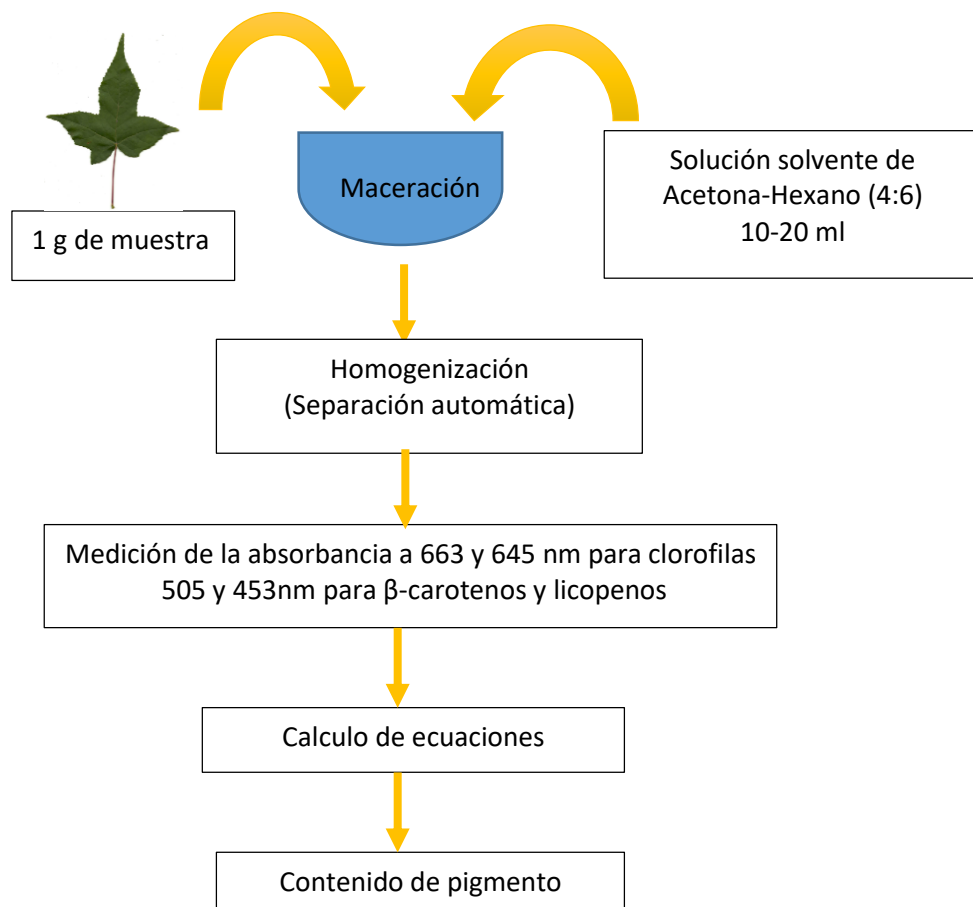
$$\text{Clorofila b (mg/100ml)} = -0.328A_{663} + 1.77A_{645}$$

$$\text{Licopenos (mg/100ml)} = -0.0458A_{663} + 0.204A_{645} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$$

$$\beta\text{-Carotenos (mg/100ml)} = 0.216A_{663} - 1.22A_{645} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$$

(A_{663} , A_{645} , A_{505} y A_{453} corresponden a las absorbancias 663nm, 645nm, 505nm y 453nm respectivamente)

Método de extracción



Anexo III. Salidas de los ANOVA para las variables anatómicas área del margen y área de la zona intercostal

Contrastes de especies vs diversos tratamientos

Fraxinus uhdei

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
FC	20	97575.0085	11238.34641	2512.97065
F5.6	20	102787.6710	6564.20024	1467.79980
F3.8	20	110132.6185	19334.33603	4323.28897
F2.5	20	73807.0475	21111.21410	4720.61098
Total	80	96075.5864	20624.63155	2305.90391

rueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7.282	3	76	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área margen

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	13.116	3	38.427	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Games-Howell

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
FC	F5.6	-5212.66250	0.297
	F3.8	-12557.61000	0.078
	F2.5	23767.96100*	0.001
F5.6	FC	5212.66250	0.297
	F3.8	-7344.94750	0.0393
	F2.5	28980.62350*	0.000
F3.8	FC	12557.61000	0.078
	F5.6	7344.94750	0.393
	F2.5	36325.57100*	0.000
F2.5	FC	-23767.96100*	0.001
	F5.6	-28980.62350*	0.000
	F3.8	-36325.57100*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
FC	20	98983.9645	14633.62515	3272.17806
F5.6	20	105702.9195	11398.65256	2548.81620
F3.8	20	134396.9295	26865.52793	6007.31467
F2.5	20	67914.5735	11706.16037	2617.57703
Total	80	101749.5967	29237.80504	3268.88598

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.680	3	76	0.053

ANOVA

Área zona intercostal

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	44678692330.000	3	14892897440.000	49.525	0.000
Dentro de grupos	22854397890.000	76	300715761.700		
Total	67533090220.000	79			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD	FC	F5.6	-6718.95500	0.613
		F3.8	-35412.96500*	0.000
		F2.5	31069.39100*	0.000
Tukey	F5.6	FC	6718.95500	0.613
		F3.8	-28694.01000*	0.000
		F2.5	37788.34600*	0.000
HSD	F3.8	FC	35412.96500*	0.000
		F5.6	28694.01000*	0.000
		F2.5	66482.35600*	0.000
Tukey	F2.5	FC	-31069.39100*	0.000
		F5.6	-37788.34600*	0.000
		F3.8	-66482.35600*	0.000

Subconjuntos homogéneos

		Área zona intercostal			
		Subconjunto para alfa = 0.05			
	Tratamiento	N	1	2	3
HSD	F2.5	20	67914.5735		
Tukey ^a	FC	20		98983.9645	
	F5.6	20		105702.9195	
	F3.8	20			134396.9295
	Sig.		1.000	.613	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.000.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Liquidambar styraciflua 1 año

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L1_C	20	73361.1310	5469.23962	1222.95916
L1_5.6	20	89196.4410	5903.45617	1320.05293
L1_3.8	20	79816.9015	7615.32714	1702.83891
L1_2.5	20	53406.1040	8490.10038	1898.44416
Total	80	73945.1444	14878.14897	1663.42762

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7.282	3	76	0.000

ANOVA

Área margen

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14815766450.000	3	4938588817.000	19.976	0.000
Dentro de grupos	18788892240.000	76	247222266.300		
Total	33604658690.000	79			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área_margen

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD Tukey	L1_C	L1_5.6	-15835.31000*	0.000
		L1_3.8	-6455.77050*	0.023
		L1_2.5	19955.02700*	0.000
	L1_5.6	L1_C	15835.31000*	0.000
		L1_3.8	9379.53950*	0.000
		L1_2.5	35790.33700*	0.000
	L1_3.8	L1_C	6455.77050*	0.023
		L1_5.6	-9379.53950*	0.000
		L1_2.5	26410.79750*	0.000
	L1_2.5	L1_C	-19955.02700*	0.000
		L1_5.6	-35790.33700*	0.000
		L1_3.8	-26410.79750*	0.000

Subconjuntos homogéneos

Área margen

		Subconjunto para alfa = 0.05				
	Tratamiento	N	1	2	3	4
HSD Tukey ^a	L1_2.5	20	53406.10			
	L1_C	20		73361.13		
	L1_3.8	20			79816.90	
	L1_5.6	20				89196.44
	Sig.			1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.000.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L1_C	20	83716.1890	7958.08372	1779.48162
L1_5.6	20	87718.8480	4245.62534	949.35069
L1_3.8	20	83757.0140	7194.12495	1608.65524
L1_2.5	20	73187.6705	19727.60879	4411.22743
Total	80	82094.9304	12452.79311	1392.26459

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
35.957	3	76	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	4.914	3	39.141	0.005

a. F distribuida de forma asintótica

Comparaciones múltiples

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	L1_C	L1_5.6	-4002.65900	0.217
		L1_3.8	-40.82500	1.000
		L1_2.5	10528.51850	0.147
	L1_5.6	L1_C	4002.65900	0.217
		L1_3.8	3961.83400	0.169
		L1_2.5	14531.17750*	0.020
	L1_3.8	L1_C	40.82500	1.000
		L1_5.6	-3961.83400	0.169
		L1_2.5	10569.34350	0.138
	L1_2.5	L1_C	-10528.51850	0.147
		L1_5.6	-14531.17750*	0.020
		L1_3.8	-10569.34350	0.138

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Liquidambar styraciflua 3 años

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L3_C	20	92016.4960	5467.57548	1222.58705
L3_5.6	20	91982.3375	8558.17867	1913.66693
L3_3.8	20	90993.4800	3330.06499	744.62517
L3_2.5	20	82040.3975	14704.37592	3287.99841
Total	80	89258.1777	9860.54097	1102.44200

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área margen

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	2.698	3	38.466	0.059

a. F distribuida de forma asintótica

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
8.651	3	76	0.000

Comparaciones múltiples

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	L3_C	L3_5.6	34.15850	1.000
		L3_3.8	1023.01600	0.891
		L3_2.5	9976.09850*	0.041
L3_5.6	L3_C		-34.15850	1.000
		L3_3.8	988.85750	0.962
		L3_2.5	9941.94000	0.063
L3_3.8	L3_C		-1023.01600	0.891
		L3_5.6	-988.85750	.0962
		L3_2.5	8953.08250	.0065
L3_2.5	L3_C		-9976.09850*	0.041
		L3_5.6	-9941.94000	0.063
		L3_3.8	-8953.08250	0.065

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L3_C	20	95622.2350	8478.59125	1895.87064
L3_5.6	20	93155.0200	4813.09337	1076.24040
L3_3.8	20	93150.6945	9136.09585	2042.89314
L3_2.5	20	71156.5145	12207.26002	2729.62632
Total	80	88271.1160	13366.99383	1494.47534

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.768	3	76	0.047

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	20.399	3	39.730	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área zona intercostal

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	L3_C	L3_5.6	2467.21500	0.673
		L3_3.8	2471.54050	0.812
		L3_2.5	24465.72050*	0.000
L3_5.6	L3_C	L3_3.8	-2467.21500	0.673
		L3_2.5	4.32550	1.000
		L3_2.5	21998.50550*	0.000
L3_3.8	L3_C	L3_5.6	-2471.54050	0.812
		L3_2.5	-4.32550	1.000
		L3_2.5	21994.18000*	0.000
L3_2.5	L3_C	L3_5.6	-24465.72050*	0.000
		L3_5.6	-21998.50550*	0.000
		L3_3.8	-21994.18000*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo IV. Salidas de los ANOVA para el contraste de los diversos tratamientos vs especies

Tratamiento control

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	20	97575.0085	11238.34641	2512.97065
L1_C	20	73361.1310	5469.23962	1222.95916
L3_C	20	92016.4960	5467.57548	1222.58705
Total	60	87650.8785	12999.94628	1678.28585

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
16.723	2	57	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área margen

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	72.527	2	35.909	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área margen

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_C	L1_C	24213.87750*	0.000
		L3_C	5558.51250	0.134
	L1_C	F_C	-24213.87750*	0.000
		L3_C	-18655.36500*	0.000
	L3_C	F_C	-5558.51250	0.134
		L1_C	18655.36500*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	20	98983.9645	14633.62515	3272.17806
L1_C	20	83716.1890	7958.08372	1779.48162
L3_C	20	95622.2350	8478.59125	1895.87064
Total	60	92774.1295	12495.59384	1613.17423

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.126	2	57	0.009

Pruebas post hoc

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	14.017	2	36.364	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área zona intercostal

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_C	L1_C	15267.77550*	0.001
		L3_C	3361.72950	0.651
	L1_C	F_C	-15267.77550*	0.001
		L3_C	-11906.04600*	0.000
	L3_C	F_C	-3361.72950	0.651
		L1_C	11906.04600*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tratamiento pH 2.5

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_2.5	20	73807.0475	21111.21410	4720.61098
L1_2.5	20	53406.1040	8490.10038	1898.44416
L3_2.5	20	82040.3975	14704.37592	3287.99841
Total	60	69751.1830	19588.31441	2528.84052

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
13.218	2	57	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área margen

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	31.327	2	33.581	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área margen

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_2.5	L1_2.5	20400.94350*	0.001
		L3_2.5	-8233.35000	0.337
	L1_2.5	F_2.5	-20400.94350*	0.001
		L3_2.5	-28634.29350*	0.000
	L3_2.5	F_2.5	8233.35000	0.337
		L1_2.5	28634.29350*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_2.5	20	67914.5735	11706.16037	2617.57703
L1_2.5	20	73187.6705	19727.60879	4411.22743
L3_2.5	20	71156.5145	12207.26002	2729.62632
Total	60	70752.9195	14907.80195	1924.58896

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
9.830	2	57	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	.656	2	36.671	0.525

a. F distribuida de forma asintótica

Tratamiento pH 3.8

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_3.8	20	110132.6185	19334.33603	4323.28897
L1_3.8	20	79816.9015	7615.32714	1702.83891
L3_3.8	20	90993.4800	3330.06499	744.62517
Total	60	93647.6667	17377.58682	2243.43681

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4.209	2	57	0.020

Pruebas post hoc

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área margen

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	28.875	2	29.874	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área margen

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_3.8	L1_3.8	30315.71700*	0.000
		L3_3.8	19139.13850*	0.001
	L1_3.8	F_3.8	-30315.71700*	0.000
		L3_3.8	-11176.57850*	0.000
	L3_3.8	F_3.8	-19139.13850*	0.001
		L1_3.8	11176.57850*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_3.8	20	134396.9295	26865.52793	6007.31467
L1_3.8	20	83757.0140	7194.12495	1608.65524
L3_3.8	20	93150.6945	9136.09585	2042.89314
Total	60	103768.2127	27711.76901	3577.57399

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
6.790	2	57	0.02

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	35.202	2	34.107	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área zona intercostal

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	
Games-Howell	F_3.8	L1_3.8	50639.91550*	0.000
		L3_3.8	41246.23500*	0.000
	L1_3.8	F_3.8	-50639.91550*	0.000
		L3_3.8	-9393.68050*	0.003
	L3_3.8	F_3.8	-41246.23500*	0.000
		L1_3.8	9393.68050*	0.003

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Tratamiento pH 5.6

Descriptivos

Área margen

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_5.6	20	102787.6710	6564.20024	1467.79980
L1_5.6	20	89196.4410	5903.45617	1320.05293
L3_5.6	20	91982.3375	8558.17867	1913.66693
Total	60	94655.4832	9144.82669	1180.59205

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área margen

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.894	2	57	0.415

ANOVA

Área margen

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2061586562.000	2	1030793281.000	20.455	0.000
Dentro de grupos	2872456895.000	57	50393980.610		
Total	4934043456.000	59			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD Tukey	F_5.6	L1_5.6	13591.23000*	0.000
		L3_5.6	10805.33350*	0.000
	L1_5.6	F_5.6	-13591.23000*	0.000
		L3_5.6	-2785.89650	0.434
	L3_5.6	F_5.6	-10805.33350*	0.000
		L1_5.6	2785.89650	0.434

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Área zona intercostal

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_5.6	20	105702.9195	11398.65256	2548.81620
L1_5.6	20	87718.8480	4245.62534	949.35069
L3_5.6	20	93155.0200	4813.09337	1076.24040
Total	60	95525.5958	10619.89366	1371.02238

Área margen

		Subconjunto para alfa = 0.05	
	Tratamiento	N	
HSD Tukey ^a	L1_5.6	20	89196.4410
	L3_5.6	20	91982.3375
	F_5.6	20	102787.6710
	Sig.		.434

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20.000.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Área zona intercostal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
19.029	2	57	0.000

Pruebas robustas de igualdad de medias

Área zona intercostal

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	24.103	2	35.132	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Área zona intercostal

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games- Howell	F_5.6	L1_5.6	17984.07150*	0.000
		L3_5.6	12547.89950*	0.000
	L1_5.6	F_5.6	-17984.07150*	0.000
		L3_5.6	-5436.17200*	0.002
	L3_5.6	F_5.6	-12547.89950*	0.000
		L1_5.6	5436.17200*	0.002

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo V. Salidas de Análisis estadísticos de ANOVA de un factor y ANOVA robusta de un factor de Welch para las concentraciones de clorofila a y b en *L. styraciflua* y *F. uhdei*

Contraste entre grupos control

Descriptivos

Clorofila_a

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	10	1.2393003	0.39561717	0.12510513
L1_C	10	1.1987421	0.47834908	0.15126726
L3_C	10	.6783760	0.50350869	0.15922343
Total	30	1.0388061	0.51550241	0.09411743

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_a			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.968	2	27	0.393

ANOVA

Clorofila_a

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1.957	2	.978	4.595	0.019
Dentro de grupos	5.750	27	.213		
Total	7.707	29			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Clorofila_a

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Tukey		L3_C	.56092430*	0.030
	L1_C	F_C	-.04055814	0.979
		L3_C	.52036616*	0.046
	L3_C	F_C	-.56092430*	0.030
		L1_C	-.52036616*	0.046

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Clorofila_a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
L3_C	10	.6783760	
L1_C	10		1.1987421
F_C	10		1.2393003
Sig.		1.000	.979

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.

Descriptivos

Clorofila_b

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	10	1.6774416	0.75393844	0.23841627
L1_C	10	1.3205776	0.43387562	0.13720352
L3_C	10	.4351677	0.19793741	0.06259330
Total	30	1.1443956	0.72740630	0.13280561

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_b

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
7.128	2	27	0.003

Pruebas robustas de igualdad de medias

Clorofila_b

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	25.934	2	14.611	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Clorofila_b

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_C	L1_C	.35686400	0.419
		L3_C	1.24227392*	0.001
	L1_C	F_C	-.35686400	0.419
		L3_C	.88540992*	0.000
	L3_C	F_C	-1.24227392*	0.001
		L1_C	-.88540992*	0.000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Contrastes por especie con respecto a los tratamientos

Liquidambar styraciflua 1 año

Descriptivos

Clorofila_a

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L1_C	10	1.1987	0.47835	0.15127
L1_2.5	10	.4708	0.17157	0.05426
L1_3.8	10	.6466	0.30993	0.09801
L1_5.6	10	.4789	0.28790	0.09104
Total	40	.6988	0.43750	0.06917

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_a

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.495	3	36	0.232

ANOVA

Clorofila_a

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3.530	3	1.177	10.765	0.000
Dentro de grupos	3.935	36	.109		
Total	7.465	39			

Comparaciones múltiples

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD Tukey	L1_2.5	0.97872*	0.000
	L1_3.8	0.87731*	0.000
	L1_5.6	0.89925*	0.000
L1_2.5	L1_C	-0.97872*	0.000
	L1_3.8	-0.10141	0.835
	L1_5.6	-0.07947	0.912
L1_3.8	L1_C	-0.87731*	0.000
	L1_2.5	0.10141	0.835
	L1_5.6	0.02195	0.998
L1_5.6	L1_C	-.89925*	.000
	L1_2.5	.07947	.912
	L1_3.8	-.02195	.998

Clorofila_a

	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
HSD	L1_2.5	10	0.4708	
	L1_5.6	10	0.4789	
Tukey ^a	L1_3.8	10	0.6466	
	L1_C	10		1.1987
	Sig.		0.638	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Clorofila_b

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L1_C	10	1.3206	0.43388	0.13720
L1_2.5	10	.3419	0.12092	0.03824
L1_3.8	10	.4433	0.20896	0.06608
L1_5.6	10	.4213	0.21304	0.06737
Total	40	.6318	0.48067	0.07600

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_b

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.491	3	36	0.076

ANOVA

Clorofila_b

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6.383	3	2.128	29.155	0.000
Dentro de grupos	2.627	36	0.073		
Total	9.011	39			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
HSD	L1_C	L1_2.5	0.97872*	0.000
		L1_3.8	0.87731*	0.000
		L1_5.6	0.89925*	0.000
Tukey	L1_2.5	L1_C	-0.97872*	0.000
		L1_3.8	-0.10141	0.835
		L1_5.6	-0.07947	0.912
	L1_3.8	L1_C	-0.87731*	0.000
		L1_2.5	.10141	.835
		L1_5.6	.02195	.998
	L1_5.6	L1_C	-.89925*	.000
		L1_2.5	.07947	.912
		L1_3.8	-.02195	.998
	L1_2.5	.07947	.737	
	L1_3.8	-.02195	.995	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Liquidambar styraciflua 3 años

Descriptivos

Clorofila_a

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L3_C	10	.6783760	0.50350869	0.15922343
L3_2.5	10	.4210992	0.27969294	0.08844667
L3_3.8	10	.7863011	0.37708973	0.11924624
L3_5.6	10	.8247963	0.59179879	0.18714321
Total	40	.6776431	0.46438003	0.07342493

Clorofila_b

Subconjunto para

Prueba de homogeneidad de varianzas alfa = 0.05

Clorofila_a

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	1	2
3.671	3	36	0.021	0.3419	
L1_3.8				10	0.4433

Pruebas robustas de igualdad de medias

Clorofila_a

Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.	1.3206	0.835	1.000
Welch	2.562	3	19.280	0.085		

a. F distribuida de forma asintótica de la media armónica = 10.000.

Descriptivos

Clorofila_b

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
L3_C	10	.4351677	0.19793741	0.06259330
L3_2.5	10	.3247230	0.19810871	0.06264747
L3_3.8	10	.5371018	0.23617769	0.07468594
L3_5.6	10	.4025925	0.16383488	0.05180914
Total	40	.4248962	0.20765539	0.03283320

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_b

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.628	3	36	0.602

ANOVA

Clorofila_b

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.232	3	.077	1.923	0.143
Dentro de grupos	1.449	36	.040		
Total	1.682	39			

Fraxinus uhdei

Descriptivos

Clorofila_a

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	10	1.2393003	0.39561717	0.12510513
F_2.5	10	.6896652	0.21949743	0.06941118
F_3.8	10	.7296097	0.60742589	0.19208493
F_5.6	10	.7383277	0.46644917	0.14750418
Total	40	.8492257	0.48472405	0.07664160

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_a

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.378	3	36	0.029

Pruebas robustas de igualdad de medias

Clorofila_a

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	4.717	3	18.585	0.013

a. F distribuida de forma asintótica

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Clorofila_a

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_C	F_2.5	.54963504*	0.009
		F_3.8	.50969057	0.160
		F_5.6	.50097257	0.080
F_2.5	F_C	-.54963504*	0.009	
	F_3.8	-.03994447	0.997	
	F_5.6	-.04866247	0.990	
F_3.8	F_C	-.50969057	0.160	
	F_2.5	.03994447	0.997	
	F_5.6	-.00871800	1.000	
F_5.6	F_C	-.50097257	0.080	
	F_2.5	.04866247	0.990	
	F_3.8	.00871800	1.000	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Descriptivos

Clorofila_b

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
F_C	10	1.6774416	0.75393844	0.23841627
F_2.5	10	.4254840	0.12967005	0.04100527
F_3.8	10	.3176912	0.19419720	0.06141055
F_5.6	10	.3768412	0.13077656	0.04135518
Total	40	.6993645	0.69011119	0.10911616

Prueba de homogeneidad de varianzas

Clorofila_b

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
15.819	3	36	0.000

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Clorofila_b

Pruebas robustas de igualdad de medias

Clorofila_b

	Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
Welch	9.721	3	19.081	0.000

a. F distribuida de forma asintótica

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Sig.
Games-Howell	F_C	F_2.5	1.25195760*	0.002
		F_3.8	1.35975042*	0.001
		F_5.6	1.30060040*	0.002
F_2.5	F_C	-1.25195760*	0.002	
	F_3.8	.10779282	0.483	
	F_5.6	.04864280	0.837	
F_3.8	F_C	-1.35975042*	0.001	
	F_2.5	-.10779282	0.483	
	F_5.6	-.05915002	0.854	
F_5.6	F_C	-1.30060040*	0.002	
	F_2.5	-.04864280	0.837	
	F_3.8	.05915002	0.854	

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.