



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**ADECUACIÓN DE LA TÉCNICA SPAD-502 PLUS PARA LA
EVALUACIÓN DE CLOROFILA COMO INDICADOR DE
DAÑO POR OZONO TROPOSFÉRICO EN *Abies religiosa* (Kunt)
Schltdl. Echam. DEL PARQUE NACIONAL DESIERTO DE LOS
LEONES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

KARLA ERIKA SANCHEZ VILLANUEVA



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. GERMÁN CALVA VÁSQUEZ**

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 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.

Dedicatoria

A mi mamá Clarita, por su cariño, paciencia y amor incondicional, por darme la confianza y libertad para elegir mi camino, por su entusiasmo inquebrantable, y porque de ella aprendí que la buena memoria es la que sólo recuerda los buenos momentos.

A mi hermano Tavo, por siempre contagiarme de su alegría y ocurrencia, por compartir conmigo carcajadas, discusiones y chistes, por su optimismo desafiante, pero en especial por ser el mejor hermano.

A mi abuelito Beto, por su cariño y apoyo, por enseñarme a ser fuerte y andar en bicicleta, y a pesar de ya no estar conmigo, conservo sus consejos sagaces.

A mi abuelita Chelo, por sus cuidados y expectativas, porque su decisión y carácter me ayudaron a seguir mis propósitos, y por sus lecciones, que aún sin estar conmigo siempre me dejan recordarla.

A mi tía Azu, y mis primos Dana y Abdalá, por el apoyo incondicional que me han brindado, por preocuparse por mí, y especialmente porque el tiempo que paso con ustedes es el mejor gastado.

A mi pequeña Hera, por acompañarme, por tu cariño, energía y alegría, porque tus ladridos y cuidar de ti me mantienen atenta, pero en especial, por todas las horas que pasaste sentada en mis pies mientras realice este trabajo.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia Tecnológica e Innovación de la CDMX, por el apoyo otorgado para realizar este trabajo (número SECITI/103/2017).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme los recursos que me permitieron crecer académicamente y personalmente.

A mi director de tesis el M. en C. Germán Calva Vásquez por su guía y apoyo desde los laboratorios de 7mo y 8vo, y por compartir conmigo su conocimiento y experiencia.

A mis sinodales: M. en C. Armando Cervantes Sandoval, Biól. Aida Zapata Cruz, Biól. Irene Castillo Chaires, y al Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro, por sus contribuciones en este trabajo, sus observaciones puntuales, y por sus consejos.

Resumen

El efecto del ozono (O_3) en *Abies religiosa* es difícil de evaluar porque no es acumulable, por ello se recurre a técnicas visuales (RED-II) para referir el daño. El medidor de clorofila SPAD 502 Plus es eficaz en medir la vitalidad en sistemas agrícolas (maíz, sorgo, trigo), razón por la que se pretende determinar la contaminación por O_3 , a través de la reducción de clorofila en el Parque Nacional Desierto de los Leones.

Realizando una curva de calibración entre $\mu\text{g/ml}$ de solución de clorofilas extraídas con etanol al 96% y unidades SPAD, se obtuvieron dos ecuaciones por regresiones polinomiales de segundo orden para las clorofilas *a* y *b* con valores bajos de R^2 (0.0619 y 0.189388, respectivamente). Se encontró una reducción de clorofilas *a* ($\bar{x}=12.4516$) y *b* ($\bar{x}=5.36652$) en acículas con moteado clorótico, comparadas con acículas sanas ($\bar{x}=13.9621$ y $\bar{x}=6.19813$) confirmando la hipótesis.

No se encontró evidencia de que la relación entre clorofila *a/b* indicara la influencia del daño por O_3 , teniendo valores de 2.2526 $\mu\text{g/ml}$ para acículas sanas, y de 2.3202 $\mu\text{g/ml}$ para acículas dañadas. El tipo de lesión en las acículas, las medias mensuales de O_3 del último año (máxima de 0.049 ppm) y la desestimación del dióxido de azufre (SO_2) (máxima de 0.0105 ppm) permitieron confirmar la reducción de clorofila por efecto del O_3 .

Con la comparación entre los datos de las lecturas sólo con SPAD, con los de espectrofotometría, y aplicando las ecuaciones de clorofilas, se concluyó que el Medidor SPAD 502 Plus es una técnica que demuestra la reducción de la concentración de la clorofila, y con ello el daño por O_3 en *Abies religiosa*.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Ozono troposférico.....	3
2.2. Efectos del O ₃ en la vegetación	4
2.2.1. Daño celular.....	5
2.2.2. Daño anatómico	7
2.2.3. Daño en el metabolismo.....	11
2.3. Formación de Clorofilas	12
2.3.1. Alteración de la clorofila por exposición a contaminantes.....	15
2.4. Movimiento de cloroplastos inducidos por luz.....	16
2.5. Teoría de la medición espectrofotométrica.....	17
2.5.1. Principio de medición espectrofotométrica.....	18
2.6. Medidor de clorofila SPAD-502 Plus.....	19
2.6.1. Teoría.....	19
2.6.2. Principio de Medición.....	19
3. ANTECEDENTES	22
4. PROBLEMÁTICA	24
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. HIPÓTESIS.....	25
7. OBJETIVOS	25
8. MÉTODO	26
8.1. Área de estudio: Parque Nacional Desierto de los Leones	26
8.1.1. Vegetación.....	26
8.1.2. Clima.....	28
8.2. Trabajo de campo.....	29
8.3. Curva de calibración	31
8.4. Análisis estadísticos.....	33
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
9.1. Ecuaciones de Conversión.....	34
9.2. Disminución de clorofila por O ₃	41
9.3. Concentraciones de O ₃	48
10. CONCLUSIONES	53
11. REFERENCIAS.....	54

Lista de Tablas

Tabla 1. Síntomas comunes de la lesión foliar por O ₃	8
Tabla 2. Técnicas para la cuantificación de clorofila y síntomas causados por O ₃	23
Tabla 3. Superficie ocupada por tipos de vegetación en el Parque Nacional Desierto de los Leones.	26
Tabla 4. Ambientes climáticos del Parque Nacional Desierto de los Leones.....	28
Tabla 5. Comparación de valores R ² reportados por diferentes autores.	36
Tabla 6. Registro por hora de parámetros en campo el 16 de abril de 2018.....	40
Tabla 7. Registro por hora de parámetros en campo el 01 de junio de 2018.....	40

Lista de figuras

Figura 1. Corte transversal de acícula de <i>Pinus sp.</i>	5
Figura 2. Moteado clorótico por exposición a O ₃ en <i>Pinus virginiana</i>	6
Figura 3. Estructura del cloroplasto.....	12
Figura 4. Estructura de la molécula de clorofila con los dos sustituyentes para las clorofilas <i>a</i> y <i>b</i>	14
Figura 5. Trayectoria de la luz a través de la muestra.	18
Figura 6. Sistema de iluminación/medición en el cabezal del SPAD 502 Plus.....	20
Figura 7. Medidor de clorofila SPAD 502 Plus.....	21
Figura 8. Ubicación del Parque Nacional Desierto de los Leones en la Ciudad de México.	27
Figura 9. Agrupación de acículas de <i>Abies religiosa</i> para la lectura con el medidor SPAD 502 Plus, en la localidad Cruz Blanca.	30
Figura 10. Procedimiento de filtrado para las soluciones etanol-clorofila antes de aforar.	32
Figura 11. Alícuotas para la lectura de absorbancias, con tres repeticiones por muestra.	32
Figura 12. Regresión Polinomial de Segundo Orden para Clorofila <i>a</i>	34
Figura 13. Regresión Polinomial de Segundo Orden para Clorofila <i>b</i>	35
Figura 14. Acículas sanas de <i>Abies religiosa</i>	37
Figura 15. Comparación de medias de clorofila <i>a</i> entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).	41
Figura 16. Comparación de medias de clorofila <i>b</i> entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).	42
Figura 17. Comparación de medias de clorofilas entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).	44
Figura 18. Comparación de medias de clorofilas con unidades SPAD.	45
Figura 19. Comparación de medias de clorofilas en muestras leídas por espectrofotometría.	47
Figura 20. Medias mensuales de O ₃ (ppm) en la estación Cuajimalpa.....	49
Figura 21. Lesiones asociadas al O ₃ encontradas en acículas de <i>Abies religiosa</i>	50
Figura 22. Moteado clorótico asociado al daño por O ₃ encontrado en acículas de <i>Abies religiosa</i>	51
Figura 23. Medias mensuales de SO ₂ (ppm) en la estación Cuajimalpa.	52

1. INTRODUCCIÓN

El *Abies religiosa* u oyamel del Parque Nacional Desierto de los Leones ha sido afectada históricamente por contaminantes atmosféricos, es una especie sensible al daño por O₃, y se conoce que la clorosis es un síntoma frecuente que conlleva a la muerte de hojas en periodos máximos de año y medio. El O₃ es considerado el principal responsable de la degradación de las clorofilas *a* y *b*, y por lo tanto de clorosis del follaje (Rivera, López y Campos, 2006).

Sin embargo, la clorosis tiene como característica, requerir de una evaluación a través del daño visual, ya que el O₃ no deja residuos elementales que puedan ser detectados por técnicas analíticas (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2010), pero que no contempla la degradación de clorofilas.

Para tener mayor certeza del daño que causa el O₃ en hojas es necesario cuantificar la reducción de la clorofila, por ser un indicador del efecto de contaminantes atmosféricos (Rabe y Heinz, 1980; Kozlowski y Constantinidou, 1986; Darrall, 1989). Las investigaciones con condiciones controladas reportan una disminución en la clorofila acompañado con expresiones de moteado clorótico, respuesta a altas concentraciones de O₃ (Knudson, Tibbitts y Edwards, 1977).

En este sentido, se plantea una evaluación más completa, que cuantifique el impacto por O₃ en *Abies religiosa*, mediante la búsqueda de síntomas visuales, y la cuantificación de clorofila, con el registro de condiciones ambientales en el sitio.

En el marco de los métodos convencionales de extracción de clorofila se encontraron desventajas para su aplicación en ecosistemas forestales, y para obtener un número representativo de muestras, ya que requieren gramos de material vegetal, conservarlos en

condiciones específicas (temperatura a 0°C y oscuridad), y grandes volúmenes de solventes (cloroformo, acetona, dimetil-formamida, dimetil-sulfóxido, dietil-éter, metanol).

Para resolver lo anterior, se cuantifico la clorofila en 12 árboles de *Abies religiosa* (10 muestras por árbol) con el medidor de clorofila SPAD-502 Plus, que se ha utilizado como un método no destructivo para evaluar el contenido de clorofila en hojas de *Ocimum basilicum*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Glycine max* (Daughtry, Walthall, Kim, Brown y McMurtrey, 2000; Fenech *et al.*, 2009; Ling, Huang y Jarvis, 2011), y la estimación de la concentración de nitrógeno en *Solanum lycopersicum* (Rodríguez, Alcántar, Aguilar, Etchevers y Santizo, 1998), como expresión del estado de salud de cultivos.

El objeto del presente es demostrar que el medidor de clorofila SPAD-502 Plus, también reporta la reducción de clorofila en *Abies religiosa* como resultado del daño por O₃ en el Parque Nacional Desierto de los Leones. Mediante una curva de calibración, ecuaciones de conversión entre unidades SPAD y concentración de µg/mL, y la relación con las concentraciones anuales de O₃ en el sitio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Ozono troposférico

El ozono (O_3) es un componente natural de la atmósfera, por lo que evolutivamente las plantas tienen tolerancia y otros grupos vegetales son susceptibles, paradójicamente en los Estados Unidos más del 90% del daño de la vegetación efectuado por los contaminantes del aire, corresponde al O_3 (Bennett *et al.*, 1981; citado en Yunus e Iqbal, 1996). El dióxido de azufre (SO_2), los óxidos de nitrógeno (NO_x) y el fluoruro de hidrógeno (HF) destruyen la estructura de las células de las hojas, desintegran las columnas de los tilacoides, la matriz del citoplasma y los aglutina en los plástidos, daña la mitocondria y reduce el número de ribosomas (Yunus e Iqbal, 1996).

En la troposfera, la formación de O_3 ocurre a partir de dióxido de nitrógeno (NO_2) que reacciona con los fotones de la luz solar (espectro visible y UV) y con reacciones subsecuentes se produce oxígeno (O), que a su vez reacciona con oxígeno atmosférico (O_2), y finalmente se produce O_3 . Las reacciones ocurren a 310 nm de longitud de onda ultravioleta, por ser suficientes para disociar el oxígeno (O'Brien y George, 1992; Manahan, 2001).

La contaminación del aire se ve rebasada en gran medida por las emisiones de actividades de la industria, transporte, agricultura, etc. La capacidad oxidativa de la atmósfera, permite distinguir al O_3 como un contaminante secundario (O'Brien y George, 1992).

En la Ciudad de México, con 2240 msnm y rodeada por cuatro sistemas montañosos, las emisiones producidas por 5.3 millones de vehículos, y 70 mil fábricas de diferentes industrias no se dispersan fácilmente, por lo que el O_3 es un contaminante que históricamente ha excedido los estándares de calidad del aire (Garfias y González, 1992; Secretaría del Medio Ambiente, 2017).

Bajo estas condiciones, en la Ciudad de México la formación fotoquímica de O₃ es de 0.01-0.08 ppm/h relacionadas con las concentraciones de NO_x. La alta producción de O₃ se debe a la reactividad de los Compuestos Orgánicos Volátiles (COV). La eficacia de producción es de 4-10 moléculas de O₃ por molécula de NO_x oxidada, y aumenta con la relación de reactividad de COV a NO₂. El O₃ se produce fotoquímicamente durante el día y se transporta a la troposfera libre en la última hora de la tarde (Lei, de Foy, Zavala, Volkamer y Molina, 2007).

El tiempo de exposición al O₃ es un factor que se considera para evaluar el daño, en la salud humana las concentraciones de O₃ no deben rebasar la media máxima diaria de ocho horas de 100 µg/m³, ya que después de este nivel están asociados efectos fisiológicos e inflamatorios en los pulmones de adultos jóvenes y un aumento de 3-5% en la mortalidad diaria (Organización Mundial de la Salud, 2005).

Los niveles críticos de O₃ en la vegetación están establecidos como la suma durante las horas diurnas, entre el promedio horario de concentración de O₃. En cultivos agrícolas el nivel crítico es de 3 ppm/h, mientras que para herbáceas y árboles es de 5 ppm/h (Bermejo, Alonso, Elvira, Rábago, y García, 2009).

Los efectos de dichos niveles son la disminución de la producción en cultivos (>5%), y la reducción del crecimiento en especies forestales (5%) y herbáceas (10%) (Bermejo *et al.*, 2009).

2.2. Efectos del O₃ en la vegetación

Existen evidencias de que los daños de O₃ en la vegetación son contradictorios y con diferencias significativas en condiciones experimentales similares, van desde un cierre parcial de los estomas, degradación de las ceras que cubren las células epiteliales, la disminución de crecimiento y reducción de la tasa fotosintética de hasta 38% (Yunus e Iqbal, 1996).

2.2.1. Daño celular. El O_3 y sus productos de degradación reaccionan con todas las superficies de las plantas, entra en las hojas a través de los estomas abiertos (figura 1) durante el proceso normal de intercambio de gases, dentro de ella el O_3 o un intermediario como un radical hidroxilo (OH^\cdot), no son interceptados en el espacio apoplásmico de los tejidos, y cambia la integridad de las células. Si las células colapsan y mueren, entonces los síntomas ocurren en la superficie de la hoja (Krupa y Manning, 1988; Heber *et al.*, 1995).

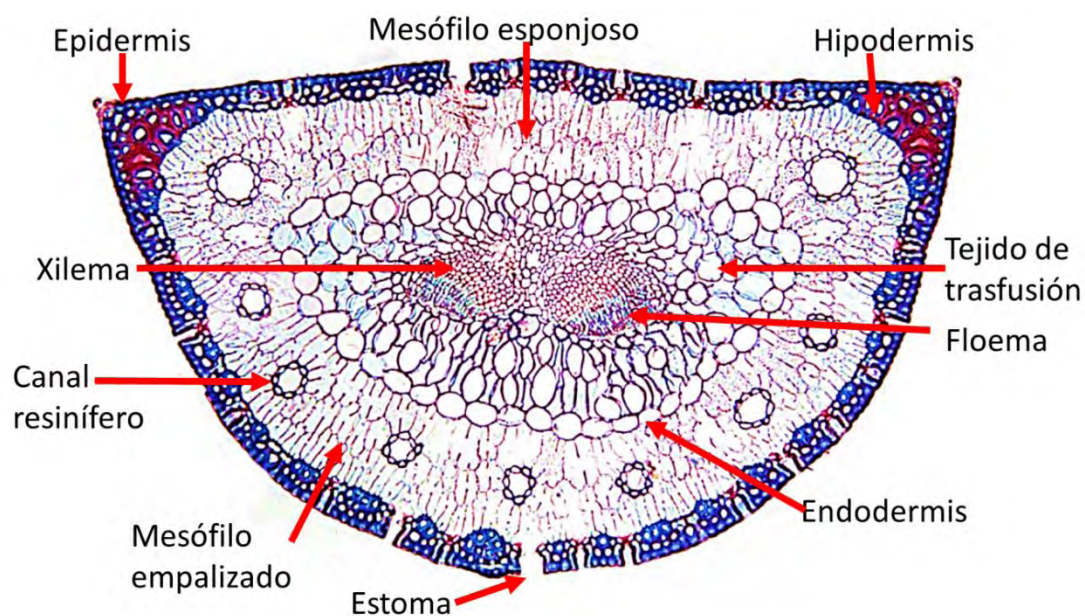


Figura 1. Corte transversal de acícula de *Pinus sp* (González-Benito, 2018).

La acción directa del O_3 en el funcionamiento estomatal cambia la permeabilidad de ion K^+ en las células, incrementando también la actividad de la enzima ATPasa. Altas concentraciones de O_3 afecta la permeabilidad de las células guarda. El ácido abscísico (ABA) reduce la fitotoxicidad del O_3 , posiblemente porque les confiere resistencia (Yunus e Iqbal, 1996).

Las plantas tienen mecanismos de desintoxicación para moléculas gaseosas, en los que se incluyen sistemas enzimáticos (catalasa, peroxidasa y superoxidasa), ácido ascórbico, vitamina E (α -tocoferol), péptidos (glutatión), carotenoides (β -caroteno), poliamidas y sistema buffer. El papel que desempeñan las enzimas es preponderante para mitigar y resistir el estrés ambiental,

entre las que se destacan superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa, fosfatasa ácida, y las antioxidantes (glutación reductasa), que pueden llegar a hacer resistente a la planta al O_3 y retardar la senescencia (Yunus e Iqbal, 1996).

La principal defensa contra el O_3 en las estructuras internas de las plantas, es la desintoxicación apoplásmica. A dosis de 0.3 ppm por 6 h el estado redox del ascorbato apoplásmico se oxida en un 90%, el ascorbato oxidado no se puede reducir en el apoplasma por lo que se transfiere al citosol, después el ascorbato citosólico se traslada de manera lenta al apoplasma. En este proceso los antioxidantes apoplasmáticos distintos del ascorbato participan en la desintoxicación del O_3 apoplásmico (Heber *et al.*, 1995).

Sin embargo, con dosis de 0.3 ppm por 48 h rebasan las defensas apoplasmáticas antioxidativas, debido a que el O_3 alcanza el plasmalema, haciendo inevitable la ozonización de residuos de ácidos grasos insaturados y otras reacciones, que son simultáneos al daño necrótico en la hoja (Heber *et al.*, 1995) como el que se observa en la figura 2.

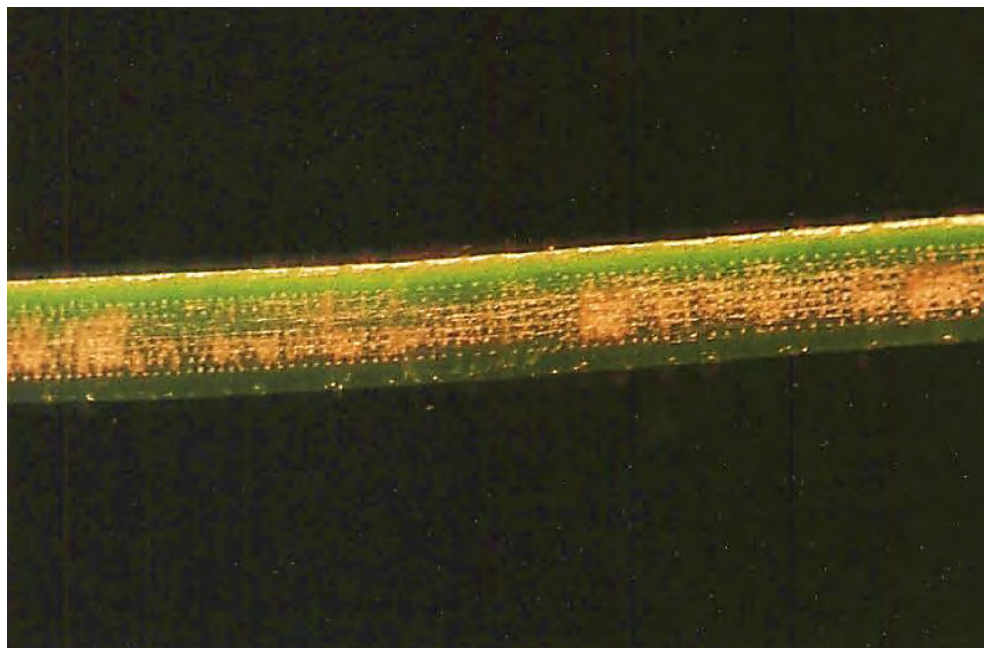


Figura 2. Moteado clorótico por exposición a O_3 en *Pinus virginiana* (Skelly *et al.*, 1987).

Sólo un pequeño porcentaje del O₃ alcanza el plasmalema, la mayor parte se difunde en el citosol, siendo interceptada dentro de esta biomembrana, dañándola por ozonización de dobles enlaces y reacciones posteriores que alteran sus propiedades de permeabilidad (Heber *et al.*, 1995).

La dilución del O₃ en agua descompone productos como peróxidos e hidróxidos, altera el pH fisiológico, así como, radicales hidroxilos al detectar la presencia de compuestos fenólicos (ácido cafeico y ácido ferúlico) (Yunus e Iqbal, 1996).

La reacción del O₃ con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) dentro de la célula incrementa radicales superóxidos (O₂⁻) y consecuentemente genera radicales OH⁻ que pueden atacar las membranas dañando la fijación subsecuente para la formación de radicales peróxido. Las membranas envuelven los radicales O₂⁻ derivados de compuestos orgánicos. El daño causado por el O₃ es a los oxi-radicales que prevalecen en el cloroplasto, donde las concentraciones son altas durante la iluminación, haciendo susceptible al cloroplasto. El almidón, azúcares, y carbohidratos en el cloroplasto podrían mitigar este daño. El O₃ y los productos secundarios pueden reaccionar con moléculas orgánicas y constituyentes inorgánicos (Yunus e Iqbal, 1996).

En condiciones de campo, es poco probable que las concentraciones de O₃ en el aire afecten directamente a los orgánulos intracelulares, primero el daño ocurre en las células antes que llegue a los cloroplastos. El O₃ reacciona con los constituyentes del medio antes de que pueda dañar los cloroplastos, a pesar de que estos son altamente sensibles a los oxidantes (Heber *et al.*, 1995).

2.2.2. Daño anatómico. Los síntomas visibles que resultan de la exposición al O₃ se reconocen como respuestas agudas o crónicas (tabla 1). La lesión aguda implica la muerte de las

células y se desarrolla en pocas horas o días después de la exposición (Skelly *et al.*, 1987; Krupa y Manning, 1988).

Tabla 1.

Síntomas comunes de la lesión foliar por O₃ (Krupa y Manning, 1988).

<i>Lesión aguda</i>	<i>Lesión crónica</i>
<p>Moteado: Pequeñas áreas necróticas debido a la muerte de células empalizadas, de color metálico o marrón, desvaneciendo a gris o blanco.</p>	<p>Pigmentación (bronceado): Las hojas se vuelven de color rojo-marrón a marrón cuando los pigmentos fenólicos se acumulan.</p>
<p>Punteado: Pequeñas manchas puntiformes donde algunas células empalizadas murieron, pueden ser blancos, negro, rojo o rojo-morado.</p>	<p>Clorosis: Puede resultar de la pigmentación o puede ocurrir solo cuando la clorofila se descompone.</p>
	<p>Senescencia prematura: Pérdida temprana de hojas o frutas.</p>

Expresado como punteado, manchas, blanqueamiento y necrosis bifacial, la lesión aguda se asocia con la exposición a altas concentraciones de O₃. La lesión crónica se desarrolla lentamente, dentro de los días o semanas posteriores a la exposición, y puede manifestarse como clorosis, pigmentación (punteado), senescencia prematura y necrosis, este tipo de lesión aparece en respuesta a una exposición prolongada de baja concentración (Skelly *et al.*, 1987).

Sin embargo, los dos tipos de lesiones, pueden ocurrir en respuesta a exposiciones de alta o baja concentración, dependiendo de las condiciones ambientales, genéticas y fisiológicas de la planta. Los tipos de lesiones pueden confundirse con síntomas de otras afecciones, como la senescencia normal, trastornos nutricionales, tensiones ambientales, patógenos bióticos o la infestación de insectos (Skelly *et al.*, 1987).

La clorosis, o pérdida de clorofila, puede ocurrir como una condición generalizada similar a la senescencia, en parches discretos llamados moteados, o en patrones similares al punteado. La clorosis a menudo es más prevalente en la superficie adaxial de las hojas de especies con células empalizadas (Lacasse y Treshow, 1976, citado por Krupa y Manning, 1988; Skelly *et al.*, 1987).

Este tipo de lesión se caracteriza por áreas pequeñas de células empalizadas muertas, y tejidos epidérmicos asociados, que conducen a la formación de lesiones irregulares en la superficie de la hoja. La necrosis bifacial se produce cuando se eliminan los tejidos que conectan las superficies adaxial y abaxial de las hojas. La coloración del tejido varía de blanco a rojo anaranjado a negro, dependiendo de la especie. Las venas pequeñas generalmente se incluyen en el tejido necrótico, pero las venas más grandes a menudo permanecen con vida. El área de células muertas se colapsa, y la partes adaxial y abaxial de las superficies de las hojas se unen para formar una lesión de textura frágil. Aunque el punteado suele ser intervenal, una lesión extensa también puede afectar a muchas de las venas, como en la clorosis generalizada. En la necrosis bifacial, los márgenes de la hoja son a veces los más gravemente dañados. Las exposiciones prolongadas a dosis bajas pueden provocar la coalescencia de tejidos cloróticos, punteado ligero y/o la producción de una apariencia bronceada, seguidas de defoliación prematura (Skelly *et al.*, 1987).

En las plantas de hoja ancha con células del mesófilo empalizadas, los síntomas comienzan a presentarse en la superficie adaxial de la hoja, debido a que éste tipo de células son especialmente susceptibles al O₃, causando punteado que aparecen uniformemente de coloración bronceada, roja, marrón, púrpura o negra, dependiendo de las características de la especie o de las condiciones ambientales o fisiológicas. La superficie adaxial de la hoja puede estar ilesa, con

solo células empalizadas subyacentes afectadas, el síntoma suele ser más intenso en las hojas expuestas a la luz directa (Lacasse y Treshow, 1976, citado por Krupa y Manning, 1988; Skelly *et al.*, 1987).

El daño puede presentarse en todas las hojas, pero las hojas más jóvenes son más sensibles, en ellas los síntomas tienden a desarrollarse en las puntas, mientras que en las hojas más viejas, el daño se produce hacia la base. Toda la superficie de las hojas más viejas puede presentar síntomas cuando se expone periódicamente al O₃ durante el crecimiento. En plantas con hojas pinnadas compuestas, solo algunas hojuelas en ciertas posiciones a lo largo del pecíolo pueden verse afectadas (Skelly *et al.*, 1987).

Las coníferas como *Abies religiosa* y las plantas con células mesofilicas indiferenciadas, pueden presentar síntomas en cualquiera de las superficies foliares, ya que sólo las células cerca de los estomas están afectadas por O₃ (Lacasse y Treshow, 1976, citado por Krupa y Manning, 1988). Los dos síntomas más comunes son el moteado clorótico y la picadura de la punta. El moteado de agujas jóvenes y viejas es inducido por exposiciones a dosis bajas, mientras que las exposiciones a altas dosis inducen la formación de puntas en las agujas jóvenes (Skelly *et al.*, 1987).

Dependiendo de la especie, las condiciones ambientales, y la concentración y duración de la exposición al O₃ puede causar una amplia variedad de síntomas en las plantas (Cooley y Manning, 1987). El moteado clorótico se desarrolla como pequeños parches de tejido amarillo rodeado de tejido aparentemente sano (figura 2). Las puntas necróticas son el resultado de la muerte regresiva de la punta o de la formación de bandas necróticas, que pueden desarrollarse cuando el tejido de mediana edad a lo largo de una aguja individual es más sensible, posteriormente el resto de la punta de la aguja también puede morir, produciendo puntas

necróticas con una coloración marrón rojiza que se desvanece con la edad. Hacia el final de la temporada de crecimiento, estas puntas necróticas pueden desprenderse, haciendo que las agujas afectadas parezcan mucho más cortas (Skelly *et al.*, 1987).

Las agujas jóvenes y de crecimiento rápido que están expuestas directamente a la luz solar son las más sensibles, pero las agujas más antiguas pueden presentar moteado y senescencia prematura como resultado de exposiciones prolongadas a dosis bajas. Las plantas sensibles al O₃ exhiben defoliación prematura de las agujas más viejas, clorosis general y acortamiento de las acículas (Skelly *et al.*, 1987).

En *Abies religiosa* las lesiones se manifiestan principalmente en la superficie adaxial de la hoja, progresivamente de la base a la punta; los síntomas consisten inicialmente en un punteado blanquecino, que posteriormente se convierte en moteados más grandes y rojizos que después se unen lateralmente a la costilla hasta cubrir toda la superficie. La lesión se extiende a los bordes laterales haciéndose evidente en el lado abaxial, que finalmente se torna de color amarillo y la hoja muere. Estos síntomas comienzan en la edad temprana del desarrollo de las agujas de un año de edad y evolucionan promoviendo la abscisión temprana, es posible encontrar todas las agujas en verticilos de 1 y 2 años, mientras que en los de 3 años las agujas son escasas (Alvarez, Lagunab y Rosas, 1998).

2.2.3. Daño en el metabolismo. La exposición a largo plazo a bajas concentraciones de O₃ afecta la fotosíntesis y da como resultado la reducción de la translocación de fotosintatos de los brotes a las raíces (Cooley y Manning, 1987). Afectando negativamente las micorrizas y la senescencia de la raíz, repercutiendo en el rendimiento de los árboles, debido a la reducción de la absorción de agua y minerales. (Krupa y Manning, 1988; Heber *et al.*, 1995).

Los efectos del O_3 en la fotosíntesis ocurren de forma indirecta, ya que los árboles forestales, donde las hojas o las agujas están expuestas al aire contaminado con O_3 durante su vida útil, no poseen defensas antioxidantes y el O_3 contribuye al declive del bosque. En el metabolismo de las coníferas, después de periodos de exposición al O_3 , las expresiones de daño también se observan en el siguiente periodo de vegetación (Heber *et al.*, 1995).

2.3. Formación de Clorofilas

La fotosíntesis es el proceso químico más importante en la Tierra, en la medida en que la luz solar de la biosfera sea capturada y convertida en la energía química, los organismos autótrofos utilizan la energía de la luz solar para ensamblar moléculas orgánicas de fuentes completamente inorgánicas (CO_2 y agua). Este proceso ocurre dentro de las células de las plantas, en los cloroplastos (figura 3), en donde la clorofila y otros pigmentos captan energía lumínica y la transforman en energía química (ATP) y en compuestos reductores (NADPH) (Hopkins, 2006).

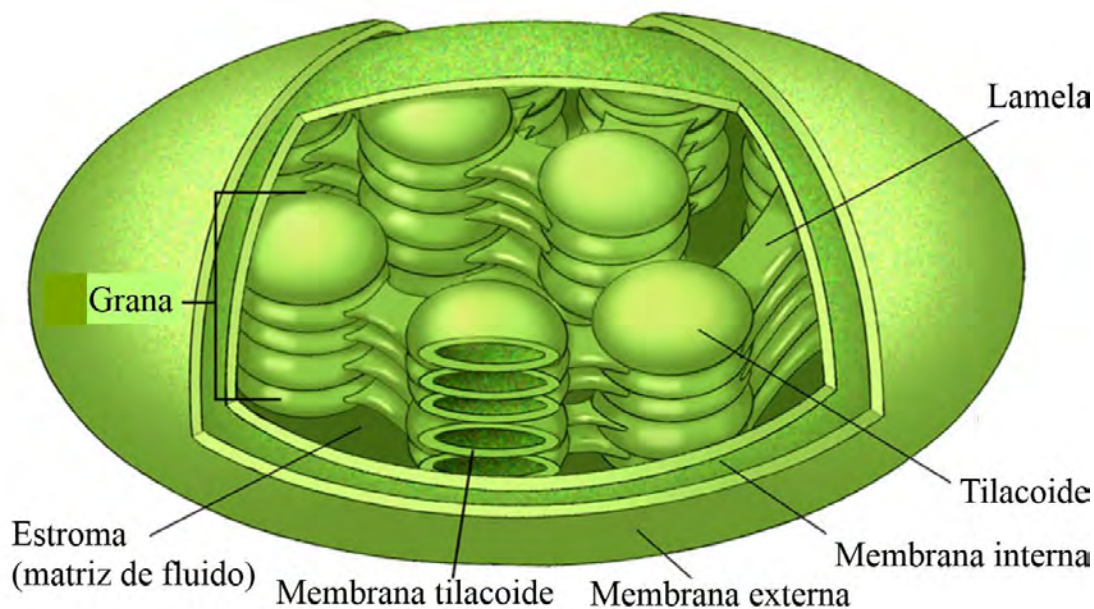


Figura 3. Estructura del cloroplasto (Carlson, s.f.b).

La biosfera recibe radiación solar comprendida entre los 290 nm y los 3000 nm de longitud de onda, de ella el 45% está concentrada entre 380-710 nm, que constituye el rango de absorción de las clorofilas y los pigmentos accesorios (Manrique, 2003).

En las plantas superiores, los pigmentos absorben los fotones (principalmente las clorofilas) y que están incrustados en estructuras de la membrana interna (tilacoides) y absorben gran parte de la energía de la radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm). La clorofila absorbe más eficientemente el azul y rojo, y en consecuencia, refleja el verde (Lambers, Chapin y Pons, 1998).

La clorofila es una molécula compleja, formada por un anillo de porfirina con un átomo de magnesio (Mg), cuya función es absorber luz, y una cadena larga de fitol ($C_{20}H_{39}OH$), que mantiene la clorofila integrada al interior de la membrana fotosintética (Heath, 1989). Existen diferentes clorofilas, que difieren entre sí en los sustituyentes en el carbono C-3, la clorofila *a* contiene un grupo metilo y la clorofila *b* un grupo formilo. Ambas clorofilas tienen un grupo vinilo y un etilo en las posiciones C-2 y C-4, respectivamente; un grupo carbometoxilo en la posición C-10 de los anillos isocíclicos y el grupo fitol en la posición C-7 (figura 4). Las clorofilas *a* y *b* tienen características espectrales distintivas, la banda azul de los espectros (la Soret Band con una absorbancia de aproximadamente 400 nm) se solapa con los espectros de carotenoides; sin embargo, la banda roja (banda alfa) se puede utilizar para separar la clorofila *a* de la clorofila *b*, y se encuentran en las plantas en una relación aproximada de 3: 1 (Heath, 1989; Fennema y Tannenbaum, 2000).

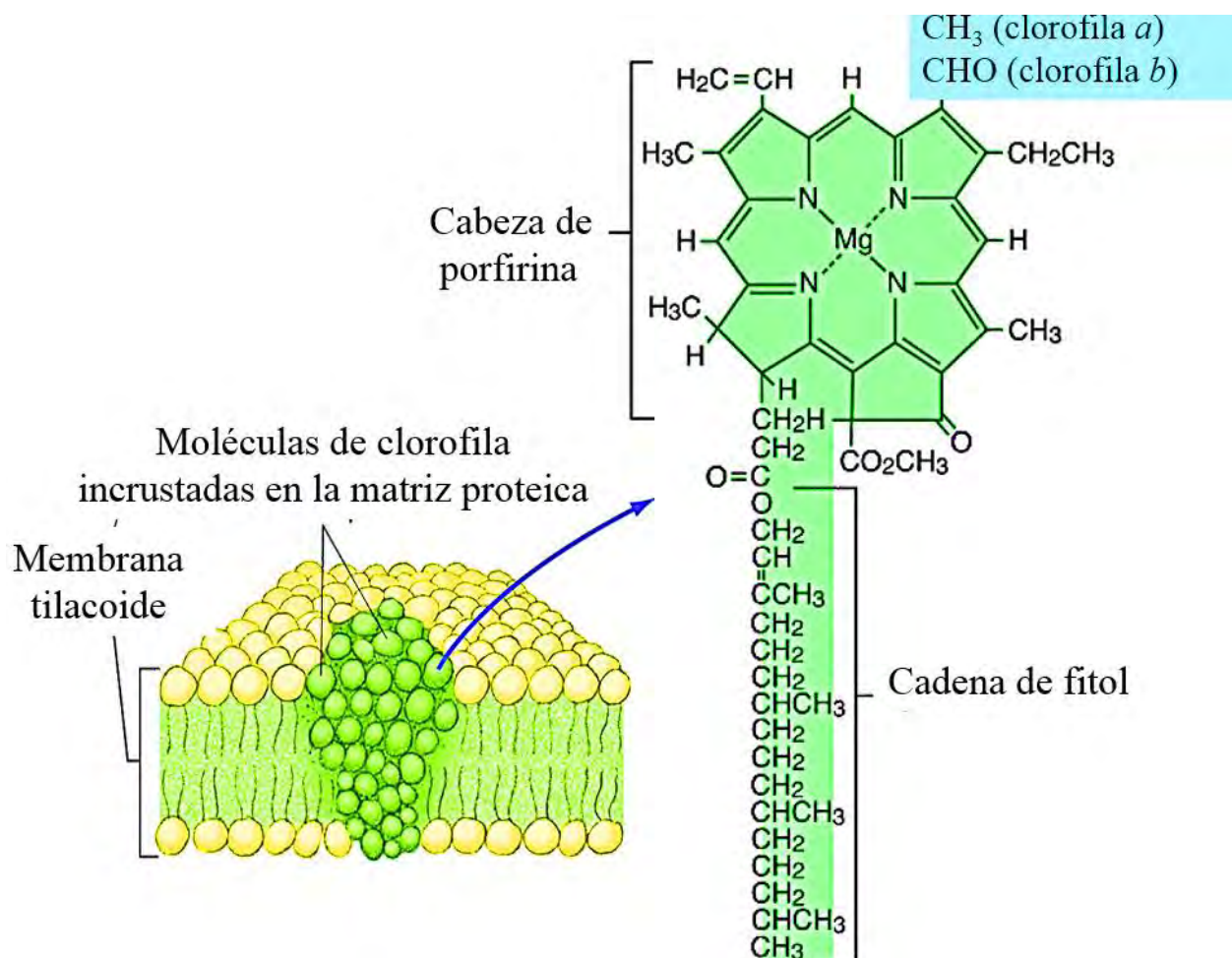


Figura 4. Estructura de la molécula de clorofila con los dos sustituyentes para las clorofilas a y b (Carlson, s.f.a).

Las moléculas de clorofila están organizadas en estructuras captadoras de luz (complejos antena), constituidos por pigmentos unidos a proteínas, que a su vez están conectados con los fotosistemas I (FS I) y II (FS II) a través de un centro de reacción, que contienen los aceptores y transportadores de electrones necesarios para llevar los electrones excitados por los fotones absorbidos hasta sus finales aceptores, las moléculas de NADP oxidado que pasarán a NADPH reducido (Manrique, 2003).

Cuando una molécula de clorofila capta un fotón de luz, un electrón pasa de su estado basal a otro excitado, de mayor nivel energético. Este estado excitado de la clorofila es estable por muy poco tiempo (10^{-9} s) e inmediatamente pueden suceder una de estas tres transiciones: 1)

transferir la energía a otra molécula de clorofila y así sucesivamente hasta que se alcanza el centro de reacción del fotosistema correspondiente (FSI o FSII) y el electrón pueda ser utilizado en el proceso fotoquímico; 2) retornar a su nivel básico emitiendo la energía en forma de calor y no emitiendo ningún tipo de fotón; o 3) en lugar de volver a su estado básico emitiendo calor, emitir un fotón de mayor longitud de onda que la absorbida en un proceso que se conoce como fluorescencia (Lambers, Chapin y Pons, 1998 citado en Manrique, 2003).

Cualquiera de estas tres transiciones tiene como consecuencia la disipación de la energía absorbida. La mayor parte de la fluorescencia que es emitida por la clorofila proviene de la clorofila *a* del FSII. La cantidad de fluorescencia emitida es una forma de medida de la eficiencia de la transferencia de los electrones (Manrique, 2003).

2.3.1. Alteración de la clorofila por exposición a contaminantes. La reducción de clorofila es iniciada por radicales libres inducidos por los contaminantes, que en sistemas químicos donde los hidroperóxidos de ácidos grasos (que se descomponen y forman radicales libres) pueden iniciarse, y el tocoferol y el caroteno (que son antioxidantes y los interruptores de la cadena de radicales libres) no pueden inhibir el blanqueamiento de la clorofila (Heath, 1989).

El SO₂ conduce a la lisis de los cloroplastos y luego a la destrucción de la clorofila, en las áreas marginales e intercostales de las hojas. Además induce la solubilización de las enzimas de la membrana (clorofilasa) que forman la clorofila, lo que conduce a la pérdida de clorofila en las membranas grana (Heath, 1989).

En variedades de *Nicotiana tabacum* y en *Glycine max* la exposición a 0.3 µl/L de O₃ durante 2 h induce la pérdida de clorofila, ARN y proteína, la lesión ocurre en los cloroplastos, ya que la reducción de la actividad de la nitrato reductasa (encontrada dentro del cloroplasto) y de la cantidad de clorofila es proporcional a la exposición de O₃ (Heath, 1989).

La clorofila *a* es menos estable que la clorofila *b*, por lo que el aumento en la proporción de *a/b* es un indicador de los efectos de la contaminación inducida por radicales libres (Heath, 1989).

2.4. Movimiento de cloroplastos inducidos por luz

En las plantas los movimientos de los orgánulos están regulados por señales ambientales, entre ellos, los cloroplastos se mueven dentro de la célula en respuesta a la intensidad y la dirección de la luz incidente (movimiento de fotorreposición del cloroplasto). El movimiento en respuesta a la poca luz garantiza la máxima absorción de luz por parte del cloroplasto para maximizar la utilización de fotosíntesis por debajo de la saturación de la luz de la fotosíntesis (respuesta de acumulación). Por el contrario, el movimiento de los cloroplastos en respuesta a la luz alta protege el cloroplasto del exceso de luz y tiene un efecto significativo en la absorción de la luz (respuesta de evitación) (Brugnoli y Bjorkman, 1992; Park, Chow y Anderson, 1996; Suetsugu, Higa, Gotoh y Wada, 2016).

El movimiento de los cloroplastos está mediado por filamentos especializados de cloroplasto-actina (cp-actina), los cuales, se localizan en la periferia del cloroplasto, entre los cloroplastos y la membrana plasmática. La luz azul regula la cantidad y las posiciones de los filamentos de cp-actina (Suetsugu, Higa, Gotoh y Wada, 2016).

En las hojas, las longitudes de onda inferiores a 500 nm son efectivas para provocar los movimientos de cloroplastos y los espectros de acción para la respuesta de baja intensidad y alta intensidad son los mismos con un pico alrededor de 450 nm. El efecto de los movimientos de los cloroplastos sobre la absorbancia de la radiación fotosintéticamente activa en una hoja depende de su anatomía y es más pronunciado en las hojas con una sola capa de células que contienen

cloroplastos y menos pronunciado en aquellas con parénquima empalizado bien desarrollado y múltiples capas celulares. (Brugnoli y Björkman, 1992).

2.5. Teoría de la medición espectrofotométrica

La espectroscopía UV-visible es la medición de la absorbancia de la luz a una longitud de onda específica en una muestra, su aplicación es identificar la presencia y la concentración de entidades moleculares. La ley de Beer-Lambert se usa para relacionar la absorción de la luz con las propiedades de la muestra a través de la cual viaja la luz. La ley de Beer-Lambert establece que (Bibby Scientific, 2014):

$$A = \epsilon l c$$

Donde:

A= absorbancia

ϵ = coeficiente de absorción molar ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

c= concentración ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l= longitud del camino (cm)

Esta ley muestra que la absorbancia es lineal a la concentración (sólo en concentraciones bajas). Para los niveles de absorbancia por encima de 3.0, la concentración comienza a alejarse de la relación lineal. La transmitancia es la proporción de la luz que pasa a través de la muestra (figura 5). La absorbancia está inversamente relacionada con la transmitancia (Bibby Scientific, 2014): Por lo tanto:

$$A = \frac{\log 1}{T}$$

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

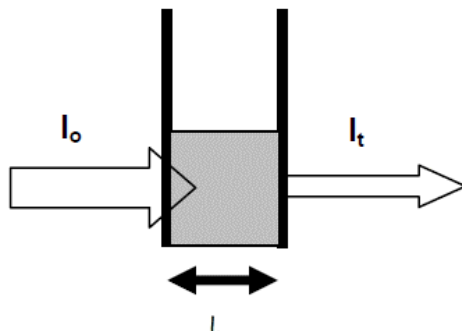


Figura 5. Trayectoria de la luz a través de la muestra.
 Donde: I_o es la luz incidente, I_t es la luz transmitida e l es la longitud del camino (Bibby Scientific, 2014).

2.5.1. Principio de medición espectrofotométrica. Los espectrofotómetros tienen cuatro componentes principales: a) fuente de luz para emitir una cantidad alta y constante de energía en todo el rango de longitud de onda; b) método de separación de luz en longitudes de onda discretas; c) portamuestras y d) detector de luz (Bibby Scientific, 2014).

El funcionamiento de éstos componentes comienza con las lámparas de tungsteno y de deuterio (componentes a y b) enfocadas en la rejilla que separa la luz en longitudes de onda discretas. El espectro de luz difractado pasa a través de una disposición de lente y ranura adicional antes de pasar a través de un divisor de haz que dirige la mitad de la luz hacia el portamuestras y la otra mitad hacia el portamuestras de referencia. La luz que no es absorbida por las dos soluciones se transmite a través de una lente colectora y al detector de señal. La señal de cada detector de fotodiodo se usa para calcular el porcentaje (%) de transmitancia. El resultado se muestra como % transmitancia o absorbancia en la pantalla del espectrofotómetro (Bibby Scientific, 2014).

2.6. Medidor de clorofila SPAD-502 Plus

2.6.1. Teoría. El medidor SPAD 502 Plus sigue el principio de la Ley de Beer-Lambert, la cual también se puede expresar en términos de la intensidad de la luz monocromática incidente (I_0) y la intensidad de la luz transmitida (I) (Uddling, Gelang-Alfredsson, Piikki y Pleijel, 2007):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

Esta relación logarítmica parte del supuesto que cada capa de una solución absorbe la misma fracción (no la misma cantidad) del haz de luz restante. La ley supone un sistema óptico ideal con una concentración uniforme de absorbedores y sin dispersión o reflectancia de la luz (Uddling *et al.*, 2007).

El medidor SPAD-502 calcula un valor SPAD de salida (M) según la siguiente ecuación:

$$M = k \log_{10} \frac{I_{0(650)} I_{(940)}}{I_{(650)} I_{0(940)}}$$

donde k es un coeficiente de proporcionalidad confidencial, estimado en un valor alrededor de 40 (Uddling *et al.*, 2007).

En una hoja, el incidente de fotones se refleja, absorbe o transmite. Matemáticamente se expresa: $\{1 = R + A + T\}$, donde R es la reflectancia, A es la absorbancia, T es la transmitancia, y 1 es la radiación incidente normalizada (I_0/I_0). La expresión más completa del valor de M , que incorpora explícitamente R y A en ambas longitudes de onda, es por lo tanto:

$$M = k \log_{10} \frac{I_{0(650)} [I_{0(940)} - (I_A + I_R)_{940}]}{I_{0(940)} [I_{0(650)} - (I_A + I_R)_{650}]}$$

Donde I_A e I_R son los flujos radiantes sujetos a absorción y reflexión, respectivamente (Uddling *et al.*, 2007).

2.6.2. Principio de Medición. Los valores del medidor SPAD 502 Plus se calculan en función de la cantidad de luz transmitida por la hoja en dos regiones de longitud de onda en las

que la absorbancia de la clorofila es diferente. Los rangos de longitud son el área roja (donde la absorbancia es alta y no se ve afectada por el caroteno) y el área infrarroja (donde la absorbancia es extremadamente baja).

Posee dos LED, uno rojo (longitud de onda pico: 650 nm aproximadamente) y otro infrarrojo (longitud de onda pico: 940 nm aproximadamente), proveen la iluminación. Ambos están integrados en el cabezal de medición y emiten la secuencia de luz cuando el cabezal está cerrado.

La luz de estos LED sale por la ventana emisora, atraviesa la hoja de muestra y entra en la ventana receptora (figura 6), luego golpea el receptor SPD (fotodiodo de silicio) y se convierte en señales eléctricas analógicas (Spectrum Technologies Inc., 2011).

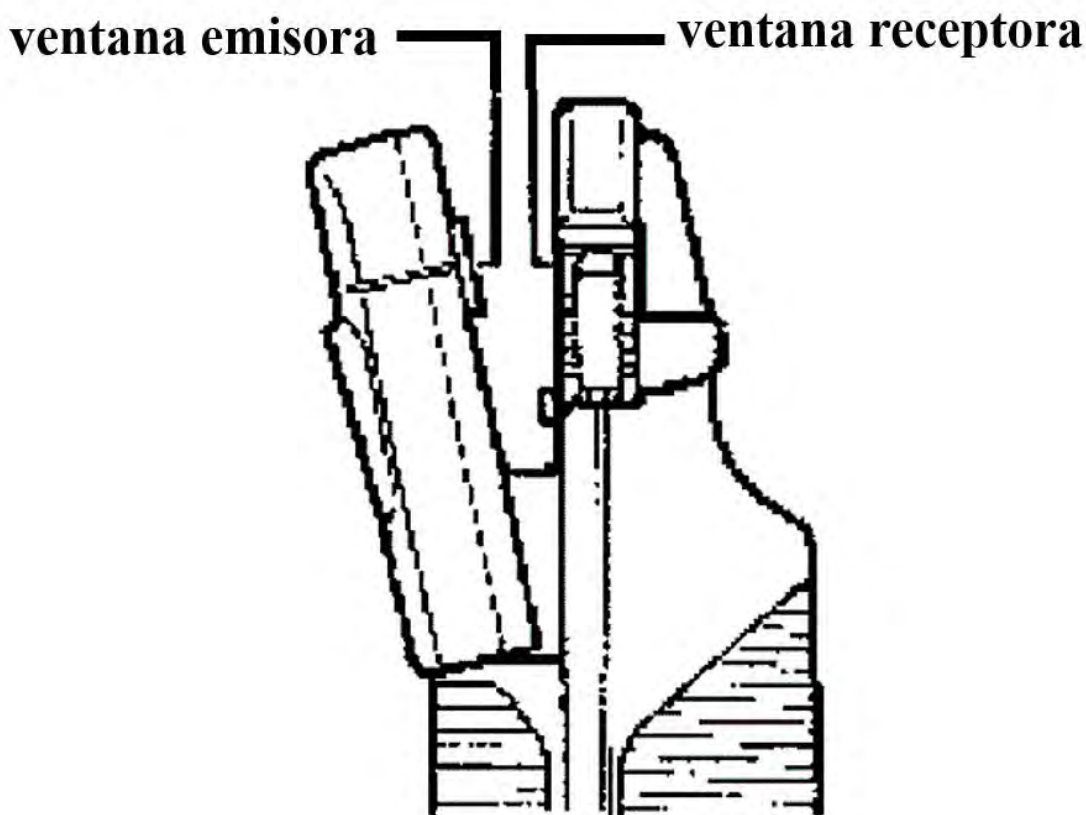


Figura 6. Sistema de iluminación/medición en el cabezal del SPAD 502 Plus (Spectrum Technologies Inc., 2011).

Estas señales analógicas son impulsadas por el amplificador y luego convertidas en señales digitales por el convertidor A/D. El microprocesador utiliza las señales digitales para calcular el valor SPAD (0-99) que se muestra en la pantalla (figura 7) (Spectrum Technologies Inc., 2011). Para la conversión a unidades de concentración se necesitan curvas de calibración.



Figura 7. Medidor de clorofila SPAD 502 Plus (Spectrum Technologies Inc., 2011).

3. ANTECEDENTES

Listado de las investigaciones que relacionan el daño por O₃ y la reducción de clorofila se citan de forma cronológica (tabla 2); durante las décadas de los 60s hasta los 80s la aplicación de la técnica espectrofotométrica se centró en mejorar la sensibilidad y en los tipos de solventes de extracción de la clorofila.

Entre las décadas de los 70s hasta finales de los años 90s las investigaciones reportan los daños a concentraciones conocidas de O₃ en plántulas de coníferas. Los estudios realizados con el medidor SPAD-502 para conocer la concentración de clorofila, han sido aplicados principalmente para hortalizas, y requieren de curvas de calibración para convertir unidades SPAD a concentración de clorofila. Estas curvas de calibración deben realizarse en específico para cada especie, y se debe considerar el tipo de solvente que se utilizó para su extracción.

Tabla 2.
Técnicas para la cuantificación de clorofila y síntomas causados por O₃.

<i>Autor</i>	<i>Año</i>	
Wintermans y De Mots	1965	Usan etanol al 96% para la extracción de clorofila, por su mejor solubilidad de fosfolípidos. Determinan los espectros de absorción específicos de las clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> para este solvente.
Knudson <i>et al.</i>	1977	Analizaron espectrofotométricamente la clorofila extraída con etanol, y reportan una alta correlación entre la reducción porcentual de la clorofila de hojas dañadas por O ₃ y el porcentaje de necrosis y clorosis visibles.
Markwell, Osterman y Mitchell	1995	Determinaron la relación entre la producción del medidor SPAD 502 y la concentración de clorofila en las hojas de <i>Zea mays</i> y <i>Glycine max</i> , con un método de calibración para la estimación directa de la clorofila.
Sanderman	1996	La exposición de O ₃ a edad temprana en <i>Picea abies</i> y <i>Pinus sylvestris</i> tiene efectos retardados como la pérdida de pigmento, bandas, clorosis y disminución de la capacidad fotosintética.
Saitanis, Riga-Karandinos y Karandinos	2001	Correlacionan la intensidad de la lesión visible con una disminución en el contenido de clorofila en <i>Nicotiana tabacum</i> , como resultado de la exposición al O ₃ . Encontraron que la clorofila <i>a</i> es más sensible al O ₃ que la clorofila <i>b</i> , por una mayor tasa de oxidación de la molécula.
Uddling <i>et al.</i>	2007	Determinaron las relaciones empíricas entre la clorofila de las hojas y las lecturas del medidor SPAD-502 para <i>Betula pendula</i> , <i>Triticum aestivum</i> , y <i>Solanum tuberosum</i> , e interpretaron sus resultados de acuerdo a las propiedades ópticas de las hojas.
Hawkins, Gardiner y Comer	2009	Determinaron la relación matemática entre las lecturas SPAD-502 y clorofila foliar total de <i>Lindera melissifolia</i> , por ser un método no destructivo, ideal para evaluar especies en peligro de extinción.
Ling <i>et al.</i>	2011	Convirtieron los datos obtenidos con el medidor SPAD-502 en valores de concentración de clorofila empleando ecuaciones de calibración.

4. PROBLEMÁTICA

Las concentraciones de O₃ en el centro de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) alcanzan de 0.07 a 0.31 ppm (González, Mendoza y Alvarado, 2010). Los contaminantes fotoquímicos en el aire son acarreados hacia el sur de la ZMVM donde se observan los daños más severos en la vegetación (Cibrián, 1989; Miller, de Bauer, Nolasco y Tejeda, 1994 citados en González *et al.*, 2010).

El daño por O₃ en la vegetación del Parque Nacional Desierto de los Leones (PNDL) ha sido descrito de manera visual desde 1981 (Cibrián y Tovar, 1989 citado en Fenn, de Bauer y Hernández, 2002), sin embargo, persiste la dificultad de evaluar éste daño en especies arbóreas debido a que el método consiste en la identificación visual de los síntomas. La reducción de la concentración de clorofila en árboles con moteado clorótico, es una prueba más exacta de la influencia del O₃ troposférico.

Para cuantificar la concentración de la clorofila en plantas, la determinación de absorbancia de redispersión *in vivo* con dispositivos que transmiten un haz de luz a través de una hoja (SPAD 502 Plus), es un método rápido y no destructivo. A diferencia de los métodos convencionales de extracción con disolventes orgánicos como el de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y el análisis espectrofotométrico (Heath, 1989).

En la cuantificación de la clorofila (*a* y *b*) hay factores implicados con la fisiología de *Abies religiosa* vinculados a los ambientales y al método de extracción, todo ello hace que la degradación de la clorofila presente dificultades en su cuantificación. De ello deriva la tesis “es el método de redispersión *in vivo* un registro más veraz para determinar la degradación de la clorofila por efecto del O₃ en las hojas de *Abies religiosa*”.

5. JUSTIFICACIÓN

El método más adecuado para evaluar el daño por O₃ en el arbolado del Parque Nacional Desierto de los Leones, es calcular la concentración de clorofila. El medidor de clorofila SPAD-502 Plus resuelve las dificultades de los métodos convencionales de extracción, permite ampliar el número de individuos, ofrece datos en campo y no destruye la vegetación. La obtención de dos ecuaciones individuales para las clorofilas *a* y *b*, permite conocer su proporción, y por lo tanto un indicador más cercano a los obtenidos por espectrofotometría.

6. HIPÓTESIS

Si las acículas sanas tienen un valor alto de concentración de clorofila registrado con el medidor SPAD 502 Plus, entonces las acículas con moteado clorótico asociado al daño por O₃, tendrán menor concentración de clorofila, en comparación con las primeras.

7. OBJETIVOS

Utilizar el medidor de clorofila SPAD-502 Plus en *Abies religiosa* para determinar el daño por O₃ en el Parque Nacional Desierto de los Leones.

- I. Cuantificar la concentración de clorofila en *Abies religiosa* para obtener una curva de calibración.
- II. Obtener ecuaciones de conversión entre unidades SPAD y concentración de µg/mL de clorofilas *a* y *b*, específicas para la especie.
- III. Demostrar la reducción de clorofilas en acículas con moteado clorótico causado por O₃, con respecto a acículas sanas.
- IV. Evaluar las concentraciones de O₃ anuales y relacionar con la cantidad de clorofila en acículas.

8. MÉTODO

8.1. Área de estudio: Parque Nacional Desierto de los Leones

Se localiza en la región central de la República Mexicana, al suroeste de la Cuenca de México. Pertenece a la unidad geomorfológica Sierra de Las Cruces, que forma parte del Eje Neovolcánico Transversal. Sus coordenadas son 19°18'59' Norte y 99°18'22' Oeste. El Parque se ubica al poniente de la Ciudad de México (figura 8), dentro de las delegaciones Álvaro Obregón y Cuajimalpa de Morelos (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2006).

8.1.1. Vegetación. Los bosques de *Abies religiosa* son escasos en la república y por consiguiente, en la Cuenca de México, en donde su distribución coincide con los parques nacionales: Desierto de los Leones, Cumbres del Ajusco, en la serranía de Las Cruces; Izta-Popo, en la Sierra Nevada; y el Mineral del Chico en la Sierra de Pachuca. En la tabla 3 se describen los tipos de vegetación del Parque y el área que ocupan (CNANP, 2006).

Tabla 3.

Superficie ocupada por tipos de vegetación en el Parque Nacional Desierto de los Leones (CNANP, 2006).

<i>Tipo de vegetación</i>	<i>Superficie (ha)</i>
<i>Abies-Pinus-Quercus</i>	680.5
<i>Abies religiosa</i>	183.03
<i>Abies</i> perturbado por incendio	421.37
<i>Abies- Pinus hartwegii</i>	59.90
<i>Pinus hartwegii- Pastizal</i>	93.49

8.1.2 Clima. Con base en la clasificación de Köppen, modificada por García (1988), el tipo de clima para el desierto de los leones corresponde a C(W2) W (b') que equivale a:

- Templado, con lluvias en verano
- Precipitación invernal menor de 5.0%, con respecto al total
- Forma parte del grupo más húmedo de los subhúmedos.
- Isotermal (la diferencia de temperatura entre el mes más cálido y el mes más frío es menor a 5.0 °C) (CNANP, 2006).

El parque es atravesado por dos isotermas: una en la porción norte de 10AC; y la otra, en la porción centro-sur de 8AC. Cuenta con ocho ambientes climáticos (tabla 4), con temperatura media anual de 10.8°C y precipitación de 1,340.6 mm (CNANP, 2006).

Tabla 4.

Ambientes climáticos del Parque Nacional Desierto de los Leones (CNANP, 2006).

<i>Ambiente climático</i>	<i>Localización</i>	<i>Clima</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pp (mm)</i>
1.	Norte	Fresco subhúmedo	12	1,200
2	Norte	Fresco subhúmedo	9-12	1,200
3	Norte	Fresco subhúmedo	9-12	1,200-1,300
4	Oriente-Poniente	Semifrío	9-11	1,300
5	Paralelo al anterior	Frio húmedo	6-9	1,300
6	Vertiente-Oriente	Frio húmedo	6-9	1,200-1,300
7	Taludes superiores	Frio subhúmedo	6-9	1,200
8	Arriba de 3,725 msnm	Frio subhúmedo	6	1,200

8.2. Trabajo de campo

Se eligió el Parque Nacional Desierto de los Leones por encontrarse al suroeste de la Ciudad de México, con la mayor de concentración de O₃. Se realizaron 2 muestreos en la localidad “Cruz Blanca” (ubicada entre las coordenadas geográficas 19° 18’ 33” N, 99° 19’ 26” W; a 3,170 msnm) en los meses de abril y junio (temporada seca).

El muestreo de árboles fue por el método de “punto centro cuadrado”, que se basa en la medida de cuatro puntos separados cada 10 m a partir de una línea centro (Mostacedo y Fredericksen, 2000). Se seleccionaron 12 árboles entre 2.3 y 5.7 m de altura.

De cada árbol, se tomaron 5 muestras de acículas (de diferentes ramas) con mayor presencia de moteado clorótico, e igual para acículas sanas. Las acículas se limpiaron con una brocha y se agruparon de manera uniforme sobre cinta adhesiva transparente (figura 9) para su lectura con el medidor Minolta SPAD-502 Plus de Spectrum Technologies, Inc. (previamente suministrado con un filtro de calibración indicado para producir una lectura de 87.1, de acuerdo con el manual de operación), Se registró el valor promedio de 10 lecturas por muestra con el medidor SPAD.



Figura 9. Agrupación de acículas de Abies religiosa para la lectura con el medidor SPAD 502 Plus, en la localidad Cruz Blanca.

De las primeras tres muestras con moteado clorótico, después de la lectura con el medidor SPAD, se recolectaron aproximadamente 2.0 g de acículas de cada una, se conservaron en frascos de plástico etiquetados previamente. Éste procedimiento se repitió para las muestras sanas, obteniendo un total de seis muestras de acículas por árbol (tres con daño clorótico y tres sanas), para la elaboración de la curva de calibración. Los frascos se transportaron en una hielera, y se mantuvieron en oscuridad a 15.0 °C hasta su procesamiento.

Utilizando la aplicación móvil de la calidad del aire de la Ciudad de México, con intervalos de 1 h, se registraron los valores de O₃, NO₂, SO₂, CO, partículas en suspensión PM10, al igual que el índice de radiación UV (IR UVA, IR UVB) y temperatura (T° C), en la estación Cuajimalpa.

8.3. Curva de calibración

Adaptando el método propuesto por Knudson *et al.* (1977), las acículas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar en oscuridad, para después pesar 1.0 g de material vegetal y colocarlas en frascos ámbar con 20.0 mL de etanol al 96%. Las muestras se mantuvieron en oscuridad por 24 h y a temperatura de 15.0 °C.

Después del periodo de oscuridad, la solución etanol-clorofila se filtró con papel Whatman No. 1 (diámetro de poro de 11 µm) en un frasco ámbar de 220 mL, realizando un enjuague con dos tercios de etanol. Al frasco que contiene la muestra se le agregaron 10.0 mL de etanol al 96% para mantener en oscuridad, después de otras 24 h, se repitió la filtración y el enjuague, añadiendo las soluciones al mismo frasco de 220 mL. El procedimiento se realizó por tercera vez después de un último período de 24 h.

La solución etanol-clorofila se filtró en un matraz aforado de 50 mL completando el volumen con etanol al 96% (figura 10). Se tomaron 3 alícuotas por muestra para leer en el espectrofotómetro 6850 UV-Vis de doble haz con resolución de 0.1 nm (figura 11), a 665 nm (clorofila *a*) y 649 nm (clorofila *b*), utilizando etanol al 96% como blanco.

Las concentraciones de clorofila se obtuvieron con las ecuaciones establecidas por Wintermans y De Mots (1965):

$$\frac{\mu\text{g Chl } a}{\text{mL solución}} = (13.70)(A_{665\text{nm}}) - (5.76)(A_{649\text{nm}})$$

$$\frac{\mu\text{g Chl } b}{\text{mL solución}} = (25.80)(A_{649\text{ nm}}) - (7.60)(A_{665\text{nm}})$$

$$\frac{\mu\text{g Chl } a + b}{\text{mL solución}} = (6.10)(A_{665\text{ nm}}) + (20.04)(A_{649\text{ nm}})$$



Figura 10. Procedimiento de filtrado para las soluciones etanol-clorofila antes de aforar.



Figura 11. Alícuotas para la lectura de absorbancias, con tres repeticiones por muestra.

La relación entre los valores SPAD y unidades de concentración de clorofila se realizó de acuerdo con lo propuesto por Ling *et al.* (2011), trazando los valores SPAD en el eje “x”, y los valores de concentración de clorofila en el eje “y”, utilizando una función polinómica de segundo orden en el programa Statgraphics Centurion XVII. De ésta función se obtuvieron las ecuaciones para convertir los valores SPAD a unidades de concentración de clorofila, específicas para clorofilas *a* y *b*.

8.4. Análisis estadísticos

Se realizó una comparación de dos muestras entre las concentraciones de clorofila *a* de acículas sanas y con daño clorótico, al igual que para la clorofila *b*; y una prueba de comparación de varias muestras (clorofilas *a* y *b*. con y sin daño), de las que se obtuvo la comparación de medias (Prueba t), desviación estándar (Prueba F), y medianas (Prueba de Mann-Whitney).

Por su mayor cercanía a la localidad “Cruz Blanca” en el PNDL, se descargó la base de datos de la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA) de la estación Cuajimalpa para las concentraciones de O₃ (Secretaría del Medio Ambiente, 2018), realizando una gráfica de medias mensual para el periodo abril 2017-mayo 2018. Con el fin de desestimar la intervención del SO₂, se repitió el mismo procedimiento.

Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Ecuaciones de Conversión

Se obtuvieron 72 muestras para realizar la calibración entre las unidades de concentración de clorofila (Variable dependiente) y los valores SPAD (Variable independiente). El coeficiente de determinación (R^2) al ser la variación total de la variable dependiente, que puede atribuirse a la variación de la variable independiente, sólo demuestra un ajuste perfecto si $R^2=1$ (Díaz, Llorente y Lucio-Villegas, 1995), con ello, las regresiones polinomiales de clorofilas *a* y *b* mostraron una mínima relación, con valores de R^2 de 0.0619 y 0.189388, respectivamente,

La ecuación que explica la relación entre clorofila *a* y los valores SPAD (figura 12) es:

$$[\text{Chl } a] = 10.0618 + 0.279532*(\text{SPAD}) - 0.00428105*(\text{SPAD}^2)$$

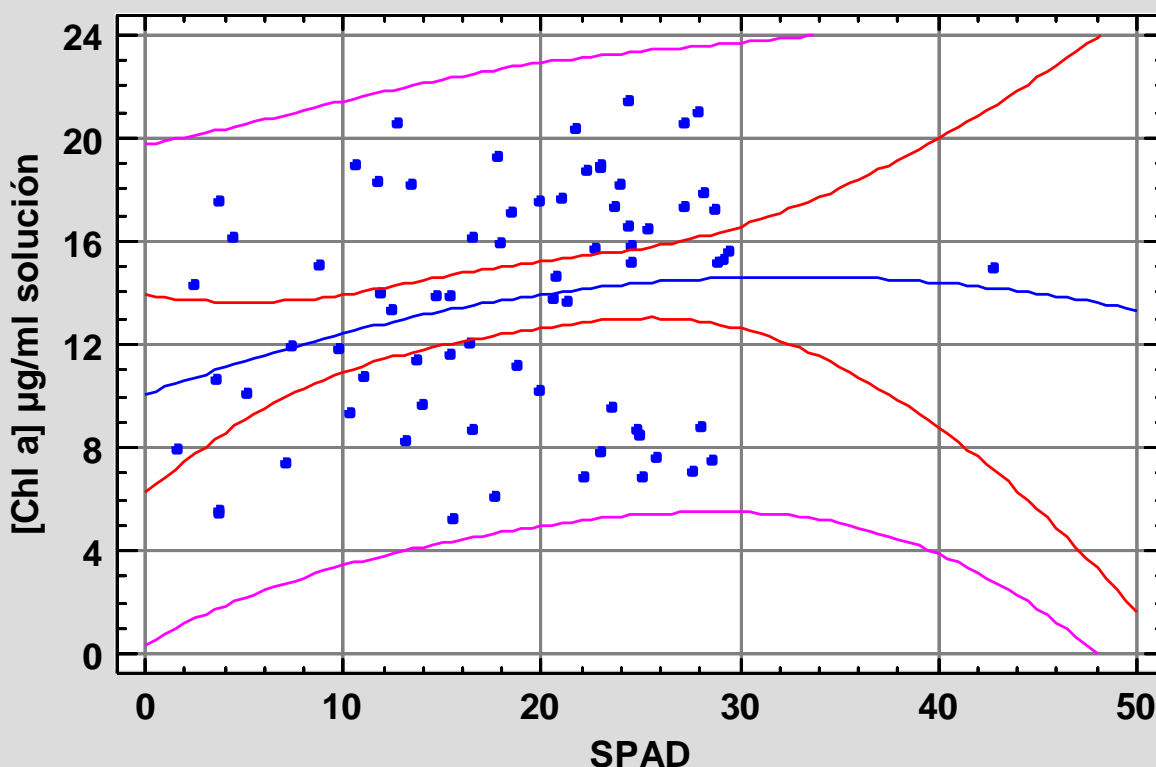


Figura 12. Regresión Polinomial de Segundo Orden para Clorofila *a*.

Mientras que la ecuación que se obtuvo del modelo ajustado de la figura 13 para la clorofila *b* es:

$$[\text{Chl } b] = 4.17954 + 0.105102 * (\text{SPAD}) - 0.00051821 * (\text{SPAD}^2)$$

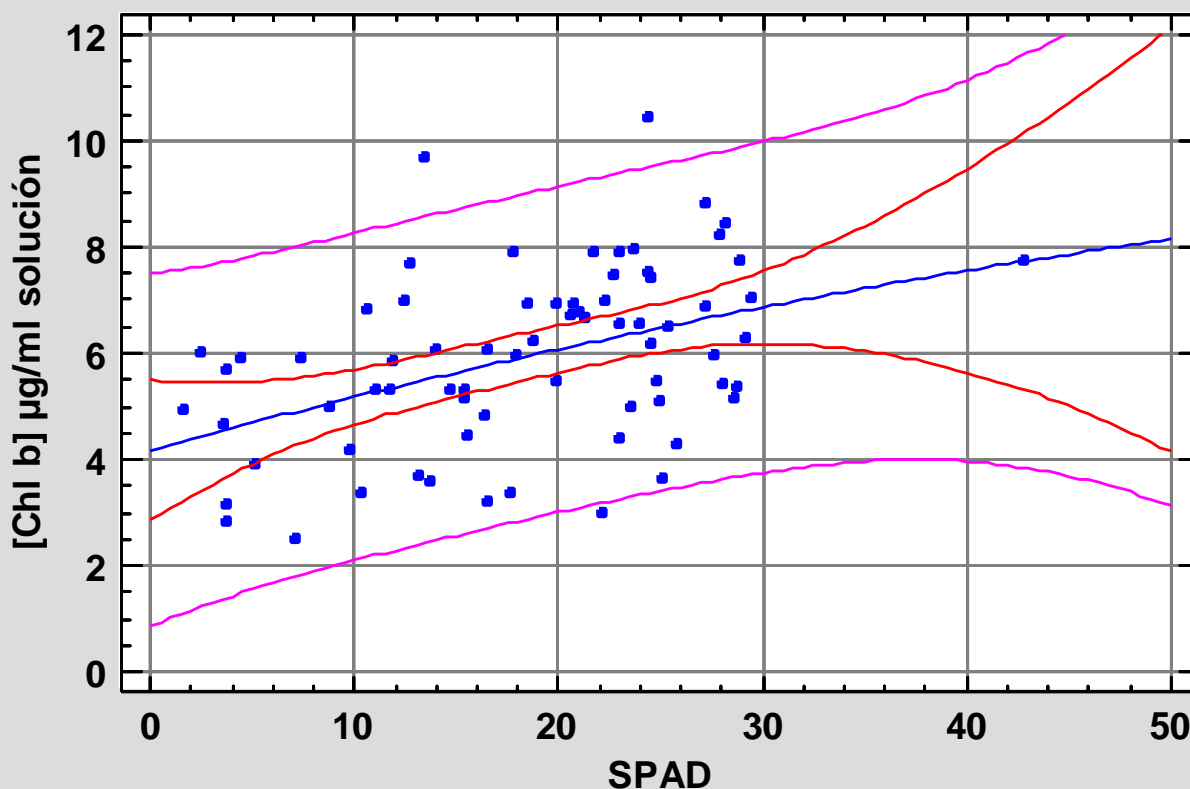


Figura 13. Regresión Polinomial de Segundo Orden para Clorofila *b*.

Los valores obtenidos de R^2 de ambas ecuaciones, difieren a lo reportado por Hawkins *et al.* (2009); Ling *et al.* (2007); Loh, Grabosky y Basuk, (2002); Rodríguez *et al.* (1998); Rodríguez y Miller (2000) y Yamamoto, Nakamura, Adu-Gyamfi y Saigusa, (2002), que utilizan varias especies, pero no hay un consenso en el tipo de ecuación que mejor se ajusta a la relación, sin embargo, a pesar de todas las diferencias sus valores R^2 son cercanos a 1.0 (tabla 5).

Tabla 5.
Comparación de valores R^2 reportados por diferentes autores.

<i>Autores</i>	<i>Especie</i>	<i>Tipo de regresión</i>	R^2
Hawkins <i>et al.</i>	<i>Lindera melissifolia</i>	Polinomial de segundo orden	0.903
Ling <i>et al.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Polinomial de segundo orden	0.996
Loh <i>et al.</i>	<i>Ficus benjamina</i>	Lineal	0.900
	<i>Populus deltoides</i>		0.910
Rodríguez <i>et al</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lineal	0.960
Rodríguez y Miller	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	Lineal	0.790
Yamamoto <i>et al.</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Lineal	0.971
	<i>Cajanus cajan</i>		0.958

El valor bajo obtenido puede estar relacionado al tipo de hoja de *Abies religiosa* y no al tipo de regresión aplicada, ya que en ninguna de las especies de la tabla 5 tiene características similares a las del oyamel (figura 14), que al tener hojas aciculadas con dimensiones entre 12 a 35 mm de longitud y 0.6 a 2 mm de ancho por 0.3-0.7 mm de espesor, se dificulta la lectura individual de acículas, por el área de superficie del medidor SPAD 502 Plus de 2x3 mm.



Figura 14. Acículas sanas de *Abies religiosa*. Se observan los lados adaxial y abaxial, respectivamente.

En este sentido, Marengo, Antezana-Vera y Nascimento (2009) demostraron para árboles de hoja ancha (*Carapa guianensis*, *Ceiba pentandra*, *Cynometra spruceana*, *Pithecolobium inaequale*, *Scleronema micranthum* y *Swietenia macrophylla*) un aumento de los valores SPAD en relación con el grosor de hoja fresca ($R^2 = 0.06$), el grosor de hoja seca ($R^2 = 0.16$), la masa foliar específica ($R^2 = 0.43$) y succulencia de hojas ($R^2 = 0.19$). Sin embargo, obtuvieron una relación negativa entre los valores SPAD y el área foliar específica ($R^2 = 0.38$) y con el contenido de agua foliar ($R^2 = 0.58$), con lo que recomiendan que para obtener mejor precisión en ecuaciones de calibración para convertir los valores de SPAD en contenido absoluto de clorofila se deben de considerar el grosor y el contenido de agua de la hoja.

Por el contrario, Wang, Jianjun, Stamps y Li (2005) no encontraron ningún efecto del grosor de la hoja en los valores de SPAD de *Anthurium*, *Ficus benjamina*, *Ficus binnendykii*, *Ficus elástica*, *Philodendron bipinnatifidum*, *Spathiphyllum*, *Dracaena deremensis*, *Epipremnum aureum*, *Philodendron scandens* y *Eucharis grandiflora*, de las cuales el espesor varió de 0.19-0.66 mm. Esto puede atribuirse a que las hojas más gruesas tienden a tener una transmitancia

más baja debido a una mayor dispersión múltiple y longitud de trayectoria óptica (efecto de desvío) a través de la hoja, en comparación con hojas más delgadas (Vogelmann, 1993).

De acuerdo al espesor de las acículas de *Abies religiosa* es poco probable que ésta característica interfiera en la lectura con el medidor SPAD, ya que las medidas son mayores a las descritas por Marengo *et al.* (2009) para hojas frescas (0.1 a 0.3 mm) y más cercanas a las de Wang *et al.* (2005).

Uddling *et al.* (2007) encontraron dos efectos relacionados con la Absorbancia (A) de la clorofila utilizando el medidor SPAD, que la distribución de la clorofila no es uniforme, disminuyendo A en la hoja intacta y que la dispersión múltiple de la radiación provoca la reflectancia interna y el aumento de A. En acículas con poca área de lectura, es posible que también ocurra, sumado a que en algunas muestras el moteado clorótico no cubría el ancho de la acícula y por lo tanto de la superficie del medidor.

Además del área de las acículas, otro factor al que se le puede atribuir la baja relación entre unidades de concentración, es por el efecto de la irradiancia. Olav y Asbjorn (1998) reportaron que las lecturas de los medidores SPAD para las hojas de *Oxalis acetosella* disminuyeron aproximadamente un 15% en 30 minutos cuando se transfirieron de irradiación baja a alta.

De acuerdo con Brugnoli y Bjorkman (1992), este fenómeno se explica por los reordenamientos de cloroplastos inducidos por la luz, que producen cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila en proporción directa a los cambios en la absorción de la hoja y pueden causar un cambio de hasta 20% en la máxima eficiencia de utilización del incidente. El efecto es mayor en plantas de sombra, de las que se puede esperar valores cercanos a los de *Oxalis acetosella*, a diferencia de las plantas que están adaptadas a cambios bruscos de

incidencia de luz. Para evitar la interferencia de los movimientos de los cloroplastos en las mediciones de fluorescencia, los autores recomiendan el uso de filtros que bloquean la luz a longitudes de onda <510 nm.

Sumado a la irradiancia, el estado hídrico de la hoja y la hora de medición son factores que repercuten en la oscilación de los valores SPAD, esto de acuerdo con Martínez y Guiamet (2004) que además encontraron una mejor relación entre el medidor SPAD y el contenido de clorofila para las lecturas tomadas por la mañana ($R^2 = 0.70$), en comparación con las de la tarde ($R^2 = 0.14$).

Los valores de R^2 reportados para la clorofila *b* tienen similitud con los de Martínez y Guiamet (2004) para las lecturas de la tarde, esto se puede deber a que durante la colecta de muestras, existió una diferencia de casi 6 h entre la lectura con el medidor SPAD de la primera y la última muestra, además de que se realizaron dos muestreos en diferentes fechas, en los cuales, a lo largo del día existieron variaciones climáticas como la radiación y temperatura (tablas 6 y 7).

Tabla 6.

Registro por hora de parámetros en campo el 16 de abril de 2018.

Parámetros	Estación Cuajimalpa						
	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00
O ₃ (ppm)	0.0418	0.0539	0.0638	0.0759	0.0869	0.0803	0.0704
NO ₂ (ppm)	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
SO ₂ (ppm)	0.0052	0.0039	SR	SR	SR	0.0026	0.0026
CO (ppm)	0.0440	0.0330	SR	SR	SR	0.0220	0.0220
PM10 (μ/m ³)	35.2	25.6	30.4	44.8	36.0	43.2	36.8
IR-UVA* (watts/m ²)	0.1042	0.1250	0.1185	0.0863	0.0677	0.0268	0.0248
IR-UVB* (watts/m ²)	0.0809	0.1097	0.1078	0.0770	0.0531	0.0170	0.0127
T° C	16.6	18.1	19.0	20.2	20.5	20.0	19.9

Tabla 7.

Registro por hora de parámetros en campo el 01 de junio de 2018.

Parámetros	Estación Cuajimalpa						
	11:00	12:00	13:00	14_00	15:00	16:00	17:00
O ₃ (ppm)	0.0528	0.0671	0.066	0.0649	0.0638	0.0704	0.0627
NO ₂ (ppm)	0.0315	0.0273	0.0252	0.0231	0.0189	0.021	0.0231
SO ₂ (ppm)	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
CO (ppm)	0.0220	0.0220	0.0110	0.0110	0	0.0110	0.0110
PM10 (μ/m ³)	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
IR-UVA* (watts/m ²)	0.1271	0.1456	0.1510	0.1405	0.1257	0.0977	0.0678
IR-UVB* (watts/m ²)	0.1099	0.1430	0.1549	0.1368	0.1119	0.0700	0.0361
T° C	19.9	21.4	23.2	24.1	24.5	24.9	25.0

Nota:

* La estación Cuajimalpa no evalúa este parámetro, por lo que los registros son de la siguiente estación (Santa Fe).

SR: RAMA no cuenta con registros en esos horarios.

9.2. Disminución de clorofila por O₃

Aplicando la ecuación de clorofila *a* al resto de las lecturas obtenidas con el medidor SPAD-502 Plus se obtuvieron 128 datos, representados en la figura 15. La media de la concentración de clorofila en acículas con moteado clorótico (CD) es de 12.4516 (± 0.804606) con límite inferior de 11.647 y superior de 13.2562, en cambio la media de acículas sanas (SD) es de 13.9621 (± 0.912726) con límite inferior de 13.0493 y superior de 14.8748, construidos con intervalos de confianza del 95.0%. Con la prueba t para comparar medias, se obtuvo un valor-P = 0.0142604, que de acuerdo con Milton (2001) se rechaza la hipótesis nula de que ambas medias sean iguales.

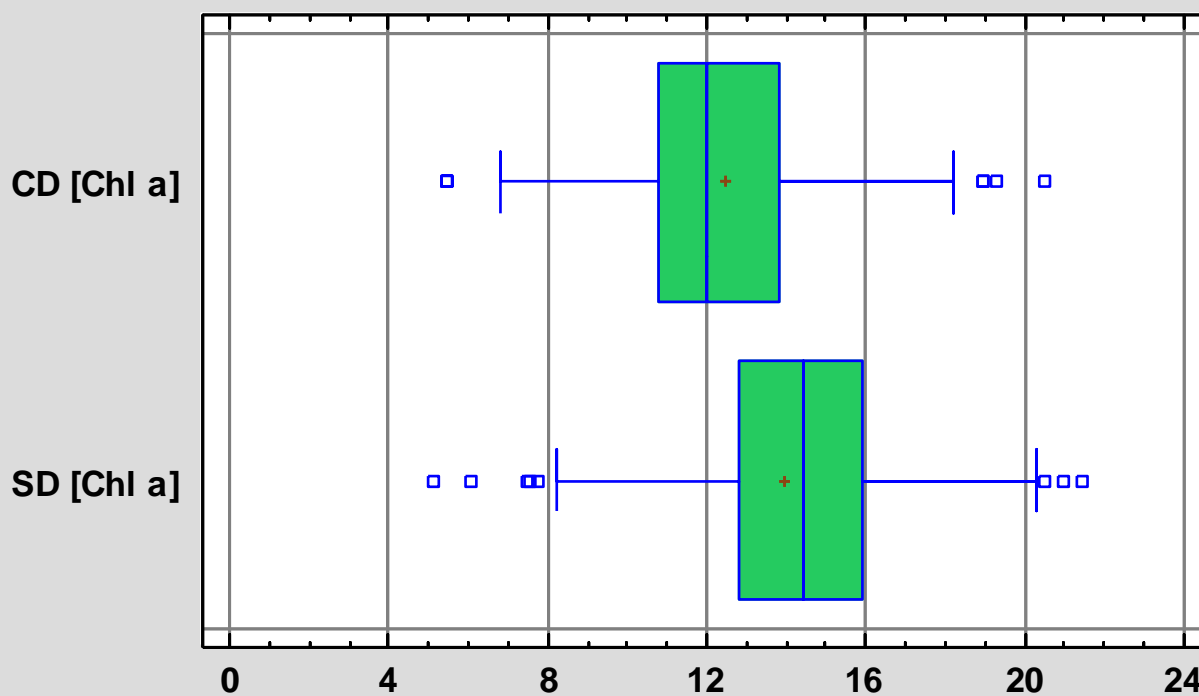


Figura 15. Comparación de medias de clorofila *a* entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).

La comparación de concentración de clorofila *b* en acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD) se muestran en la figura 16, la concentración de acículas sanas tiene una media de 6.19813 (\pm 0.346498) con límite inferior de 5.85164 y superior de 6.54463. En muestras con moteado clorótico se obtuvo una media de 5.36652 (\pm 0.320214) con límites de 5.04631 y 5.68674, e intervalos de confianza de 95%. Se obtuvo un valor-P=0.000589212, con lo que se rechazó la hipótesis nula (media CD=media SD).

El intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, se extiende desde -1.29837 hasta -0.364857, dado que el intervalo no contiene el valor 0, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras, con un nivel de confianza del 95.0%.

Gráfico Caja y Bigotes

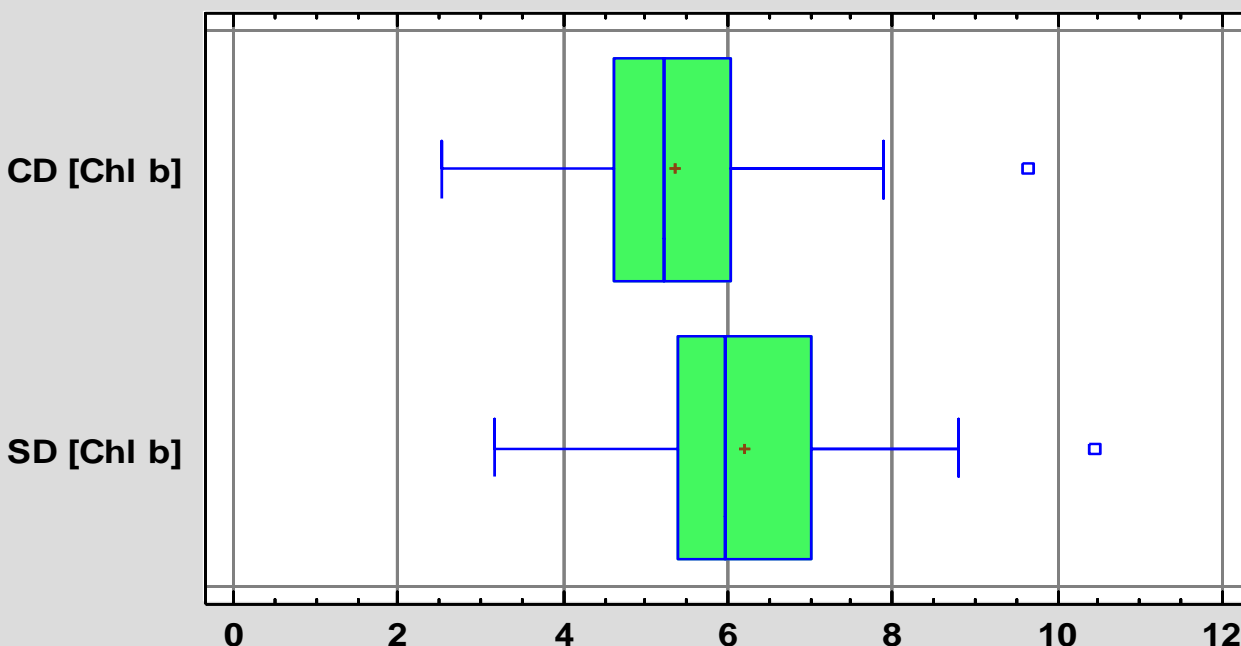


Figura 16. Comparación de medias de clorofila *b* entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).

Con la comparación de muestras múltiples, se obtuvo la figura 17, donde se muestran las diferencias entre clorofilas y daño. Las medias de clorofilas para acículas con daño (CD) son de 12.4516 (límite inferior y superior de 12.0012-12.902) para clorofila *a*, y 5.36652 (4.91613-5.81692) para clorofila *b*. En cambio las medias de clorofilas en acículas sanas (SD) son de 13.9621 (13.5046- 14.4196) para clorofila *a*, y de 6.19813 (5.74065- 6.65562) para clorofila *b*.

Con la prueba-F se obtuvo un valor-P=0, con lo que existe una diferencia estadísticamente significativa entre medias de los cuatro grupos, con un nivel del 5.0% de significación. Estos datos destacan que ninguno de los límites de las clorofilas se traslapan entre sí, lo que muestra una ligera disminución en la concentración de clorofila en acículas con daño clorótico, confirmando la hipótesis.

La figura 17 también permite observar la relación entre clorofilas *a/b*, ya que para acículas sanas la relación es de 2.2526, mientras que para acículas con moteado clorótico es de 2.3202. Esto difiere con de la relación de 3:1 establecida por Fennema y Tannenbaum (2000), pero es más cercana a la relación de 2.5 propuesta por Heath (1989).

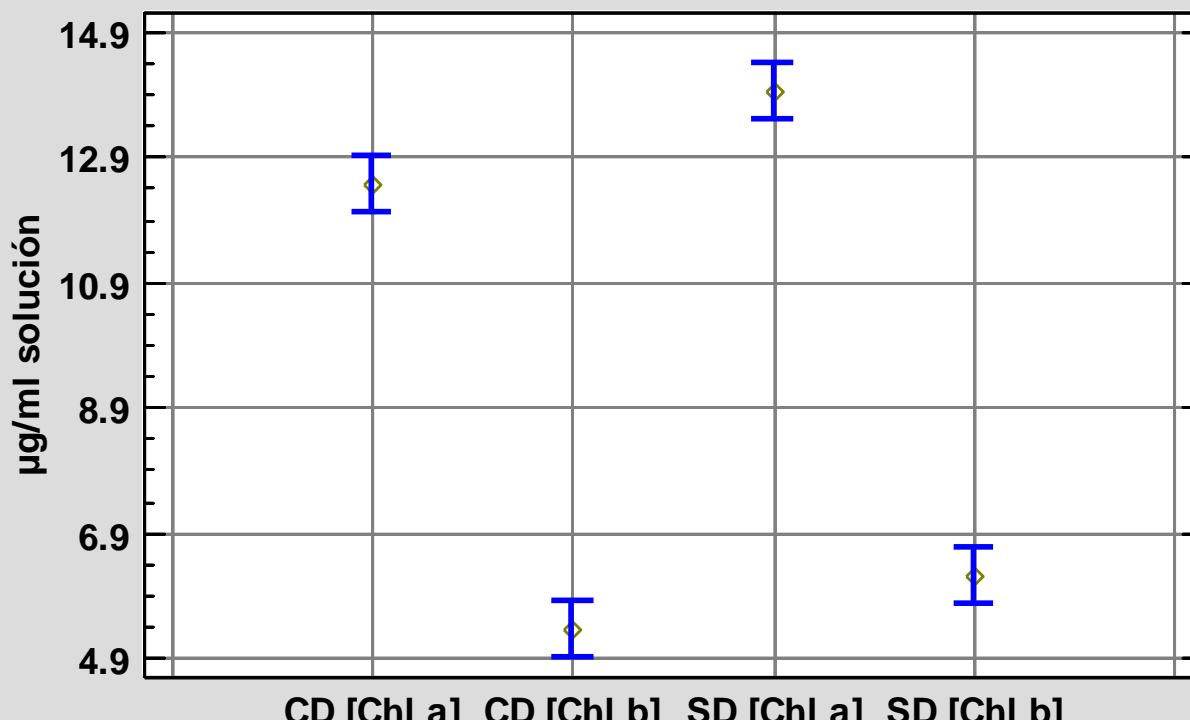


Figura 17. Comparación de medias de clorofilas entre acículas sanas (SD) y con moteado clorótico (CD).

Knudson *et al.* (1977) encontraron que la relación Chl *a/b* disminuye directamente proporcional a la concentración total de Chl, teniendo para 14.0, 8.0 y 2.0 µg/mg de peso seco de Chl total, la relación de Chl *a/b* es de 3.31, 3.10 y 2.02, respectivamente. La relación encontrada de clorofila *a/b* no cumple con la disminución proporcional, siendo las acículas sin daño las que tienen una menor relación de clorofilas, sin embargo los valores de acículas sanas y con moteado no presentan amplia diferencia. Por el contrario Rabe y Heinz (1980) concluyen que los cambios en la relación clorofila *a*: clorofila *b* no son indicadores adecuados de la influencia de la contaminación del aire, cuando se encuentran en condiciones de campo ambas clorofilas se descomponen casi con igual rapidez.

En contraste con las figuras 15, 16 y 17 la figura 18 representa las diferencias entre las medias de clorofila para acículas sanas de 22.1556 (20.0346-24.2765) y dañadas por O_3 de 12.1554 (10.1669-14.1439), evaluadas únicamente con el medidor SPAD-502 Plus, y sin diferenciar entre clorofilas a y b , con un total de 128 datos. Se observa que los valores son similares a los obtenidos con concentración, por lo que se confirma la reducción del contenido de clorofila por la intervención del O_3 .

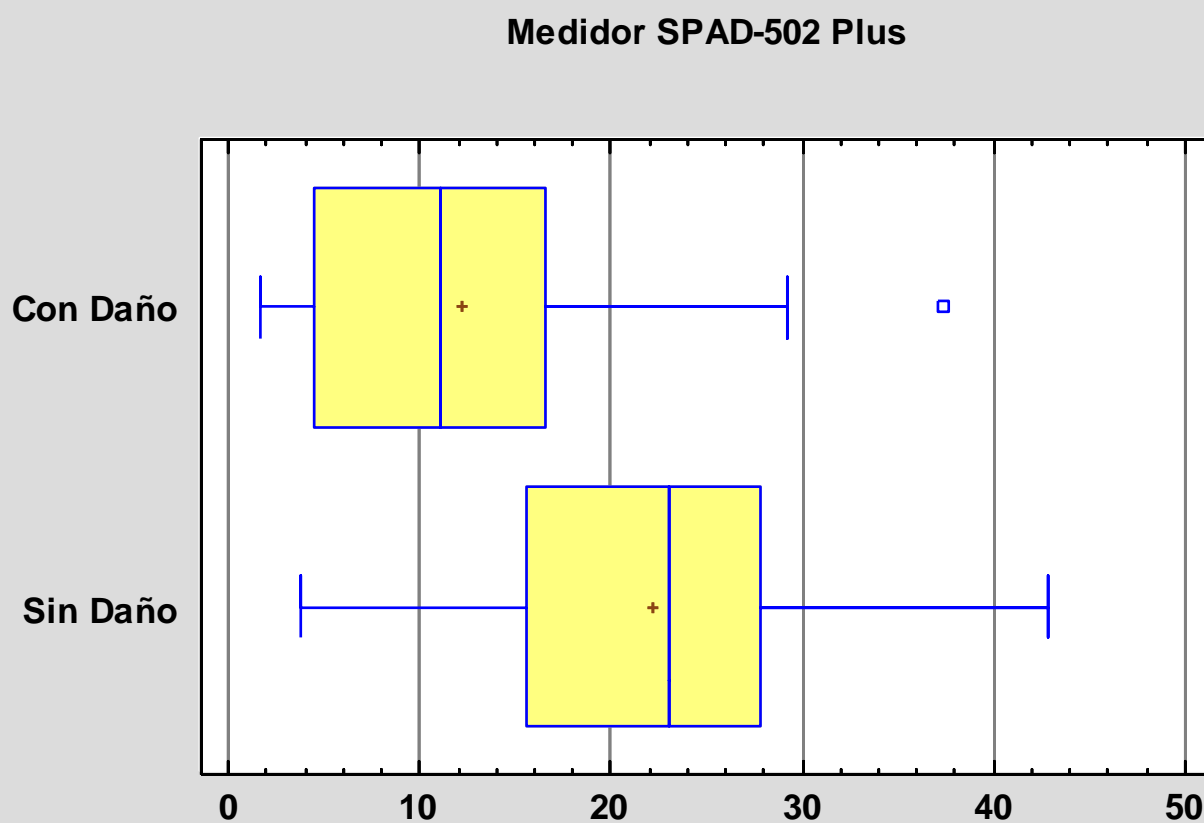


Figura 18. Comparación de medias de clorofilas con unidades SPAD. Con intervalos de confianza de 95%.

Los bajos valores de determinación obtenidos en la regresión polinomial, pueden indicar que las ecuaciones obtenidas no describen correctamente la relación entre los valores SPAD y las unidades de concentración, por ello la figura 19 muestra las diferencias entre acículas sanas y con daño, únicamente con las muestras que se leyeron por el método espectrofotométrico (72 muestras).

En esta figura las medias para clorofilas *a* y *b* con daño son de 12.7168 y 5.56155, respectivamente, mientras que la concentración para acículas sanas es mayor, teniendo una media de 14.2226 para la clorofila *a*, y de 6.25621 para clorofila *b*. Los datos muestran similitud con la figura 17, específicamente para muestras con daño, ya que las medias de la figura 17 se encuentran dentro de los límites de la figura 19, además los valores de concentración para acículas sanas también son muy cercanos.

Lo que diferencia a la figura 19, es la amplitud de los límites, teniendo el límite inferior y superior para la clorofila *a* con daño de 11.9276-13.506 y de 4.77235-6.35075 para la clorofila *b*. En acículas sin daño los límites son de 13.4334-15.0118 (clorofila *a*) y de 5.46701-7.04542 (clorofila *b*). Atribuido a la poca cantidad de datos, pero que coinciden en que la concentración de clorofila es mayor en acículas sanas.

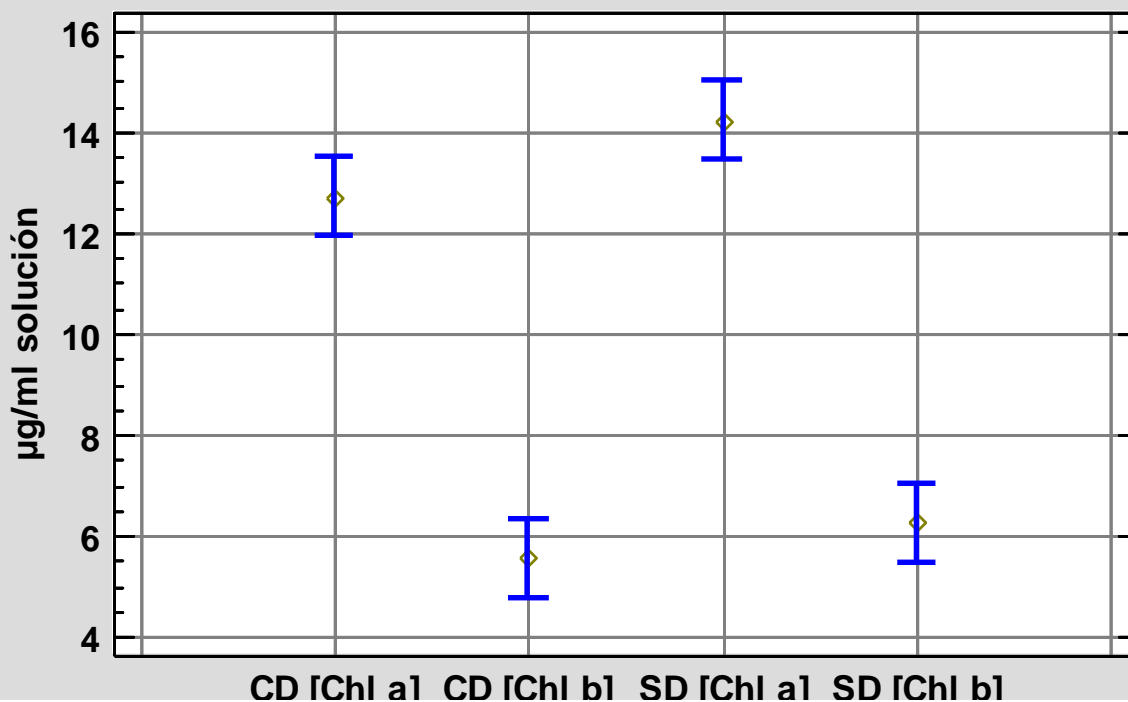


Figura 19. Comparación de medias de clorofilas en muestras leídas por espectrofotometría.

La comparación de los resultados por tres formas de evaluación (aplicación de las ecuaciones polinomiales, sólo unidades SPAD, y sólo por espectrofotometría) concuerdan en la ligera disminución de las concentraciones de clorofilas en acículas que presentaron moteado clorótico asociado al O_3 .

Los resultados coinciden con Knudson *et al.* (1977), a concentraciones de O_3 de 0.50-0.90 $\mu\text{L/L}$ (en tres intervalos de 1 h) la reducción de clorofila es de 69.0% a los cuatro días de tratamiento (reducción máxima), con un coeficiente de relación de $r=0.9$ entre el porcentaje de necrosis y clorosis visibles, y la reducción de clorofila.

La reducción de clorofila reportada también puede indicar una reducción en la actividad fotosintética, cierre estomático y aumento en la concentración de CO_2 intercelular, acompañados de la alteración en el transporte de electrones del FSII, que están asociados con concentraciones

de 0.08 ppm de O₃, pero con un único periodo de exposición de 4 h (Guidi, Nali, Ciompi, Lorenzini y Soldatini, 1997).

Si bien, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la comparación de acículas sanas y con daño (con base en las medias y el valor-P), la reducción neta es de alrededor de 1 µg/mL de solución, la cual se puede atribuir al número de muestras que no fue suficiente para reportar una diferencia más amplia. Otra alternativa es, que a niveles de contaminación que aún no causan lesiones visibles se mida la inhibición de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH), en conjunto con la reducción de clorofila, con la posibilidad de que esta enzima sea específica de la influencia del O₃ (Rabe y Kreeb, 1970).

9.3. Concentraciones de O₃

La oscilación de las concentraciones de O₃ en el último año se observa en la figura 20, se evidencia el comportamiento esperado en los meses más cálidos y secos (marzo, abril y mayo) con las concentraciones más altas, y decayendo hacia el invierno (diciembre, enero y febrero).

La Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2014 (Diario Oficial de la Federación, 2014) de salud ambiental, establece las concentraciones máximas de ozono en 0.095 ppm (promedio horario) y en 0.070 ppm como máximo anual del promedio móvil de 8 h, aunque la figura 20 no muestra el comportamiento del O₃ a lo largo del día, permite visualizar que incluso el mes con las más altas concentraciones (mayo-2017) se encuentra muy por debajo del máximo anual.

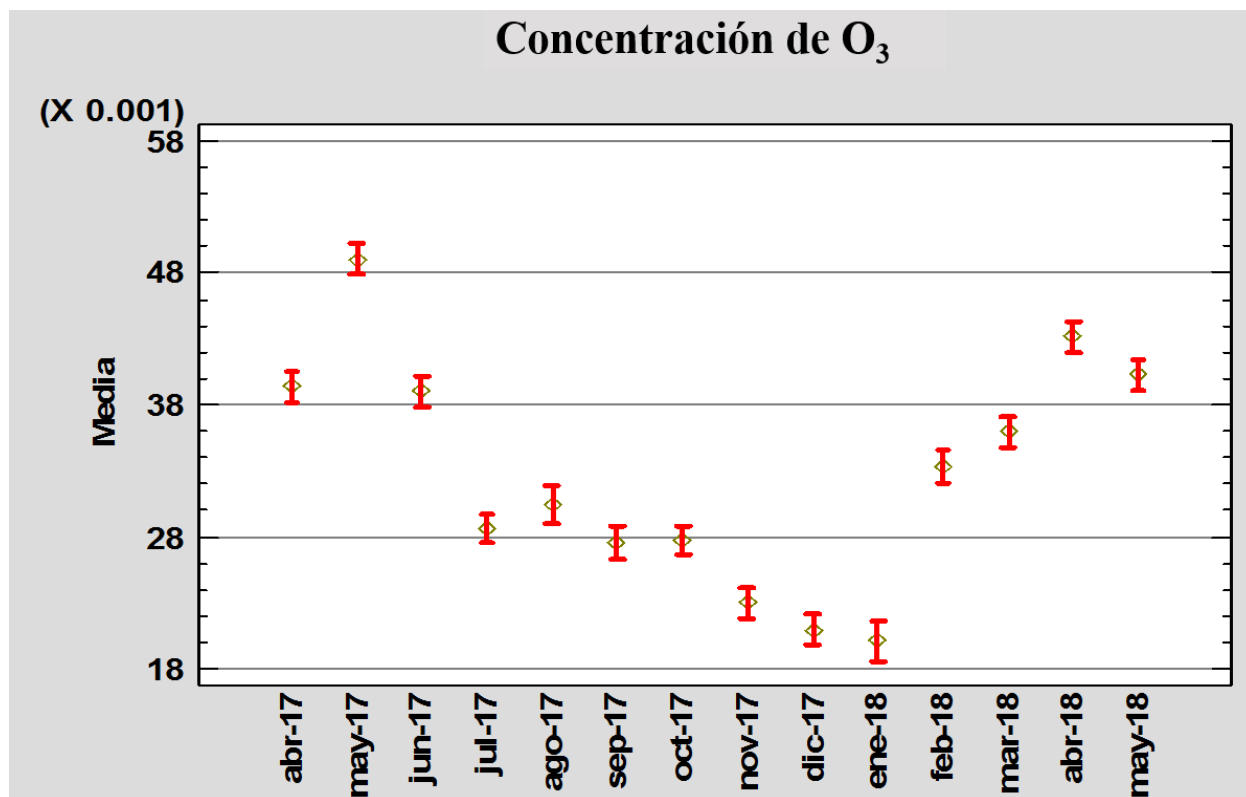


Figura 20. Medias mensuales de O₃ (ppm) en la estación Cuajimalpa.

Se destaca una clara disminución de las concentraciones en el mes mayo de 2018, con respecto al año anterior, pese a ello, los meses en que se realizó la colecta de *Abies religiosa* fueron los más altos en lo que va del año (y es de esperar que sean el pico máximo anual).

La vegetación en el Parque Nacional Desierto de los Leones (cercana a la estación Cuajimalpa) no está expuesta a concentraciones que rebasen las normas mexicanas, no obstante, se observa que lo largo de un año existe una constante exposición al O₃ cuya media más baja es de 0.020 ppm.

A exposiciones altas de O₃ de hasta 0.4 ppm en periodos de 24 h no se ha encontrado daños en la lesión visual o contenido de clorofila (Saitanis *et al.*, 2001) con lo que se infiere que lo que causa un daño severo es la exposición prolongada a concentraciones más bajas de O₃, más que altas dosis por periodos cortos (Schreiber, Vidaver, Runeckles y Rosen, 1977). De acuerdo

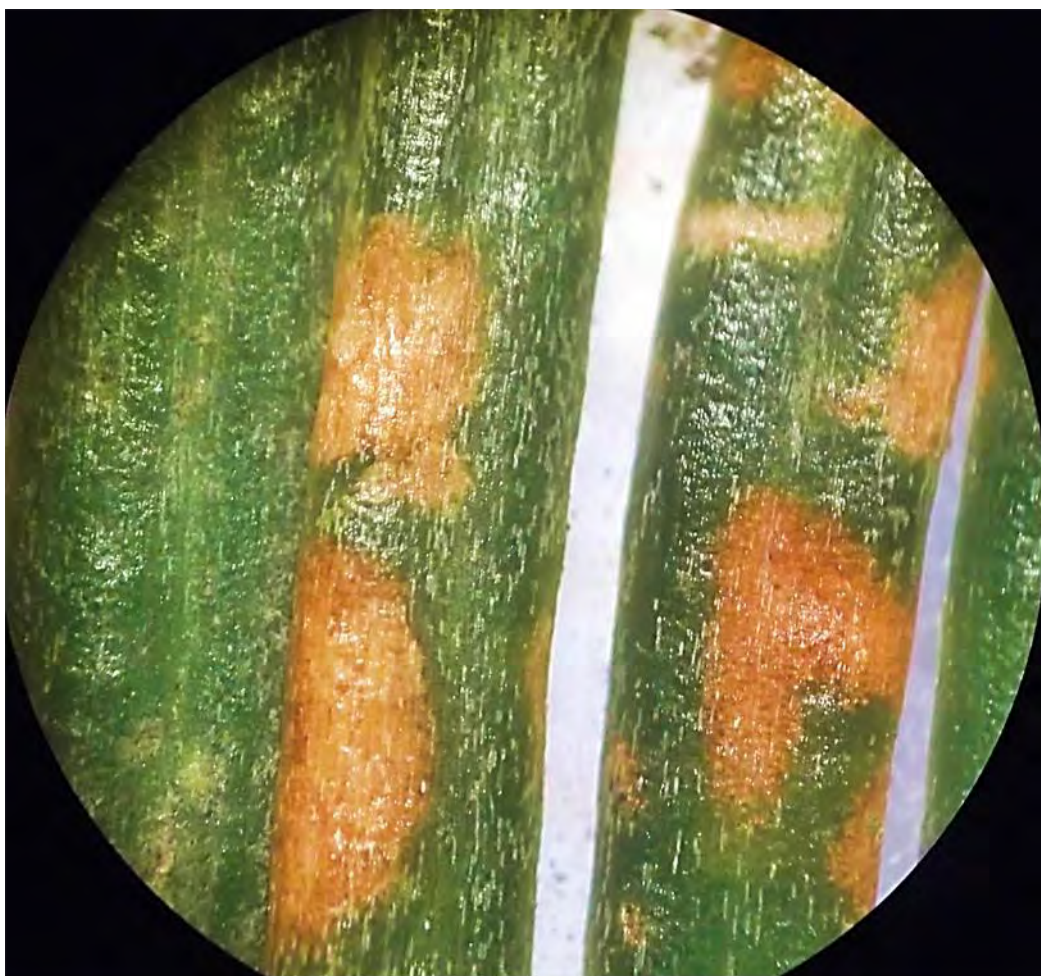
con Saitanis *et al.* (2001) las lesiones encontradas, así como la disminución de la clorofila indican una reducción de la fotosíntesis.

El daño visual encontrado en acículas de *Abies religiosa* está claramente asociado a la intervención de O₃ (figuras 21 y 22), en contraste con acículas sanas (figura 14). Éste daño está dentro de los síntomas macroscópicos descritos por Alvarez *et al.* (1998) para la misma especie en el Parque Nacional Desierto de los Leones, ésta lesión a nivel tisular, también daña la capa superior del parénquima empalizada.



Figura 21. Lesiones asociadas al O₃ encontradas en acículas de *Abies religiosa*.

Skelly, Freidenburg y Kiesecker (2002) expresan que en las hojas de acícula corta, lo primero que ocurre es un barrido de las ceras, la destrucción de las células epidérmicas y del parénquima, generan alrededor de las puntaciones cafés, una hendidura con forma de cráter, producto de los ácidos producidos por la difusión de los gases con el agua intra e inter celular. Mientras que en la clorosis, se va desvaneciendo el color verde fuerte a más claro hasta llegar a amarillo, sin que se presente el borde de cráter, debido a que la difusión de los gases no daña las paredes y membranas celulares, y sólo reaccionan con la matriz de los cloroplastos.



*Figura 22. Moteado clorótico asociado al daño por O_3 encontrado en acículas de *Abies religiosa*.*

Debido a que la reducción de la clorofila también ha sido asociada a la influencia del SO_2 (Rabe y Heinz, 1980) la figura 23 muestra su comportamiento para el mismo periodo que el de O_3 , en ésta se mantiene con concentraciones bajas la mayor parte del año y sólo altas en el invierno (0.0105 ppm), pero menor al promedio anual de 0.025 ppm (DOF, 2010). Con ello, se desestima que el moteado clorótico encontrado sea causado por SO_2 .

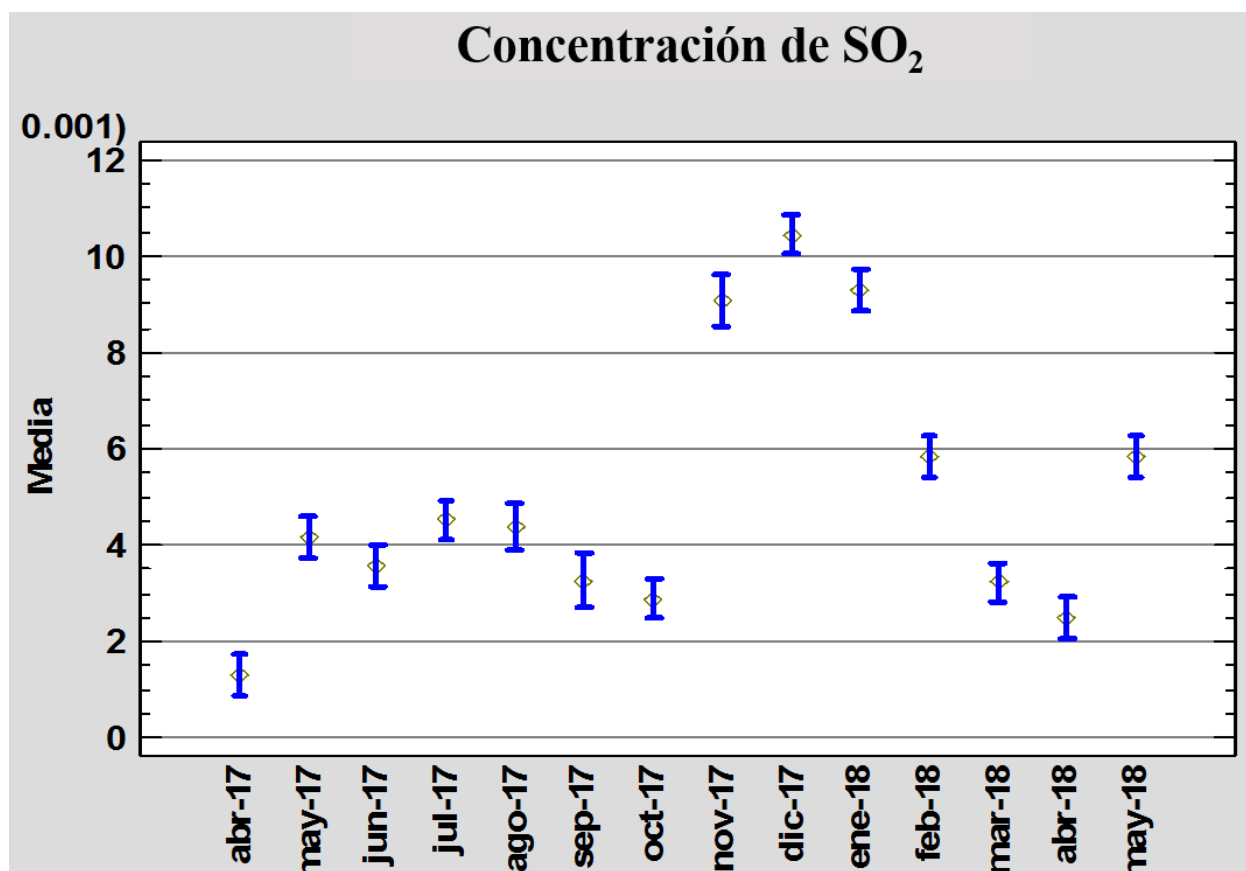


Figura 23. Medias mensuales de SO_2 (ppm) en la estación Cuajimalpa.

10. CONCLUSIONES

- La asociación entre las clorofilas *a* y *b* con los registros del SPAD se representó débilmente con una ecuación polinomial de segundo orden, para robustecerla se deberá considerar la hora del día de registro, la arquitectura y el estado hídrico de las hojas y ampliar el tamaño de muestra.
- Para aumentar la eficiencia de registro con el medidor SPAD, las acículas de *Abies religiosa* deben ser agrupadas, ya que por sus dimensiones presentan dificultades para su lectura.
- Se encontró una reducción de clorofila, aunque mínima, por la influencia de O₃.
- La comparación entre los datos obtenidos con el medidor SPAD 502 Plus y los de espectrofotometría permiten recomendar el uso del medidor en otras especies para evaluar el impacto de contaminantes atmosféricos.
- Con base en las concentraciones anuales de O₃, el moteado clorótico y la reducción de clorofila, se demuestra que daño es causado por el O₃.

11. REFERENCIAS

- Alvarez, D., Laguna, G., y Rosas, I. (1998). Macroscopic and microscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near Mexico City. *Environmental Pollution*, 103, 251-259.
- Bermejo V., Alonso, R., Elvira, S., Rábago, I., y García, M. (2009). *El ozono troposférico y sus efectos en la vegetación*. Madrid, España: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 60-61.
- Bibby Scientific. (2014). Spectrophotometer 6850 Jenway. Operating Manual, 14-15. Disponible en: <http://www.jenway.com/product.asp?dsl=886> [2018, 11 de abril].
- Brugnoli, E., y Björkman, O. (1992). Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to ApH and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research*, 32, 23-35.
- Carlson, D. (s.f.a). *Chlorophyll Molecular Structure*. Carlson Stock Art: Life Science illustration and more. Recuperado de: <https://www.carlsonstockart.com/photo/chlorophyll-complex-structure-molecular-structure/?search=chlorophyll>
- Carlson, D. (s.f.b). *Chloroplast Structure*. Carlson Stock Art: Life Science illustration and more. Recuperado de: <https://www.carlsonstockart.com/photo/leaf-chloroplast-structure-green-plant-cells-organelle-plastid-granum-thylakoid/?search=chloroplast>
- Cooley, D., y Manning, W. (1987). The impact of ozone on assimilate partitioning in Plants: A review. *Environmental Pollution*, 47, 95-113.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, (2006). Programa de conservación y manejo Parque Nacional Desierto de los Leones, 19-29.
- Darrall, N. (1989). The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell & Environment*, 12(1), 1-30.

- Daughtry, C., Walthall, C., Kim, M., Brown, E., y McMurtrey, E. (2000). Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration from Leaf and Canopy Reflectance. *Remote Sensing Environment*, 74, 229-239.
- Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA1-2010, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto al dióxido de azufre (SO₂). Valor normado para la concentración de dióxido de azufre (SO₂) en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. Recuperado de: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4149/salud1/salud1.htm>
- Diario Oficial de la Federación. (2014). Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA1-2014, Salud ambiental. Valor límite permisible para la concentración de ozono (O₃) en el aire ambiente y criterios para su evaluación. Recuperado de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5356801&fecha=19/08/2014
- Díaz, M. M., Llorente, M. M., y Lucio-Villegas, M. (1995). *Introducción a la econometría el modelo de regresión*. Oviedo, España: Universidad de Oviedo.
- Fenech, L. Troyo, E., Trasviña, M., Ruiz, F., Beltrán, A., Murillo, B., García, J., y Zamora, S. (2009). Relación entre un método no destructivo y uno de extracción destructivo, para medir el contenido de clorofila en hojas de plántula de albahaca (*Ocimum basilicum L.*). *Universidad y Ciencia*, 5(1), 99-102.
- Fenn, M., de Bauer L., y Hernández, T. (2002). *Summary of air pollution impacts on forests in the Mexico City air Basin*. Urban Air Pollution and Forests Resources at Risk in the Mexico City Air Basin, 337-353.
- Fennema, O., y Tannenbaum, S. (2000). *Química de Alimentos*, Editorial Acribia, 782-789.

- Garfias, J., y González, R. (1992). Air Quality in Mexico City. En D. A. Dunnette, y R. J. O'Brien. (Eds.). *The Science of Global Change* (pp. 149). Washington, DC, E.U.A.: American Chemical Society.
- González, R., Mendoza, M., y Alvarado, D. (2010). Exposición a ozono en relación a vitalidad en un bosque de oyamel (*Abies religiosa*). *Madera y Bosques*, 16 (4), 8.
- González-Benito, M. E. (2018). *Hoja: Anatomía*. Madrid. Universidad Politécnica de Madrid. Recuperado de: <http://blogs.upm.es/innebioveg/hoja/>
- Granados, D., López, R., y Hernández, M. (2010). La lluvia ácida y los ecosistemas forestales. *Serie ciencias forestales y del ambiente*, 16(2), 187-206.
- Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., y Soldatini, G. (1997). The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. *Journal of Experimental Botany*, 48(306), 173-179.
- Hawkins, T., Gardiner, E., y Comer, G.(2009). Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. *Journal for Nature Conservation* 17, 123-127.
- Heath, R. (1989). Alteration of Chlorophyll in Plants upon Air Pollutant Exposure. En National Academy Press. (Ed.), *Biologic Markers of Air-Pollution Stress and Damage in Forests* (pp. 347-352). Washington, DC, E.U.A, doi: 10.17226/1414
- Heber, U., Kaiser, W., Luwe, M., Kindermann, G., Veljovic-Javonovic, S., Yin, Z., Pfanz, H., y Slovik, S. (1995). Air Pollution, Photosynthesis and Forest Decline: Interactions and Consequences. En E. Schulze, y M. Caldwell. (Eds). *Ecophysiology of Photosynthesis* (pp. 285-286). New York, E.U.A: Springer.
- Hopkins, W. G. (2006). *Photosynthesis and Respiration*. New York, E.U.A: Chelsea House.

- Knudson, L., Tibbitts, T., y Edwards, G. (1977). Measure of Ozone Injury by Determination of Leaf Chlorophyll concentration. *Plant Physiol*, 60, 606-608.
- Kozlowki, T., y Constantinidou, H. (1986). Responses of Woody Plants to Environmental Pollution, *Forestry Abstracts*, 47(1), 6-37.
- Krupa, S., y Manning, W. (1988). Atmospheric Ozone: Formation and effects on Vegetation. *Environmental Pollution*, 50, 101-137.
- Lambers H., Chapin F.S., y Pons T.L. (1998). Photosynthesis, Respiration, and Long-Distance Transport. En *Plant Physiological Ecology*. New York, E.U.A: Springer.
- Lei, W., de Foy, B., Zavala, M., Volkamer, R., y Molina, L. T. (2007). Characterizing ozone production in the Mexico City Metropolitan Area: a case study using a chemical transport model. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7, 1347-1366.
- Ling, O., Huang, W., y Jarvis, P. (2011). Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth Res*, 107, 209–214.
- Loh, F., Grabosky, J., y Bassuk, N. (2002). Using the SPAD 502 Meter to Assess Chlorophyll and Nitrogen Content of Benjamin Fig and Cottonwood Leaves. *HortTechnology*, 12(4), 682-686.
- Manahan, S. E. (2001) *Fundamentals of Environmental Chemistry*. Recuperado de: <http://www.ingenieroambiental.com/4004/Fundamentals%20of%20Environmental%20Chemistry,%20Manahan.pdf>
- Manrique, E. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1), 1-11.
- Marenco, R. A., Antezana-Vera, S. A., y Nascimento, H. C. (2009). Relationship between specific leaf area, leaf thickness, leaf water content and SPAD-502 readings in six Amazonian tree species. *Photosynthetica*, 47(2), 184-190.

- Markwell, J., Osterman, J., y Mitchell, J. (1995). Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Photosynthesis Research*, 46, 467-472.
- Martínez, D. E., y Guiamet, J. J. (2004). Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie*, 24, 41-46.
- Milton, J. S. (2001). *Estadística para biología y ciencias de la salud*. Recuperado de: <http://www.x.edu.uy/libros/Estadistica%20para%20Biologia%20y%20Ciencias%20de%20la%20Salud%203a%20Ed.pdf>
- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, (2010). Red de parcelas permanentes para el seguimiento intensivo y continuo de los ecosistemas forestales (Manual Red de Nivel II), Secretaria general de agricultura y alimentación, Programa Internacional de Cooperación para el Seguimiento y la Evaluación de los Efectos de la Contaminación Atmosférica en los Bosques.
- Mostacedo, B., y Fredericksen, T. (2000). Manual de Métodos Básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal, Proyecto de Manejo Forestal Sostenible BOLFOR, 12-14.
- O'Brien, R. J., y George, L. A. (1992). Tropospheric Chemical Reactivity and Its Consequences for Clean and Polluted Air. En D. A. Dunnette, y R. J. O'Brien. (Eds.). *The Science of Global Change* (pp. 66-67, 71-72). Washington, DC, E.U.A.: American Chemical Society.
- Olav, H. B., y Asbjorn, S. K. (1998). Effect of Irradiance on Chlorophyll Estimation with the Minolta SPAD-502 Leaf Chlorophyll Meter. *Annals of Botany*, 82, 389-392.
- Organización Mundial de la Salud. (2005). Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre, 16.

- Park, Y., Chow, W. S., y Anderson, J. M. (1996). Chloroplast Movement in the Shade Plant *Tradescantia albiflora* Helps Protect Photosystem II against Light Stress. *Plant Physiology*, *111*, 867-875.
- Rabe, R., y Heinz, K. (1980). Biondication of air pollution by Chlorophyll Destruction in Plant Leaves. *Nordic Society Oikos*, *34*, 163-167.
- Rabe, R., y Kreeb, K. H. (1970). Enzyme activities and chlorophyll and protein content in plants as indicators of air pollution. *Environmental Pollution*, *19*, 119-137.
- Rivera, R., López, M., y Campos, R. (2006). Nutrición y síntomas de declinación de *Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham. en el Desierto de los Leones, D.F. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, *12*(002), 145-150.
- Rodríguez, I., y Miller, G. (2000). Using a Chlorophyll Meter to Determine the Chlorophyll Concentration, Nitrogen Concentration, and Visual Quality of St. Augustinegrass. *HortScience*, *35*(4), 751-754.
- Rodríguez, M., Alcántar, G., Aguilar, A., Etchevers, J., y Santizo, J. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra*, *16* (2), 135-141.
- Saitanis C., Riga-Karandinos, A., y Karandinos, M. (2001). Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere*, *42*, 945-953.
- Sandermann, H. (1996). Ozone and Plant Health. *Annual Reviews Phytopathol*, *34*, 347-66.
- Schreiber, U., Vidaver, W., Runeckles, V. C., y Rosen, P. (1977). Chlorophyll Fluorescence Assay for Ozone Injury in Intact Plants. *Plant Physiol*, *61*, 80-84.
- Secretaria del Medio Ambiente. (2018). Bases de datos - Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA). Ciudad de México, Méx.. *Aire CDMX*. Recuperado de: <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php?opc=%27aKBh%27>

- Secretaría del Medio Ambiente. (2017). Aviso por el que se da a conocer el programa de verificación vehicular obligatoria para el segundo semestre del año 2017. Recuperado de: <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/storage/app/media/aviso-por-el-que-se-da-a-conocer-el-programa-de-verificacion-vehicular-obligatoria-para-el-segundo-semestre-del-ano-2017.pdf>
- Skelly, J., Davis, D., Merrill, W., Cameron, E., Brown, H., Drummond, D., y Leon, S. (Eds.). (1987). *Diagnosing injury to eastern forest trees*. Washington, E.U.A.: Northern Research Station.
- Skelly, D. K., Freidenburg, L. K., y Kiesecker, J. M. (2002). Forest canopy and the performance of larval amphibians. *Ecology*, 83(4), 983-992.
- Spectrum Technologies Inc. (2011). SPAD 502 Plus Chlorophyll Meter Product Manual. Disponible en: <https://www.specmeters.com/documents/?CategoryId=4&Keywords=spad> [2018, 08 de marzo].
- Suetsugu, N., Higa, T., Gotoh, E., y Wada, M. (2016). Light-Induced Movements of Chloroplasts and Nuclei Are Regulated in Both Cp-Actin-Filament-Dependent and -Independent Manners in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 11(6), doi: 10.1371/journal.pone.0157429
- Uddiling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K., y Pleijel, H. (2007). Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. *Photosynth Res*, 91, 37-46.
- Vogelmann, T. C. (1993). Plant Tissue Optics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 231-251.
- Wang, Q., Chen, J., Stamps, R. H., y Li, Y. (2005). Correlation of Visual Quality Grading and SPAD Reading of Green-Leaved Foliage Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 1215–1225.

- Wintermans, J., y De Mots, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 109, 448-453.
- Yamamoto, A., Nakamura, T., Adu-Gyamfi, J., y Saigusa, M. (2002). Relationship between chlorophyll content in leaves of sorghum and pigeonpea determined by extraction method and by chlorophyll meter (spad-502). *Journal of Plant Nutrition*, 25(10), 2295-2301.
- Yunus, M., e Iqbal, M. (Eds.). (1996). *Plant Response to Air Pollution*. Michigan, E.U.A: Wiley.