

00376 1
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DETERMINACIÓN DE ALTERACIONES A NIVEL CITOLÓGICO E
HISTOQUÍMICO EN ABIES RELIGIOSA (H.B.K.) SCHL ET
CHAM DEL DESIERTO DE LOS LEONES DEL D.F. Y SU RELACIÓN
CON EL OZONO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (ECOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES)**

**P R E S E N T A
DIANA EDITH ALVAREZ CAMARENA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

A MIS PAPÁS, A QUIENES TANTO AMO Y TODO DEBO, COMO UN HOMENAJE A SU CONSTANTE ENTREGA.

A TODOS Y CADA UNO DE MIS HERMANOS, EJEMPLOS DE VERDADERA HERMANDAD.

A HORACIO, MI NOVIO Y MÁS GRANDE AMIGO, POR SU AMOR.

A MI DIOS, DE QUIEN PROVIENE TODO LO BUENO EN MI VIDA, MIS SERES QUERIDOS Y MIS PROPIAS CAPACIDADES, POR HACERME PARTÍCIPE DEL CONOCIMIENTO, AUNQUE SEA ÍNFIMO, DE SU OBRA MARAVILLOSA DE LA VIDA.

A MARÍA POR SER MI MADRE.

EN AGRADECIMIENTO:

A la Dra. Irma Rosas Pérez por aceptar la labor de dirigir mi tesis, compartiendo sus ideas para orientar y dar forma a las mías. Por su ayuda desinteresada, su constante confianza en mí en el ámbito académico y su apertura en el personal; por su ejemplo de amor y dedicación a la difícil tarea del "conocimiento".

Al Dr. Guillermo Laguna Hernández, por ser mi "otro", pero igualmente importante, director de tesis; gracias a quien fue posible su realización. Por su apoyo y ayuda incondicionales, su entrega generosa en los aspectos profesional y humano, y por enriquecerme con sus conocimientos.

A los sinodales: Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, Dr. Miguel Guillermo Franco Baqueiro, Dr. Francisco Alfonso Larqué Saavedra, Dra. María de Lourdes de la Isla de Bauer y Dra. Clara Esquivel Huesca, por la revisión del trabajo y por sus valiosos comentarios que contribuyeron a su enriquecimiento y a mi satisfacción personal, ya que me llevaron a comprobar algunas hipótesis que había planteado originalmente.

Al Laboratorio de Citología de la Facultad de Ciencias, UNAM, por brindarme todos los medios físicos que requirió la elaboración de la tesis, pero especialmente a todos sus miembros (Judith, Clara, Alicia, Sonia, Silvia, Guillermina, Lourdes, Ma. Eugenia, Raquel, Reina, Ricardo, Ana, Citlali, Aurora) por su apoyo, sugerencias, trato amable y por hacerme sentir parte de ellos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico.

Al Colegio de Postgraduados de Chapingo, por facilitar la información relativa a las concentraciones de ozono en el Desierto de los Leones, D.F.

Al Centro de Ciencias de la Atmósfera por las facilidades prestadas durante la elaboración de la tesis.

A todos aquellos quienes me ayudaron en diferentes aspectos técnicos:

En el campo: M. en C. Diodoro Granados y su equipo, e Ing. Daniel Paz por su asesoría y colaboración en la obtención de muestras. A Horacio Ramírez, sin cuya ayuda no hubiera podido realizar la mayor parte del trabajo de campo.

En el área de microscopía electrónica:

. Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias, UNAM; especialmente a la Dra. Olga Echeverría y a la Dra. Guadalupe Zavala.

. Al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Física, especialmente al Dr. José Reyes y al Sr. Pedro Mexía.

. Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente al Dr. Horacio Merchant.

Por facilitar su equipo y/o su tiempo en la atención de ciertos detalles técnicos.

- Al Dr. Laguna quien tomó las fotografías.

En el área de computación: la Dra. Amparo Martínez, el M. en I. Armando Baez, el Ing. Raúl Belmont, Ma. Carmen Calderón, Ma. Carmen Torres, Rocío García, y al Lic. José María Landín Bonilla, por participarme de su tiempo, conocimientos y equipo.

Y a todos Aquéllos que me apoyaron moralmente en el transcurso de la realización de la tesis.

*Toda sabiduría viene del Señor
y con Él está por siempre.
La arena de los mares, las gotas de lluvia,
los días de la eternidad, ¿quién los puede contar?
La altura del cielo, la anchura de la tierra,
la profundidad del abismo, ¿quién los alcanzará?
Antes de todo estaba creada la Sabiduría,
la inteligente prudencia desde la eternidad.
La raíz de la sabiduría ¿a quién fue revelada?,
sus recursos, ¿quién los conoció?
Sólo uno hay sabio, en extremo temible,
El que en su trono está sentado.
El Señor mismo la creó,
la vio y la contó
y la derramó sobre todas sus obras,
en toda carne conforme a su largueza,
y se la dispensó a los que le aman.*

ECLESIAÍSTICO 1, 1-10

INDICE

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	4
DIAGNOSIS	5
ANTECEDENTES	6
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSION	21
. Efectos a nivel estructural	
- Plasmalema y citoplasma	21
- Aparato de Golgi y Reticulo Endoplásmico	24
- Mitocondrias y Microcuerpos	24
- Cloroplastos	26
- Vacuolas	37
- Caracterización celular	40
- Evaluación de las alteraciones a nivel histológico	44
. Efectos a nivel bioquímico	
- Carbohidratos	47
- Lípidos	53
- Proteínas	59
- Metabolitos secundarios	60
. Síntomas visibles	
- Daños en las acículas	65
- Vigor y tipo de muerte del arbolado	66
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	74
FIGURAS	82

RESUMEN

El arbolado de oyamel (Abies religiosa) del Parque Cultural y Recreativo Desierto de los Leones conocido otrora por su porte majestuoso, sufre desde hace varios años, una severa degradación evidente a simple vista por la pérdida de la coloración "siempre verde" de su follaje, la abscisión prematura de sus acículas y su muerte acelerada.

El origen de tal declinación es desconocido, aunque últimamente se ha sugerido que el ozono, presente en el área en elevadas concentraciones, desempeña un papel decisivo. Es por ello que, con el objeto de contribuir a la diagnosis del daño reportado en esta especie, se realizó el presente estudio empleando una combinación de biomarcadores de exposición a ozono a nivel citológico e histoquímico.

Los análisis se efectuaron en cortes de acículas incluidos en resina epóxica para su examen al microscopio electrónico de transmisión y en parafina para su estudio al microscopio de luz, después de haber sido sometidos a las técnicas histoquímicas correspondientes.

A nivel celular se determinó el estado estructural de plasmalema, protoplasma, cloroplastos, mitocondrias y material ergástrico de la vacuola, mismos que mostraron alteraciones conspicuas de acuerdo a lo descrito en casos de afectación por ozono. A nivel histológico el daño estructural más severo se circunscribió al parénquima en empalizada, donde radica precisamente el daño provocado por este contaminante. Las pruebas histoquímicas pusieron de manifiesto alteraciones en el contenido de metabolitos tales como carbohidratos, lípidos y compuestos fenólicos, ocasionados probablemente por las transformaciones ultraestructurales observadas en los organelos.

Los resultados obtenidos en ambos niveles de organización se correlacionaron entre sí y con los síntomas macroscópicos del arbolado, tratando de aportar una explicación clara e integral de los procesos involucrados en el fenómeno de degradación.

INTRODUCCION

A nivel mundial se considera que gran parte de los problemas del deterioro ambiental se deben a la deforestación; las cifras en el mundo entero y aún en nuestro país son alarmantes. Las estimaciones de la tasa de deforestación en México varían de 200,000 ha por año en 1983, a 400,000 en 1990; reconociéndose oficialmente una tasa de deforestación anual de 370,000 ha. De éstas, 110,000 corresponden a bosques, 190,000 a selvas y 50,000 a zonas áridas (de las que hay un total de 27.5, 11.4 y 73.2 millones de ha. respectivamente) (Jasso y López, 1991).

Los factores de destrucción y disturbio de los ecosistemas forestales se agrupan por su origen en agentes naturales y antropogénicos. Aún cuando los desastres naturales devastan grandes áreas forestales, estos no pueden ser considerados agentes de deforestación por sí mismos, ya que los ecosistemas dañados pueden recuperarse nuevamente. Los agentes de origen antropogénico son los que realmente causan la deforestación o pérdida permanente de la vegetación.

Dentro de los principales factores de destrucción y disturbio de los bosques se encuentran la extracción de madera de los bosques para su utilización como combustible en las áreas rurales, la transformación de terrenos forestales en zonas de cultivos agrícolas o de pastizales y el proceso de desarrollo e industrialización de la sociedad que trae consigo la construcción de grandes vías de comunicación, obras de infraestructura hidráulica y más recientemente, el aumento de la contaminación atmosférica (Vargas y Velázquez, 1991).

En 1989 se afirma que aproximadamente el 50% de las áreas protegidas del país -sitios destinados a la preservación y uso racional de los recursos naturales, por cuanto a que constituyen un potencial económico y patrimonio genético y ecológico-, padecen algún síntoma de degradación de sus ecosistemas, ocasionado en gran medida por la contaminación ambiental (SEDUE, 1983; Arenas, 1989).

En particular, el Desierto de los Leones, bosque clasificado bajo la denominación de "Parque Cultural y Recreativo", es un claro ejemplo de degradación forestal. En los últimos años se ha convertido en un sitio de interés para quienes se preocupan por el estado fitosanitario de los bosques de nuestro país (Vázquez, 1987, 1988; Cibrián, 1989).

Son numerosas las hipótesis que pretenden explicar la causa de tal decaimiento. Este se ha atribuido a la acción de múltiples factores bióticos y abióticos entre los que se consideran la incidencia de patógenos, insectos y ácaros; el excesivo aprovechamiento de los mantos acuíferos; la falta de manejo forestal y más recientemente la contaminación atmosférica (Vázquez, 1987). Según los estudios realizados por Alvarado *et al.* (1987b, 1989) y De la Isla y Hernández (1986), los tres primeros factores, aunque contribuyen al decaimiento del arbolado, juegan un papel secundario; mientras que la contaminación atmosférica que proviene de la zona metropolitana de la Cd. de México, parece estar ejerciendo efectos tóxicos sobre el follaje.

Se ha sugerido que el problema principal de la Cd. de México es el causado por los gases oxidantes producidos fotoquímicamente. Sus concentraciones se han elevado sobre la norma de calidad del aire debido a la gran cantidad de automotores de combustión interna que circulan diariamente y que son la principal fuente de emisión de sus precursores. A ello hay que añadir el hecho de que la ciudad se localiza a una elevada altitud, lo que facilita una mayor incidencia de radiación ultravioleta, y que está rodeada por montañas y sus vientos con frecuencia son ligeros (< 1.5 m/seg), lo cual dificulta la dispersión de los contaminantes (Hernández y de la Isla, 1984; De la Isla y Krupa, 1990).

El ozono, que es un oxidante fotoquímico y uno de los principales componentes de la contaminación atmosférica, usualmente es más dañino a las plantas que el resto de los contaminantes pues es un agente altamente reactivo con las moléculas orgánicas de los organismos (Miyake *et al.*, 1984). Se absorbe directamente de la atmósfera y su entrada está

limitada a los órganos que contienen clorofila, esencialmente las hojas, en donde penetra principalmente por vía estomática -aunque también puede haber penetración transcuticular (De la Isla, comunicación personal)-. Ya que estos órganos son la parte más activa involucrada en el intercambio de gases con el ambiente, son el blanco principal del ozono.

La cantidad de ozono que se difunde del aire hacia los sitios reactivos dentro de la hoja son determinantes en el daño. El flujo de contaminantes está en función de las propiedades químicas y físicas presentes a lo largo de la vía de difusión de gas a líquido (Guderian, 1985).

Una vez que el ozono ha penetrado a los tejidos se llevan a cabo reacciones que transforman la química celular dando origen a la perturbación, que es un cambio primario en la estructura y/o función celular (Guderian, *op cit.*; Schiffgens-Gruber y Lutz, 1992). Se sabe que el ozono sufre una rápida descomposición, lo que reduce drásticamente su concentración en los espacios intercelulares, pero en cambio se liberan radicales libres altamente reactivos que tienen fuertes afinidades por las membranas celulares (Anttonen *et al.*, 1995).

Los estudios ultraestructurales y bioquímicos sugieren que las membranas son los sitios primarios de acción del ozono por ser éste o sus productos de reacción, agentes altamente reactivos con aminoácidos, proteínas, ácidos grasos insaturados y grupos sulfhidrilo, constitutivos de las membranas celulares (Tingey y Taylor, 1982; Guderian, *op cit.*; Kozlowski y Constantinidou, 1986). Sean estas membranas de organelos o el plasmalema, el menoscabo de su integridad puede significar por una parte, cambios en su permeabilidad (Dugger *et al.*, 1966; Beckerson y Hofstra, 1980; Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*) y con ello alteración de balances iónicos, y por otra, disfunción de enzimas asociadas. Ambos casos estrechamente relacionados a procesos metabólicos como la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas y lípidos, y el metabolismo secundario.

El daño resulta de la incapacidad para reparar o compensar las perturbaciones con repercusión en el metabolismo. Bioquímicamente éste puede expresarse como alteraciones de actividades enzimáticas y contenidos metabólicos (Guderian, *op cit.*), las cuales han sido reportadas en diversas especies vegetales por Dugger *et al.* (*op cit.*), Dugger y Ting (1970), Tingey (1974), Tingey *et al.* (1975, 1976a,b).

Las anomalías en la estructura y función celular pueden también expresarse acumulativamente a nivel histológico y anatómico; así como en patologías foliares, incluyendo la aceleración del proceso de senectud de las hojas; dislocación de carbohidratos; reducción en crecimiento y productividad; alteración de la morfología de los árboles y finalmente afectación de las comunidades y ecosistemas (Guderian, *op cit.*; Winner y Atkinson, 1986). El daño bien puede estar exento de síntomas visibles (Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*); tal es el caso de plantas expuestas a bajas concentraciones de contaminantes que presentan una reducción de su crecimiento y productividad sin que pueda evidenciarse alguna anomalía a simple vista (Soikkeli y Karenlampi, 1984).

Atendiendo a lo expuesto y al conocimiento de que:

- el ozono es un agente contaminante altamente fitotóxico,

- las concentraciones de ozono en el Desierto de los Leones frecuentemente sobrepasan los límites permitidos,

se propone que el ozono está impactando fuertemente el arbolado de Abies religiosa.

De acuerdo a esto, la investigación se efectúa a nivel de diagnóstico, para lo cual se emplea una combinación de biomarcadores de manera que pueda ofrecerse más de una línea de evidencia para la comprobación de la hipótesis.

Los objetivos específicos consisten en:

A NIVEL MACROSCOPICO

D e t e r m i n a r :

- . Vigor del arbolado
- . Tipo de muerte del arbolado
- . Retención de acículas
- . Daño en acículas.

A NIVEL HISTOLOGICO

D e t e r m i n a r :

- . Tejido(s) dañado(s)
- . Alteraciones estructurales de las células del o los tejidos afectados
- . Alteraciones en el contenido de:
 - carbohidratos insolubles
 - proteínas
 - lípidos
 - compuestos fenólicos

A NIVEL CITOLOGICO

. Caracterizar y determinar posibles alteraciones estructurales de los siguientes componentes celulares:

- | | | |
|----------------|-------------------------|----------------|
| - plasmalema | - microcuerpos | - vacuola |
| - citoplasma | - aparato de golgi | - cloroplastos |
| - mitocondrias | - retículo endoplásmico | |

DIAGNOSIS

En áreas impactadas por oxidantes fotoquímicos en las que simultáneamente existen múltiples contaminantes atmosféricos así como otros agentes de perturbación, resulta difícil rastrear el origen del daño en la vegetación. Pese a ello, la identificación total del o los componentes fitotóxicos específicos puede llevarse a cabo por el examen del síndrome de la comunidad vegetal, esto es, haciendo uso de una diagnosis (Taylor, 1973; Guderian, *op cit.*).

Según Treshow (1984) la diagnosis es el proceso que determina la naturaleza y circunstancias de un estado patológico por la observación de signos o síntomas que le son propios, reconociendo especialmente la causa de la enfermedad o perturbación.

En la determinación de efectos inducidos por contaminación estos síntomas son todas aquellas reacciones que puedan funcionar como bioindicadoras, esto es, que constituyan cambios que se asocien directamente con exposiciones a un contaminante atmosférico específico. Los bioindicadores se emplean en diferentes niveles de organización biológica como comunidad, población, organismo, órgano y organelo. Tradicionalmente se han usado en combinación debido a que normalmente se necesita más de una línea de evidencia para confirmar que un contaminante atmosférico es el causante de un efecto dado (Guderian, *op cit.*; Miller, comunicación personal).

La diagnosis correcta involucra muchos elementos integrados: los síntomas, que constituyen un elemento cardinal -el conocimiento de la sintomatología es el mejor medio de diagnosis- deben estar apoyados por la información que se obtiene de los siguientes parámetros asociados:

- Historia del ecosistema.
- Estudios de percepción remota y distribución de plantas afectadas.
- Características del terreno y ubicación.
- Análisis dendrológicos.
- Exposición de plantas bioindicadoras.
- Exclusión de posibles factores bióticos o abióticos (fuera de la contaminación) como causa de daño.
- Presencia de fuentes contaminantes y monitoreo del aire.

El análisis químico de plantas y suelo como indicadores de contaminación por ozono es inútil ya que éste no es bioacumulable (Guderian, *op cit.*; Treshow, *op cit.*; Miller, comunicación personal).

En conjunto, estos factores comprenden los elementos de diagnosis proporcionando el síndrome total -patrón de enfermedad total- (Treshow, *op cit.*).

ANTECEDENTES

Según Manzanilla (1974), el oyamel y el oyamental son el árbol y el bosque más importantes en el Desierto de los Leones. Desde el punto de vista económico Abies religiosa es una especie que se emplea principalmente para la extracción de pulpa para papel, y como su madera no es muy durable, se utiliza para la elaboración de cajas, canastos, puertas, etc. Tradicionalmente se le ha empleado como árbol de navidad y como leña. Sin embargo, su importancia dentro del parque trasciende el aspecto económico, cobrando relevancia en los ámbitos recreativo, estético y de protección de los recursos naturales. Dentro del último rubro hay que recalcar su importancia en la retención y absorción del agua pluvial que permite recargar los mantos acuíferos que suministran a la Ciudad de México; su papel en la conservación de suelos; en el mejoramiento del régimen térmico de la Cd. de México; en la protección a los flujos del viento y en el mejoramiento de las condiciones atmosféricas, contribuyendo con ello a la salud de los habitantes. Finalmente cabe agregar que Abies religiosa constituye un recurso que brinda un interés particular que es ser una especie mexicana y la única representante de su género en la Cuenca (Manzanilla, *op cit.*; Fernández, 1987; Rodea, 1987; Vázquez, 1988).

HISTORIA DEL ECOSISTEMA

De acuerdo a los registros, el Desierto de los Leones ha sufrido numerosas perturbaciones dentro de las que se pueden destacar como eventos históricos la acción de un viento huracanado (1918), talas excesivas (1930), la apertura de caminos (1933) y fuertes períodos de sequías y heladas (1976 y 1982). Así mismo, ha estado sujeto a eventos de perturbación continuos como la extracción de tierra de monte, leña y piedra; ataques del defoliador del oyamel Evita hyalinaria y del descortezador de las alturas Dendroctonus adjunctus en pinos; explotación de mantos acuíferos y ocoteado. (Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal, 1985; Madrigal, *op cit.*; Vázquez, 1988; Rodea, *op cit.*; Alvarado, 1989).

Para fines de la década de 1970, se detectan patrones de mortalidad que no corresponden a los agentes de destrucción entonces conocidos y sufridos por los árboles del parque. Tales síntomas son: decoloración y pérdida de acículas; disminución de la biomasa, tanto radical como aérea; muerte de retoños y deformación de las copas, culminando generalmente en la llamada muerte descendente de los árboles, que se inicia en la punta de la copa y culmina en su parte inferior (Vázquez, 1987). Algunos autores registran, sin embargo, una muerte ascendente, es decir, un patrón de muerte inverso al anterior (De la Isla y Hernández, *op cit.*; Alvarado *et al.*, 1987b, 1993).

La mortandad del arbolado se notó claramente a partir de 1981 en que los árboles empiezan a morir en pequeños grupos. Para 1982 se observa una declinación sin precedente del arbolado (Alvarado, *op cit.*; Alvarado *et al.*, 1987b, 1993). Se registran además grandes porciones del bosque con preponderancia de árboles maduros y sobremaduros, esto es, una escasa representación de las clases de edad más jóvenes y una casi completa ausencia de renuevos. Para 1983 la mortandad es tal que es necesario hacer un inventario para determinar el volumen de árboles muertos en pie (Vázquez, 1988; Cibrián, *op cit.*).

Alvarado (*op cit.*) muestra que de un volumen total de 753,063 m³ de madera de oyamel, en 1983 se encuentran dañados 181,318 m³, es decir, el 24%. De 1984 a 1987, el deterioro se incrementa a 270,775 m³, lo que corresponde al 36% del volumen original. Esto indica que en esos últimos 4 años se ve afectado aproximadamente 12% del volumen total. El debilitamiento y

la mortandad del arbolado llega a cubrir 274 ha que constituyen el conjunto de 5 áreas comunmente denominadas "cementerios" (Vázquez, 1987), aunque otros autores (Rodea, *op cit.*) mencionan que el área dañada en ese entonces abarca 420 ha.

PERCEPCION REMOTA Y DISTRIBUCION DE PLANTAS AFECTADAS Y CARACTERISTICAS DEL TERRENO

La Dirección de Sanidad Forestal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos llevó a cabo dos vuelos sobre el parque para tomar fotografías en infrarrojo y evaluar el progreso del daño. El primer vuelo se realizó en octubre de 1985 y el segundo en junio de 1987. El avance de la mortandad es muy evidente entre un vuelo y otro (Cibrián, *op cit.*), detectándose que la pérdida de vigor en los árboles se incrementa considerablemente de un año al otro; siendo los sitios ubicados al sur (S) y sureste (SE) de la zona urbana los más afectados y los que presentan mayor mortalidad. Se confirma que el avance de la muerte masiva del arbolado tiende a dirigirse hacia la dirección S, SO y SE coincidiendo con la de los vientos provenientes de la zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM).

En general se observa que el mayor número de árboles muertos -zonas de cementerios- se concentra en las cañadas en donde se estanca el viento cargado de contaminantes y donde la mortalidad sigue un patrón que va del centro hacia ambas pendientes de la misma. Las exposiciones que presentan las cañadas con arbolado muerto son norte (N), noreste (NE) y noroeste (NO) (Alvarado *et al.*, 1987b, 1993; Alvarado, *op cit.*; Rodea, *op cit.*; Macías y Tovar 1987; Cibrián, *op cit.*).

Cabe mencionar finalmente que Rodea (*op cit.*) recalca que las exposiciones NE presentan más del 50% de individuos muertos, mientras que el resto muestra menos del 50%.

Atendiendo a los problemas del parque, la Comisión Coordinadora para el Desarrollo Rural (COCODER) encargada del mismo, ha puesto en marcha programas de limpieza y saneamiento forestal, extrayendo maderas muertas y dañadas. Sin embargo, tanto la mortandad de árboles como los problemas de regeneración del bosque se siguen presentando (Vázquez, 1988; De la Isla, 1991; Alvarado *et al.*, 1993).

ANALISIS DENDROLOGICOS

Dos tipos de estudios dendrológicos se han contemplado en relación al creciente daño observado en Abies religiosa, uno incluye árboles de la misma categoría diamétrica y otro tocones de árboles muertos de diferentes categorías diamétricas derribados poco tiempo antes de su examen. El primero incluye muestras de dos sitios del Desierto de los Leones, uno con afectación y otro sano, y de un lugar en Zoquiapan, Méx. Los árboles del área afectada (pendientes expuestas a barlovento) son árboles más maduros con un promedio de 96 años y un tiempo de paso (tiempo que tarda para pasar a la próxima categoría diamétrica, en este caso, los próximos 10 cm) de 29. En las áreas no afectadas (exposición sur) del Desierto de los Leones los árboles son más jóvenes, con un promedio de 60 años y un tiempo de paso de 19; y en Zoquiapan con una edad promedio de 43 años y un tiempo de paso de sólo 7 años (Cibrián, *op cit.*).

El segundo estudio comprende sólo muestras del Desierto de los Leones y los resultados señalan que los árboles tardan más tiempo de lo normal en pasar de una categoría diamétrica a la inmediata superior. Esto se desprende del hecho de que el tiempo de paso en todas las categorías diamétricas (desde la de 25 cm hasta la de 110, o sea desde 57 a 148 años de edad respectivamente) es similar, lo que denota la presencia de un factor desconocido que retarda el

crecimiento. La drástica reducción en el grosor de los anillos de los últimos treinta años en todas las categorías diamétricas de los árboles en declinación indica que su acción ha sido continua durante muchos años (Alvarado *et al.*, 1987a, 1993).

EXPOSICION DE PLANTAS SENSIBLES

Al confirmarse en 1972 -por medio de plantas indicadoras- la presencia de niveles fitotóxicos de gases oxidantes (ozono, nitrato de peroxiacetilo -PAN- y óxidos de nitrógeno) en la Ciudad de México y conocer la dirección de sus vientos dominantes (del norte y noreste al sur y suroeste Mapa 2B -pag. 15'-), Krupa y Bauer (1976, en De la Isla y Hernández *op cit.*), consideran la posibilidad de encontrar daños de esta índole en la vegetación de las montañas del Ajusco, D.F. Es así como realizan un reconocimiento de esta área, detectando daños por ozono de tipo crónico en Pinus hartwegii y Pinus leiophylla. Los síntomas consisten en un moteado y bandeado clorótico en las hojas de un año de edad, así como una clorosis general. P. hartwegii muestra ser más sensible al ozono que P. leiophylla (De la Isla y Hernández, *op cit.*).

La declinación y muerte del arbolado en el Desierto de los Leones motiva, en 1985, la realización de estudios tendientes a explicar este decaimiento. Siguiendo el mismo procedimiento empleado en el Ajusco para la evaluación en el campo del daño por gases oxidantes en pino (escala visual de Miller), se determina el daño en P. hartwegii del Desierto de los Leones, donde también es especie nativa. De los 79 árboles evaluados, se encuentra que 96% pueden considerarse muy severamente dañados y el 4% restante severamente dañados (De la Isla *et al.*, 1985; De la Isla y Hernández, *op cit.*; Hernández y De la Isla, 1986).

El efecto manifestado consiste nuevamente en un moteado y/o bandeado clorótico en las hojas del último crecimiento anual (UCA) y defoliación prematura; ambos síntomas son característicos de la acción de oxidantes fotoquímicos, particularmente ozono, en esta especie. Dados estos resultados, los autores concluyen que los gases oxidantes procedentes de la zona metropolitana de la Ciudad de México juegan un papel muy importante en el deterioro de P. hartwegii (considerada como especie sensible al ozono) en el Desierto de los Leones.

Ciesla y Macías (1987) en Vázquez (1987) coinciden en afirmar que la contaminación atmosférica es el agente causal de la muerte del arbolado en este sitio y que la evidencia de ello es, igualmente, el arbolado de P. hartwegii.

EXCLUSION DE FACTORES BIOTICOS Y ABIOTICOS COMO POSIBLES CAUSAS DE DAÑO

Dentro de los métodos empleados para excluir la acción de otros agentes de perturbación y confirmar la incidencia de un contaminante sobre la vegetación, a menudo se emplean sustancias que se aplican sobre la superficie de la planta, se mezclan con el suelo o bien se inyectan en ella a fin de protegerlas de los efectos de la polución (Guderian, *op cit.*). Con base en la hipótesis de que la declinación del oyamel es ocasionada por contaminantes aéreos, Alvarado *et al.* (1989, 1993) inician en 1986 la aplicación sobre el follaje de un antitranspirante conocido como "Clear Spray" con el objeto de suprimir o retardar la defoliación de los árboles afectados reduciendo la entrada del contaminante a la hoja. De acuerdo a los resultados, de la primera serie de ensayos se suprime temporalmente la aparición de los síntomas foliares típicos y se evita la pérdida de follaje de las ramas; en contraste con las ramas testigo, que muestran tanto el daño en el haz de las acículas como la caída de su follaje.

De manera adicional, los autores comparan la masa forestal del Desierto de los Leones con otra de San Juan Tetla, fuera de la influencia de la contaminación. Sus resultados señalan

que el arbolado en este sitio testigo no muestra las señales de declinación que se presentan en el primero.

BACTERIAS Y HONGOS

En un intento por determinar la etiología del daño en el Desierto de los Leones, Alvarado *et al.* (1987b) y Alvarado (*op cit.*) aíslan del tronco de Abies religiosa al hongo Graphium y algunas bacterias. La ausencia de síntomas posteriores a la inoculación del primero sobre plántulas de oyamel de aproximadamente un año y de bacterias sobre tubérculos de papa, indica el carácter anodino de ambos. Por otra parte, no obtienen algún hongo que sea dañino a hojas y raíces.

Cibrián (*op cit.*) reporta la existencia de un hongo de pudrición no identificado en las raíces de varios árboles con follaje verde en la zona afectada. El síntoma que presentan las raíces poco tiempo después de morir consiste en un cambio de color del xilema; aquellas en que la pudrición es más avanzada se evidencia un "abanico" micelar parecido al de Fomes annosus, pero no se han podido obtener estructuras reproductoras que lo identifiquen. En las raíces con pudrición muy avanzada se ha observado un deterioro del floema, encontrándose micelios entre los tejidos leñosos. Aún no se ha determinado el papel que este hongo pudiera jugar en la muerte del arbolado.

INSECTOS

Los insectos que más se han asociado con la patología de Abies religiosa son el descortezador Pseudohylesinus variegatus(Blandford) y el desfoliador del oyamel Evita hyalinaria.

Por lo que concierne al ciclo de vida del descortezador y sus ataques, sus larvas se desarrollan completamente en 3 estadios y al final de su ciclo penetran a la madera a diferentes profundidades para construir la cámara de pupación y así emerger como adulto. Según los resultados obtenidos por Aguirre y Bernal (1988) los ataques de este descortezador sólo son exitosos en árboles con copas en avanzado estado de declinación y con un color de follaje café oscuro, mientras que oyameles con copas en mejor estado repelen su ataque. De acuerdo a ello, los insectos juegan un papel secundario en la muerte del oyamel ya que su penetración se facilita sólo en el arbolado muy deteriorado. P. variegatus infesta mayormente las partes altas de los árboles y en menor grado las inferiores, lo que viene a presentar un patrón de muerte descendente.

Con el objeto de determinar el papel que este descortezador juega en la muerte del arbolado, la División de Ciencias Forestales de la Universidad Autónoma de Chapingo obtiene muestras de corteza de 420 árboles con follaje verde -sano-. De ellas, el 98% muestra que los ataques por nuevos adultos son infructuosos ya que al penetrar al floema -para ovipositar- mueren absorbidos por la resina. Los ataques exitosos se registran en árboles con follaje café o carente de él; las larvas se encuentran en árboles que han muerto varios meses antes (Cibrián, *op cit.*).

Muñiz (1987) reporta que la presencia de algunos insectos que normalmente se les califica de plagas, están presentes en los sitios estudiados, pero en número tan reducido que no llegan a ser significativos, y aún cuando manifiestan intentos de proliferación, al siguiente ciclo casi desaparecen. Todos los insectos y ácaros dejan testimonio de su presencia sin causar la muerte de algún individuo.

Se concluye con base en los resultados, que ciertos patógenos y/ o insectos contribuyen y/o aceleran la muerte de los árboles pero no son el principal agente de su declinación (Alvarado, *op cit.*).

EDAD

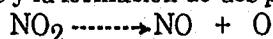
Los estudios dendrológicos -descritos previamente- realizados por Alvarado *et al.* (1993) en tocones de árboles del Cementerio, demuestran que la muerte del arbolado incluye individuos desde 57 hasta 148 años de edad; siendo la categoría de 99 a 108 años la dominante. Dado que en Vázquez (1987) han sido reportados árboles de hasta 180 años, puede decirse que la muerte del arbolado no es un fenómeno de senectud natural.

PRESENCIA DE FUENTES CONTAMINANTES Y MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AIRE

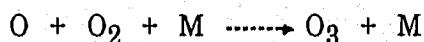
CONTAMINACION POR OZONO

Los procesos de combustión de madera, carbón, petróleo y gas natural además de CO₂ y H₂O, dan origen a productos parcialmente oxidados como el CO, las olefinas (alquenos) y elementos de hidrocarburos no quemados del combustible. Además de que algunos de ellos pueden producir SO₂, las altas temperaturas alcanzadas durante la combustión promueven la oxidación del nitrógeno contenido en el aire formando así óxidos de nitrógeno (NOx), particularmente óxido nitroso (NO) que ante ciertas interacciones atmosféricas se convierte rápidamente en dióxido de nitrógeno (NO₂) (Schuck, 1973).

El NO₂ absorbe la radiación de un amplio rango del espectro violeta y ultravioleta (con longitud de onda menor a 242 nm) proveniente de la luz solar que alcanza la superficie de la Tierra (Stephens, 1969). Tal absorción de energía es seguida inmediatamente de un rompimiento de los enlaces químicos y la formación de dos productos, el NO y átomos de oxígeno



Esta reacción ocurre rápidamente hacia la derecha, mientras que en sentido opuesto es demasiado lenta para ser significativa cuando la concentración de NO es baja. Cuando el nivel de NO₂ es bajo, los átomos de oxígeno instantáneamente se combinan con el oxígeno del aire para originar ozono (O₃) (Dugger y Ting, *op cit.*; Schuck, *op cit.*; Stephens, *op cit.*).



(M es cualquier molécula que absorba la energía de reacción, sin ésta, el átomo de oxígeno entrante desplazaría uno de los átomos de oxígeno de la molécula de O₂). Esta reacción ocurre por la presencia de oxígeno molecular; algunas pruebas indican que los átomos de oxígeno en el aire tienen una vida media de tan solo diez millonésimas de segundo debido a esta reacción.

El ozono a su vez reacciona instantáneamente con el NO para volver a formar NO₂.



El resultado neto es un estado de equilibrio que se establece en el transcurso de algunos minutos. Cuando se alcanza, el único proceso continuo es la absorción de luz y su conversión en calor (Stephens, *op cit.*).



Esta rápida reacción cíclica no produce cambios totales en el sistema y en ausencia de reacciones de competencia, no se da una conversión neta del NO a NO₂, ni se observan niveles elevados de O₃ (Schuck, *op cit.*; Dugger y Ting, *op cit.*).

Este punto de equilibrio puede modificarse por la intervención de reacciones tan rápidas como las que ocurren en esta ecuación, cosa que no sucede en una atmósfera contaminada que contenga tan solo algunas partes por millón de contaminantes. Lo que puede alterar ese

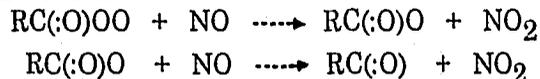
equilibrio o aún nulificarlo son procesos aún más lentos pero que, o bien alteran la cantidad total de NOx o afectan el balance entre NO y O₃. Tal es el caso de los procesos que aún siendo lentos, convierten al NO en NO₂ sin consumir una cantidad equivalente de O₃, lo que conlleva a su acumulación; esto ocurre en las reacciones con los hidrocarburos (Stephens, *op cit.*).

Los escapes de los automóviles han sido identificados como la fuente principal de hidrocarburos olefinicos y óxidos de nitrógeno esenciales en las reacciones fotoquímicas (Cvetanovic, 1964).

Algunos hidrocarburos pueden competir con el oxígeno molecular por los átomos de oxígeno y con el NO por el O₃, el resultado neto después de una o dos horas es un desbalance del ciclo fotolítico del NO₂. Las repercusiones atmosféricas inmediatamente observables son la constante conversión de todo el NO en NO₂, la formación de productos de oxidación de hidrocarburos como aldehídos y cetonas, la formación constante de niveles elevados de O₃ y de derivados de hidrocarburos tales como los nitratos de peroxiacetilo (PAN's) (Schuck, *op cit.*).

El O y el O₃ inician la oxidación de los fragmentos gaseosos de hidrocarburos, los cuales a su vez oxidan el NO en NO₂ sin destruir el O₃. El O₃ se acumula en la atmósfera.

Dos de estas reacciones son:



La niebla veraniega presente sobre áreas pobladas de vegetación lejanas a los centros urbanos es atribuida a los productos de foto-oxidación de terpenos y óxidos de nitrógeno (Dugger y Ting. *op cit.*).

CONTAMINACION EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CD. DE MEXICO

La Cd. de México es susceptible de sufrir problemas de contaminación por ozono debido a las altas emisiones antropogénicas de contaminantes atmosféricos y factores meteorológicos que promueven su formación (Bravo *et al.*, 1988).

Bravo *et al.* (1987) presentaron un inventario para emisiones vehiculares en que se registran 11 000 ton al día (4 000 000 ton al año) de las cuales 89% es CO, 9.15% hidrocarburos (HC), 0.9% son óxidos de nitrógeno (NOx) y 0.3% óxidos de azufre (SOx) y 0.4% partículas. A pesar de que los hidrocarburos y óxidos de nitrógeno constituyen poco más del 10% de estas emisiones, los autores consideran que su importancia en la generación de oxidantes fotoquímicos los hace ser el problema potencial más serio de la calidad del aire en la ZMCM.

De estos oxidantes, el ozono es el contaminante principal y su concentración se eleva muchas veces a lo largo del año. Otros oxidantes como el PAN pueden formarse, pero según Bravo *et al.* (1987) pueden considerarse de menor importancia que el ozono. En ello coincide Guderian (*op cit.*) quien afirma que las emisiones fitotóxicas de ozono son las más ampliamente distribuidas y las que generalmente ocurren en mayores concentraciones en el ambiente, comparadas con las de PAN.

Las fuentes de emisión de precursores antropogénicos son en primer lugar los automóviles (con NOx y NMHC -hidrocarburos no metano-) (el parque vehicular asciende a más de tres millones en 1985), la industria ligera y pesada (NOx, NMHC) y expendios de gasolina (NMHC) (Bravo *et al.*, 1988; De la Isla y Krupa, 1990).

En décadas pasadas los motores, que empleaban gasolina adicionada con tetraetilo de plomo para elevar el índice de octanaje, descargaban a la atmósfera compuestos contaminantes

o precursores como hidrocarburos parcialmente oxidados, CO, NOx y partículas carbonáceas con óxidos de plomo, además de CO₂ y H₂O.

La gran inquietud pública por los altos índices de contaminación lleva a la eliminación del tetraetilo de plomo, lo que se traduce en una disminución del índice de octanaje y con ello una disminución en la eficiencia del motor. Como respuesta debe haberse modificado la formulación de las gasolinas, posiblemente con la adición de hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos de cadena corta que aumentan el índice de octanaje (gasolina Nova Plus).

Las emisiones de vehículos que utilizan esta gasolina incluyen una serie adicional de subproductos de combustión como n-butano, etileno, propileno, benceno, tolueno y m-xileno que constituyen un potencial importante en la formación de oxidantes fotoquímicos. Se ha registrado que desde el cambio de gasolina los valores de ozono han aumentado (Bravo *et al.*, 1988).

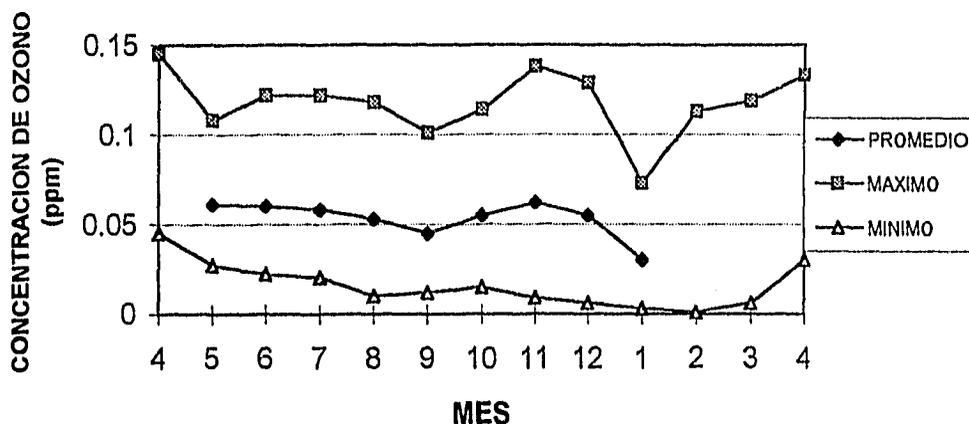
CONCENTRACIONES DE OZONO EN EL DESIERTO DE LOS LEONES

Como consecuencia del transporte de la masa de contaminantes emitidos en la parte norte y centro de la ZMCM por acción de los vientos y debido a la acción de la radiación solar en esta masa, se registran altos niveles de ozono en la parte sur y suroeste de la ciudad (Bravo *et al.*, 1988; Cibrian, *op cit.*). Estas condiciones se apoyan con la evidencia de que el aire contaminado de áreas urbanas puede ser transportado a distancias de 48 a 64 km (Treshow, *op cit.*) e inclusive, por ejemplo, que el ozono originado en la Cd. de los Angeles, California es llevado hacia montañas localizadas a 75 millas (120.6 km.) de distancia -bajo ciertas condiciones meteorológicas (Davis y Wood, 1972). A este respecto, Ruiz (comunicación personal) sugiere que gran parte del ozono presente en elevadas concentraciones en las zonas boscosas es producido in situ, a partir de precursores que provienen de las zonas urbanas (NOx), y de aquellos de origen biogénico (HC)

Como parte de un estudio sobre cambio climático y depositación atmosférica, la Comisión Forestal de Norteamérica perteneciente a la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), instaló en 1990 una estación de monitoreo de ozono en el Desierto de los Leones (en el exconvento) a unos 10 km al oeste del límite urbano de la Cd. de México y a 25 km del centro de su zona más densamente urbanizada (Miller *et al.*, 1994).

Debido a que la consulta de la información que ahí se obtiene está restringida, los registros con que se cuenta en este trabajo sólo comprenden algunos meses de 1990 y de 1991; sin embargo, se considera que son de utilidad ya que ofrecen ciertos indicios sobre el comportamiento de este contaminante en dicho lugar.

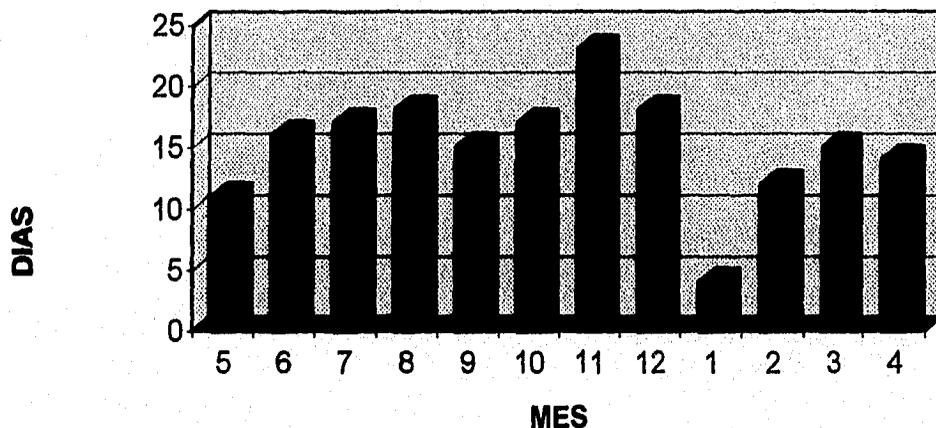
La gráfica 1 muestra las concentraciones promedio mensuales totales, máximas y mínimas desde los meses de abril de 1990 a abril de 1991; sin embargo los registros de algunos meses son incompletos en mayor o menor grado.



GRAFICA 1. Concentraciones promedio mensuales de ozono en el Desierto de los Leones

Tomando en cuenta que la norma de calidad de aire tiene como límite permitido una concentración de ozono de no más de 0.11 ppm promedio por hora (Bravo *et al.*, 1987) se tiene como primera consideración el número de días al mes en que es violada dicha norma (se toma como violación las concentraciones mayores de 0.11 aunque sean tan solo por una hora).

Según la gráfica 2 el número mínimo de violaciones al mes es de 3 días en enero de 1991 y de 22 en noviembre de 1990, con un promedio de 14.5 días al mes. La cantidad total de violaciones es de 175 días de 303 que fueron monitoreados en el transcurso de un año, esto es el 57.75% anual.

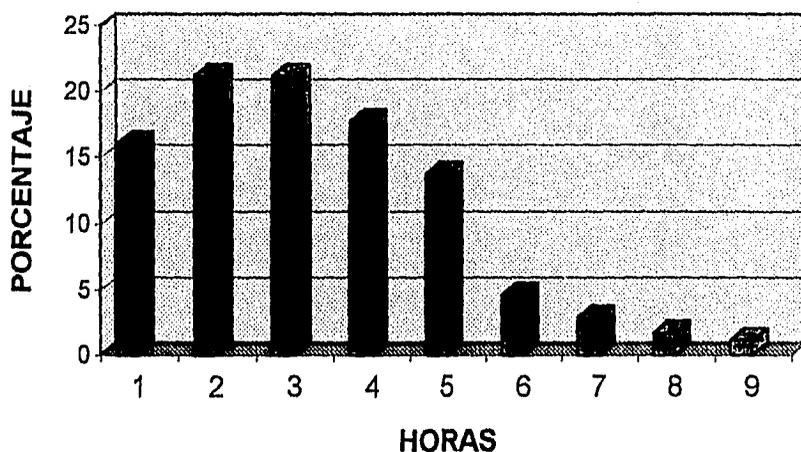


GRAFICA 2. Número de días que se excede por mes la Norma Mexicana de la Calidad del Aire para ozono en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

De acuerdo al National Ambient Air Quality Standard (NAAQS) la concentración para oxidantes fotoquímicos es de $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ó 0.08 ppm máximo sin exceder una hora una vez al año (Guderian, *op cit.*).

A lo largo del año el límite llega a rebasarse hasta por 9 horas (incluyendo las horas con concentraciones de 0.11 ppm) aunque esos casos constituyen sólo el 1.14% de las veces; mientras

que la mayoría de las violaciones es de 2 a 3 horas (42.28%), siendo también importantes los valores de 4 y 5 horas (17.7% y 13.71% respectivamente) ver gráfica 3.



GRAFICA 3. Distribución del número de horas que se excedió la Norma de Calidad del Aire para ozono en el período de 1990 a 1991

La gráfica 1 de concentraciones promedio mensuales máximas demuestra que con frecuencia se sobrepasan los valores de 0.11 ppm, ya que se tienen promedios de hasta 0.138 ppm en el mes de noviembre de 1990 y sólo en dos casos -mayo 1990 y septiembre 1990- el promedio no sobrepasa este valor pero alcanza 0.100 ppm.

Por otra parte, la gráfica de promedios mensuales totales demuestra que a lo largo del año las concentraciones se mantienen en un rango de 0.045 y 0.062 ppm.

CONCENTRACIONES MINIMAS DE OZONO QUE SON DAÑINAS A LA VEGETACION.

Solamente se ha determinado para pocas especies vegetales las concentraciones mínimas de ozono que les son dañinas, pues la sensibilidad varía mucho. Pinus ponderosa Laws muestra síntomas sólo después de una fumigación de 0.50 ppm durante 9 h/día en el transcurso de 9 a 18 días continuos; en cambio Pinus strobus L. presenta daños después de someterse a concentraciones de 0.065 ppm durante 4 h. La mayoría de las especies vegetales más sensibles como Nicotiana tabacum var. Bel W-3 entre otras, que es frecuentemente usada como indicadora de ozono, son susceptibles a concentraciones de 0.10 ppm durante 2 h. (Davis y Wood, *op cit.*).

Las hojas del año en curso o último crecimiento anual (UCA) de algunas especies son susceptibles de padecer daño agudo con concentraciones de 0.03 ppm durante 48 h y 0.07 ppm durante 4 h. (Guderian, *op cit.*).

Después de tomar en cuenta estas consideraciones y analizando las gráficas relativas a la concentración de ozono en el Desierto de los Leones, no cabe duda de que este contaminante debe jugar un papel determinante en la salud de la vegetación de dicho lugar.

MATERIAL Y METODOS

AREA DE ESTUDIO

El Parque Cultural y Recreativo Desierto de los Leones se localiza al suroeste de la zona metropolitana de la Ciudad de México en la Sierra de las Cruces, particularmente en las delegaciones de Cuajimalpa y Alvaro Obregón. Se sitúa entre los 19° 19'00" y los 19° 13'27" de latitud norte, y los 99° 20'00" y los 99° 17'40" de longitud oeste (Mapa 1). Comprende una superficie de 1529 ha. El nivel altitudinal más bajo es de 2800 msnm, mientras que el más alto supera los 3800 msnm; de ahí que sea posible encontrar variaciones climáticas notables dentro de esa pequeña superficie, aunque puede considerarse que en general el clima es semifrío subhúmedo C(W2). El período de mayores temperaturas se presenta de abril a junio, con una disminución en septiembre que se acentúa de noviembre a febrero. La temporada húmeda se verifica durante siete meses, iniciándose en abril para concluir en octubre (Rodea, *op cit.*; Vázquez 1987).

Dentro de los límites del parque existen como especies dominantes dos coníferas: Abies religiosa (oyamel) y Pinus hartwegii. El oyamel tiene como intervalo altitudinal 2560 msnm como límite inferior y 3660 msnm como límite superior, siendo la amplitud de 2900 a 3200 msnm aquél en que se encuentra mejor representado. Por su parte Pinus hartwegii se localiza desde los 3200 msnm al límite altitudinal máximo de la vegetación (Madrigal, 1964; Vázquez, *op cit.*).

SITIOS DE MUESTREO

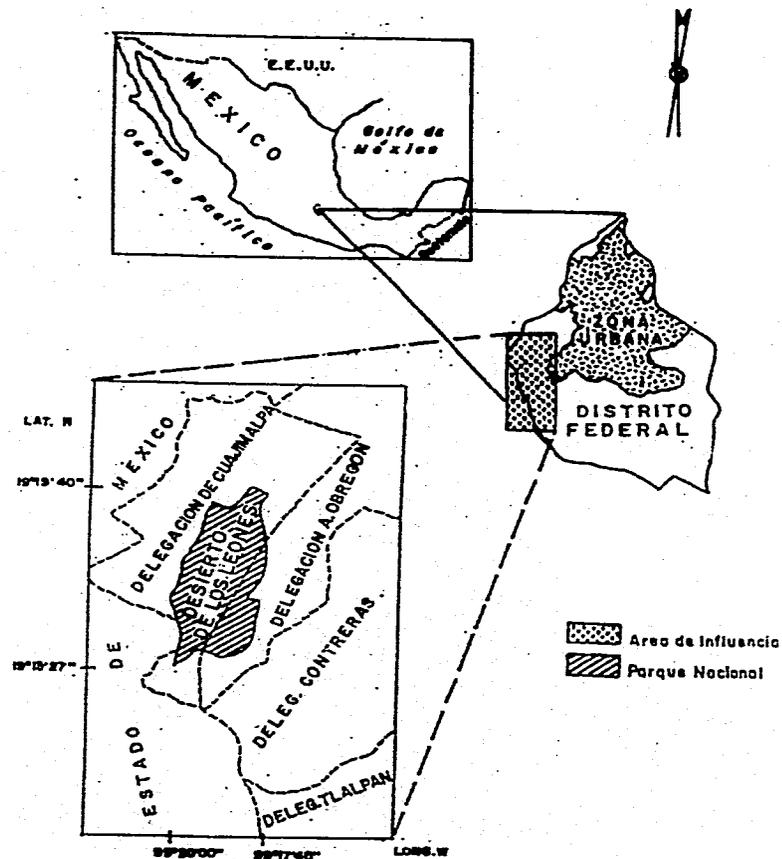
El muestreo se llevó a cabo en el arbolado de Abies religiosa localizado en las áreas con mayor mortandad dentro del bosque del Desierto de los Leones conocidas con el nombre genérico de cementerios; particularmente en tres de ellos: Cementerio, Casamanero y Lobos. Aunque originalmente se consideraban 5 cementerios, incluyendo los 3 anteriores, Coloxtitla y Goteadero, este último se fusionó a través del tiempo con Casamanero (Vázquez, 1987).

Estos lugares han sido objeto de limpiezas forestales, siendo más intensas en Cementerio, ubicado más al noreste del parque, y menores en Lobos, más hacia el suroeste (Mapa 2A)

Los cementerios se localizan en terrenos ondulados con pendientes mayores de 20% y altitudes de 3,100 a 3,450 msnm. Los suelos en estos sitios son profundos (>150 cm), de color café grisáceo oscuro, texturas francas y franco-arenosas, drenaje superficial rápido, capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) moderada (17 a 20 meq/100 g), predomina calcio (5.3 a 7.4 meq), materia orgánica moderada (3.5%), fósforo aprovechable pobre (1.4 a 2.1 ppm), pH ligeramente ácido (6.3 a 6.4), sin sodio intercambiable. Se acepta que a unos 3,200 msnm hay una precipitación pluvial de 1,300 mm anuales que se distribuyen en 100 ó más días con lluvia apreciable. Abundan los días nublados y con rocío (Vázquez, 1987).

Los sitios estudiados se encuentran en cañadas o laderas con orientación hacia la zona metropolitana de la Ciudad de México (Fig. 9A), la cual puede observarse desde "El Cementerio" (Fig. 9B).

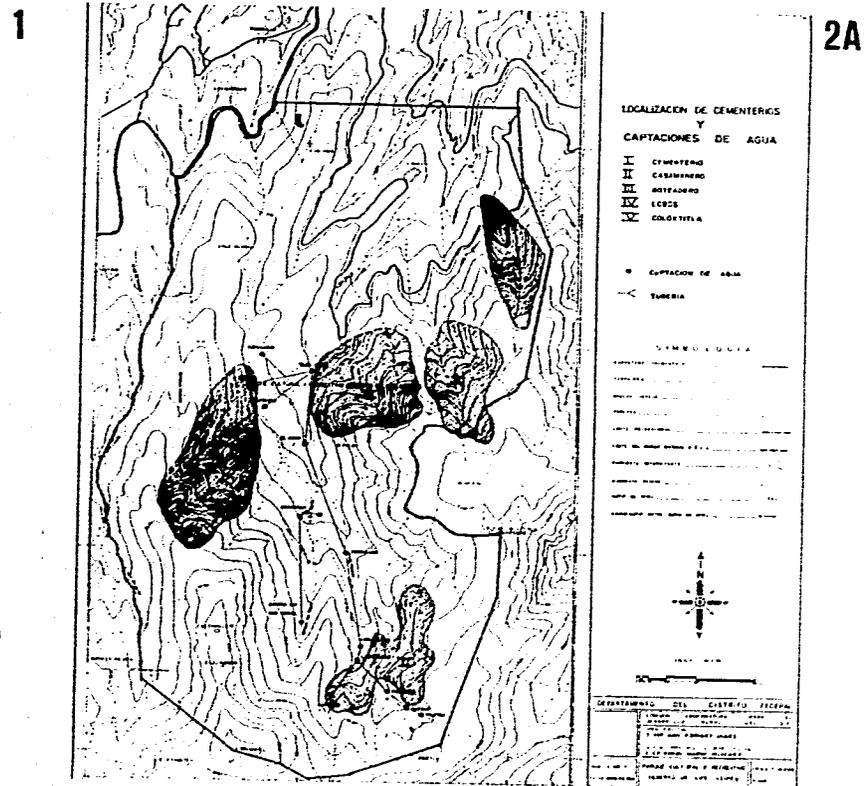
En lo que respecta al sitio testigo, se seleccionó originalmente el bosque de El Chico, Hgo., pero lamentablemente éste presenta severos síntomas de deterioro de origen biótico - insectos desfoliadores-. Se escogió alternativamente un sitio en las laderas del Popocatepetl, Méx. en una zona boscosa del camino a Tlamacas, unos 13 km antes del Paso de Cortés; región con una altitud de 3,000 a 3,500 msnm.



MAPA 1. Localización del área de estudio (tomado de Rodea, 1988)

MAPA 2A. Localización de "cementeros" en el Desierto de los Leones (tomado de Vázquez, 1987).

MAPA 2B. Cuenca del Valle de México y patrón regular de flujo de viento dominante (* Desierto de los Leones y + Ajusco) (tomado de Bravo et al., 1988).



2A



2B

TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo incluyó:

Exploración de los síntomas en las acículas

Esta se efectuó en dos ocasiones; la primera a manera de reconocimiento inicial y la segunda en la comprobación de los síntomas de las muestras empleadas para los estudios histoquímicos y citológicos, y se llevó a cabo por:

- . Observación directa en los individuos.
- . Obtención de muestras de las ramas.

El primer caso incluyó organismos jóvenes cuyas ramas se encontraban accesibles para su reconocimiento, ya fuera en cementerios (ejemplares de reforestación o plántulas de regeneración natural), o en zonas aledañas.

El segundo se empleó exclusivamente en el arbolado adulto de los tres cementerios ya que su deterioro es tal, que las ramas quedaban fuera del alcance y fue preciso cortarlas para apreciar su estado.

Determinación del vigor del arbolado

Se basó en una modificación de la clave de caracterización fisonómica de Paz (1989). Esta clave comprende la comparación del oyamel en su forma fisonómica saludable respecto a sus diferentes y más significativos estados, que se observan en el bosque hasta el momento en el que el oyamel está completamente muerto. Las características son las siguientes:

- Porcentaje de longitud de fuste con follaje vivo: consiste en hacer una comparación de la longitud que tendría la copa de manera normal (100%), con la que presenta el individuo en el momento de la evaluación; independientemente de que se trate de una copa secundaria, esto es, de aquélla que se forma como respuesta del oyamel al tratar de recuperar la copa deteriorada.

- Porcentaje de ramas muertas en la copa actual: se evalúan las ramas muertas, muriendo o ausentes de la copa; esto permite estimar la cantidad de follaje vivo que tiene el oyamel, siendo complementaria a la anterior.

- Porcentaje de copa original: describe, del porcentaje de longitud de fuste con follaje vivo, cuánto corresponde a la copa original, por lo que se elimina la copa secundaria.

- Condición de la punta: se refiere al daño que ésta ha sufrido por el agente causal. La condición puntiaguda representa el estado normal; muerta con recrecimiento, significa que el vigor del árbol es casi normal; redondeada o plana indican que el árbol ha dejado de crecer; y muerta sin recrecimiento, que el vigor ha disminuido considerablemente.

La clave es la siguiente:

CARACTERISTICAS	CATEGORIAS	VALOR
- Porcentaje de longitud de fuste con follaje vivo.	100 - 85	1.00
	80 - 65	0.75
	60 - 45	0.50
	40 - 25	0.25
	20 - 0	0.00
- Porcentaje de ramas muertas o ausentes en la copa actual.	0 - 20	1.00
	25 - 40	0.75
	45 - 60	0.50
	65 - 80	0.25
	85 - 100	0.00
- Retención del follaje.	6 años	1.00
	5 - 4	0.75
	3	0.50
	2 - 1	0.25
	0	0.00
- Porcentaje de copa original	100 - 85	1.00
	80 - 65	0.75
	60 - 45	0.50
	40 - 25	0.25
	20 - 0	0.00
- Condición de la punta	Puntiaguda	1.00
	muerta con recrecimiento	0.66
	plana o redondeada	0.33
	muerta sin recrecimiento	0.00

Con la suma de los valores obtenidos en cada uno de los cinco atributos medidos se obtienen los siguientes valores de vigor

5.00 - 4.16	muy bueno
4.15 - 3.33	bueno
3.32 - 2.50	moderado
2.49 - 1.67	pobre
1.66 - 0.84	muy pobre
0.83 - 0.00	casi muerto

Estos valores se asignaron a cada individuo y posteriormente se calculó el porcentaje de cada uno de los valores obtenidos del arbolado por sitio y el porcentaje total (de los tres sitios).

Determinación del daño por agentes bióticos y físicos

El estudio de las características del arbolado también incluyó el reconocimiento de factores bióticos o físicos que pudieran estar afectando su vigor; de acuerdo a ello se clasificaron de la siguiente manera:

TIPO DE DAÑO	CARACTERISTICAS	GRAVEDAD DEL DAÑO
FACTORES BIOTICOS		
- Descortezadores	. galerías de insectos adultos . abundantes grumos brillantes y frescos . pocos grumos y secos . ausencia	. severo . moderado . ligero . sin daño
- Muérdago	. en gran cantidad . regular . poco . ausente	. severo . moderado . ligero . sin daño
- Tumores	. muchos . algunos . pocos . ausentes	. severo . moderado . ligero . sin daño
- Desfoliadores	. 100 a 75% de las hojas dañadas . del 75 al 50% . del 50 al 25% . del 25 al 0 %	. severo . moderado . ligero . sin daño
DAÑOS FISICOS		
	. Dañado por rayos . Lesión abierta transversal > a la mitad de la circunferencia . Lesión vertical > a 3 veces el diámetro . Ausencias	. severo . moderado . ligero . sin daño

Muestreo de acículas

Una vez reconocida la sintomatología foliar y comprobado su distribución generalizada, se realizaron los muestreos en junio y julio de 1992 y abril y mayo de 1993, aproximadamente entre 11:00 a.m. y 3:00 p.m. Cada muestreo incluyó un árbol maduro por sitio y se realizó a una altura aproximada de entre 4.00 y 5.00 m, dependiendo de la accesibilidad de las ramas. Para información adicional se tomaron acículas de plántulas en Cementerio, Lobos y Tlamacas (un individuo de cada sitio).

La edad de las acículas incluyó hasta los tres años, que fue la retención máxima -pero muy escasa- (Fig. 9C). En el presente trabajo se hace alusión a la edad denominando a las acículas indistintamente como hojas de 1,2 y 3 años o bien hojas del último crecimiento anual (UCA), 2do y 3er año, respectivamente.

Fijación

En el primer muestreo, todas las acículas se fijaron en una solución en frío de glutaraldehído al 3 % en amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M, pH 7.2. El tiempo de fijación fue de 6.00 h para el tratamiento de microscopía óptica y de 2.00 h para el de microscopía electrónica.

En el primer caso se obtuvieron 10 acículas por categoría de edad, las que fueron seccionadas en 3 porciones, separándose según la porción (ápice, región media y base). En el segundo se obtuvieron otras 10 acículas por categoría de edad, considerándose las mismas porciones, pero cada una dividida en fracciones de aproximadamente 1.00 mm.

En el segundo muestreo se emplearon dos fijadores en frío para estudios de microscopía óptica:

- Glutaraldehído al 3% disuelto en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y sacarosa 0.06 M, pH 7.2. Las acículas (7 por categoría de edad) se fijaron inicialmente sin cortar durante 12.00 h, posteriormente se cortaron en tres secciones y se fijaron durante 10.00 h más.

- Formaldehído-ácido acético (FAA). Las acículas (5 por categoría de edad) se fijaron sin cortar y se conservaron en el fijador hasta su inclusión.

En microscopía electrónica las acículas (7 por categoría de edad) se colocaron en el mismo fijador de glutaraldehído; las regiones medias se fijaron primeramente durante 12 h, posteriormente se fraccionaron en secciones de 1 mm y se fijaron nuevamente durante 10 h. Una postfijación en una solución de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo amortiguador se empleó durante 2 h previa a la inclusión, para permitir mayor contraste.

TRABAJO DE LABORATORIO.

Las muestras para las pruebas histoquímicas se incluyeron en "paraplast" según la técnica descrita por Johansen (1940) con un máximo de 3 acículas por bloque, las cuales se seccionaron a un grosor aproximado de $8\mu\text{m}$, colocándose hasta 6 cortes por portaobjetos. Las acículas para análisis estructurales finos se incluyeron en resina epóxica ("epon") según Mollenhauer (1971), con 2 muestras por bloque; para estudios en microscopía óptica se cortaron en secciones de $1\mu\text{m}$, con 5 ó 6 por portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina; para microscopía electrónica el grosor fue de 50 nm, teñidos con citrato de plomo y acetato de uranilo, y colocados en rejillas (4 en cada una).

Las pruebas empleadas en secciones transversales, longitudinales y sagitales de "paraplast" comprendieron las técnicas: Dicrómica de safranina-verde rápido para determinar la estructura celular, ácido peryódico-schiff (PAS) para detección de carbohidratos totales, azul negro de naftol para proteínas y rojo "O" de aceite para lípidos, según Jensen (1962). Para evidenciar los compuestos fenólicos se empleó el OsO_4 , por su capacidad de reaccionar con polifenoles como antocianinas y taninos, pero particularmente con o-difenoles y sus respectivas o-diquinonas (Czaninski y Catesson, 1974). Los tejidos fueron rehidratados en una serie descendente de etanoles hasta agua y montados en jalea.

La prueba de carbohidratos resultó muy útil en la identificación de granos de almidón en los cloroplastos y de carbohidratos en células del floema; la de proteínas no ofreció suficiente resolución para determinar alteraciones -coagulación- en su estructura.

La fijación en FAA no fue exitosa ya que provocó plamólisis de todos los tejidos y oscurecimiento de la estructura celular. Las preparaciones así tratadas sirvieron únicamente para demostrar el estado general de los tejidos: presencia o ausencia de hiperplasia, hipertrofia, daños por insectos, necrosis, así como presencia o ausencia de almidón.

El rompimiento de los tejidos se puede provocar por fallas en la técnica de deshidratación y/o inclusión; particularmente la endodermis es difícil de conservar intacta tanto en "paraplast" como en "epon".

Comparativamente la inclusión en "epon" ofrece las mejores condiciones para el estudio de la estructura celular, ya que en parafina la resolución es mucho menor y los tejidos son más susceptibles de romperse, sin embargo ofrece mayor área de análisis y permite la identificación de metabolitos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los estudios de diagnóstico parten de lo general a lo particular, ya que es a través de los síntomas macroscópicos como se percibe primeramente el estado patológico, aunque realmente sean el eslabón final de una serie de alteraciones que tienen su origen en lo íntimo de las células. Es por ello que la presentación de los resultados se expone en sentido opuesto -de los síntomas microscópicos a la caracterización de síntomas visuales- a fin de ir sentando las bases que contribuyan a la explicación progresiva de los diferentes fenómenos.

La discusión de los resultados obtenidos en Abies religiosa en relación a un tema en particular, se presenta individualmente en cada capítulo y se destaca en el texto al quedar separada de los resultados por un mayor espacio.

Para proceder a la exposición de los resultados y a su discusión baste hacer la siguiente consideración: los exámenes de microscopía de luz señalan que es en el parénquima en empalizada donde se localizan de manera más conspicua los daños, es por este motivo que los análisis, sobre todo a nivel ultraestructural, se enfocan fundamentalmente en este tejido, pero sin dejar a un lado el resto de ellos.

EFFECTOS A NIVEL ESTRUCTURAL

PLASMALEMA Y PROTOPLASMA

La evidencia de daño en el plasmalema de parénquima en empalizada sólo es conspicua en casos de separación de la pared (Figs. 2C, 2D y 5E), fenómeno que va acompañado de una mayor o menor degeneración del protoplasma, el cual tiende a desplazarse al centro celular en ausencia del contenido ergástrico de la vacuola. Este evento que involucra células aisladas o pequeños grupos es poco frecuente en Cementerio y Casamanero, y es más común en Lobos (Tabla 1); además se aprecia en las muestras incluídas en resina epóxica donde se manifiesta mejor la estructura celular.

Además del protoplasma en avanzado estado de degradación asociado a daños conspicuos en el plasmalema (fig. 2D y 5E), son evidentes otros tipos de alteraciones pero sin que exista manifestación de daño en esta última y que consisten en la reducción en cantidad del protoplasma y el aumento de la densidad del citosol, lo que dificulta en mayor o menor grado la resolución de los organelos (Figs. 1E a 1G, 2A, 2B, 3B a 3F, Tabla 1). Estos estados estructurales contrastan con otro en el que el citoplasma es abundante con citosol claro, donde resaltan numerosos ribosomas y organelos (Figs. 1A a 1D y 3A), y que se presenta casi exclusivamente en los tejidos más jóvenes (menores o iguales a 1 año).

Aún cuando el aumento en densidad del protoplasma puede apreciarse en Tlamacas (Figs. 1E y 3C), ahí se hace aparente a partir de los 2 años, donde se le encuentra principalmente en cantidad moderada, mientras que en cementerios se evidencia desde 1 año y más reducido (Fig. 1F y Tabla 1).

TABLA I. ESTADO ESTRUCTURAL DE LOS COMPONENTES CELULARES DE PARENQUIMA EN EMPALIZADA DE LOS 4 SITIOS ESTUDIADOS.

COMPONENTES CELULARES	SITIOS Y EDADES DE LAS ACICULAS (EN AÑOS)											
	TLAMACAS			CEMENTERIO			CASAMANERO			LOBOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PLASMALEMA												
- bien	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
- separado de pared					X		X	X		X		X
PROTOPLASMA												
<u>estructura</u>												
- clara	X	X	X	X	X		X			X		
- densa		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
- degradada				X	X					X	X	X
<u>cantidad</u>												
- abundante	X											
- moderada		X	X	X	X		X			X		X
- poca		X	X	X	X		X			X	X	X
- escasa			X		X	X	X	X	X			
MICROCUERPOS												
<u>membrana externa:</u>												
- bien evidente	X			X			X					
- contorno obscuro		X					X			X		
- difusa							X					
- no evidente			X	X	X		X					
<u>diferenciación</u>												
- sí	X	X		X	X		X			X	X	
- no (o ausente)			X		X	X		X	X	X	X	X
MITOCONDRIAS												
<u>forma</u>												
- alargada	X	X	X	X			X	X		X	X	X
- redonda	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<u>membranas externas</u>												
- ambas bien evidentes	X											
- evidentes en partes		X	X				X					
- contorno denso		X	X	X			X	X		X		X
- no evidentes				X	X	X	X	X	X	X	X	
<u>crestas</u>												
- bien dilatadas	X	X	X				X	X		X*	X*	
- deprimidas				X	X		X	X			X	
- sin crestas			X	X	X	X	X	X		X	X	X
<u>degradación</u>												
			X	X	X		X	X		X		X
<u>diferenciación</u>												
- sí	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X
- no			X		X	X		X		X	X	X

* Dentro de la misma mitocondria escasas crestas dilatadas, no normal.

Aunque la separación del plasmalema ha sido descrita en vegetación sometida a exposiciones crónicas de ozono (Ojanperä *et al.*, 1992), ésta es mucho más frecuente en caso de exposición aguda, donde constituye uno de los primeros síntomas de la denominada fase de degradación (Thomson *et al.*, 1966). Inicialmente los cloroplastos se conservan casi intactos y el plasmalema y tonoplasto no exhiben daños estructurales -ruptura-, pero el colapso del protoplasma es ya evidente (Pell y Weissberger, *op cit.*). El proceso de degeneración progresa hasta ocasionar el rompimiento del plasmalema con daño irreversible, pues sobreviene la muerte celular con la degradación de todas las membranas, salvo los tilacoides (Thomson *et al.*, *op cit.*; Thomson, 1975; Pell y Weissberger, *op cit.*; Swanson y Thomson, 1973; Miyake *et al.*, *op cit.*; Sutinen *et al.*, 1990).

Según lo descrito, es posible que el daño observado al microscopio electrónico en muestras del último crecimiento anual de Lobos, constituya los primeros síntomas de la fase de degradación, y la destrucción de todos los organelos con la conservación de los tilacoides vistas en el tercer año, la etapa final (Fig. 2D).

Al igual que en Evans y Miller (1972a) y Stewart *et al.* (1973), en el presente estudio son muy pocos los casos de separación del plasmalema de la pared -particularmente en los sitios Cementerio y Casamanero- y en casi todos, esta membrana permanece aparentemente intacta, lo que coincide con los reportes de Swanson y Thomson (*op cit.*). La membrana se describe como "aparentemente" intacta ya que la poca resolución que alcanzan las fotografías en este trabajo, no permite apreciar cambio en su ultraestructura, sin embargo ello no implica la ausencia de daño a este nivel: las modificaciones en la permeabilidad a iones y agua en células dañadas por oxidantes fotoquímicos citados por Beckerson y Hofstra (*op cit.*) y Evans y Ting (1973), no necesariamente están relacionados a cambios estructurales del plasmalema, sino a alteraciones bioquímicas del mismo (Tingey y Taylor, *op cit.*). Runeckles y Chevone (1992) comprueban que después de exponer a ozono las membranas celular, nuclear y de cloroplastos, muestran características de transición de fases, de líquida a gel, en la bicapa lipídica. Esto sugiere cambios moleculares comparables a los que ocurren en el proceso de senectud normal, tanto en plantas como en animales.

Ya que el ozono o sus productos de reacción deben atravesar primeramente el plasmalema para alcanzar el protoplasma, es factible que esta membrana sea el sitio primario de ataque del ozono (Pell y Weissberger, *op cit.*); aunque los cambios manifiestos ocurran previamente en los cloroplastos u otros organelos (Guderian, *op cit.*), situación que resulta de acuerdo con las observaciones realizadas en el presente estudio. La baja densidad y abundancia del protoplasma en los tejidos más jóvenes de Abies religiosa, puede sugerir que es una condición peculiar de los mismos; sin embargo, en Picea abies, especie relacionada con aquélla, éste es su estado normal aún en tejidos de hasta 7 años (Sutinen, 1987), mientras que su aumento en densidad y su estrechamiento han sido descritos en casos de daño por ozono:

De acuerdo a Ojanperä *et al.* (*op cit.*), los primeros síntomas de daño por ozono involucran la reducción precoz en el contenido del protoplasma; según Swanson y Thomson (*op cit.*), el aumento en densidad ocurre en células moderadamente afectadas de Nicotiana tabacum L.; mientras que para Karenlampi (1986) este hecho, junto con la acumulación de taninos en la periferia de la vacuola, constituye un daño grave en Pinus ponderosa -situación que puede apreciarse en A. religiosa en las Figs. 3D y 3E-. De acuerdo a Sutinen *et al.* (*op cit.*), la desintegración del protoplasma, aunado al deterioro en mitocondrias, corresponde ya a la etapa de daño más avanzada, habiendo sido afectados los cloroplastos y microcuerpos en etapas previas, condición muy similar a la observada en A. religiosa en las Figs. 2C y 3D.

De acuerdo a Thomson (1975), Sutinen *et al.* (*op cit.*) y Miyake *et al.* (1989), estos eventos son resultado de la contaminación por ozono y cada uno de ellos tiene su origen en cambios en la permeabilidad del plasmalema. Conforme a ello, se puede suponer que las alteraciones celulares de A. religiosa que involucran protoplasma y plasmalema, a saber:

- Compactación y aumento precoz de la densidad del protoplasma.
- Degradación del protoplasma con separación del plasmalema de la pared.
- Colapso celular con desprendimiento del plasmalema de la pared y degradación de todos los organelos, pero con conservación de tilacoides.

constituyen diferentes manifestaciones de daño, pero derivadas de un mismo proceso -la alteración de sus membranas-. Dicho esto, se sugiere que la primera corresponde al tipo crónico que se verifica en células afectadas por largo tiempo, lo que coincide con las investigaciones de Miyake *et al.* (1989) y Ojanperä *et al.* (*op cit.*) con concentraciones relativamente bajas de ozono, y que la degradación del protoplasma con separación del plasmalema y el colapso celular corresponden al tipo de daño agudo, lo que se ajusta con lo reportado por Pell y Weissberger (*op cit.*) con elevadas concentraciones.

APARATO DE GOLGI Y RETICULO ENDOPLASMICO

Estos sistemas membranosos en general se observan con dificultad, ya sea por sus dimensiones muy reducidas o por su obscurecimiento al incrementarse la densidad de la matriz citoplasmática según estimación previa. Si a ello se añade el desconocimiento de su frecuencia natural, difícilmente constituyen una herramienta útil de diagnóstico.

MITOCONDRIAS Y MICROCUERPOS

Las alteraciones observadas en mitocondrias comprenden cambios a nivel de forma y de sistemas de membranas, tanto externas como internas, los que dificultan la diferenciación con los microcuerpos (Tabla 1).

Siendo natural que los tejidos muestren mitocondrias alargadas y redondas (Figs. 1A y 1D) según su disposición para el corte, resulta anormal que en ciertos casos aparezcan exclusivamente o en su mayoría redondas (Figs. 2G y 2H); si a esto se añade la "desaparición" de las crestas mitocondriales (Figs. 2G y 2H) y la falta de definición de sus membranas externas (Figs. 2F y 2H), se pierde toda estructura que las identifique.

Ambas membranas externas de las mitocondrias sólo se aprecian perfectamente en las muestras del último crecimiento anual (UCA) de Tlamacas (1A) y en tramos en el segundo y tercer años del mismo sitio y en el UCA de Casamanero; en el resto de los tejidos se pierde su definición para volverse contornos densos (Fig. 1D) o bien dejan de ser evidentes (Figs. 2F y 2H).

Por cuanto a las crestas mitocondriales existe otro tipo de alteración que consiste en su estrechamiento por la aproximación de las membranas que las constituyen, a lo que se ha denominado "depresión de crestas", fenómeno que sólo se presenta en algunas muestras de los cementerios (Fig. 2F).

El caso extremo de daño consiste en la degradación de la mitocondria, fenómeno que se aprecia en los cuatro sitios -aún en Tlamacas- pero preponderantemente en Lobos (Fig. 2I).

La configuración redonda de las mitocondrias ha sido descrita por Swanson y Thomson (*op cit.*) y Thomson *et al.* (*op cit.*) como dominante en tejidos moderada o severamente afectados por ozono, a diferencia de la alargada de tejidos sanos.

Por lo que toca a las membranas externas, pueden permanecer intactas aún en caso de deformación de la mitocondria (como se aprecia en la Fig. 2G), lo que no descarta la posibilidad

de cambios tempranos en su permeabilidad como origen de su turgencia (Swanson y Thomson, *op cit.*), mismos que han sido aseverados por Malhotra y Khan (1984). Por su parte Pell y Weissberger (*op cit.*) mencionan que ambas membranas se tiñen fuertemente con plomo después de su exposición a ozono, fenómeno que coincide con algunas de las muestras del presente estudio, inclusive en las de Tlamacas, por lo que quizás allí sea el primer indicio de daño que culmina en su nula resolución en los ejemplares de cementerios.

La depresión de las crestas mitocondriales ha sido reportada por Miyake *et al.* (*op cit.*) en Spinacia oleracea L., quienes consideran que es el resultado de una penetración muy acelerada del ozono más allá del plasmalema.

Finalmente según los trabajos realizados por Sutinen *et al.* (*op cit.*), la degradación de microcuerpos y mitocondrias constituyen la segunda y tercera etapas respectivamente de daño por ozono en Picea abies. Este orden de eventos apoya la hipótesis de que los organelos descritos son mitocondrias, particularmente en los tejidos de mayor edad, en tanto que los microcuerpos ya han desaparecido.

Según los estudios de Ojanpera *et al.* (*op cit.*), no existe evidencia de daño en mitocondrias de Triticum aestivum fumigada con diferentes concentraciones de ozono.

C L O R O P L A S T O S

MICROSCOPIA ELECTRONICA

En el presente estudio las micrografías ponen de manifiesto la existencia de cloroplastos que difieren estructuralmente. En un intento por caracterizarlos y explicar sus diferencias, se empleó la abundancia y localización del citoplasma como herramientas tomando como principio que el cloroplasto no está aislado sino que está asociado con los demás elementos celulares. De acuerdo a ello y según rasgos generales se distinguen:

CLOROPLASTOS A. Estos están presentes en células donde el protoplasma es abundante, sea éste claro -saludable- o denso -afectado-. Son amorfos o abultados, sin una estructura interna real, ya que si acaso tienen tilacoides bien formados, éstos se apilan escasamente en 2 ó 3 sin formar verdaderos grana y están desordenados, pero principalmente se manifiestan como manchas difusas con estroma claro/normal. Poseen algunos o varios plastoglobuli densos. A menudo se les encuentra en división (Fig. 1A).

CLOROPLASTOS B. Se localizan principalmente en células con protoplasma un tanto reducido pero aún considerable y claro. Son elípticos abultados, con tilacoides alargados que corren de uno a otro lado del cloroplasto sin formar grana. Poseen pocos o algunos plastoglobuli densos. Algunos cloroplastos pueden encontrarse aparentemente en división (Fig. 1B).

CLOROPLASTOS C. En células con protoplasma moderadamente abundante se presentan estos cloroplastos que son elípticos ensanchados o alargados, o amorfos; con tilacoides constituyendo grana muy rudimentarios, delgados y no muy bien apilados, pueden estar desordenados. Muestran pocos o algunos plastoglobuli densos (Fig. 1C).

CLOROPLASTOS D. Este tipo de cloroplasto observa las características comunes descritas normalmente en los cloroplastos. De forma elíptica ligeramente alargada o bien un poco ensanchado por la presencia de un grano de almidón de gran tamaño; con un sistema de membranas bien desarrollado, tilacoides oscuros muy bien definidos colocados en grana correctamente apilados angostos o anchos principalmente que contrastan con un estroma de electrodensidad más claro; con pocos o algunos plastoglobuli electrodensos (Fig. 1D).

CLOROPLASTOS F. Preferentemente se localizan en células con protoplasma reducido y oscuro. De forma elíptica ensanchada por el centro, ocasionalmente abultados por la presencia de almidón; en general poseen tilacoides muy bien definidos pero de color claro que contrastan con un estroma muy denso -tinción negativa- (Fig. 2J) y que se apilan en grana que difieren en grosor según el sitio y la edad (Tabla 1); tienen algunos plastoglobuli claros (Figs. 1E y 1F).

CLOROPLASTOS G. Este tipo de cloroplasto se presenta preferentemente en células con escaso protoplasma. Son abultados, casi esféricos y ostentan manchas claras muy evidentes de lo que parecen ser grana que se están disolviendo -anchos o angostos-. El estroma en el que destacan puede ser moderadamente o muy electrodenso, por lo que el contraste varía; poseen numerosos plastoglobuli claros (Fig. 1G).

CLOROPLASTOS H. Presentes en células con protoplasma escaso. Aunque los hay de forma elíptica alargada, son esencialmente abultados esféricos y muestran aparentemente la última etapa de disolución de tilacoides pues han perdido toda estructura membranosa interna por lo que se ven lisos, sin manchas; pero sus plastoglobuli que son claros y numerosos pueden llegar a llenar el cloroplasto (Fig. 2A).

CLOROPLASTOS H'. En estos cloroplastos no se evidencia ya ni el sistema membranoso interno, ni los plastoglobuli y presentan un contorno muy irregular y difuso (Fig. 2B).

Además de los síntomas ya expuestos de desvanecimiento de tilacoides, los cloroplastos manifiestan signos de otro tipo de degradación que son los siguientes:

CLOROPLASTOS I. La degradación consiste en una marcada separación o dilatación de los tilacoides, de manera que quedan espacios claros entre ellos, perdiéndose cierta integridad del granum (Fig. 2C).

CLOROPLASTOS J. El daño se ha agudizado tanto que el cloroplasto se destruye por completo y aunque las membranas externas y tilacoides permanecen, éstas quedan disgregadas. Los plastoglobuli sin embargo continúan bien adheridos entre sí (Fig. 2D).

La distribución diferencial de estos tipos de cloroplastos en las acículas de distintas edades de Abies religiosa y en los cuatro sitios estudiados se presenta a continuación.

AÑOS	SITIOS			
	TLAMACAS	CEMENTERIO	CASAMANERO	LOBOS
1	A,C	A,C,F'H	C,F',G,H	B,F',G,H,I,J
2	A,D,F*	B,F',G	G,H	F',G,H
3	A,B,F'	F',G,H	H	F',G,H,I,J
		* = con grana anchos	' = con grana angostos	

Para poder discutir y comprender este ordenamiento, es preciso tratar de dilucidar el origen de la variedad de cloroplastos.

La caracterización de los organelos fotosintéticos en el presente estudio resulta un tanto compleja ya que, según se observa, no tienen naturalmente una estructura estática, sino que manifiestan ciertos cambios asociados aparentemente con su desarrollo a lo que hay que sumar las alteraciones causadas por agentes patógenos.

La comprensión de la naturaleza estructural de los cloroplastos puede facilitarse empleando como referencia las características de cloroplastos normales en desarrollo. La información disponible pertenece a Pinus strobus, Abies balsamea y Picea abies relacionadas con la especie en cuestión. En los dos primeros casos se trata de primordios de hoja, en el último de hojas de 1 a 7 años de edad.

No obstante que en el caso de P. strobus no se describen las características de los cloroplastos, las micrografías demuestran organelos elípticos y preferentemente abultados; y aunque con un sistema membranoso interno, no muestran un desarrollo típico de grana, pues sus tilacoides se extienden de uno a otro lado del cloroplasto, o bien, apenas inician su apilamiento, particularmente en los cloroplastos elípticos (Harris, 1971). A. balsamea evidencia el mismo patrón de organización de membranas y forma, además de poseer varios plastoglobuli densos (Chabot y Chabot, 1974).

En el caso de P. abies hasta la edad de 3 años su forma elíptica ligeramente abultada permanece inalterada; poseen un sistema tilacoidal bien desarrollado, estroma homogéneo y claro, pocos plastoglobuli oscuros y membranas externas intactas. Al madurar las hojas (4 años en adelante) los cloroplastos se aplanan, se reduce su estroma, aumenta el número de tilacoides y se conservan intactas las membranas externas. Los plastoglobuli, en cantidad muy semejante al de células más jóvenes, se decoloran y casi se desvanecen. La degeneración de estos organelos ocurre sólo en las hojas de mayor edad. Los cloroplastos elípticos y planos no coexisten en una misma célula (Sutinen, *op cit.*).

Las observaciones sugieren que existe una secuencia de cloroplastos (A,B,C Y D) constituida por etapas dentro del desarrollo usual de los mismos, el cual se fundamenta en la formación de tilacoides y su organización en grana y, hasta cierto punto, en la morfología del mismo cloroplasto. Aunque el tipo "A" no se ha citado como tal en la literatura, se sugiere que corresponde a la etapa de proplasto, y los cloroplastos "B" y "C" bien pueden equipararse con los

cloroplastos en desarrollo de Abies balsamea (Chabot y Chabot, *op cit.*) y Pinus strobus (Harris, *op cit.*).

En la determinación del daño por ozono hay que ser muy cautelosos en las observaciones, a fin de evitar confundir un proceso o estado normal con el patológico. Según Thomson *et al.* (*op cit.*) los tilacoides se expanden lateralmente y el sistema de grana se modifica para dar origen a un sistema lamelar ordenado cuando las plantas han sido expuestas a ozono. Este tipo estructural se asemeja al que presentan los cloroplastos en su proceso de desarrollo -cloroplasto "B"- (Fig. 1B) y constituye el orden natural de los tilacoides en los cloroplastos de células albuminosas y células de matriz de endodermis (Fig. 2E) (Carde, 1978).

El aumento en la electrodensidad del estroma con un subsecuente obscurecimiento de la estructura del cloroplasto en células muy dañadas, es una característica constantemente asociada a la contaminación por ozono (Thomson *et al.*, *op cit.*; Thomson, *op cit.*; Swanson, *op cit.*; Heath, 1975; Pell y Weissberger, *op cit.*; Sutinen *et al.*, *op cit.*; Anttonen *et al.*, 1995); sin embargo en esos casos la electrodensidad no alcanza la magnitud de la observada en los cloroplastos "F" de Abies religiosa y la tinción de sus tilacoides es normal a diferencia del patrón de "tinción negativa" de "F" que es totalmente opuesto al ordinario. La "tinción negativa" presenta tilacoides claros sobre estroma oscuro, cuando lo común es que sean a la inversa (según se observa en los cloroplastos "D" de la Fig. 1D). En sus experimentos sobre efectos de ozono y neblina ácida sobre Picea abies, Rosenkranz *et al.* (1990) descubren este patrón anormal de tinción, pero sin poderlo relacionar con estos tratamientos ni lograr establecer sus causas.

Independientemente de los tilacoides claros de "F" que pudieran ser el resultado de la acción del ozono sobre su contenido lipídico como se analizará más adelante, puede observarse un verdadero incremento en la densidad del estroma y el obscurecimiento de su estructura puede surgir mucho antes que sea evidente un daño en la célula. Se considera que el aumento en la densidad puede ser debido a la alteración de ciertas actividades enzimáticas, o bien por la coagulación de la D-ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Thomson *et al.*, *op cit.*; Pell y Pearson, 1983; Anttonen *et al.*, *op cit.*) o el resultado de alteraciones iónicas dentro del cloroplasto y de la deshidratación del mismo inducidas por cambios en la permeabilidad en la célula (Coulson & Heath, 1974 en Heath, 1975; Swanson *et al.*, *op cit.*). El aumento de densidad puede llegar a obscurecer la estructura del cloroplasto haciendo difícil su resolución pero en células muy dañadas (Karenlampi, *op cit.*; Thomson *et al.*, *op cit.*; Swanson y Thomson, *op cit.*; Pell y Weissberger, *op cit.*).

Si bien el proceso propuesto de formación de grana supone el apilamiento gradual de tilacoides (más de 3 según Rosenkranz *et al.*, *op cit.*), la presencia de grana angostos en ciertos casos (Tabla 1), sugiere un fenómeno de simplificación o reducción de los mismos; ya sea por suspensión en la formación de tilacoides, en cuyo caso el grosor de los grana no progresa, y/o por su degradación, en el que hay un angostamiento y/o desvanecimiento de los grana.

La reducción en el número de tilacoides ha sido observada por Karenlampi (*op cit.*) en Pinus ponderosa de California, EUA, donde se ha comprobado su afectación debido a exposiciones prolongadas a ozono; por Parameswaran *et al.* (1985) en Abies alba y Picea abies de la Selva Negra (Karenlampi, *op cit.*) y por Sutinen *et al.* (*op cit.*) en Picea abies y Noble *et al.* (1980) en Populus al exponerlos a concentraciones conocidas de ozono.

De acuerdo a Rosenkranz *et al.* (*op cit.*) en Picea abies el ozono altera el ensamblaje de los tilacoides y con ello la formación de grana, lo que conlleva finalmente a una reducción en el número de grana por cloroplasto. Las diferencias en este aspecto son de carácter diagnóstico si se emplea paralelamente un testigo para compensar la etapa de desarrollo de la hoja; las diferencias en el número de tilacoides por granum observadas en cloroplastos "F" de los 4 sitios ofrecen este parámetro de diagnóstico según se analizará más tarde.

Por su parte Sutinen *et al.* (*op cit.*) reportan que en los cloroplastos afectados por ozono los tilacoides usualmente ofrecen menor resolución, es decir son más difíciles de distinguir que los testigo, y ya que Toyama 1976 (en Guderian, *op cit.*) especifica que hay desintegración de tilacoides, aquella quizá sea la primera etapa de esta desintegración. Si esto es cierto, los cloroplastos "G" y "H" pueden ser la evidencia de un estado morbozo caracterizado por una degradación del sistema de membranas interno ocasionado por ozono.

El estudio de las micrografías indica que esta degradación del sistema de membranas está íntimamente asociada con los plastoglobuli. Se puede mencionar que en general:

- La cantidad de plastoglobuli en un cloroplasto es inversamente proporcional a la cantidad de tilacoides y/o grana que éste contenga.
- La electrodensidad de los plastoglobuli tiende a ser menor en los cloroplastos "F" y los considerados como etapas de un estado patológico (G y H).

En relación al último aspecto se tratará más adelante en el capítulo de lípidos, baste decir que Karenlampi (*op cit.*), Miyake *et al.* (1989), Sutinen *et al.* (*op cit.*) y Rosenkranz *et al.* (*op cit.*) han descrito cloroplastos con abundantes plastoglobuli claros que aparecen en hojas que han estado sometidas por períodos prolongados a ozono.

Los primeros registros -con que se cuenta- que hacen alusión a los plastoglobuli, se refieren a éstos como "cuerpos electrodensos", "grandes glóbulos", o "glóbulos osmiofílicos", pero como quiera que sean nombrados, su aumento en tamaño y cantidad dentro del cloroplasto están asociados a la contaminación por ozono, particularmente tratándose de concentraciones relativamente bajas (Noble *et al.*, *op cit.*; Toyama, 1985 y Nouchi *et al.*, 1977 en Miyake *et al.*, 1984; Miyake *et al.*, 1989; Ojanperä *et al.*, *op cit.*; Wellburn y Wellburn, 1994.).

El incremento en la cantidad de plastoglobuli coincide con la reducción en el número de tilacoides en cloroplastos sometidos natural o experimentalmente a ozono en los estudios de Karenlampi (*op cit.*), Parameswaran *et al.*, 1985 (en Karenlampi, *op cit.*), Rosenkranz *et al.* (*op cit.*) y Noble *et al.* (*op cit.*). También se asocian con su desintegración (Toyama, 1976 en Guderian, *op cit.*) o bien con su desaparición (Sutinen *et al.*, *op cit.*).

Se ha observado en Picea abies que la cantidad de plastoglobuli varía a través del año, incrementándose particularmente durante el invierno (Harris, *op cit.*; Senser *et al.*, 1975; Sutinen, *op cit.*), fenómeno que va acompañado por una reducción del sistema de membranas del cloroplasto (Senser *et al.*, *op cit.*; Miyake *et al.*, 1989), el cual es capaz de recuperarse al aumento de temperatura en la primavera; mientras que en los casos de estrés los cloroplastos nunca recuperan su estructura normal o se destruyen. Senser *et al.* y Sutinen (*op cit.*) opinan que cuando los plastoglobuli están presentes, confieren una función protectora -"endurecimiento- contra el daño por congelación, aunque no explican de qué manera.

Se ha asociado también el aumento en número de plastoglobuli con el envejecimiento natural (Chabot y Chabot, *op cit.*; Miyake *et al.*, *op cit.*; Rosenkranz *et al.*, *op cit.*) lo cual se acompaña de desintegración de tilacoides más severa en época de invierno (Senser *et al.*, *op cit.*).

Los plastoglobuli son elementos del cloroplasto que constituyen reservas de lípidos y que además contienen grandes cantidades de quinonas lipofílicas como la plastoquinona, la alfa-tocoferolquinona, la alfa-tocoquinona y la vitamina K, que como las ubiquinonas, pueden jugar un papel muy importante en el transporte de electrones de la fotosíntesis (Muhlethaler, 1971; Robinson, 1993). Se ha demostrado que los proplastidios -proplastos- libres de tilacoides en plántulas etioladas contienen numerosos plastoglobuli, los que luego se vuelven algo aislados o esporádicos en los cloroplastos de plantas iluminadas. Esto constituye una evidencia de que estas estructuras representan reservas para los lípidos lamelares (tilacoides) que se acumulan en la obscuridad antes de la formación de estas membranas (Muhlethaler, *op cit.*).

Esta información quizás explica parcialmente los eventos que se están suscitando en el cloroplasto. La formación de numerosos plastoglobuli indica que se ha producido un excedente de lípidos (Muhlethaler, *op cit.*) y éste posiblemente sea la consecuencia de dos procesos:

1. Que no estén siendo requeridos para la constitución de membranas -el proceso de síntesis de plastoglobuli es continuo y no se detiene aún después de la creación del sistema tilacoidal- (Muhlethaler, *op cit.*).

2. Que sean el resultado de la degradación de este sistema membranoso. Según Rich (1970) y Butler *et al.* (1971) (en Karenlampi, *op cit.*) las gotas lipídicas pueden representar productos de la descomposición o desintegración de membranas o bien precursores que continúan acumulándose.

Ambos procesos probablemente explican el incremento de plastoglobuli y la disminución de tilacoides durante el envejecimiento, ya que en éste disminuyen las reacciones anabólicas - en este caso la formación de tilacoides- y aumentan las catabólicas -desintegración de los mismos-. Ya que estas características están presentes en hojas "jóvenes" -por cuanto al tiempo que tienen de vida- de A. religiosa, es posible que en ellas se esté constatando una inducción de senescencia prematura; de la misma manera que ocurre en Picea abies, donde el aumento en la formación de plastoglobuli claros ocasionado por ozono y neblina ácida se considera como primera evidencia de senescencia inducida por estos contaminantes (Rosenkranz *et al.*, *op cit.*).

De igual forma, es posible que estas alteraciones observadas durante el invierno sean los efectos de un letargo en el que se reducen las funciones del cloroplasto y con ello la formación de tilacoides y la acumulación de lípidos, o quizás los efectos de un daño por congelamiento. Sin embargo, en el caso de Abies religiosa no se considera que esta sea la causa, ya que:

. los casos descritos pertenecen a países de latitudes altas (Alemania y Finlandia) donde hay condiciones extremas de temperatura;

. aunque en el sitio estudiado pueda haber heladas, las muestras no se obtuvieron en tiempo de bajas temperaturas;

. se ha observado que los cloroplastos del género Abies se mantienen intactos -no hay desintegración de tilacoides- durante el invierno (Chabot y Chabot, *op cit.*);

. los cloroplastos del testigo no manifiestan estos cambios tan abruptos desde los tejidos más jóvenes.

De acuerdo a lo expuesto, es muy posible que el ozono, reconocido por sus efectos dañinos en las membranas sea el responsable de estos síntomas.

El por qué de la falta de formación y/o degradación de los tilacoides y de la baja electrodensidad de los plastoglobuli tratará de explicarse en el capítulo concerniente a lípidos. Sin embargo se considera oportuno comentar que se ha encontrado que en Chlamydomonas -organismo unicelular muy empleado para estudios genéticos sobre la estructura, función y patrones de herencia de los cloroplastos- los mutantes con deficiencia en citocromo 559 (asociado a la plastoquinona) produce la formación de tilacoides largos no apilados; o bien los mutantes que carecen de uno de los dos componentes adyacentes del transporte de electrones, citocromo 553 y plastocianina, presentan pares largos de tilacoides (Avers, 1983). Se entiende entonces que los plastoglobuli no sólo son fuente de suministro de lípidos estructurales sino de elementos transportadores de electrones -plastoquinonas- sin los cuales quizás tampoco el apilamiento de los tilacoides sea posible.

Las características de los cloroplastos "I" han sido descritas numerosas veces en la literatura asociadas a la contaminación por ozono, particularmente cuando sus concentraciones son elevadas (Thomson *et al.*, *op cit.*; Noble *et al.*, *op cit.*; Miyake *et al.*, 1984, 1989; Anttonen *et al.*, *op cit.*). Estos cloroplastos ocurren realmente en pocas células, lo que coincide con Thomson *et al.* (*op cit.*) y Miyake *et al.* (1989), y de acuerdo a las experiencias de Miyake *et al.* (1984) la dilatación de los tilacoides es el primer indicio del daño por ozono el cual surge inicialmente en el parénquima esponjoso. En el presente trabajo no puede determinarse la secuencia de daños por encontrarse alterados simultáneamente varios aspectos celulares, pero este daño no se evidencia en el parénquima esponjoso (Fig. 4A).

Se cree que la apariencia laxa de los tilacoides se debe a que el ozono rompe la unión entre las membranas tilacoidales anexas de manera que los espacios tilacoidales del granum se ensanchan, variando de amplitud (Thomson *et al.*, *op cit.*).

Se considera que la dilatación de las membranas tilacoidales es una respuesta general a cualquier clase de tensión y que aparece en ciertas etapas del ciclo normal de vida de los plastos (Rosenkranz *et al.*, *op cit.*). Tampoco es un síntoma específico de algún contaminante ya que se presenta con SO₂, HF, NO₂, lluvia ácida, en senectud normal y en condiciones de invierno. Posiblemente esta modificación pueda explicarse por la alteración de las condiciones osmóticas en el estroma y cambios en la permeabilidad de los tilacoides (Schiffgens-Gruber y Lütz, *op cit.*).

Según lo expuesto previamente, ni la senectud normal ni el invierno pueden considerarse como los factores que desencadenen estos síntomas. Por lo que respecta a los contaminantes, al menos ni el SO₂ ni el HF son de importancia en el lugar por lo que pueden descartarse.

Thomson *et al.* (*op cit.*), Swanson *et al.* (*op cit.*) y Pell y Weissberger (*op cit.*) han encontrado en vegetación expuesta experimentalmente a concentraciones agudas de ozono, cloroplastos muy dañados en donde se evidencia un sistema membranoso desorganizado pero con tilacoides íntegros -cloroplastos tipo "J". Al igual que en esos estudios, en el presente trabajo los tilacoides constituyen los únicos elementos distinguibles en células completamente degradadas. Es importante señalar que sólo una muy pequeña proporción de las células, y por lo tanto de estos cloroplastos, se encuentra en este estado de degradación.

Finalmente, Miyake *et al.* (1989) y Anttonen *et al.* (*op cit.*) destacan que después de la dilatación de los tilacoides sobreviene la ruptura de los cloroplastos -pero sin acumular plastoglobuli-, en casos de elevadas concentraciones de ozono; lo que sugiere que los cloroplastos "I" y "J" constituyen etapas de un mismo proceso.

MORFOLOGIA

Como se ha señalado al describir los tipos de cloroplastos, su alteración no sólo involucra al sistema membranoso interno, sino también su forma. A este respecto, se presume que la morfología abultada o deforme de los cloroplastos más jóvenes, es debida a los cambios que involucra el proceso de división, ya que varios muestran evidencias claras de estrangulación. Sin embargo, la tendencia inicial de deformación anormal observada en algunos cloroplastos ya maduros del tipo "F", culmina con la presencia de cloroplastos esféricos.

Miyake *et al.* (1984) manifiestan que en etapas avanzadas de daño por ozono los cloroplastos se deforman, perdiendo su condición elíptica para transformarse en organelos abultados; y Toyama (1975) y Nouchi *et al.* (1977) (en Miyake *et al.*, *op cit.*) Karenlampi (*op cit.*) y Ojanperä *et al.*, (*op cit.*) afirman que los cloroplastos degeneran para formar cuerpos esféricos con numerosos plastoglobuli. De acuerdo a Karenlampi (*op cit.*) estos síntomas aparecen en hojas que han estado sometidas a ozono durante largo tiempo (exposiciones crónicas).

En algunas ocasiones los cambios estacionales se reflejan en la morfología de los cloroplastos, de manera que pueden apreciarse algo abultados durante el invierno. Se considera que estas deformaciones pueden ser el resultado de cambios del potencial osmótico entre el estroma y el citoplasma y estar asociados al proceso de "endurecimiento" (Soikkeli 1978).

Dado que en el caso de Abies religiosa la "condición de invierno no procede como explicación a la deformación de sus cloroplastos, se sugiere como alternativa lógica un cambio en el potencial osmótico pero generado por ozono, por su tan mencionado efecto sobre la permeabilidad de las membranas celulares.

Finalmente, los síntomas en los cloroplastos del presente estudio no coinciden con ninguno de los síntomas característicos de cloroplastos con deficiencias nutricionales específicas (N, Ca, Mg, P, K y S) de los estudios de Hall *et al.* (1972) en condiciones experimentales.

MEMBRANAS EXTERNAS

La evidencia conspicua de deterioro de las membranas externas de cloroplastos (Fig. 2D) se presenta sólo en aquellos que están totalmente degradados, los que a su vez sólo se aprecian en los casos de daño severo de las células, evento que se observa esporádicamente. La mayoría de las células muestra alteraciones someras o moderadas, y en ellas el estado físico de las membranas externas de los cloroplastos es muy difícil de evaluar, ya que no manifiestan cambios muy claros y las micrografías no siempre ofrecen suficiente resolución para apreciar con certeza las condiciones de las mismas.

Los efectos de la contaminación por ozono también han sido registrados a nivel de las membranas externas de los cloroplastos. Las alteraciones en estas estructuras se han analizado a su vez en función de la magnitud del daño celular; así, Swanson y Thomson (*op cit.*) al emplear concentraciones de 0.30 ± 0.03 ppm durante 2 h encuentran que en células moderadamente afectadas (sin plasmólisis) la envoltura del cloroplasto se mantiene intacta aunque con apariencia irregular por invaginaciones del citoplasma; Thomson *et al.*, (*op cit.*) utilizando concentraciones de 0.6 - 1.0 ppm durante 30 min. detectan, ya en células moderadamente dañadas, un rompimiento de estas membranas el cual culmina en una degeneración total en células severamente dañadas y Miyake *et al.*, (*op cit.*) describen también su rompimiento pero en casos de daño severo de la célula. Estas descripciones coinciden en general con los resultados obtenidos ya mencionados.

El hecho de que no se aprecien cambios radicales en las membranas no significa que no exista una alteración real de las mismas, pues pueden sufrir modificaciones más finas como cambios en su permeabilidad (Thomson, *op cit.*). El aumento en densidad del estroma descrito previamente y la disminución del volumen del cloroplasto que se estudiará más adelante, pueden ser la evidencia de una deshidratación del mismo inducida por cambios en su permeabilidad (Swanson y Thomson, *op cit.*).

Por cuanto a la ruptura de la membrana externa del cloroplasto, se ha considerado que es uno de los primeros síntomas de exposición aguda al ozono (Guderian, *op cit.*), lo cual pudiera ser el caso de algunas muestras de los cementerios; mientras que el cambio de densidad del estroma y/o una posible disminución de tamaño del cloroplasto, sin daño aparente de las membranas externas, sean evidencia de un daño gradual en otras.

Es importante señalar que los efectos del ozono en la integridad de las membranas externas y tilacoides pueden afectar los procesos metabólicos dentro del cloroplasto al perturbarse el estatus quimiosmótico y el balance de protones y otros flujos iónicos (Runeckes & Chevone, *op cit.*).

Como consideración final es importante señalar que los cloroplastos del resto de los tejidos, particularmente en algunas células del parénquima esponjoso, también pueden presentar cambios ultraestructurales como tilacoides difusos o ausencia de estructura interna, pero sin llegar a ser tan frecuentes como en el parénquima en empalizada. La cantidad de plastoglobuli no se ve afectada, es decir, no se registran cambios importantes, pero su electrodensidad puede reducirse, aún en Tlamacas en el tejido de transfusión y endodermis.

Según Sutinen *et al.* (*op cit.*), cuando el daño alcanza las células acompañantes y la endodermis, los cloroplastos presentan los mismos síntomas que en las células del mesófilo, esto es, sistema tilacoidal reducido, estroma electrodensito y grandes cantidades de plastoglobuli. De acuerdo a ello, es posible que el daño en las muestras se encuentre ya extendido.

Una vez analizado el origen de la estructura de los cloroplastos, es posible interpretar a que tipo pertenecen y cuales son los fenómenos que determinan su distribución en los cuatro sitios estudiados a través de los años; así que, considerando los datos de la tabla 2 se tiene que:

- En Tlamacas a lo largo de los tres años se perciben cloroplastos normales, incluyendo los tipos juveniles. Son abundantes los cloroplastos con un patrón de electrodensidad negativo a partir del segundo año, pero sus grana son considerablemente más anchos en éste que los de sus homólogos de cualquier sitio y edad. Esto indica que a pesar de los cambios en electrodensidad - que además no son tan marcados- su sistema de membranas permanece íntegro. En el tercer año sus grana se simplifican angostándose de la misma manera que en los otros lugares, lo cual puede ser una evidencia inicial de daño.

- En Cementerio los cloroplastos normales y jóvenes se conservan sólo hasta el segundo año. Desde los tejidos más jóvenes puede constatarse aunque escasamente, la degradación o dilución inicial o avanzada de los tilacoides, misma que se agudiza y hace extensiva en el tercer año. Por cuanto a los cloroplastos "F", éstos surgen desde los tejidos de un año de edad con grana angostos, condición que permanece hasta el tercer año.

Conforme al análisis previo del tipo de cloroplastos, el patrón que aquí se manifiesta parece indicar que existe un proceso patológico de daño crónico, en el que además los síntomas progresan relativamente lento.

- En Casamanero los cloroplastos normales y del tipo "F" se conservan exclusivamente en tejidos de un año de edad. En aquellos que sufren degradación del sistema de membranas internas, inicial y avanzada, presentes desde el UCA se extienden en el segundo y abundan en el tercero.

En este sitio, al igual que en el anterior, se considera que existe un proceso de daño crónico, pero aquí se desarrolla más rápidamente.

- En Lobos el estado físico de los cloroplastos es muy particular, pues no sólo coinciden a lo largo de los tres años cloroplastos con síntomas de desvanecimiento de los tilacoides, sino otros con marcadas manifestaciones de un tipo de degradación diferente, cloroplastos "I y J"; por cuanto a los cloroplastos normales, sólo están presentes en los tejidos más jóvenes. En lo que respecta a la disgregación de tilacoides, ésta se nota ya en etapa avanzada en algunas células del tejido más joven, situación que se generaliza con la edad, pero que, como se mencionó, de ninguna manera incluye a todos los cloroplastos. El otro tipo de degradación, en la que se aprecia separación de tilacoides y destrucción total del cloroplasto se hace manifiesta igualmente desde el tejido más joven, sin embargo son pocas las células que pueden identificarse en tal estado, la mayoría ya deben estar muertas, sin restos, que es lo que se observa en los estudios histológicos.

La evidencia sugiere daños de tipo crónico y agudo simultáneos, los cuales posiblemente se expliquen parcialmente por diferencias de sensibilidad a nivel celular. En el caso de daño crónico -síntoma de dilución de tilacoides- aunque se genere prematuramente, progresa muy lentamente y no es extensivo. Tratándose de daño agudo -separación de tilacoides y rompimiento del cloroplastos- también surge tempranamente, y aunque son muy escasas las células que los presentan, éste debe ser el tipo de efecto característico en este sitio, según se nota en la cantidad de células necrosadas que deben ser la consecuencia final de esta alteración.

MICROSCOPIA OPTICA

Además de los cambios ultraestructurales de los cloroplastos que se observan a nivel de microscopía electrónica, pueden percibirse en microscopía óptica otra clase de alteraciones pero que involucran su grado de perceptibilidad (resolución). Al estudiar la estructura celular de tejidos sometidos a la técnica de safranina verde rápido, resulta sobresaliente el hecho de que en algunas muestras los cloroplastos sean perfectamente evidentes (Figs. 7F y 7G) y en otras sean difíciles de apreciar (Figs. 7H, 8A, 8C y 8D).

Los resultados obtenidos con la combinación de las diferentes técnicas han permitido suponer que la mayor o menor resolución de los cloroplastos está en función de 3 factores: color, tamaño y abundancia.

Con la técnica de tinción con safranina-verde rápido los cloroplastos pueden teñirse fuertemente de rojo o de verde (Figs. 7F y 7G) independientemente del tejido; sin embargo en muchos casos esta tinción puede resultar muy débil, situación que dificulta la observación de los cloroplastos (Figs. 7H, 8A, 8C y 8D). No hay que confundir los cloroplastos con tinción débil con aquéllos que muestran una porción incolora, la que corresponde al grano de almidón presente en el cloroplasto pero que con esta técnica queda sin teñir (Fig. 7F).

Puede decirse que en general las muestras de los sitios Tlamacas y Lobos contienen cloroplastos verdes, las del Cementerio rojos y las de Casamanero incoloros (Tabla 3).

Los estudios al microscopio óptico y electrónico de muestras en resina epóxica evidencian en general una disminución del número de cloroplastos en las células de cementerios. La prueba de ello se aprecia al comparar las hileras de cloroplastos en la periferia de las paredes celulares de las muestras del sitio Tlamacas (Figs. 3B, 5A y 5C), y la presencia de cloroplastos menor o mayormente aislados junto a las paredes laterales o bien hacia los extremos de las células de los cementerios (Figs. 3C, 3D, 3E, 5B y 5D).

Por lo que respecta al tamaño de los cloroplastos, puede afirmarse que depende directamente del tamaño del grano de almidón que contengan (Fig. 1D, 1E, 4E, 5A a 5D). Sin embargo, existen casos en que, eliminando el volumen conferido por el almidón, hay una reducción real del tamaño del cloroplasto. En este caso, los cloroplastos F y H' del parénquima en empalizada de cementerios (Figs. 1F y 2B) son un ejemplo en comparación de los demás, pero parece que este fenómeno también se encuentra en células de los parénquimas esponjoso, endodérmico y de tejido de transfusión (Figs. 3G, 4A, 6A, 6D, 6E y 6F y Tabla 3).

Por otra parte en los cloroplastos de los tipos G y H se notan mayores dimensiones debido a la acumulación constante de plastoglobuli. Cabe la posibilidad de que los cloroplastos finalmente vuelvan a reducirse cuando sufren una mayor degeneración con la disolución de los plastoglobuli (Fig. 2B).

Según Chabot y Chabot (*op cit.*) el número y tamaño de los cloroplastos aumenta con la edad, no obstante en el presente estudio se observa el fenómeno inverso.

La reducción inicial del tamaño de los cloroplastos bien puede ser el resultado de cambios en la permeabilidad de sus membranas externas con un consecuente aumento en la densidad del estroma según se discutió previamente. El aumento posterior en el tamaño de algunos cloroplastos obedece a la acumulación continua de plastoglobuli, mismos que al parecer pasan por una etapa final de disolución, lo que trae como consecuencia una nueva reducción en el tamaño del cloroplasto, el cual muy posiblemente acaba por desaparecer. Ello podría explicar finalmente la causa de la reducción en la cantidad de cloroplastos por célula de los tejidos de las muestras provenientes de los cementerios, particularmente de Cementerio y Casamanero.

Las reducciones en tamaño y número de cloroplastos como un efecto de la contaminación por ozono, han sido descritas por varios autores tanto a nivel de microscopía electrónica como de luz: Sutinen *et al.* (*op cit.*), Miyake *et al.* (1984, 1989), Thomson (*op cit.*), Swanson y Thomson (*op*

TABLA 3. COLOR Y RESOLUCION DE CLOROPLASTOS EN LOS 4 SITIOS ESTUDIADOS

TEJIDOS Y TIPOS DE CLOROPLASTOS	SITIOS Y EDADES DE LAS ACICULAS (EN AÑOS)												
	TLAMACAS			CEMENTERIO			CASAMANERO			LOBOS			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
PARENQ. EMPALIZADA													
COLOR													
- incoloro							X	X	X		X		
- verde	X	X	X					X			X	X	X
- rojo				X	X	X		X					
RESOLUCION													
- muy evidente	X	X	X	X	X		X				X	X	X
- poco o no evidente			X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
PARENQ. ESPONJOSO													
COLOR													
- incoloro	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
- verde	X	X	X								X	X	X
- rojo				X	X			X					
RESOLUCION													
- muy evidente	X	X	X		X		X				X		
- poco o no evidente				X	X	X	X	X	X			X	X
ENDODERMIS													
COLOR													
- incoloro	X	X	X				X				X	X	
- verde	X		X								X		X
RESOLUCION													
- muy evidente	X	X	X				X						
- poco o no evidente			X	X	X	X		X	X		X	X	X
TEJ. TRANSFUSION													
COLOR													
- incoloro	X	X	X	X	X	X	X				X	X	X
RESOLUCION													
- muy evidente	X	X	X	X	X		X				X		
- poco o no evidente			X	X	X	X		X	X		X	X	X

cit.), Ojanperä *et al.* (*op cit.*), Anttonen *et al.* (*op cit.*); reducción que se traduce en una disminución en el área que estos organelos ocupan dentro de la célula (Ojanperä *et al.*, *op cit.*), como se aprecia al comparar las figuras 7F, 7G, 7H y 8A.

Por cuanto a los cloroplastos de endodermis, aunque éstos sean normalmente más pequeños que los de las células del mesófilo, también se reducen sus dimensiones como efecto de la contaminación por ozono (Ojanperä *et al.*, *op cit.*).

Según Miyake *et al.* (1989), Sutinen *et al.* (*op cit.*) y Anttonen *et al.* (*op cit.*), el encogimiento de estos organelos está en función de la exposición al contaminante. De acuerdo a ello, los cloroplastos de hojas de Raphanus sativus, Phaseolus spp., Picea abies, Pinus sylvestris y Pinus halepensis expuestos a bajas concentraciones durante periodos prolongados, manifiestan este síntoma; mientras que las sometidas a concentraciones elevadas (400-2000 μg^3) en el transcurso de algunas horas no manifiestan disminución alguna. En lugar de ello, se genera un rompimiento de las membranas de los cloroplastos, y en general de todas ellas, con lo que sobreviene la muerte celular.

En cuanto a los colores verde y rojo de cloroplastos, no existen referencias que los asocien a daño por ozono, sin embargo sí se ha reportado que los cloroplastos de Pinus ponderosa (Evans y Miller, 1972a) y Sequoiadendrum giganteum (Evans y Leonard, 1991), presentan un patrón de tinción anormal al ser expuestos a ozono. Se piensa que el color es resultado de la tinción de membranas externas y/o estroma, y que su diferencia debe demostrar las alteraciones que se llevan a cabo en estos elementos constitutivos; sin embargo se desconoce cual sea la causa. De acuerdo a la técnica de safranina verde rápido, los cloroplastos se tiñen normalmente de verde (Jensen, *op cit.*), lo que indica que el color rojo es una anomalía; pero además tiñe de rojo los elementos fenólicos y/o ciertos lípidos (Mauseth, 1988), de modo que la alteración en el metabolismo de estos compuestos dentro de los cloroplastos pudiera explicar el cambio de coloración, aspecto que precisa comprobación.

VACUOLAS

Según se describe en el capítulo de "compuestos fenólicos," el contenido natural de las vacuolas de células parenquimáticas está formado por taninos, denominación que se da a un grupo diverso de compuestos polihidroxifenólicos de alto peso molecular (Chabot y Chabot, *op cit.*). Las observaciones demuestran que este material es susceptible a sufrir cambios en su conformación y según su grado de consolidación se pueden distinguir en el parénquima en empalizada: inclusiones cristalinas, material denso, moderadamente denso, claro y granular. Aunque la presencia de un tipo de inclusión no excluye el resto, siempre existe(n) alguno(s) que domina(n) y son éstos los que se representan en la tabla 4.

TIPO DE VACUOLA	SITIOS Y AÑOS DE LAS ACICULAS											
	TLAMACAS			CEMENTERIO			CASAMANERO			LOBOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
- CRISTAL		X										X
- DENSA			X X	X			X X				X X X	
- MODERADA									X			
- CLARA				X			X				X	
- GRANULAR				X X								

De acuerdo a los patrones de distribución de los tipos de vacuolas a lo largo de los años en cementerios y Tlamacas, se deduce que la vacuola sufre un proceso de desarrollo que comprende dos etapas, una de formación y otra de degradación. En la primera se da una agregación de numerosas vacuolas pequeñas con contenidos de taninos que al fusionarse dan forma a una vacuola central con inclusión cristalina (Figs. 3A, 1B y 1C) y que con el tiempo se desarrolla en tamaño (Fig. 7F) hasta llegar a un grado máximo cuyos taninos constituyen un material denso muy finamente granular (Figs. 3B, 7G, 5A y 5C). En algún momento a partir de ese estado se inicia la segunda etapa en la que un factor desencadena su degeneración. Surgen así en su primera fase las vacuolas con un material moderadamente denso (Fig. 7H), la degradación continua reduce el contenido de la vacuola de tal manera que se va perdiendo densidad (Fig. 5B), los gránulos finos empiezan a conglomerarse -polimerizarse- (Figs. 3C y 3D) para formar agregados gruesos que quedan homogéneamente distribuidos en la vacuola y que pueden simultáneamente migrar hacia la periferia de la misma donde se acumulan en mayor o menor grado (Figs. 3E y 5D).

Este mismo patrón de degradación, pero partiendo de vacuolas finamente granulares densas como fase inicial, se desencadena en células parenquimáticas de tejido esponjoso, endodérmico y de transfusión.

El proceso de desarrollo de la vacuola, en relación a su formación -independientemente de su contenido- coincide con el descrito por Bidwell (1990) y Chabot y Chabot (*op cit.*). En cuanto a su contenido, uno de los factores desencadenantes de su degradación es aparentemente la edad: durante la senectud normal pueden apreciarse la granulación de taninos y/o su acumulación a lo largo del tonoplasto; las células más degeneradas por la edad carecen de depósitos vacuolares (Sutinen, *op cit.*; Karenlampi, *op cit.*).

Si bien en las muestras del presente estudio la degradación progresa con la edad, este proceso no es igual en los cuatro sitios, pues en algunos se acelera más que en otros, p. ej. en Tlamacas este es más lento, con células densas dominantes en 2 y 3 años, mientras que en

Cementerio es más abrupto, con células granulares dominantes en los mismos años (Tabla 4). Se desconoce hasta que edad deben conservarse densas las vacuolas de Abies religiosa, pero en Pinus ponderosa y Picea abies la vacuola típica es finamente polvosa y densa (Soikkeli, 1981; Karenlampi, *op cit.*), y en P. abies obtenidas en Finlandia este contenido se conserva en este estado hasta las acículas de mayor edad -9 años-, mientras que las colectadas en Alemania son granulares las de mayor edad -7 años- (Sutinen, *op cit.*) lo cual puede estar relacionado a ambientes estresados por contaminación, pues ahí la calidad del aire según Sutinen (*op cit.*) es peor que la de Finlandia. Este aspecto lleva a considerar a la contaminación como agente causal de degradación.

El estado o condición de la vacuola central se ha empleado como un marcador para estimar la severidad de daño en Pinus sp. y Picea sp. de ambientes contaminados (Soikkeli, *op cit.*; Karenlampi, *op cit.*). De acuerdo a ello, se han determinado los siguientes grados de daño:

- Taninos a manera de banda delgada en la periferia de la vacuola con partículas (más o menos finas) dispersas en ella (citoplasma obscurecido).
- Taninos en banda gruesa y algunas veces como gránulos (más gruesos), pocos, (citoplasma delgado y denso).
- Taninos como banda gruesa alrededor de la vacuola que impiden la resolución del citoplasma denso.

Estos grados de deterioro de la vacuola se aprecian en Abies religiosa, pero es tan sutil la diferencia de los dos últimos -pues en las muestras el tercer grado también posee agregados de taninos gruesos dispersos en la vacuola- que ambos se han catalogado como vacuolas granulares para su mejor detección en microscopía de luz (Fig. 5D). El primer grado corresponde a las vacuolas claras (Fig. 5B).

Los cambios estructurales del contenido de la vacuola también pueden ser un artefacto del proceso de fijación debidos a la alta o baja molaridad de la solución amortiguadora, lo que representa cambios en la química de la célula o de la vacuola (Soikkeli, *op cit.*; Karenlampi, *op cit.*). Ciertamente ésta no puede ser la causa de los efectos observados en las muestras en resina epóxica del presente estudio, pues al menos todas las acículas obtenidas en el segundo muestreo fueron tratadas con la misma molaridad. No obstante, este aspecto es de particular importancia ya que da la pauta para explicar estos cambios estructurales: alteración del potencial osmótico.

Este cambio de potencial bien puede ser el resultado de cambios en la permeabilidad de membranas, particularmente del tonoplasto, ocasionados por ozono. Soikkeli (*op cit.*) ha reportado que los cambios estructurales del contenido de la vacuola promovidos por alteraciones del potencial osmótico pueden ser causados por contaminantes atmosféricos.

La vacuola mantiene la estructura y rigidez de la célula actuando como un globo interno que, ejerciendo presión sobre la pared celular impide que se deforme o colapse (Bidwell, *op cit.*). Esto también debe ser cierto para el protoplasma, de manera que si se perdiera esta presión, sea por disminución de la tonicidad del tonoplasto, sea por alteración del contenido de la vacuola ocasionados por ozono, es razonable pensar que sobreviniera una dispersión del mismo (Figs. 3F y 5E). Quizás esto corresponda, en modo sutil y/o previo, a la etapa de colapso de la vacuola con la agregación del citoplasma al centro celular descrita por Thomson *et al.* (*op cit.*).

Siguiendo sobre la línea de afectación del tonoplasto, su destrucción, así como el rompimiento del plasmalema, ha sido descrita sólo cuando el daño de las células ya es muy severo (Soikkeli y Karenlampi, *op cit.*) o bien por exposiciones a elevadas concentraciones de ozono (Guderian, *op cit.*). Estos registros sugieren que la ruptura del tonoplasto, así como del plasmalema, pueden ser eventos que surjan lenta y gradualmente -daño crónico-, o bien, rápidamente. En el primer caso como última etapa de una serie de pasos del proceso de degeneración del protoplasma y en el segundo como factor desencadenante de la degradación total del mismo.

De ser así, el proceso de daño crónico es muy similar al de senectud natural donde la alteración y rompimiento del tonoplasto juegan un papel muy importante para digerir el material celular que ha dejado de ser necesario y donde la estructura interna de los cloroplastos y mitocondrias ha sido reducida antes de la destrucción del tonoplasto (Bidwell, *op cit.*). En cuanto al daño agudo, debe corresponder al descrito por Thomson *et al.* (*op cit.*) y Pell y Weissberger (*op cit.*), en el cual, con la degeneración del tonoplasto, el contenido protoplásmico que se agrega al centro celular se encuentra totalmente degradado -a excepción del sistema membranoso interno de los cloroplastos-; efecto que asemeja al observado en muestras de Lobos (Fig. 2D).

Se sabe que las vacuolas pueden ser compartimentos lisosómicos (Thomson, *op cit.*; Bidwell, *op cit.*), por lo que la destrucción final de la matriz citoplasmática y de los organelos puede ser el resultado del efecto desnaturalizador de los taninos que los contamina después de la ruptura del tonoplasto, o bien de la liberación de enzimas líticas posterior a su trastorno o decaimiento (Thomson, *op cit.*; Soikkeli y Karenlampi, *op cit.*; Miyake *et al.*, 1989). Se cree que el manchado de Nicotiana tabacum se debe a la autólisis de las células dañadas por ozono (Rich, 1964). Es posible que este proceso ocurra muy rápidamente, pues sólo se percibe en pocos casos ya que en la mayoría sólo se aprecian los restos de la necrosis.

Finalmente un fenómeno frecuentemente observado es la formación de numerosas vesículas en el borde entre la vacuola principal y el citoplasma -de donde parecen desprenderse- (Figs. 2C, 3D y 3E) o bien, internas en la vacuola hacia donde parecen migrar. Según consideraciones previas la vacuola puede funcionar como un compartimento lisosómico, de lo cual se desprende que las vesículas observadas son manifestación de una autólisis del citoplasma y/o de la misma vacuola. Son grandes y muy numerosas en las porciones donde aún hay citoplasma en cantidad apreciable -como en los extremos de las células- y disminuyen en tamaño y en número con la escasez del mismo, por lo tanto son evidentes aún en algunos casos de Tlamacas.

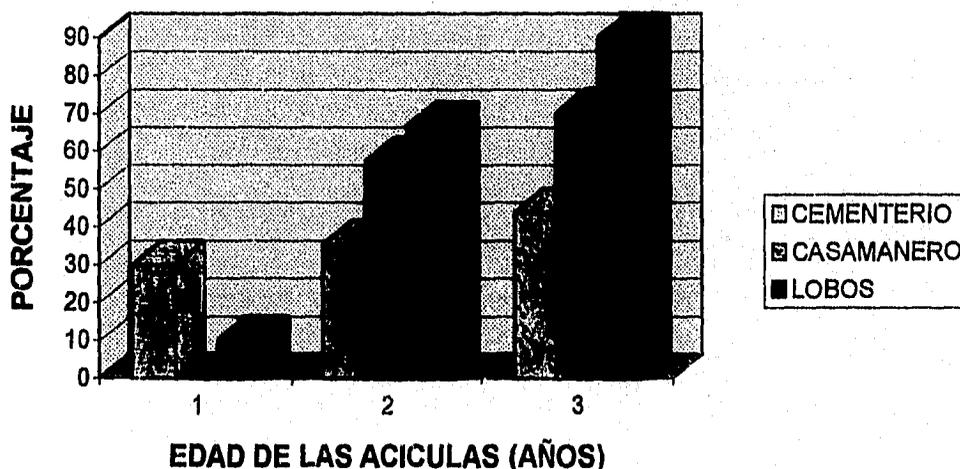
Noble *et al.* (*op cit.*) y Ojanperä *et al.*, (*op cit.*) han descrito la formación de vesículas del citoplasma que se introducen a las vacuolas en Populus sp. y Triticum aestivum -respectivamente- fumigados con ozono a diferentes concentraciones, y aunque no explican el mecanismo por el cual se da este proceso, Ojanperä *et al.* (*op cit.*) afirman que estas vesículas se derivan de las membranas de los cloroplastos, lo que no es el caso en A. religiosa.

CARACTERIZACION CELULAR

Si se estudian de manera conjunta el grado de percepción de cloroplastos y el tipo de vacuola de las células del parénquima en empalizada, se puede hacer una caracterización celular útil a nivel de microscopía óptica para muestras en "paraplast".

La caracterización es la siguiente; para su distribución en los sitios ver tabla 5.

- Tipo A. Células en que aún no hay vacuola, por lo tanto son claras con cloroplastos bien evidentes homogéneamente distribuidos en el citoplasma (Figs. 3A y 7F).
- Tipo B. Células de vacuolas reducidas con inclusiones cristalinas, bordeadas por citoplasma abundante, cloroplastos grandes muy evidentes especialmente hacia ambos extremos donde se acumula el citoplasma (Figs. 3A y 7F).
- Tipo C. Células con vacuola muy bien desarrollada, cloroplastos muy evidentes. El material de la vacuola puede ser sólido a manera de cristal (subtipo 1), denso (subtipo 2), moderadamente denso (subtipo 3), fino claro (subtipo 4) o como agregados gruesos (subtipo 5) (Fig. 7G).
- Tipo D. Células con vacuola muy bien desarrollada pero con cloroplastos poco o no evidentes. El material de la vacuola puede ser cualquiera de los 5 mencionados arriba (Figs. 7H y 8A).
- Tipo L. Células en las que hay separación del plasmalema de la pared (plasmólisis).
- Tipo N. Células en las que hay una pérdida total de organelos y ruptura de paredes laterales, pero en las que se conserva la unión con la célula inmediata inferior. Además presentan una acumulación de material de origen fenólico que engruesa la pared - principalmente en su extremo superior- (necrosis) (Figs. 8B, 8C y 8D). Su distribución en los tejidos de los diferentes sitios y edades se muestra en la gráfica 4.



GRAFICA 4. Necrosis del parénquima en empalizada de la acículas de los cementerios.

TABLA 5. TIPOS CELULARES OBSERVADOS EN TEJIDO DE PARENQUIMA EN EMPALIZADA

SITIOS	AÑOS	TIPOS CELULARES															
		a	b	c1	c2	c3	c4	c5	d1	d2	d3	d4	d5	d6	L	N	
TLAMACAS	1		<u>X</u>	X	<u>X</u>	X	X										
	2		X		X	X	<u>X</u>	X				X					
	3	X	X	X	X	<u>X</u>	<u>X</u>	X		X	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>				
CEMENTERIO	1	X	<u>X</u>						X	X	X	<u>X</u>				X	
	2				<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>				X	<u>X</u>	X	X		X	
	3						X					<u>X</u>	<u>X</u>	X	X	X	
CASAMANERO	1	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>					<u>X</u>	X	X	<u>X</u>				X	X
	2	X	X	<u>X</u>					<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>					<u>X</u>
	3			X					<u>X</u>	<u>X</u>	X	X					<u>X</u>
LOBOS	1	X	<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	X	X		<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	X	X			X	<u>X</u>
	2		X		<u>X</u>	<u>X</u>			<u>X</u>	<u>X</u>	<u>X</u>	X					<u>X</u>
	3	<u>X</u>	<u>X</u>	X	<u>X</u>	X			<u>X</u>	<u>X</u>	X					X	<u>X</u>

a = CELULAS MUY JOVENES

b = CELULAS EN DESARROLLO

c = CELULAS MADURAS CON CLOROPLASTOS EVIDENTES *

d = CELULAS MADURAS CON CLOROPLASTOS POCO O NO EVIDENTES *

(* LOS NUMEROS EN ORDEN ASCENDENTE INDICAN LA DEGRADACION PROGRESIVA DE LAS VACUOLAS)

X = TIPO CELULAR MÁS IMPORTANTE

X = TIPO CELULAR SEGUNDO EN IMPORTANCIA

Los análisis previos de cloroplastos y vacuolas, la distribución diferencial de los tipos celulares según la edad de la hoja, así como los estudios de Bidwell (*op cit.*) y Chabot y Chabot (*op cit.*), permiten determinar que el tipo "A" corresponde a células muy jóvenes con capacidad de dividirse, el "B" a células en desarrollo y el "C" -con sus primeros dos subtipos- a células maduras; y constituyen etapas del desarrollo celular normal. El resto de los subtipos "C" forman parte de un proceso de degeneración celular, pero que sólo involucra de manera más evidente a las vacuolas.

El tipo celular "D" manifiesta, de primera instancia, una alteración a nivel de cloroplastos que los hace ser poco o no evidentes según se estudió previamente. Esta alteración surge aún en casos donde la vacuola no demuestra signos de afectación y permanece hasta las etapas de mayor degradación de la vacuola. Es posible que este tipo de daño este asociado al reportado por Evans y Leonard (*op cit.*).

Según consideraciones previas, es posible que el tipo celular "D" corresponda a un daño crónico en el que los cloroplastos junto con el resto del protoplasma sufren modificaciones graduales lentas y previas, o al menos simultáneas, a las alteraciones de la vacuola; mientras el tipo "C" con degradación más inmediata de las vacuolas pertenezca a un daño agudo.

De acuerdo a ello y atendiendo a la tabla 5, el tipo de daño agudo, aunque presente en los individuos de los sitios Lobos y Cementerio, parece ser condición característica de Tlamacas. Ya que esta forma de alteración sólo involucra las vacuolas, y la técnica de inclusión en resina epóxica demuestra que en este sitio el material ergástrico es preferentemente denso (Figs. 5A y 5C, Tabla 4), se considera que la fijación de las muestras para su inclusión en parafina ocasionó el desequilibrio osmótico de las células y con ello la alteración de la estructura de este material.

Por lo que corresponde a la localidad de Cementerio, este tipo de daño no parece ser de gran trascendencia, en cambio en Lobos el daño agudo se manifiesta ya en casos de plasmólisis, mismos que se reconocen por la presencia de cloroplastos de los tipos "I" y "J" (Figs. 2C y 2D) según descripciones previas.

En relación al daño de tipo crónico, en Cementerio sólo es conspicuo en los tejidos de mayor edad -3 años-, mientras que en Casamanero lo es desde los 2 años y en Lobos lo es inclusive en los tejidos más jóvenes -UCA-; esto indica que el deterioro de las acículas es menos severo en el primer sitio y mayor en el último. Esta condición se apoya en los niveles de necrosis evidentes en los sitios, ya que según las observaciones, y el trabajo de Evans y Leonard (*op cit.*), la necrosis es la consecuencia final de la plasmólisis y/o de los cambios patológicos que conducen a la alteración de la estructura celular. Según la gráfica 4, el sitio Lobos muestra la mayor incidencia de necrosis y Cementerio la menor; además, en los casos de Cementerio y Casamanero se involucran preferentemente pequeños grupos aislados de células, mientras que en Lobos se abarcan gran cantidad de ellas. Aquí es importante destacar que aunque la necrosis se observa en cualquiera de las regiones de la acícula (ápice, región media o base), esta es más frecuente y conspicua en la base (Fig. 8D) y casi ausente en el ápice; a excepción de Lobos donde la necrosis es también muy aparente en el ápice. Este aspecto está en estrecha relación con la distribución de los tipos celulares a lo largo de la acícula.

Hay que considerar que la necrosis puede ser resultado de daño de tipo crónico o agudo, situación que podría explicar su mayor incidencia en Lobos. La necrosis, tal como se describe en el presente trabajo coincide con uno de los tipos sintomáticos de daño por ozono encontrado por Hill *et al.* (*op cit.*). Particularmente, el engrosamiento de las paredes asociado a su pigmentación, ha sido descrito desde 1959 por Ledbetter *et al.* (en Thomson *et al.*, *op cit.*) como posible indicador de daño por este contaminante.

Finalmente, en relación a la presencia de células de tipo "D" en acículas de 3 años de Tlamacas, es factible que sea reflejo de lo que sucede realmente y que su origen sea el mismo que el de los cementerios; lo que es dudoso es el avanzado grado de deterioro de sus vacuolas pues no existen células de subtipos precedentes.

DESARROLLO FOLIAR.

En cortes longitudinales y sagitales de A. religiosa se ha evidenciado, en unas ocasiones más notoriamente que en otras, una gradación de tipos celulares a lo largo de las acículas, fenómeno que pone de manifiesto el proceso de desarrollo foliar. Según Howell (1974) durante la expansión foliar se generan diversos tipos de células, mientras algunas son ya maduras, otras están creciendo y aún otras siguen dividiéndose, por lo tanto en una hoja debe haber unas células en una edad fisiológica que favorezcan el anabolismo y otras el catabolismo. Este proceso no implica que todos los tipos celulares estén presentes en una misma acícula, lo que depende en parte de la edad de la misma.

La distribución diferencial de los tipos celulares a lo largo de las acículas de A. religiosa da la pauta en la determinación del patrón de desarrollo de las mismas, el cual tiene una dirección de la base al ápice, con las células más maduras en la primera y las más jóvenes en la segunda. Linzon (1967) ha observado que en tejido muy joven donde aún no hay estomas o todavía no son funcionales no hay movimiento interno del xileno durante la inclusión; este fenómeno se ha encontrado en los ápices de las hojas de A. religiosa donde todas las células muestran plasmólisis, evidencia de un fuerte cambio osmótico que apoya el patrón de desarrollo descrito. Estas consideraciones son relevantes ya que ofrecen el fundamento para explicar la localización inicial del daño en la base.

Se ha afirmado que la sensibilidad al ozono está en función de la maduración de la acícula y del desarrollo celular (Howell, *op cit.*; Taylor, 1973, Hill *et al.*, 1961). En cuanto a la primera, la sensibilidad está posiblemente asociada a la funcionalidad o presencia de estomas sin los cuales se reduce la entrada del contaminante y con ello del daño (Howell, *op cit.*), o bien, de manera indirecta al tiempo que el tejido ha estado expuesto, p. ej. el daño por ozono en acículas de Pinus sp. localizado en los ápices de las acículas corresponde a la zona de células más maduras y por lo tanto que han estado más tiempo expuestas al ozono (Taylor, *op cit.*; Costonis y Sinclair, 1969; Evans y Miller, 1972a). La situación inversa se da en A. religiosa donde según se explicó el daño se localiza preferentemente hacia la base lo que coincide con el tejido más maduro.

En cuanto al desarrollo celular, la diferencia de sensibilidad a nivel celular se entiende bajo el concepto de un sistema dinámico completo en que las células de distintos grados de madurez poseen diversas capacidades para resistir la entrada del ozono y los cambios químicos subsecuentes. El ozono puede estar afectando a la vez muchas reacciones metabólicas que involucren componentes tales como la glucosa, proteínas, lípidos y fenoles (Howell, *op cit.*), de manera que aquellas células que se encuentren en un estado fisiológico que favorezcan el anabolismo manifiesten inicialmente menor daño que aquellas que muestran ya tendencia al catabolismo.

Esta sustentación es apoyada por los resultados de Lucas *et al.* (1993) quienes detectan que la clorosis propiciada por ozono sólo afecta a las hojas de mayor edad. Además sugieren que la exposición prolongada a este contaminante tiene efectos acumulativos sobre los tejidos vegetales y son resultado de una senectud acelerada, tal como se aprecia en las acículas de A. religiosa.

Cabe agregar que después de la pérdida de la integridad de las membranas en unas cuantas células susceptibles, se pueden desatar reacciones en cadena que involucren componentes intra o extracelulares (Howell, *op cit.*) que expliquen en parte la expansión de la necrosis. La sensibilidad diferencial de las acículas en los diferentes sitios puede estar dada por varios factores, entre ellos las concentraciones y duración de exposición de ozono, la carga genética de los individuos, el ambiente físico, etc.

EVALUACION DE LAS ALTERACIONES A NIVEL HISTOLOGICO

Con excepción de las modificaciones de la estructura celular (vacuolas y cloroplastos) que aunque particularmente conspicuas en parénquima en empalizada, son también evidentes en parénquimas esponjoso, endodérmico y de transfusión, la plasmólisis y la necrosis se observan exclusivamente en el parénquima en empalizada de los cementerios (Tabla 6).

Además de la plasmólisis y necrosis, existe otro tipo de daño que se detecta particularmente en el parénquima esponjoso (Fig. 8D) que consiste en la formación de un material granular compacto dentro de sus células, hipertrofia, hiperplasia y presencia de glóbulos pequeños adheridos externamente a las paredes de las células que forman la cavidad estomática, mismos que se observan al microscopio electrónico (Fig. 4H). Todos estos síntomas están asociados entre sí, pero no necesariamente se manifiestan todos sincrónicamente.

El daño surge inicialmente en la parte inferior del parénquima esponjoso inmediato a la epidermis, pero posteriormente puede extenderse hasta involucrar otros tejidos dependiendo de la localización del daño, de tal manera que si éste es más céntrico, se abarcarán tejidos como la endodermis y los haces vasculares; si es más lateral, se extenderá hacia mayores porciones del parénquima esponjoso y el canal resinífero, sin embargo, estas condiciones se detectan escasamente.

Estos síntomas son la evidencia interna de las lesiones que tienen su origen en el ataque por insectos desfoliadores según se describirá posteriormente.

Este tipo de daño no está asociado a la edad y, según se muestra en la tabla 6 es más frecuente en Casamanero, siguiendo en orden descendente Cementerio, Lobos y Tlamacas, respectivamente. En general su incidencia es muy baja por lo que no es la causa principal de deterioro de los tejidos. Además no guarda relación con el daño presente en el parénquima en empalizada pues uno y otro ocurren independientemente.

Fuera de la necrosis y el parasitismo por insectos, no existe otro tipo de daño tan conspicuo en ningún otro tejido.

Los estudios realizados en diferentes especies de pino señalan que los daños por ozono se limitan al mesófilo (Evans y Miller, 1972a,b; Anttonen *et al.*, *op cit.*) Cuando el mesófilo es diferenciado -en p. empalizada y esponjoso- resulta peculiar que la lesión se localice específicamente en el parénquima en empalizada, siendo ahí la zona de depósito de los pigmentos que engrosan las paredes (Figs. 8B, 8C y 8D) y la del deterioro celular en general (Thomson *et al.*, *op cit.*; Taylor, 1973.; Noble *et al.*, *op cit.*; Treshow, *op cit.*; Guderian, *op cit.*; Miyake *et al.*, 1989) lo cual coincide particularmente en los casos de plasmólisis y necrosis de A. religiosa en los cementerios, donde el resto de los tejidos permanecen sin daño. Hay que hacer notar que según las características celulares en esta especie, el tejido comprendido entre el haz vascular y la epidermis inferior es realmente una pequeña porción de parénquima en empalizada, situación que explica la existencia de necrosis y plasmólisis en ese lugar.

En el caso de contaminación por ozono, su ingreso a los tejidos se da principalmente por la vía estomática, atravesando el parénquima esponjoso -cuando lo hay- para ejercer su acción sobre las células del parénquima en empalizada. De esta manera, cuando éste ya se encuentra dañado, es posible identificar epidermis, parénquima esponjoso, haces vasculares, canales resiníferos y cutícula aparentemente intactos durante un período considerable (Taylor, *op cit.*; Thomson *et al.*, *op cit.*; Guderian, *op cit.*).

Se ha observado que especies menos susceptibles a ozono poseen mayor número de células del mesófilo por estoma, lo cual aparentemente da una mayor resistencia a la penetración del ozono (Evans y Miller, 1972b). Es posible que en las acículas de plántulas de A. religiosa que manifiestan mayor susceptibilidad que las hojas de árboles adultos, esta relación

TABLA 6. DAÑOS A NIVEL HISTOLOGICO EN LAS ACICULAS DE LOS 4 SITIOS DE MUESTREO

TEJIDOS	SITIOS Y EDADES DE LAS ACICULAS (en años)											
	TLAMACAS			CEMENTERIO			CASAMANERO			LOBOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PARENQUIMA EMPALIZADA	--	--	--	N	N	N,L	L	N	N	N,L	N	N,L
PARENQUIMA ESPONJOSO	--	P	--	--	P	P	P	P	P	P	P	P
ENDODERMIS	--	--	--	--	P	P	--	--	P	--	--	--
TEJIDO TRANSFUSION	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HACES VASCULARES	--	--	--	--	P	--	--	--	--	--	--	--
CANALES RESINIFEROS	--	--	--	--	P	--	P	P	--	--	P	--
EPIDERMIS	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
HIPODERMIS	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

N= necrosis P= daño por insecto desfoliador -- = sin daño L= plasmólisis
 NOTA: Se incluyen las técnicas de glutaraldehído, faa y epón.

sea mayor y por lo tanto tengan espacios aéreos más amplios y con ello mayor ventilación (Fig. 8C).

Karenlampi (*op cit.*) reporta que en casos de exposición crónica natural de *Pinus* sp. a ozono, aún en tejido claramente clorótico, sólo una proporción menor de células se destruyen completamente, mientras que la mayoría conserva su integridad aunque muestra algunas alteraciones; esta situación coincide particularmente con las muestras de Cementerio y Casamanero.

Por lo que respecta a las modificaciones de la estructura celular, al menos en lo que corresponde a los cambios en la vacuola y tamaño de cloroplastos, no se circunscriben al parénquima en empalizada. Los estudios se limitaron a ese tejido ya que en él las alteraciones son más conspicuas, lo que coincide con los resultados de Swanson y Thomson (*op cit.*) y Miyake *et al.* (1989) sobre los efectos del ozono: aún cuando reportan daños en el parénquima esponjoso, éste es del tipo moderado cuando la mayoría de las células del parénquima en empalizada se encuentran ya severamente dañadas. Parece existir un patrón de evolución del daño en el que si bien no se limita al mesófilo, surge inicialmente en él, pero al transcurrir el tiempo se extiende a otros tejidos -endodermis y estele, células acompañantes, albuminosas, etc., pero con un grado de daño menor pues según lo descrito el efecto intracelular también se agrava. Vale la pena mencionar que aún en mesófilo no diferenciado el progreso del daño no es azaroso, sino que sigue un cierto orden de acuerdo a su localización (Evans y Miller, 1972a; Costonis y Sinclair, *op. cit.*; Sutinen *et al.*, *op cit.*).

Pell y Weissberger (*op cit.*) afirman que aún cuando la alteración a nivel visual ocasionada por ozono en soya es evidente sólo en la región adaxial, los estudios histológicos demuestran que el deterioro ocurre por igual en ambos parénquimas en términos de porcentaje, lo que habría que comprobarse.

Es posible que la baja susceptibilidad aparente del parénquima esponjoso se deba en parte a que sus paredes celulares son mucho más gruesas que las de parénquima en empalizada y la mayor difusión o intercambio de gases se lleva principalmente en el segundo.

Como consideración final cabe destacar la importancia de la anatomía patológica como herramienta en el diagnóstico de plantas enfermas, según la cual la determinación de los tejidos dañados permite, si no especificar la causa, sí eliminar aquellos factores no asociados a ella y así limitar los involucrados en la etiología. Con base en que los síntomas ocasionados por un cierto factor perturbador tienden a ser consistentes independientemente de la especie afectada, se ha determinado que:

- El daño inicial en el mesófilo está asociado básicamente a boro (Bo), SO₂, O₃ y toxicidad por sal.

- El daño inicial en tejido de transfusión es debido a senectud natural, bajas temperaturas, estrés hídrico y ácido fluorhídrico (HF).

- El daño a floema es el resultado de la senectud natural, estrés hídrico y HF (Stewart *et al.*, *op cit.*).

Esta información da la pauta para eliminar como agentes primarios del daño a la senectud natural, las bajas temperaturas, la tensión hídrica y la contaminación por flúor. Así mismo descarta la posibilidad de toxicidad por sal, pues ésta se utiliza para deshielar en época de invierno en EUA. En el caso del boro, puede excluirse por no haber fuentes que lo emitan -al menos no importantes- en la zona. Por cuanto al SO₂, se desconocen sus concentraciones en el Desierto de los Leones, pero por ser un contaminante asociado a la industria la cual se localiza al norte de la ciudad y a que sus niveles se han reducido sensiblemente desde que se sustituyó el empleo de combustóleo por gas, sus concentraciones en la zona suroeste no son tan elevadas como las de ozono.

EFFECTOS A NIVEL BIOQUIMICO

CARBOHIDRATOS

ALMIDON Y CARBOHIDRATOS DEL FLOEMA

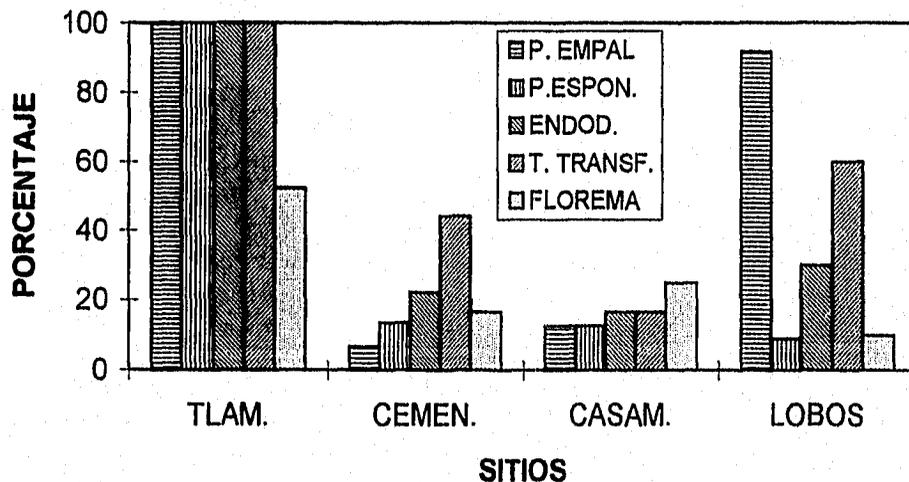
El examen de secciones en resina epóxica observadas a los microscopios óptico y electrónico, permite constatar en algunas muestras la presencia de granos de almidón que pueden ocupar parte o la totalidad del volumen de los cloroplastos (Figs. 1A,1D,1E y 5A). Estos granos que se tiñen de rosa con la técnica de PAS se aprecian como puntos coloreados de distintos tamaños distribuidos en el interior de las células. Además del almidón, es posible evidenciar puntos mucho más pequeños en el floema que también reaccionan positivamente a la técnica (Figs. 7A y 7C).

Para la mejor interpretación de los datos, se manejan desde varias perspectivas, comparando sitios, tejidos y edades. Antes de exponer los resultados es importante recordar que la información obtenida no tiene por objeto ofrecer un análisis estadístico, sino señalar ciertas tendencias para ayudar a comprender el fenómeno que se está presentando, para lo cual se han empleado los diagramas de barras. El eje de las ordenadas muestra el porcentaje de muestras que reaccionan positivamente a la técnica, lo cual manifiesta su representatividad dentro del tejido o del año.

Puede afirmarse que la abundancia relativa de almidones en los tejidos y/o años, está en relación con el porcentaje de presencia en los mismos. Se ha encontrado que cuando el almidón es poco frecuente, también es poco abundante en los casos en que aparece y viceversa.

ESTUDIO POR SITIOS Y POR TEJIDOS

En cada sitio se agrupan los datos obtenidos durante los tres años de cada uno de sus tejidos de manera que se tienen frecuencias relativas en cada tejido. Los resultados así expuestos permiten apreciar de primera instancia el contenido de almidón en cada lugar y su distribución en los tejidos de cada sitio (Gráfica 5).



GRAFICA 5. Distribución de los carbohidratos en los diferentes tejidos de las acículas de los cuatro sitios estudiados.

La detección de carbohidratos en floema es un tanto difícil en cortes transversales por falta de resolución, por lo que existen dudas sobre la exactitud de los datos; aún así, se considera que son de utilidad.

En Tlamacas el almidón de las muestras se encuentra de manera constante en todos los tejidos, lo que indica que es frecuente y abundante, y está distribuido homogéneamente dentro de la acícula. Los carbohidratos del floema por su parte se reducen casi a la mitad de los casos (Gráfica 5).

De los sitios afectados, aunque los valores de las muestras de Cementerio denotan poco contenido de almidón en las acículas y en las de Casamanero aún menos, ambos muestran un patrón de distribución muy similar: el tejido fotosintéticamente activo -parénquima en empalizada- y/o el de reserva -parénquima esponjoso- muestra(n) los niveles más bajos, mientras que los del cilindro central -tejido de transfusión y/o endodermis- son mayores (Gráfica 5). En Lobos, el contenido de almidón es el mayor en los cementerios y su patrón de distribución es muy diferente; el parénquima en empalizada presenta valores casi tan altos como en Tlamacas y aunque en tejido de transfusión sean relativamente elevados son menores que en aquél. Su presencia en endodermis es baja y en parénquima esponjoso mucho menor (Gráfica 5).

ESTUDIO POR EDADES

Se pretende explicar en cada sitio el comportamiento de los carbohidratos en cada tejido con el transcurso del tiempo.

TLAMACAS: Todos los tejidos a lo largo de los 3 años en todos los cortes tienen almidón (Figs. 1A,1D,1E,3B,4E,5A,6C,7A y 7C), lo que varía es la distribución de los granos en el parénquima en empalizada donde son generalmente más abundantes en la capa inferior en cualquiera de los años y con tendencia a localizarse diferencialmente en la capa superior al tercer año (al centro o a los lados) (Fig. 7C); en el parénquima esponjoso puede distribuirse sólo en las células más periféricas (en corte transversal) pero no parece haber un patrón con la edad pues no es muy frecuente.

CEMENTERIO: En el parénquima en empalizada prácticamente en todos los cortes de los tres años los cloroplastos carecen de almidón (Figs. 1F,1G,2A,2B,3D,3E y 5D).

En parénquima esponjoso, al igual que en el tejido anterior en la mayoría de los casos los cloroplastos carecen de almidón durante los tres años, pero en esta ocasión, los pocos existentes tienden a disminuir con la edad (Fig. 4H).

En la endodermis con granos de almidón medianamente frecuentes, se reducen con la edad hasta casi desaparecer (Fig. 2E).

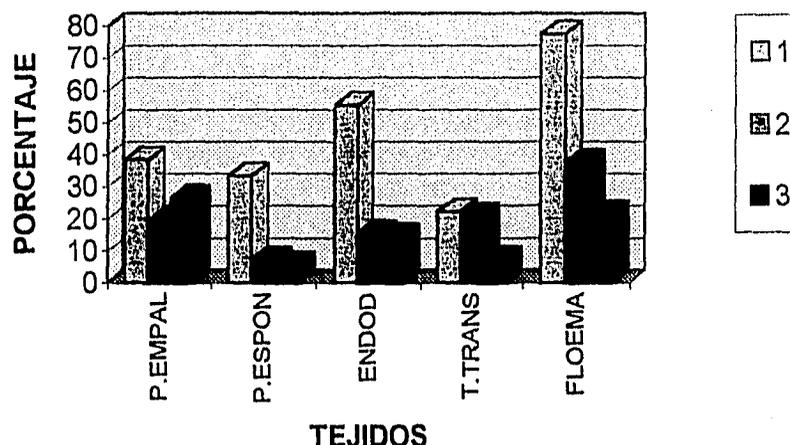
En el tejido de transfusión, presentes en todos los casos en un año, disminuyen considerablemente a los tres años (Figs. 6A y 6D).

CASAMANERO: Partiendo de altas frecuencias en el UCA en todos los tejidos, se llega a la ausencia de almidón en ellos y de carbohidratos en el floema a los dos y tres años (Figs. 3A,3C,3G,4A,5B,6E, 7B y 7D).

LOBOS: Existe una tendencia a la disminución del contenido de almidón en el parénquima esponjoso y en el tejido de transfusión. La endodermis no muestra cambios muy evidentes y el parénquima en empalizada con almidón abundante en los tres años (Figs. 2C,2D,3F,6B,6F y 7E).

Para comprender mejor la relación que existe entre el contenido de almidón y la edad de los tejidos de los cementerios, los resultados se agrupan para su estudio.

En este caso se asocian para cada tejido los datos de los tres cementerios que corresponden a un mismo año de tal manera que se tiene la tendencia del comportamiento general de los carbohidratos con respecto a la edad en los sitios afectados (Gráfica 6).



GRAFICA 6. Distribución de los carbohidratos en los diferentes tejidos de acuerdo a la edad en años.

Los resultados demuestran una reducción en el contenido de granos de almidón, ya desde el UCA, en todos los tejidos, pero menor en endodermis. Este proceso se acentúa a los dos años, particularmente en el parénquima esponjoso y en la endodermis, hasta que prácticamente se estabiliza, por lo que a los tres años el descenso es más ligero. Por cuanto al parénquima en empalizada, si bien a los dos años hay una importante caída de la frecuencia, ésta no es tan drástica como en los otros tejidos, además vuelve a incrementarse a los tres años, comportamiento que puede explicarse por la constante presencia de almidón aún en dos y tres años de los tejidos colectados en Lobos según se describió previamente. En el floema, la reducción de carbohidratos decrece con la edad, pero de manera más uniforme.

CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A COMPUESTOS FENOLICOS

Estos compuestos fenólicos, presentes a manera de pequeños cuerpos esféricos en las células de los cementerios según se describirá posteriormente, reaccionan a la técnica para detección de carbohidratos, lo que hace suponer que están asociados a ellos.

El comportamiento diferencial de los carbohidratos en los tejidos de muestras de diferentes años y sitios demuestra que están involucrados distintos procesos, los que se discuten a continuación.

Disminución en el contenido de almidón. Numerosos estudios se han realizado para determinar el efecto del ozono sobre el contenido de carbohidratos, pero ellos arrojan diferentes resultados en cuanto al contenido de azúcares solubles, lo que impide establecer un comportamiento consistente entre la relación del ozono y los carbohidratos. Sin embargo, aún cuando algunos autores reporten su aumento y otros su disminución, ambos fenómenos son una manifestación de la disfunción del metabolismo de polisacáridos provocada por ozono (Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*; Kainulainen *et al.*, 1994).

El abatimiento de la producción de almidón en plantas expuestas a ozono ha sido reportado frecuentemente por Dugger *et al.* (*op cit.*), Miller *et al.* (en Dugger y Ting, *op cit.*), Karenlampi (*op cit.*), Kainulainen *et al.* (*op cit.*) y particularmente para exposiciones agudas

Noble *et al.* (*op cit.*), Dugger *et al.*, 1962a y Younger & Nudge, 1980 (ambos en Guderian, *op cit.*); y para exposiciones crónicas Miller *et al.*, 1969 y Dugger y Palmer, 1969 (en Guderian *op cit.*). Este fenómeno ha sido demostrado histoquímicamente por Evans y Miller (1972a) en cuyos estudios los cloroplastos de células expuestas a ozono no presentan tinción o es débil para carbohidratos insolubles, por lo que se dificulta la diferenciación entre estos organelos y la matriz citoplasmática. A nivel ultraestructural, Anttonen *et al.* (*op cit.*) han descrito una disminución considerable del tamaño de los granos de almidón en Pinus halepensis expuestos a ozono.

La teoría afirma que la reducción en el contenido de almidón puede ser el resultado de 2 procesos: la inhibición de su síntesis o la estimulación de su hidrólisis.

En el primer caso la síntesis puede ser inhibida a partir de la transformación de la hexosa (Dugger *et al.*, *op cit.*) o bien desde los orígenes -producción de azúcares- la fotosíntesis.

La inhibición o decremento de la fotosíntesis seguida de una sola exposición a ozono ha sido reportada por numerosos autores (Miller *et al.*, 1969; Barnes, 1972a; Botkin *et al.*, 1971, 1972; Carlson, 1979;) todos en Kozlowski y Constantinidou, (*op cit.*); Rosenkranz *et al.* (*op cit.*) y Tingey *et al.* (1976a).

Treshow (*op cit.*) afirma que la alteración y destrucción de los cloroplastos provocada por ozono es la causa de la reducción del potencial fotosintético, así como de la clorosis. Particularmente, se ha sugerido que los cambios en el sistema membranoso interno de los cloroplastos y del estroma ocasionados por ozono pueden estar involucrados en el efecto sobre la fotosíntesis (Thomson, 1975). Según se sabe las reacciones luminosas se ubican en los grana del cloroplasto y las oscuras en el estroma. Las primeras dependen de los pigmentos asociados a los tilacoides particularmente de la clorofila (Avers, *op cit.*; Esau, 1965) la cual se destruye por efecto del ozono (Runeckles y Chevone, *op cit.*), aspecto que se confirma con la reducción de su contenido (Howell y Kremer, 1973; Malhotra y Khan, *op cit.*).

La síntesis de clorofila y la formación de tilacoides son eventos independientes. Esta aseveración se desprende del hecho de que algunos mutantes que son incapaces de desarrollar tilacoides producen clorofila normal, o bien pueden desarrollar tilacoides normales pero con niveles muy bajos de clorofila. En algunos tipos de mutantes este pigmento es destruido rápidamente supuestamente porque es incapaz de integrarse a las membranas que lo protegen (Avers, *op.cit.*). Si, como parece en el presente estudio, el sistema membranoso interno de los cloroplastos se ve alterado por procesos de degradación y/o por inhibición en su formación, se podría asumir que sus clorofilas expuestas son susceptibles a desaparecer. Los efectos fisiológicos a largo plazo, tratándose de una fuerte reducción de la capacidad fotosintética y pigmentos (Schiffgens y Lutz, *op cit.*), bien pueden ser el resultado de la degradación irreversible de los tilacoides que impide su recuperación.

Por lo que respecta a las reacciones oscuras, el estroma es el almacén de las enzimas involucradas en la fijación de CO₂, por lo que su alteración puede estar directamente relacionada con la inhibición de la fijación de este compuesto observada en casos de exposición a ozono (Thomson, *op cit.*; Dugger y Ting, *op cit.*). Se ha considerado que el aumento en densidad del estroma puede ser el resultado de la coagulación de la Rubisco (D-ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) (Thomson *et.al.*, *op cit.*) -muy susceptible a oxidarse por ser rica en grupos sulfhidrilo- y cuyo contenido se ve menguado considerablemente en Medicago sativa L. después de ser expuesta a ozono (Pell y Pearson, 1983).

Presencia de polisacáridos según la edad. Los diferentes grupos de hojas de determinadas edades presentes en un momento dado juegan papeles distintos en la economía del carbono del árbol. La energía requerida para el crecimiento de nuevas hojas en numerosas coníferas se deriva en parte del carbón almacenado y de los productos fotosintéticos de las hojas de los años anteriores (Chabot y Chabot, *op cit.*). El almidón observado en cloroplastos aún inmaduros en los

estudios de Chabot y Chabot (*op cit.*) y Senser *et al.* (1975) y en el presente trabajo (Fig. 1A), debe ser explicado como un aporte proveniente de las hojas maduras, pues al menos en Abies religiosa éste no puede ser el resultado de su propia actividad por carecer de tilacoides, de modo que deben fungir como amiloplastos.

Una vez que las hojas del año en curso se han desarrollado y adquieren capacidad fotosintética -lo que ocurre muy pronto- asumen el papel principal en el suministro de carbono a la planta para su crecimiento, mantenimiento y almacenamiento. Las hojas contribuyen cada vez menos al mantenimiento de la planta conforme envejecen (Chabot y Chabot, *op cit*; Bidwell, *op cit.*)

La marcada reducción del contenido de almidón en los cementerios desde el UCA constituye un síntoma real de un estado afectado. Tingey *et al.* (1976a) han mencionado que las exposiciones crónicas a ozono abaten la tasa fotosintética de las hojas más viejas, pero que estimulan la fotosíntesis de las hojas del UCA, abatimiento que surge previo a la aparición de daño visual. En condiciones de exposición a ozono en el campo, se ha descrito que los tejidos que han padecido clorosis por mucho tiempo y están próximos a la necrosis carecen casi por completo de almidón (Karenlampi *op cit*); esto pone de manifiesto que la edad en este caso se traduce en tiempo de exposición y por lo tanto grado de daño o deterioro.

Es pertinente señalar que Senser *et al.* (*op cit.*) han determinado que el contenido de almidón en el mesófilo decrece, por su utilización, de las células situadas inmediatamente por debajo de la epidermis a aquellas cercanas al haz vascular de acuerdo al gradiente de intensidad de la luz.

Finalmente, hay que considerar que para el reestablecimiento de los grupos sulfhidrilo y lípidos insaturados oxidados por ozono, de manera que el transporte normal y la permeabilidad de las membranas se restauren, se necesita una fuente endógena de energía (Guderian, *op cit.*), proceso que se dificulta por la situación recientemente expuesta.

Transporte de carbohidratos. A diferencia de la desaparición de almidón del tejido fotosintético en Cementerio y Casamanero, en Lobos se conserva en células de tres años, aún cuando existan claras evidencias de daño en ese tejido. Se han reportado casos de células fotosintéticamente activas que acumulan almidón después de su exposición a ozono, sea experimental (1.00 ppm por 7 hr durante 23 días), o en el campo -naturalmente- (Schiffgens y Lutz, *op cit.*).

En Tingey (*op cit.*) y Wellburn y Wellburn (1994) esta conservación se verifica en casos de exposición aguda. La similitud de los síntomas presentes en los cloroplastos de Lobos con los reportados por Pell y Weissberger (*op cit.*), Thomson *et al.* (*op cit.*) y Miyake *et al.* (1984) en los que a pesar de la degradación y deformación de cloroplastos, hay una permanencia de tilacoides y granos de almidón, permite suponer que el daño en estas células es más inmediato (daño agudo), de manera que no hay tiempo para que se verifique un proceso de disolución de tilacoides y se evite la producción de almidón.

La acumulación de almidón en el tejido fotosintético y su disminución en el resto de los tejidos, bien pueden ser el resultado de una baja traslocación de productos fotosintéticos, ya que según Hanson y Stewart (1970) el almidón se acumula en las hojas durante las horas del día cuando la fotosíntesis excede la tasa de traslocación de sus productos -lo que supone que los tejidos del cilindro central y el parénquima esponjoso inclusive, deben estar saturados de almidón, situación que no se verifica en Lobos-. Además, según Karenlampi (*op cit.*) y Senser (*op cit.*), es común ver grandes granos de almidón en células de endodermis, parénquima de transfusión y en algunas traqueidas de transfusión.

Según Hanson y Stewart (*op cit.*) los oxidantes fotoquímicos de alguna manera pueden bloquear o retardar ciertos pasos del proceso hidrólisis-traslocación del almidón.

El almidón normalmente se degrada a carbohidratos de bajo peso molecular que se exportan por el floema hacia varios sitios para su utilización (Schiffgens y Lutz, *op cit.*). El azúcar de transportación más común parece ser la sacarosa (soluble), los azúcares reductores (glucosa y fructosa, de los cuales está formada la sacarosa) rara vez se encuentran; sin embargo los oligosacáridos a base de sacarosa se localizan frecuentemente como importantes azúcares de transportación (Bidwell, *op cit.*).

El tejido de transfusión y las células albuminosas son tejidos característicos de las gimnospermas y median la acumulación de azúcares y otros compuestos y juegan un papel muy importante en su "cargamento" o transporte a las células cribosas del floema para su exportación al resto de la planta (Mauseth, *op cit.*; Carde, *op cit.*).

Por cuanto a la endodermis, su posición anatómica la ubica en la confluencia de dos flujos opuestos: un flujo endógeno de metabolitos fotosintéticos elaborados en el mesófilo que se dirigen al floema por la vía de las células albuminosas o de Strasburger, y uno exógeno de agua que corre del xilema a las traqueidas de transfusión y finalmente al mesófilo y estomas. Se considera que la endodermis no es muy diferente de otras células parenquimáticas en relación a la traslocación de los solutos, actuando solamente como intermediario pasivo (Carde, 1978).

Según las gráficas de distribución de carbohidratos en los tejidos de Cementerio y Casamanero el poco almidón que existe es traslocado del parénquima en empalizada hacia los tejidos del cilindro central. Los niveles de carbohidratos en floema con relación al resto de los tejidos permiten suponer que efectivamente hay transporte al resto de la planta -aunque escaso por el bajo contenido de carbohidratos en las acículas, lo que apoya la idea de que el problema radica en la disminución de la síntesis de almidón del parénquima fotosintético. En cambio en los materiales de Lobos, la mayor acumulación de carbohidratos en parénquima en empalizada superior e inferior en relación al resto de los tejidos sugiere que es la manifestación de un transporte alterado. Schiffgens y Lutz (*op. cit.*) en sus estudios por determinar el efecto del ozono afirman que la acumulación inusual de almidón puede ser el resultado de una interrupción en la conexión entre la fuente y el sitio de utilización, indicando posiblemente una perturbación a nivel de transporte a través de la envoltura del cloroplasto. Al igual que en el presente estudio, no consideran que el problema radique en la capacidad de transporte del floema por no estar colapsado (por ozono en su caso). En cambio, en los estudios de Wellburn y Wellburn (*op cit.*) la acumulación de almidón que se efectúa en las células endodérmicas, es el resultado de fallas en su traslocación debidas al colapso de las células cribosas, ocasionado a su vez por un severo estrés hídrico propiciado por elevadas concentraciones de ozono. El daño en estas células no se verifica en casos de bajas concentraciones de ozono.

Si el daño involucra las células paravenales se puede afectar el transporte del fotosintetizado de las células de parénquima al floema (Pell y Weissberger, *op cit.*), pero tampoco es éste el caso.

LIPIDOS

La prueba empleada para la detección de lípidos reaccionó exclusivamente con aquéllos que conforman la capa de cutícula que envuelve a la acícula. Esto permitió comprobar que aunque en ciertos casos puede ser ligeramente escamosa en su región superior, en todos los cementerios se encuentra íntegra -sin rupturas y hoquedades-, incluyendo aquellos casos en que se sitúa sobre las células necrosadas del parénquima en empalizada; no así en algunos de los casos en que ha habido infestación por insectos -que son los menos-. Esto indica que no hay aparentemente otros agentes externos que causen deterioro conspicuo de la cutícula con el que se pudieran afectar los tejidos subyacentes.

El grosor de la misma no puede determinarse con esta técnica por lo que no es posible comprobar reducción en sus dimensiones, sin embargo, en algunos casos en muestras de cementerios parece más angosta en su parte superior que en la inferior, lo cual probablemente sea un efecto de desgaste natural.

ENDODERMIS

La técnica en "epon" permite descubrir en el citoplasma de las células de matriz de la endodermis dos tipos de compuestos lipídicos que se distinguen por su apariencia física. Unos aparecen como diminutas gotas poco evidentes al microscopio de luz, mientras que al microscopio electrónico tienen un aspecto terso, moderadamente electrodensos y están asociados a un retículo endoplásmico muy bien desarrollado (Fig. 4C), y otros de mayores dimensiones que los hacen ser más fácilmente visibles al microscopio de luz y que al microscopio electrónico se aprecian como manchas informes ligeramente electrodensas que tienden a expandirse hacia la vacuola y se encuentran libres en el citoplasma sin asociarse a membrana (Fig. 4D).

La distribución de estos componentes es muy heterogénea entre los diversos sitios (Tabla 7):

En TLAMACAS en el UCA y durante el segundo año hay exclusivamente lípidos como pequeñas gotas, en el tercer año se presentan los dos tipos, pero predominan las gotas (Figs. 5F y 6C).

En CEMENTERIO únicamente existen lípidos a manera de manchas y son abundantes en el transcurso de los tres años (Figs. 6A y 6D).

En CASAMANERO se encuentra la misma clase de lípidos que en el anterior, sólo que aquí normalmente son escasos en los tres años (Fig. 6E).

En LOBOS escasamente hay lípidos de alguna clase en los tres años y si se presentan son principalmente del tipo de mancha (Fig. 6B y 6F).

Con la técnica de safranina-verde rápido las gotas a manera de manchas se tiñen de rojo; así detectadas son evidentes casi exclusivamente en acículas del Cementerio, ya que en Casamanero difícilmente aparecen y en Lobos no se hallan. Con las técnicas de tinción con tetraóxido de osmio y schiff estas gotas son incoloras y refringentes.

CELULAS ALBUMINOSAS

En el citoplasma de estas células se distingue, en resina epóxica al microscopio de luz, un material a manera de diminutas gotas, semejantes en dimensión y apariencia a las existentes en endodermis, pero que al microscopio electrónico se aprecian como pequeñas gotas ligeramente más electrodensas que las de endodermis, dispersas homogéneamente en el citoplasma y no asociadas a retículo endoplásmico (Fig. 4F). Su distribución es diferencial en los sitios de muestreo (Tabla 7) y se presenta de la siguiente forma:

TLAMACAS con numerosas gotitas en prácticamente todos los cortes observados de los tres años (Figs. 5F y 6C).

CEMENTERIO es moderada en las acículas de los tres años (Figs. 6A y 6D).

**TABLA 7. TIPOS DE LIPIDOS OBSERVADOS EN LOS TEJIDOS DE LAS ACICULAS DE LOS
4 SITIOS DE MUESTREO**

TEJIDOS Y LIPIDOS	SITIOS Y EDADES DE ACICULAS (en años)											
	TLAMACAS			CEMENTERIO			CASAMANERO			LOBOS		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ENDODERMIS												
- Lípidos como manchas	—	—	+	++	++	++	+	+	+	—	—	—
- Lípidos como gotas	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CEL. ALBUMINOSAS	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
TEJ. TRANSFUSION	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FLOEMA	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+++ = abundante ++ = moderado + = escaso — = ausente												

CASAMANERO salvo algunos casos en que no hay lípidos, las gotas son muy escasas en los tres años (Fig. 6E).

LOBOS aunque están presentes en casi todos los cortes de cada año, son muy pocos (Figs. 6B y 6F).

TEJIDO DE TRANSFUSION Y FLOEMA

En células de tejido de transfusión y de floema, existen gotas que al microscopio electrónico y de luz hacen suponer que se trata de lípidos (Figs. 4E y 4G). En ambos tejidos se presentan exclusivamente en las acículas de Tlamacas (Tabla 7).

Los lípidos son elementos de gran importancia biológica por cuanto a que constituyen reservas alimenticias, pero sobre todo porque son componentes estructurales de las membranas celulares y de la cutícula de las plantas (Bidwell, *op cit.*).

Estos compuestos resultan ser muy susceptibles al ataque por ozono, ya sea de manera directa por la peroxidación de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados (Malhotra y Khan, *op cit.*; Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*; Fangmeier *et al.*, 1990; Wolfenden y Wellburn, 1991), por el rompimiento de enlaces éster (Wolfenden y Wellburn, *op cit.*), o por fragmentación de ácidos grasos poliinsaturados por la acción de radicales libres (Fangmeier *et al.*, *op cit.*); o bien indirectamente por inhibición o reducción de su síntesis (Runeckles y Chevone, *op cit.*; Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*; Wolfenden y Wellburn, *op cit.*) o por un incremento en la actividad de lipasas (Tomlinson y Rich, 1969; Malhotra y Khan, *op cit.*).

LIPIDOS ESTRUCTURALES

En lo que respecta a los lípidos estructurales y su alteración, puede decirse que aunque la porción de ácidos grasos de la cera de la cutícula puede reaccionar con el ozono, en el presente estudio resulta imposible detectar cambios finos en la estructura de este componente, no así en el caso de las membranas de cloroplastos.

La descripción previa sobre los cambios estructurales de los cloroplastos en el presente trabajo, hace alusión a fenómenos como la simplificación de los grana por reducción en el número de sus tilacoides y la degradación de los mismos, aspectos que han sido relacionados al daño por ozono. Ya que los lípidos son elementos constitutivos de todas las membranas incluyendo por supuesto del sistema membranoso de los cloroplastos, es muy posible que el daño se esté efectuando a este nivel.

Los glicéridos constituyen cerca del 50% en peso de las membranas tilacoidales, una gran proporción de los cuales se presenta como mono y digalactosil diglicéridos, exclusivos de estas membranas. Se ha observado que el ozono induce cambios en los lípidos de los cloroplastos, particularmente reduciendo los niveles de estos glucolípidos (Runeckles y Chevone, *op cit.*); ya sea inhibiendo su síntesis o estimulando su degradación.

El primer caso ha sido reportado por Sakaki *et al.* (1990) y según Kozlowski y Constantinidou (*op cit.*), puede deberse a una previa oxidación por ozono de los ácidos grasos del cloroplasto. Esta inhibición bien puede explicar la falta de formación de tilacoides y con ello la simplificación de los grana observados en éste y otros trabajos.

En el segundo caso, Sakaki *et al.* (1985) en Miyake *et al.* (1989) reportan que en hojas de espinaca fumigadas con bajas concentraciones de ozono, los glucolípidos de los tilacoides degeneran y se transforman en triacilgliceroles que se acumulan en los plastoglobuli -estudios analíticos indican que los principales componentes de los plastoglobuli son triacilgliceroles y prenilquinonas (Steinmüller y Tevini, 1985 en Miyake *et al.*, 1989)-.

Según Sakaki *et al.* (1990) el mecanismo de degradación de los glucolípidos por ozono involucra la hidrólisis de monogalactosil diacilglicerol (MGDG) posiblemente por estimulación

de la galactolipasa, de manera que se verifica la liberación de ácidos grasos, principalmente de ácido alfa-linolénico [18:3] (el primer número indica la longitud de la cadena -18 átomos de C- y el segundo el número de enlaces insaturados) que se modifica químicamente a 1,2-diacilglicerol y que a su vez se transforma en triacilglicerol.

Este proceso se ajusta muy bien para explicar los fenómenos de degradación de tilacoides y acumulación de plastoglobuli de cloroplastos "G" y "H" de A. religiosa, sin embargo no explica la causa de la "decoloración" de aquellas estructuras membranosas, particularmente evidente en cloroplastos "F". Es factible que ésta sea el resultado de la peroxidación u ozonación de los dobles enlaces de sus cadenas de ácidos grasos según se analiza a continuación.

Bajo el principio de que los grupos olefinicos de los lípidos de membrana constituyen los sitios de reacción tanto del ozono como del OsO₄ -que sirve como fijador en los estudios de microscopía electrónica-, se ha considerado que el tratamiento previo con ozono debe oxidarlos, y con ello reducir o eliminar la reacción subsecuente con OsO₄ (Hayes *et al.*, 1963 en Miyake *et al.*, 1989; Swanson y Thomson, *op cit.*; Esau, 1965). A pesar de ello, los estudios de Swanson y Thomson (*op cit.*) con concentraciones de 0.3 ppm durante 2 h no muestran alteración de las membranas e inclusive se encuentran ultraestructuralmente bien preservadas. Sin embargo, en el presente estudio los tilacoides sí son claros, lo que demuestra una escasa o quizás nula reacción con el OsO₄, condición que resalta como "tinción negativa" de los cloroplastos.

El proceso de ozonólisis, que consiste en la adición directa de ozono entre las dobles ligaduras, es de menor importancia comparado con la peroxidación, que extrae, por medio de los radicales libres producidos durante la exposición a ozono o SO₂, átomos de hidrógeno de los grupos metileno entre los dobles enlaces, lo que genera una reacción en cadena de radicales libres (Heath, 1975; Fangmeier *et al.*, *op cit.*).

El proceso recién descrito supone un incremento en la saturación de lípidos el cual puede manifestarse bioquímicamente por la reducción en el contenido de ácido linolénico (18:3) e incremento de los ácidos linoléico (18:2) y oléico (18:1) (Fangmeier *et al.*, *op cit.*; Wolfenden y Wellburn, *op cit.*; Anttonen *et al.*, 1995), aspecto que resulta de gran trascendencia ya que el principal ácido graso de los cloroplastos es el ácido linolénico (Anttonen *et al.*, *op cit.*).

Finalmente, por lo que respecta a los plastoglobuli, su pérdida de densidad está en función del mismo proceso explicado para la "decoloración" de los tilacoides:

De acuerdo a Miyake *et al.* (1989), los plastoglobuli usualmente muestran gran afinidad por el OsO₄, por lo que aparecen densos; por lo tanto su baja afinidad parece ser ocasionada por la peroxidación de sus lípidos insaturados, misma que según los autores, es inducida por el superóxido y otros oxígenos activos que se generan por la fumigación con ozono. De esta manera, concluyen que los plastoglobuli claros son el resultado del daño por ozono.

Como se menciona con anterioridad, el aumento en número y tamaño de plastoglobuli, así como su decoloración, son también características de senectud de los cloroplastos. Aparentemente la conversión de los lípidos estructurales de los tilacoides a triacilgliceroles ocurre en cloroplastos senescentes y la peroxidación de sus lípidos se debe a un aumento en la producción de aniones superóxido, la cual se inicia por rearrreglos moleculares en los tilacoides. De aquí que el efecto del ozono en la estructura de los cloroplastos es muy similar al de senectud en lo que concierne al comportamiento de los lípidos (Miyake *et al.*, 1989).

Además estos plastoglobuli se "desvanecen", quizás también por efecto de la actividad de lipasas.

Es muy posible que los mecanismos que están actuando a nivel de membranas de cloroplastos estén ejerciendo su acción sobre el resto de las membranas celulares, particularmente plasmalema y tonoplasto de A. religiosa.

LIPIDOS COMO DERIVADOS METABOLICOS

Lípidos de endodermis:

Ambos tipos lipídicos se describen en Carde (*op cit.*). Las pequeñas gotas semejan osferosomas -orgánulos incluídos en una unidad de membrana que se originan como vesículas que contienen aceites y que se desprenden del retículo endoplásmico (Esau, *op cit.*)-, pero realmente en ocasiones es difícil distinguir si se trata realmente de una membrana o de un arreglo especial de los lípidos externos. Lo que sí es real, es que están asociados con el RE y no libres en la matriz citoplasmática (hialoplasma), desafortunadamente se desconoce la naturaleza lipídica y funcional de los mismos.

Los lípidos a manera de manchas son lípidos neutros -triglicéridos y estéridos- y aumentan de tamaño al envejecer las hojas; se describen como grasas de reserva que se acumulan durante el invierno y menguan en la primavera y el verano.

Las características del contenido lipídico de las acículas colectadas en Tlamacas se apegan más fielmente a la somera descripción presentada, mientras que en Cementerio y Casamanero se da una sustitución de los tipos lipídicos (aumento en lípidos a manera de mancha y disminución de aquéllos como pequeñas gotas) y en Lobos una desaparición casi total de ambos.

Se ha sugerido que el ozono es capaz de inhibir una vía en la síntesis de lípidos favoreciendo el incremento del producto de una rama alterna (Swanson y Thomson, *op cit.*), pero también se sugiere la hidrólisis de algunos que pueden proveer los ácidos grasos libres necesarios para la síntesis de otros (Tomlinson y Rich *op cit.*).

El ataque por radicales libres en ácidos grasos poliinsaturados de lípidos polares ocasiona su fragmentación y la formación de malondialdehído -que es un producto de oxidación de ácidos grasos insaturados- y de otros fragmentos (Malhotra y Khan, *op cit.*; Halliwell y Gutteridge, 1989 en Fangmeier *et al.*, 1990). De acuerdo a los estudios de Wolfenden y Wellburn (*op cit.*) y Anttonen *et al.* (*op cit.*) sobre el efecto del ozono en lípidos, algunos de estos fragmentos pueden ser ácidos grasos libres de cadenas más cortas que las de aquellos de los que derivan y con mayor grado de saturación. Ahora bien, cuando hay un incremento de ácidos grasos libres de manera que empiezan a acumularse, son transformados en triacilgliceroles, a fin de neutralizar su efecto tóxico como desacopladores de la fosforilación y mediadores de la desintegración de tilacoides (Sakaki *et al.*, *op cit.*).

Con base en lo recién expuesto y en las descripciones de los tipos lipídicos, es factible que aquéllos a manera de gotas sean lípidos polares con ácidos grasos poliinsaturados -dada su forma y densidad- que al desaparecer aporten los ácidos grasos que se constituyen en los triglicéridos con mayor grado de saturación que son las manchas claras.

Este parece ser el caso en Cementerio y Casamanero donde se favorece la producción de lípidos como manchas -que teóricamente no deberían estar por la época del año y por su ausencia en Tlamacas- y se inhibe la de lípidos como gotas.

Es significativo el hecho de que el contenido de lípidos como manchas sea diferente en los cementerios; se sabe que la exposición a ozono ocasiona la pérdida de grasas neutras (Treshow *et al.*, 1969 y Trevathan *et al.*, 1979 en Malhotra y Khan, *op cit.*; Runeckles y Chevone, *op cit.*) debido posiblemente a una inhibición de la síntesis de ácidos grasos o bien por su degradación como se mencionó previamente (Tomlinson y Rich, *op cit.*).

Son variados los efectos del ozono sobre los ácidos grasos, hay quienes afirman que su composición permanece inalterada (Treshow *et al.*, 1969 y Mudd. *et al.*, 1971a en Malhotra y Khan, *op cit.*) y quienes mencionan una reducción en el contenido de todos los ácidos grasos (Tomlinson y Rich, *op cit.*). Estas divergencias pueden ser el resultado de pérdidas reales, pero difíciles de detectar por estar involucrado tan solo un pequeño porcentaje de ácidos grasos en el ataque por ozono (Heath, 1975) o bien por tratarse de diferentes grados de daño. De acuerdo a los resultados, en Cementerio posiblemente la síntesis o contenido de ácidos grasos sea normal,

pero se desvían para la producción de grasas neutras; en Casamanero posterior a la desviación de recursos empiecen a menguar disminuyendo el contenido de grasas neutras, dándose en las muestras de Lobos el caso extremo con un agotamiento total de los recursos.

b) Lípidos de células albuminosas, de floema y de tejido de transfusión:

Se desconoce la naturaleza y función de los lípidos de estas células. Se sabe que las células albuminosas de Picea abies contienen compuestos lipídicos (Sutinen, *op cit.*) y se asume por la naturaleza de éstas y por la reacción positiva a proteínas de pequeños puntos en el floema, que los lípidos de estos dos tipos celulares tienen una fracción protéica -lipoproteínas-, de manera que su disminución en los cementerios pueda estar relacionada a alteraciones en el metabolismo de las proteínas según se analizará posteriormente, o bien, a una reducción, peroxidación y/o hidrólisis de sus ácidos grasos, ya que su alta densidad hace suponer que son lípidos poliinsaturados muy susceptibles a esos procesos.

Por cuanto a los lípidos del tejido de transfusión, es posible que su descenso se explique por los mecanismos ya mencionados.

PROTEINAS

La técnica aplicada en este trabajo sólo permitió la tinción diferencial de ciertos componentes del floema, mismos que parecen coincidir con las diminutas gotas de lípidos observadas en este tejido al microscopio electrónico y con los pequeños puntos que se describen en la sección de carbohidratos.

Aunque en el presente estudio no es posible determinar el contenido protéico de los tejidos, en numerosas investigaciones se ha reportado su rápido decremento en hojas, tallos y raíces bajo exposiciones agudas a ozono. Esta disminución se ha asociado a una marcada descomposición de las proteínas a aminoácidos o a una inhibición en la síntesis de proteínas como consecuencia de un daño del retículo endoplásmico (Heath, 1975; Rabe & Kreeb, 1979; Ting y Mukerji, 1971 y Constantinidou y Kozlowski, 1979 en Malhotra y Khan, *op cit.*). De ahí que si los lípidos de células albuminosas y de floema son lipoproteínas, la reducción de su contenido, así como del de los lípidos de endodermis asociados a retículo endoplásmico, quizás pueda explicarse por estos mecanismos.

Por lo que respecta a las alteraciones observadas a nivel ultraestructural de citoplasma y sistemas membranosos de cloroplastos, aunque no sea posible identificarlas a nivel histoquímico, pueden estar asociadas de alguna manera a modificaciones en el metabolismo de las proteínas, las cuales probablemente se inducen por ozono.

Este contaminante puede oxidar aminoácidos susceptibles, esenciales para conferir o mantener la estructura terciaria y/o la actividad de las proteínas (Malhotra y Khan, *op cit.*). La pérdida de la estructura terciaria o desnaturalización ocurre cuando se rompe el sistema de enlaces y la proteína puede coagularse o precipitarse (Bidwell, *op cit.*). Ya que la matriz citoplasmática y particularmente su sistema de microtúbulos está constituido por proteínas, es posible que su granulación y aumento de densidad, sean consecuencia de una alteración estructural de las mismas.

Es factible que este fenómeno también ocurra a nivel de membranas. Se piensa que la reacción del ozono con las proteínas expuestas del plasmalema la desorganizaría, y con ello alteraría el metabolismo celular. La reacción con estas proteínas parece involucrar los residuos de aminoácidos aromáticos (triptofano y fenilalanina) y el aminoácido con grupo sulfhidrilo (cisteína), importantes para la integridad estructural de las proteínas (Heath, 1980 y Mudd & Freeman, 1977 en Kozlowski y Constantinidou, *op cit.*). Si es así, este fenómeno debe involucrar todos los sistemas membranosos.

METABOLITOS SECUNDARIOS

COMPUESTOS FENOLICOS

FENOLES EN VACUOLAS

Las técnicas de OsO_4 y de safranina verde rápido permiten la identificación de compuestos fenólicos que normalmente llenan las vacuolas de las células de parénquimas en empalizada, esponjoso, endodérmico y de transfusión, así como de vacuolas de células epidérmicas y células taníferas.

Además de este material existe otro que, aunque de naturaleza química semejante, presenta un arreglo estructural diferente y no es común o propio de tejidos sanos. Este se encuentra a manera de cuerpos esféricos (Fig. 3G), o bien como estructuras reticulares (Fig. 4A) y naturalmente son pardas como las vacuolas moderadamente densas o claras de células parenquimáticas.

Ambas estructuras surgen principalmente en el interior de las vacuolas de células de tejido de transfusión y de endodermis, pero pueden presentarse aún en parénquima esponjoso, parénquima en empalizada y epidermis; especialmente los cuerpos esféricos (Fig. 4B y 8C). Las fotografías en microscopio electrónico de las pequeñas esferas de las células de la endodermis y del tejido de transfusión muestran indicios de una reticulación (Fig. 3H), lo que hace suponer que ambas inclusiones son realmente el mismo tipo de estructura, sólo que con distinto grado de desarrollo: mientras la apariencia esférica es pequeña, poco desarrollada, la reticular surge al crecer la primera, por lo que se incluyen de manera conjunta en la tabla 8.

Tanto en el tejido de transfusión como en el endodérmico coinciden ambas formas, sólo que en el primero se tiende más a la esférica y en el segundo a la reticular.

TABLA 8. CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS EN FORMA DE ESTRUCTURAS ESFERICAS Y RETICULARES, EN ACICULAS DE *Abies religiosa*.

TEJIDOS	SITOS Y EDAD (en años) DE ACICULAS EN QUE SE PRESENTAN			
	TLAMACAS SOLO EN 3 AÑOS	CEMENTERIO SOLO EN 3 AÑOS	CASAMANERO DESDE UCA	LOBOS DESDE UCA
ENDODERMIS	X	X	XX	XXX
TEJ. TRANSF.	X	X	XX	XXX
	X = POCO	XX = MODERADO	XXX = MUCHO	

Los resultados demuestran que las muestras del sitio Lobos posee no sólo los mayores niveles de este tipo de compuestos fenólicos, sino que sobrepasan con mucho los del resto de los cementerios, lo cual indica nuevamente una respuesta más intensa de este sitio al agente perturbador, misma que se verifica ya desde el UCA. En Casamanero la respuesta es menor, pero igualmente temprana; mientras que en Cementerio y Tlamacas es pobre y ocurre sólo hasta los tres años.

Las pruebas realizadas en plántulas demuestran que la producción de estas estructuras es igual o más elevada que en los árboles maduros de Lobos, ya que se aprecian no sólo en la endodermis y en el tejido de transfusión, sino en casi todos los tejidos (Fig. 8C).

COMPUESTOS FENOLICOS EN CELULAS NECROSADAS

Como se menciona en capítulos anteriores, las células cuyos contenidos han sufrido un proceso lítico presentan como único vestigio restos de paredes pero con un notable engrosamiento, particularmente en su parte superior, que reacciona positivamente como compuesto fenólico con la técnica de safranina verde.

El término "compuesto fenólico" comprende una extensa variedad de sustancias vegetales que poseen en común un anillo aromático portador de uno o más radicales oxhidrilo. Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y sus funciones son tan numerosas, que no siempre son bien conocidas. Se sabe que pueden jugar un papel relevante en los procesos fisiológicos de las plantas que los producen, p.ej. el transporte de electrones de la fotosíntesis; así mismo pueden tener importancia a nivel ecológico, p.ej. la polinización por insectos de las flores que los contienen; o bien, como mecanismos de defensa contra patógenos -hongos, bacterias y virus- o herbívoros -insectos- (Robinson, 1993).

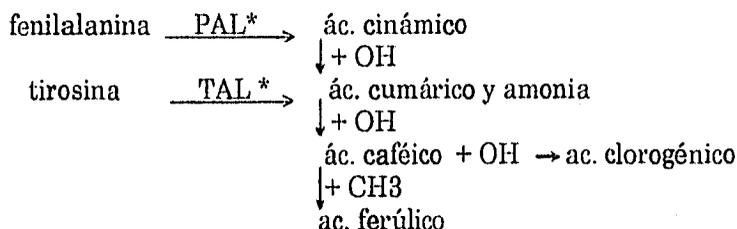
En esos casos, los fenoles son componentes que se presentan comúnmente en las plantas, de la misma manera que los taninos dentro de las vacuolas de células parenquimáticas sanas de algunas coníferas como *Picea abies* y *Abies balsamea* entre otras (Chabot y Chabot, *op cit.*; Sutinen, 1987), lo que implica que el contenido de las vacuolas de *A. religiosa* no es más que el material ergástrico propio de estas células, además de que representa una parte importante de las reservas de carbono de la hoja (Horborne, *op cit.*; Chabot y Chabot, *op cit.*). Este aspecto resulta de particular importancia, pues según descripciones previas, hay una continua y marcada degradación de estos compuestos en las vacuolas de los tejidos de cementerios, lo cual debe significar un agotamiento de dichas reservas.

Por otra parte, según los resultados, en *A. religiosa* existen además de los taninos normales, compuestos fenólicos que no constituyen un material propio de tejido sano y cuya síntesis se está viendo estimulada de alguna manera; se trata de los cuerpos esféricos y reticulares, y de los depósitos en paredes de células necrosadas. Aunque los cuerpos esféricos han sido reportados en Chabot y Chabot (*op. cit.*) en *Abies balsamea*, se desconoce su origen. Muy posiblemente todos ellos corresponden a las sustancias conocidas como fitoalexinas, esto es, aquellas que son tóxicas para los patógenos pero que se producen sólo durante o a continuación de su invasión y que frecuentemente son derivados fenólicos (alexina significa evitar o guardar contra) (Bidwell, 1990). No obstante que esta definición por sí misma implica la intervención de un factor biótico -del cual además no hay evidencia en *Abies religiosa*-, el ozono es también un eficaz estimulante de la síntesis de estos compuestos. Según Eckey-Kaltenbach *et al.* (1994), una sola exposición a ozono (0.2 ppm/10 h), es capaz de inducir en perejil la producción de fitoalexinas de furanocumarina, las cuales de otra manera son el resultado de la infección por hongos.

La acumulación de fenoles inducida por ozono se reporta en muchas especies vegetales. Algunos estudios detectan un aumento de fenoles totales o bien elevados niveles de ácidos clorogénico y caféico (o-difenol), antocianinas, glucósidos, derivados flavonoides y furanocumarinas (Howell y Kremer, *op cit.*; Howell, *op cit.*; Tingey, 1974; Keen y Taylor, 1975; Eckey-Kaltenbach *et al.*, *op cit.*). La acumulación de este tipo de compuestos a su vez se ha relacionado a la enzima fenilalanina amonio liasa -PAL-, que es una enzima clave en su biosíntesis y cuya actividad se ve estimulada por la exposición crónica -o única- a ozono (Tingey, *op cit.*).

La fenilalanina, la tirosina y el triptofano se forman por una vía común a muchos compuestos fenólicos denominada vía del ácido shikímico. Una vez formada la fenilalanina sufre una reacción de desaminación en la que un amonio es liberado con la participación de la PAL

dando origen al ácido cinámico. Una serie de reacciones van dando lugar a otros productos según se muestra a continuación.



* PAL= fenilalanina amonio liasa TAL= tirosina amonio liasa

Estos compuestos relativamente simples tienen la propiedad de formar pigmentos en las hojas de muchas especies vegetales, ya sea dando origen a diversos derivados como las cumarinas, la lignina, los flavonoides, los taninos, las antocianinas; o bien, oxidándose a sus respectivas o-quinonas que se polimerizan con aminoácidos, proteínas, aminas y grupos sulfhidrilo (Bidwell, *op cit.*; Robins, *op cit.*, Howell y Kremer, *op cit.*; Howell, *op cit.*)

Por lo que respecta a los cuerpos esféricos y reticulares, la gran afinidad inicial que muestran los primeros al OsO₄ y a la técnica de PAS, indica que son glucósidos cuya fracción fenólica es muy posiblemente un o-difenol, o bien, una o-diquinona. Es factible además, que el incremento en tamaño y adquisición de la forma reticular sea el resultado de una continua polimerización de estos compuestos, que por alguna razón van perdiendo su afinidad al OsO₄ y al Schiff, quizás porque se asocian a otras fracciones químicas.

La hidrólisis de los pigmentos encontrados por Howell y Kremer (*op cit.*) en plantas fumigadas con ozono, indica que son polímeros formados por una porción fenólica (un o-difenol), veinte aminoácidos, siete metales y dos azúcares. En el presente trabajo se desconoce el factor que pudiera propiciar la polimerización, sin embargo, como se mencionó previamente, son las quinonas, derivados de la oxidación de los fenoles, las que fácilmente se polimerizan y según Howell y Kremer (*op cit.*) el ozono puede oxidar directamente estos compuestos.

En cuanto a la necrosis con acumulación de compuestos fenólicos en el parénquima en ompalizada de A. religiosa, recuerda la reacción de hipersensibilidad de muchas plantas (particularmente mono y dicotiledoneas) como mecanismo de resistencia a la invasión de patógenos -proceso que en ocasiones va asociado a la formación de un tejido subyacente de cicatrización (Keen y Taylor, 1975; Mauseth, *op cit.*). El ozono, sin embargo, puede producir el mismo efecto (necrosis); la presencia de lesiones pigmentadas ha sido descrita por Howell y Kremer (*op cit.*), Howell (*op cit.*), Keen y Taylor (*op cit.*) y Treshow (1984), y aparentemente puede involucrar la evolución de dos fenómenos: síntesis de compuestos fenólicos y su oxidación por vía enzimática.

Keen y Taylor (*op cit.*) y Howell y Kremer (*op cit.*) encuentran que ciertos compuestos flavonoides de plantas expuestas a ozono están asociados a tejidos necróticos y ya que su acumulación es mucho menor en aquellos casos en que la necrosis es más inmediata que cuando es más tardía (Keen y Taylor, *op cit.*), se deduce que su síntesis es previa a la necrosis. Este aspecto concuerda con los resultados de Howell y Kremer (*op cit.*) en los que el pigmento se produce antes de la detección visual de los daños. Este fenómeno posiblemente se relacione con la estimulación de la PAL como se señala previamente. Aunque se desconoce el mecanismo que desencadena la acumulación de estos compuestos, Keen y Taylor (*op cit.*) consideran que puede ser el cambio en la permeabilidad de las membranas celulares ocasionado por ozono.

Ahora bien, ya que la acumulación de estos pigmentos está estrechamente asociada a la necrosis y que químicamente éstos son el resultado de una polimerización, posiblemente de componentes flavonoides que se han oxidado y de aminoácidos o proteínas, se cree que queda involucrado el proceso de oxidación a través de enzimas oxidantes.

La oxidación de los fenoles puede seguir dos vías, por contacto con las enzimas del complejo fenolasa: polifenol oxidasa -PPO- (catecol oxidasa) y peroxidasa, y por oxidación directa por oxígeno molecular, en las que el ozono puede ser el promotor.

Los fenoles están presentes en cloroplastos y vacuolas de las células vegetales. La enzima PPO y otras del complejo fenolasa están ligadas a los tilacoides o al estroma y al citoplasma. Aunque dichas enzimas y sus sustratos se encuentran próximos, no pueden reaccionar hasta que una alteración física (ya sea una herida, la invasión de patógenos o el daño por insectos) o el proceso de senectud natural alteren la permeabilidad y/o la integridad de las membranas, exponiendo los fenoles a las enzimas oxidantes permitiéndoles reaccionar en presencia de oxígeno (Tolbert, 1973; Howell y Kremer, *op cit.*; Howell, *op cit.*; Tingey *et al.*, 1975; Bidwell, *op cit.*).

Este proceso puede ser inducido directamente por ozono debido a su capacidad de alterar la estructura de las membranas celulares (Howell y Kremer, *op cit.*; Howell, *op cit.*). Dado que en *A. religosa* no hay evidencia de daño por los factores primeramente señalados, queda la posibilidad de que el ozono sea el responsable de la pigmentación de células necróticas con la participación de las enzimas y sustratos asociados a citoplasma y vacuolas respectivamente.

Es posible que un fenómeno similar ocurra a nivel de cloroplastos con las enzimas y sustratos relacionados a ellos. La enzima del complejo fenolasa asociada a estos organelos es la PPO, que se encuentra en forma latente en los sáculos de los tilacoides. En cloroplastos intactos los sustratos no pueden alcanzar su sitio activo, pero al perder su integridad, estos sitios quedan expuestos catalizando la oxidación de mono y dihidroxifenoles (Tolbert, *op cit.*; Czaniński y Catesson (*op cit.*)).

A este respecto es importante resaltar que la degradación de tilacoides descrita en capítulos anteriores, es signo de que se ha llevado a cabo la pérdida de compartimentalización, y que la existencia de cloroplastos rojos (Figs. 7F y 7H) revelados por la técnica de tinción con safranina, puede ser la manifestación histoquímica del contacto de la enzima y su sustrato, ya que según se menciona previamente, la safranina es afín a los compuestos fenólicos.

La coloración roja de cloroplastos siempre que sea por o-diquinonas, bien puede ser el resultado de la oxidación directa por ozono de los o-difenoles posiblemente presentes en estroma; de esta manera puede coincidir el aumento de densidad del estroma y la conservación de la integridad de los tilacoides como en el caso de los cloroplastos "F".

Es igualmente posible que la tinción de los cloroplastos no involucre necesariamente productos oxidados, sino sus correspondientes o-difenoles, en cuyo caso el aumento de densidad del estroma de cloroplastos que aún poseen tilacoides claros pero íntegros sea resultado de la afinidad del OsO_4 con estos compuestos. Si esto es así, el incremento de densidad del estroma podría reflejar una elevación en la cantidad total de compuestos fenólicos -o-difenoles- en el cloroplasto. El estímulo de la síntesis de estos compuestos se ha reportado por efecto del ozono según se señaló previamente.

Los o-difenoles tales como los ácidos clorogénico y caféico en altas concentraciones suprimen la fijación del CO_2 y el desprendimiento de O_2 ; al añadir al cloroplasto un aceptor de electrones exógeno, se anula el efecto del o-difenol, lo que sugiere que la supresión de la fotosíntesis reportada como daño por ozono bien puede deberse a la acción de o-difenoles y o-diquinonas actuando como donadores o aceptores de electrones que desestabilizan o interrumpen la vía normal del flujo de electrones de la fotosíntesis o cambiando el potencial rédox de los intermediarios de la cadena de transporte de electrones. La foto-reducción parcial

de las o-diquinonas también produce semiquinonas altamente reactivas e inhibitoras (Howell, *op cit.*).

Finalmente es importante señalar que el ozono estimula la producción de alfa-tocoferol, y ya que los tocoferoles son importantes antioxidantes, su incremento indica el acrecentamiento de un estrés oxidativo (Schmieden y Wild, 1994; Robinson, *op cit.*). Los tocoferoles que en general constituyen la vitamina E se encuentran en aceites vegetales, y ya que en especial los alfa-tocoferoles se localizan exclusivamente en plastos (Robinson, *op cit.*) y que los plastoglobuli son elementos lipídicos que contienen grandes cantidades de alfa-tocoferolquinona (Muhlethaler, *op cit.*), es de suponer que el incremento de estos últimos en cloroplastos "G" y "H" de A. religiosa repercute en un aumento en el contenido de tocoferoles en estos organelos, muy posiblemente como resultado a su exposición a ozono.

Destaca además el hecho de que aunque estos compuestos son agentes antioxidantes, extrañamente pueden acelerar la peroxidación de lípidos al elevarse sus concentraciones (Robinson, *op cit.*), fenómeno que posiblemente se esté llevando a cabo en los plastoglobuli de cloroplastos de A. religiosa.

CRISTALES DE OXALATO DE CALCIO

En algunas muestras de acículas de cementerios incluídas en resina epóxica, se aprecian, en células de parénquima en empalizada, proyecciones internas de la pared impregnadas de cristales a manera de rafidios (Fig. 5D). Sin embargo, ya que estas estructuras pueden ser muy poco perceptibles, es muy factible que hayan pasado inadvertidas en muchos casos, lo que evita la determinación de un patrón de ocurrencia.

Estas formaciones cristalinas han sido descritas por Fink (1991) en acículas de Picea abies expuestas a ozono y están constituídas de depósitos de callosa y celulosa de la pared con inclusiones de oxalato de calcio.

Ya que según el autor, las coníferas en general "guardan" el calcio en el apoplasto (a diferencia de las angiospermas que lo acumulan en el simplasto), estos precipitados cristalinos dentro de sus células indican que ha habido un flujo desmedido de calcio hacia el protoplasma, generado muy posiblemente por el ozono, al alterar la permeabilidad de las membranas. Esta penetración a su vez favorece la formación de callosa al activar la enzima 1,3- glucano sintetasa, lo que explica su acumulación. Además, el flujo excesivo de este elemento promueve la senescencia, ya que desencadena procesos catabólicos como la activación de la fosfolipasa y la lipoxigenasa, que provocan un reciclamiento más acelerado de las membranas y con ello un aumento de su permeabilidad. El calcio a elevados niveles en el apoplasto y bajos en el simplasto, retarda la senescencia, mientras que de manera inversa la promueven (Fink, *op cit.*).

La presencia de este tipo de formaciones cristalinas en A. religiosa sugiere que el proceso recién descrito se está llevando a cabo en esta especie.

SINTOMAS VISIBLES

DAÑOS EN LAS ACICULAS

Las acículas colectadas en Tlamacas se muestran sanas tanto en el haz como en el envés (Fig. 8I) -salvo escasas lesiones ocasionadas por insectos desfoliadores-. Las acículas de los cementerios presentan evidencias macroscópicas de daño, que aunque pueden variar en cuanto a su extensión entre los sitios, su apariencia es la misma en los tres cementerios y coinciden con los síntomas reportados por Alvarado (*op cit.*) y Alvarado *et al.* ya desde 1987 (b). Estos se aprecian como diminutos puntos claros presentes exclusivamente en el haz (sin síntomas visibles en el envés) localizados preferentemente en la base (Fig. 8E) -lo que concuerda con las alteraciones en el parénquima en empalizada descritas con anterioridad-. Con el tiempo empiezan a cambiar su coloración y a coalescer (Fig. 8F), extendiéndose lateralmente hacia el ápice, de manera que pueden observarse casos extremos de hojas cuyos limbos se han tornado café-rojizos, conservándose intacta la zona de la hendidura que corresponde al cilindro central (Fig. 8G). Con frecuencia la lesión se agudiza en los márgenes u orillas de la acícula, haciéndose entonces evidente también por el envés, ya que en esa zona el tejido corresponde al parénquima en empalizada. Finalmente el envés en su totalidad toma una coloración amarillenta (Fig. 8H).

El detrimento de las acículas se hace más conspicuo con la edad y culmina en la abscisión prematura de las hojas más maduras (desde 3 años) (Fig. 9C), en tanto que las lesiones se van desarrollando en aquellas más jóvenes que se han conservado (1 y 2 años).

Por lo que concierne a ataques por desfoliador (posiblemente Evita hyalinaria según lo reportado por Vázquez, 1988), existen indicios en los tres cementerios, particularmente en el arbolado de Casamanero, en donde varias de sus acículas manifiestan alguna lesión, pero sin ser de carácter grave. La evidencia inicial se observa en el envés, razón por la cual se detectan los daños en el parénquima esponjoso antes descritos, y consiste en la presencia de diminutas perforaciones rodeadas por un tejido costroso café, formando manchas redondas que posteriormente se hacen evidentes en el haz -primero de color claro o cloróticas, después oscuras-. Estas lesiones pueden distinguirse indistintamente a lo largo de la acícula y en cualquier categoría de edad.

Los síntomas de las acículas de A. religiosa de los cementerios y Tlamacas, descartan en forma contundente la acción de un desfoliador como el factor de decaimiento del arbolado en el Desierto de los Leones; mismo que tampoco puede considerarse como agente secundario de daño. Por otra parte, aún cuando las lesiones amorfas blanquecinas se han asociado a la infestación por ácaros, la ausencia de éstos en los tejidos elimina esa posibilidad en los cementerios, en cambio bien pueden asociarse a los efectos del ozono sobre la vegetación.

Existen cuatro tipos reconocibles de daños por ozono que son: clorosis, decoloración, lesiones pigmentadas y necrosis bifacial. La clorosis está asociada al deterioro de cloroplastos y a la reducción del contenido de clorofila de las células afectadas. Las lesiones de este tipo pueden comprender áreas de aproximadamente 1 mm de diámetro que coalescen dando origen a punteado o moteado clorótico (Guderian, *op cit.*; Hill *et al.*, *op cit.*; Treshow, *op cit.*). Estos síntomas son más comunes en pino donde el mesófilo no está diferenciado, por lo que se desarrollan en cualquier superficie de la acícula (Hill *op cit.*; Davis y Wood, 1973). En células con mesófilo diferenciado se confinan al haz (Hill, *op cit.*; Treshow, *op cit.*; Lucas *et al.*, *op cit.*).

La decoloración y las lesiones pigmentadas son síntomas de muerte celular, sólo que en el primer caso se generan espacios intercelulares que se evidencian como manchas claras; las lesiones pigmentadas resultan de la acumulación en las células muertas del parénquima en

empalizada de pigmentos -antocianinas o polifenoles específicos inducidos por ozono. Estos síntomas son por lo común característicos de árboles deciduos, arbustos y herbáceas, y ocurre principalmente en el haz, pero esto es tan solo el resultado de poseer mesófilo diferenciado como en el caso de A. religiosa.

La necrosis bifacial es un caso agudo de necrosis en que el daño se ha extendido por ambos lados.

Los puntos claros de A. religiosa deben ser la manifestación del daño en cloroplastos más que de necrosis según los resultados a nivel celular y tisular; y la expansión de las lesiones a lo largo de la acícula excluyendo la nervadura coincide con lo reportado por Hill *et al.* (*op cit.*).

La abscisión prematura de hojas es uno de los daños inducidos por ozono y puede ser la consecuencia de exposiciones breves a elevadas concentraciones, pero más a menudo es el resultado de exposiciones prolongadas o continuas y debiera considerarse como un síntoma crónico (Taylor, 1973; Parmeter y Miller, 1968 en Taylor, 1984; Costonis y Sinclair, *op cit.*; Evans y Leonard, *op cit.*; Rich, *op cit.*). De acuerdo a Byres *et al.* (1992) y Lucas *et al.* (*op cit.*), esta abscisión es el resultado de una senectud temprana de las hojas promovida por ozono, misma que se comprueba a nivel histológico y ultraestructural con los estudios de numerosos autores, entre ellos los de Ojanperä *et al.* (*op cit.*), los cuales coinciden con los síntomas observados en A. religiosa.

Finalmente, es importante señalar que cualquier factor que afecte la tasa de producción o sobrevivencia de las hojas fotosintéticamente activas, repercutirá a largo plazo en el crecimiento de la planta (Byres *et al.*, *op cit.*).

VIGOR Y TIPO DE MUERTE DEL ARBOLADO

Todo proceso patológico se manifiesta tarde o temprano en una disminución del vigor -vitalidad- del árbol que lo padece, por lo que a continuación se señala por una parte el vigor del arbolado de cada uno de los sitios y por otra el vigor promedio del arbolado del Desierto de los Leones (los tres sitios) según la clave antes propuesta.

TABLA 9. VIGOR DEL ARBOLADO DE CADA UNO DE LOS SITIOS ESTUDIADOS				
VIGOR	SITIOS			
	TLAMACAS	CEMENTERIO	CASAMANERO	LOBOS
MUY BUENO	67 %			
BUENO	25	8 %		25 %
MODERADO	8	50	92 %	58
POBRE		17	8	17
MUY POBRE		8		
CASI MUERTO		17		

TABLA 10. RELACION TOTAL DEL VIGOR DEL ARBOLADO EN EL DESIERTO DE LOS LEONES		
VIGOR	NO. TOTAL DE ARBOLES	PORCENTAJE
BUENO	3	8
MODERADO	25	69
POBRE	5	14
MUY POBRE	1	3
CASI MUERTO	2	6

En relación al daño por agentes abióticos y físicos se tiene:

TABLA 11. AGENTES BIOTICOS Y FISICOS QUE AFECTAN EL ARBOLADO DE CADA UNO DE LOS SITIOS ESTUDIADOS									
AGENTES			SITIOS Y DAÑO						
	TLAMACAS			CEMENTERIO		CASAMANERO		LOBOS	
	%	TP	%	%	TP	%	TP	%	TP
BIOTICOS	83	lig. 40 mod. 20 sev. 40	33	mod. 50 sev. 50	16	sev. 100	25	lig. 33 mod. 66	
FISICOS	50	lig. 100	8	lig. 100	33	lig. 100	17	lig. 100	
TP = Tipo de daño lig = ligero mod = moderado sev = severo									

De acuerdo a la tabla 11, en Tlamanca 50% del arbolado presenta algún daño físico, pero son lesiones ligeras que no afectan fuertemente el vigor. El 83% presenta daños por agentes bióticos y pueden ser ligeros 40%, moderados 20% y severos 40%. El factor más frecuente es el ataque por descortezador (posiblemente *Pseudohylesinus variegatus* que se presenta como descortezador secundario del oyamel, según Vázquez, 1988), pero en la mayoría de los casos no es exitoso; le sigue en importancia el muérdago (quizás del género *Arceuthobium* de acuerdo a Vázquez, 1988) cuya invasión es severa y finalmente los ácaros que se observan muy escasamente pero con daños severos.

En Cementerio hay daños físicos en 8% de los casos, pero son ligeros. Hay invasión de descortezadores en un 33% de los cuales 50% constituye daño moderado y 50% severo.

En Casamanero hay presencia de descortezadores sólo en un 8% a manera de daño severo y hay evidencias de ataque por defoliador en algunas acículas, aproximadamente hasta en un 20% pero con lesiones escasas, por lo que no se puede considerar pernicioso. También se detectan tumores en un 8% con carácter severo. Por cuanto a los daños físicos, existen en un 33% de los casos; los cuales son ligeros.

En Lobos la aparición de descortezadores está en el 25% de los casos, y los daños pueden ser ligeros (33%) o moderados (66%). Los daños físicos se aprecian en un 16% y son ligeros.

La tabla 12 muestra, en resumen, los daños evidentes en el arbolado del Desierto de los Leones.

TABLA 12. RELACIÓN TOTAL DEL ARBOLADO DEL DESIERTO DE LOS LEONES DAÑADO POR AGENTES BIOTICOS Y FISICOS.		
- TOTAL DE ARBOLES ESTUDIADOS	36	100 %
- TOTAL DE ARBOLES CON DAÑOS FISICOS	8	22 %
- TOTAL DE ARBOLES CON DESCORTEZADOR	8	22 %

Aunque el tipo de muerte que sufre el arbolado es un parámetro que se emplea para la determinación del vigor, se considera por separado. Los resultados son los siguientes.

TABLA 13. TIPO DE MUERTE DEL ARBOLADO EN CADA UNO DE LOS SITIOS ESTUDIADOS				
TIPO DE MUERTE	SITIOS			
	TLAMACAS	CEMENTERIO	CASAMANERO	LOBOS
ASCENDENTE	8 %	83 %	66 %	66 %
AZAROSA	25		16	
ASCENDENTE LATERAL			16	33
COMPETENCIA*	16			
NO DETERMINABLE		16		

*La competencia refiere el daño por interferencia física con otro árbol.
 NOTA: El resto del porcentaje de Tlamacas no muestra señales de muerte prematura por algún factor.

Los patrones de muerte del arbolado del Desierto de los Leones en orden de importancia son:

TABLA 14. RELACION TOTAL DEL TIPO DE MUERTE DEL ARBOLADO DEL DESIERTO DE LOS LEONES		
- TOTAL DE ARBOLES ESTUDIADOS	36	100 %
- TOTAL DE ARBOLES CON MUERTE ASCENDENTE	26	72 %
- TOTAL DE ARBOLES CON MUERTE ASCENDENTE LATERAL	6	16 %
- TOTAL DE ARBOLES CON MUERTE AZAROSA	2	5 %
- TOTAL DE ARBOLES CON MUERTE NO DETERMINABLE	2	5 %

Los resultados señalan que la mayor o menor pérdida de vigor del arbolado de Tlamacas es, al menos en principio, de origen biológico, no así la de los cementerios -no obstante que el arbolado se ve más seriamente afectado- y la incidencia de plagas es baja en relación al sitio anterior y poco exitosa.

De acuerdo a la observación personal y a la literatura (Alvarado *et al.*, 1987b; y Alvarado, *op cit*), la retención foliar del oyamel es normalmente de 6 años o más, de modo que en el Desierto de los Leones esta especie sufre una defoliación anormal muy marcada, ya que a lo sumo se encuentran acículas de tres años.

Se sabe que el ozono causa daño visible en forma de pérdida prematura de las hojas, de disminución en el crecimiento y vigor del árbol, predisposición al ataque por insectos descortezadores y muerte del árbol (Evans y Leonard, *op cit.*). Si bien estos aspectos no son exclusivos del daño por ozono, su inspección es útil pues indica el estado fitosanitario en que se encuentra el organismo y puede dar un indicio del proceso que se está desarrollando.

Por otra parte, aunque el tipo de muerte del arbolado es una característica que Paz (*op cit.*) emplea en la determinación del vigor, tiene por sí misma un carácter bioindicador útil a

nivel de diagnosis. Según Miller (comunicación personal) el patrón de deterioro de la copa es una clave visual importante en la detección del daño por ozono, ya que la abscisión del follaje de mayor edad se acelera por este contaminante, de manera que los árboles dañados poseen ramas sin hojas cerca del tronco y las ramas inferiores tienen menor cantidad de hojas. Esto es un patrón de deterioro que progresa de dentro hacia afuera y de abajo hacia arriba (muerte ascendente), patrón que corresponde al dominante encontrado en cada uno de los cementerios y en general, en el arbolado del Desierto de los Leones. Si bien este tipo de muerte es un fenómeno normal relacionado a la edad de las hojas, su importancia radica en lo acelerado de su proceso lo que coincide con el efecto de senectud prematura ocasionada por ozono; pero además contrasta con el patrón de muerte descendente, que se presenta cuando el daño es por descortezadores (Aguirre y Bernal, *op cit.*), aspecto que apoya su eliminación como agentes primarios del daño.

Aunque las alteraciones en Tlamacas pueden deberse principalmente a la incidencia de organismos patógenos, la evidencia ultraestructural y de contenido de metabolitos, demuestra que el mismo factor que daña a los cementerios puede estar ejerciendo cierta influencia en las acículas estudiadas de mayor edad.

Estas consideraciones pretenden explicar el origen de la pérdida de vigor, pero ¿qué ocurre con respecto a la severidad del daño?

Aún cuando la mayor proporción del arbolado de cada uno de los cementerios presenta un vigor "moderado", las categorías en Cementerio indican una tendencia hacia su disminución, en tanto que en Lobos parece conservar un mejor estado. Estos resultados coinciden con la mortandad de árboles en cada sitio: comparativamente en Cementerio hay mayor número de árboles muertos que en Casamanero y en éste que en Lobos, aspecto que está estrechamente relacionado con las labores de limpia forestal realizadas por COCODER, de las cuales las más intensas se han verificado en el Cementerio, sitio que corresponde a la ladera mayormente expuesta a la Ciudad. Sin embargo, los valores de vigor no se apegan a los resultados relativos a los daños a nivel estructural de organelos y tejidos, así como de las alteraciones en el contenido de metabolitos de las acículas.

De acuerdo a ellos, cabría esperar que el arbolado de Lobos fuera el más seriamente afectado, a continuación Casamanero y finalmente Cementerio, pero ¿por qué esto no se cumple de esta manera? La respuesta posiblemente radique en los parámetros "tipo de daño" y "tiempo". Se piensa que en Cementerio los pocos árboles que quedan son organismos más tolerantes en los que el proceso de daño es mucho más lento y menos severo -daño crónico- y que por llevar mucho tiempo padeciéndolo, su vigor se ha deteriorado fuertemente; en tanto que en Lobos, aún cuando el daño es más drástico, no alcanza el grado máximo de afectación: muerte de árbol (al menos no en la proporción observada en Cementerio, ni aún en Casamanero) debido a que lo ha experimentado por menos tiempo. Si esta interpretación es correcta, el tipo de daño observado en Lobos puede ocasionar la muerte súbita de su arbolado.

CONCLUSIONES

- La persistencia de los síntomas de deterioro durante ocho años al menos en las acículas y arbolado de Abies religiosa, demuestra la acción constante de un mismo agente perturbador responsable de su decaimiento. Esta situación, aunada a la evidencia generada por estudios previos y por la presente investigación, descartan la acción de eventos puntuales como sequías, heladas y fuertes vientos, y señalan, además, que la acción de organismos patógenos (desfoliadores, descortezadores, ácaros, bacterias y hongos) no es responsable directa de la muerte del arbolado.

- El daño tampoco está en relación con la edad, ya que los síntomas se presentan tanto en árboles jóvenes como maduros, así como en plántulas.

- En cuanto al posible efecto ocasionado por la extracción del agua de los mantos freáticos del bosque, la evidencia histopatológica y los síntomas en plántulas sugieren que no es un estrés hídrico la causa primera de daño y tampoco es una deficiencia nutricional según los síntomas ultraestructurales de cloroplastos.

- Se considera que el agente perturbador responsable del daño del arbolado es la contaminación atmosférica presente en el Desierto de los Leones a la cual permanecen expuestas durante años las hojas perennes de A. religiosa. Las acículas de mayor edad y el tejido más maduro de las mismas son los primeros en mostrar daños, debido a que han estado expuestos por períodos más prolongados y son más susceptibles.

- Se sugiere que muy específicamente el ozono, causa graves daños en la vegetación dado que:

. Sus concentraciones en el parque son elevadas a lo largo de todo el año.

. Existen síntomas de daño a nivel visual, orgánico y ultraestructural que son indicadores de exposición a ozono.

. Aún cuando A. religiosa está sometida a una combinación de contaminantes, los síntomas corresponden a los daños reportados en otras especies como causados por ozono y que además son los mismos que los producidos por oxidantes totales en casos experimentales. Esto constituye una fuerte evidencia de que el ozono es el principal agente tóxico involucrado y que la participación de otros componentes del complejo oxidante no se distingue histológicamente en las concentraciones ambientales presentes.

Los síntomas presentes en A. religiosa que son útiles como biomarcadores para el diagnóstico de daño por ozono -sea crónico o agudo- se indican en la Tabla 15.

- La evidencia señala que el sitio inicial de daño se localiza en las membranas celulares, lo cual repercute sobre aspectos estructurales de la célula y procesos fisiológicos que alteran su contenido metabólico y conducen finalmente a la necrosis.

- El destino de la célula depende de la intensidad del daño sobre las membranas: si éste es grave, sobreviene la muerte celular en un período relativamente corto -daño agudo-; si es leve, sus funciones se ven limitadas y el daño progresa gradualmente, culminando finalmente en necrosis -daño crónico-.

- El daño crónico observado en acículas desde un año de edad, es similar al que se presenta en el proceso de senectud natural, lo cual resulta de particular interés, ya que además de que este último está también asociado a alteraciones a nivel de membranas, el daño por ozono está evidentemente ligado a la senectud prematura de las hojas.

- Los síntomas detectados en Cementerio y Casamanero parecen ser principalmente de carácter crónico y los de Lobos de tipos crónico y agudo, lo cual se debe posiblemente a un proceso de preselección dado por la muerte del arbolado más sensible en los dos primeros sitios, en los cuales posiblemente permanecen los individuos más tolerantes.

- Los síntomas de daño como la necrosis, la pérdida de carbohidratos y la producción de compuestos fenólicos que se manifiestan en árboles adultos, son mucho más severos en acículas

de plántulas; aspecto que demuestra una mayor susceptibilidad en esa etapa de desarrollo de A. religiosa.

- La clorosis, la necrosis y la acelerada abscisión de las acículas son de gran importancia ya que eventualmente pueden ocasionar la muerte del árbol.

- Los síntomas visibles e histológicos descritos serán de utilidad en el diagnóstico de daño en A. religiosa cuando éste sea tan grave como para detectarse a simple vista.

- El estudio de los síntomas descritos a nivel histológico y ultraestructural serán importantes para diagnosticar tempranamente el daño sobre un bosque de A. religiosa en el que haya sospecha de alteración.

- Estos síntomas por sí mismos no pueden considerarse como evidencia absoluta de daño por ozono, pues necesitan ir acompañados de información adicional que permita eliminar otros factores como agentes causales, tal como se efectuó en el presente estudio.

- Seguramente los daños presentes en A. religiosa asociados a ozono están relacionados a ciertas condiciones ambientales, genéticas y fisiológicas que los hacen manifestarse más conspicuamente en unos casos que en otros. Este aspecto resulta interesante y da la pauta para proseguir estos estudios para comprender de forma más integral los procesos de deterioro del arbolado y así idear técnicas de manejo adecuadas y efectivas.

- La permanencia de árboles bajo las persistentes condiciones de contaminación por ozono (en Cementerio) hace pensar en la existencia de individuos genéticamente más tolerantes, que aunque fuertemente afectados, muestran daños del tipo crónico aún con las mismas exposiciones a las que estuvieron sometidos los árboles ya muertos. Si se piensa reforestar, tendrá que ser con genotipos más tolerantes, ya que la solución del problema de la contaminación muy posiblemente tardará mucho tiempo.

TABLA 15. BIOINDICADORES DE EXPOSICION A OZONO CON CARACTER DIAGNOSTICO.

BIOINDICADOR	PROCESO	T.D.*	TEJIDO	LUGAR	E.A.*	OTDA*
- Plasmalema	.Separacion de la pared	agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
- Citosol	.Aumento de densidad	crónico	en todos	Cementerio Casamanero y Lobos	1 año	2 años
	.Degradación	agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
- Mitochondrias	.Sin diferenciar -sin membranas ext. ni crestas-	crónico	p. empalizada	Cementerio y Casamanero	2 años	3 años
	.Con crestas deprimidas	agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
		agudo	p. empalizada	Cementerio Casamanero y Lobos	1 año	---
	.En degradación	crónico agudo	p. empalizada	Cementerio Casamanero Lobos	1 año	3 años
- Cloroplastos	.Alteración de membr. ti- lacoidales y estroma	crónico	p. empalizada	Cementerio Casamanero	1 año	2 años < grave
	.Cloropl. abultados con degradación de tilacoides y numerosos plastoglobuli claros	crónico	p. empalizada	Cementerio Casamanero y Lobos	1 año	---
	.Separación de tilacoides	agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
	.Ruptura de cloroplastos	agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
	.Reducción en número	crónico	p. empalizada	Cementerio y Casamanero	2 años	---
- Tipo celular "d"	.Alteracion apreciable me- diante microscopia optica de vacuolas y cloroplastos	crónico	p. empalizada	Cementerio	3 años	3 años
				Casamanero	2 años	no
				Lobos	1 año	dominante
- Lípidos	.Sustitución	crónico	endodermis	Cementerio	1 año	---
	.Eliminación	agudo	endodermis	Lobos	1 año	---
	.Reducción	crónico	cels albumin	Cementerio y	1 año	---

BIOINDICADORES	PROCESO	T.D.*	TEJIDO	LUGAR	E.A.	O.T.D.A.
(CONTINUACION)						
Lípidos	.Eliminación	agudo	tej transfus y floema cels albulmin tej transfus y floema	Casamanero Lobos	1 año	---
- Carbohidratos	.Reducción de polisacáridos	crónico	en todos los tejidos, pero primero en p. empalizada	Cementerio y Casamanero	1 año	3 años
	.Traslocación	agudo	polisacaridos en p. empaliz., escasos en el resto de los tejidos	Lobos	1 año	---
- Compuestos fenólicos	.Producción y/u oxidación	agudo* crónico +	endodermis, tej transfusión y p. esponjoso	Lobos* Casamanero+	1 año 2 años	3 años escaso
		agudo* crónico+	necrosis en p. empalizada	Lobos* Casamanero y Casamanero+	1 año 2 años	---
- Daño en tejido	.Necrosis	crónico	p. empalizada	Cementerio y Casamanero	2 años	---
		agudo	p. empalizada	Lobos	1 año	---
- Síntomas visi- bles en las acículas	.Con punteado claro o pig- mentado en el haz, hacia la base o extendido a toda la acícula	crónico y agudo		Cementerio Casamanero y Lobos	1 año	---
		y agudo		Casamanero y Lobos		
- Tipo de muerte del arbolado	.Ascendente y de adentro hacia afuera	crónico y agudo		Cementerio, Casamanero y Lobos		---

* T.D. = TIPO DE DAÑO

E.A. = EDAD DE LA ACICULA

OTDA= OBSERVADO EN TLAMACAS DESDE LA ACICULA. ..

REFERENCIAS

- Aguirre, D.H.; T.A. Bernal. 1988. Influencia del descortezador Pseudohylesinus variegatus (Brandford) en la muerte de Abies religiosa (H.B.K.) Schl. et Cham. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- Alvarado, D.; G. Elizalde; M.L. De la Isla de Bauer y T. Hernández. 1987a. Declinación y muerte del bosque de oyamel en el sur del Valle de México: estudios dendrológicos. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Morelia, Mich.
- Alvarado, D.; M.L. De la Isla de Bauer; J. Galindo. 1993. Decline of sacred fir (Abies religiosa) in a forest park south of Mexico City. Environ. Pollut. 80:115-121.
- Alvarado, D.; T. Hernández; M.L. De la Isla de Bauer. 1987b. Declinación y muerte del bosque de oyamel en el sur del Valle de México: síntomas, desarrollo y posibles causas. Memorias del XIV Congreso Nacional de Fitopatología. Morelia, Mich.
- Alvarado, D. 1989. Declinación y muerte del bosque de oyamel Abies religiosa en el sur del Valle de México. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México.
- Alvarado, D.; M.L. De la Isla de Bauer y J. Galindo. 1989. Una posible alternativa para retardar la declinación del oyamel. Resúmenes del V Simposio sobre Parasitología forestal. Chih. México.
- Anttonen, S.; J. Herranen; P. Peura; L. Karenlampi. 1995. Fatty acids and ultrastructure of ozone-exposed Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.) needles. Environ. Pollut. 87:235-242.
- Arenas, R. 1989. Museo Vivo o Naturaleza Muerta. Ed. Universidad Veracruzana. Xalapa, México.
- Avers, Ch.J. 1983. Biología Celular. Editorial Iberoamerica. México D.F.
- Bidwell, R.G. 1990. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México.
- Beckerson, D.W.; G. Hofstra. 1980. Effects of sulfur dioxide and ozone singly or in combination, on membrane permeability. Can J Bot. 58:451-457.
- Bravo, A.H.; G.F. Perrin; E.R. Sosa; J.R. Torres. 1988. Incremento de la contaminación atmosférica por ozono en la zona metropolitana de la Ciudad de México. Ingeniería Ambiental 1:8-14.
- Bravo, A.H.; G.F. Perrin; E.R. Sosa. 1989. Gasoline's lead reduction in Mexico City. It's effects in the air quality. Paper 890583 International Congress of the Society of Automotive Engineers. Detroit, Michigan. USA.
- Byres, D.P.; T.J. Dean; J.D. Johnson. 1992. Long-term effects of ozone and simulated acid rain on the foliage dynamics of Slash pine (Pinus elliottii var. elliottii Engelm.). New. Phytol. 120:61-67.

- Carde, J.P. 1978. Ultrastructural studies of Pinus pinaster needles: the endodermis. Amer. J. Bot. 65:1041-1054.
- Cibrián, D. 1989. Air pollution and forest decline near Mexico City. Environ. Monit. Asses. 12:49-58.
- Costonis, A.C.; W.A. Sinclair. 1969. Relationships of atmospheric ozone to needle blight of eastern white pine. Phytopathology 59:1566-1574.
- Cvetanovic, R.J. 1964. Free radicals and their relations to reactions in the atmosphere. J Air Pollut Contr Assoc. 14:208-212.
- Czaninski, Y.; A.M. Catesson. 1974. Polyphenol oxidases (plants). En: Hayat, M.A. (Ed.). Electron microscopy of enzymes principles and methods. Vol II. Dept. of Biology. Kean College of New Jersey. Van Nostrand Reinhold Company.
- Chabot, J.F.; B.F. Chabot. 1974. Developmental and seasonal patterns of mesophyll ultrastructure in Abies balsamea. Can J Bot. 53:295-304.
- Chappelka, A.H.; B.I. Chevone. 1992. Tree responses to ozone. En: A.F. Lefohn (Ed.). Surface level ozone exposures and their effects on vegetation. Lewis Pub. USA.
- Davis, D.D.; F.A. Wood. 1972. The relative susceptibility of eighteen coniferous species to ozone. Phytopathology 62:14-19.
- De la Isla de Bauer, M.L.; T. Hernández; W.J. Manning. 1985. Ozone causes needle injury and tree decline in Pinus hartwegii at high altitudes in the mountains around Mexico City. J. APCA. 8:838.
- De la Isla de Bauer, M.L.; T. Hernández. 1986. Contaminación, una amenaza para la vegetación en México. Col. Posgraduados, Centro de Fitopatología. México.
- De la Isla de Bauer, M.L.; S.V. Krupa. 1990. The Valley of Mexico: summary of observational studies on its air quality and effects on vegetation. Environ. Pollut. 65:109-118.
- De la Isla de Bauer, M.L. 1991. La influencia urbana en el área del Ajusco. Memorias del Primer Simposio Nacional sobre Agricultura Sostenible. Comisión de Estudios Ambientales. Colegio de Postgraduados. México.
- Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal. 1985. Documentos relativos a la situación fitosanitaria del Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones. México.
- Dugger, W.M.; J. Koukol; R.L. Palmer. 1966. Physiological and biochemical effects of atmospheric oxidants on plants. J. Air Pollut. Contr. Assoc. 16:467-471.
- Dugger, W.M.; I.P. Ting. 1970. Air pollution oxidants, their effects on metabolic processes in plants. Ann. Rev. Plant. Phys. 21:215-234.

- Eckey-Kaltenbach, H.; D. Ernst; W. Heller; Sandermann, H. Jr. 1994. Biochemical plant response to ozone: IV. Cross induction of defensive pathways in parsley (Petroselinum crispum L.) plants. *Plant Physiol.* 104:67-74.
- Esau, K. 1965. *Plant anatomy*. John Wiley and Sons. Nueva York.
- Evans, L.S.; P.R. Miller. 1972a. Ozone damage to Ponderosa pine: a histological and histochemical appraisal. *Amer. J. Bot.* 59:297-304.
- Evans, L.S.; P.R. Miller. 1972b. Comparative needle anatomy and relative ozone sensitivity of four pine species. *Can. J. Bot.* 50:1067-1071.
- Evans, L.S.; I.P. Ting. 1973. Ozone induced membrane permeability changes. *Amer. J. Bot.* 60:155-162.
- Evans, L.S.; M.R. Leonard. 1991. Histological determination of ozone injury symptoms of primary needles of giant sequoia. *New Phytol.* 117:557-564.
- Fangmeier, A.; L.W. Kress; P. Lepper; W.W. Heck. 1990. Ozone effects on the fatty acid composition of Loblolly pine needles (Pinus taeda L.). *New Phytol.* 115:639-647.
- Fernández, G.M. 1987. Estudio ecológico del bosque de Abies religiosa (H.B.K) Schl. et Cham, en el Parque Nacional La Malintzin en el estado de Tlaxcala, México. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México.
- Fink, S. 1991. Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in Spruce needles and their possible relationship to the impact of pollutants. *New Phytol.* 119:41-51
- Guderian, R. (ed.) 1985. *Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants*. Springer Verlag. Berlin. Ecological Studies, Analysis and Synthesis Vol. 52.
- Hall, J.D.; R. Barr; A.H. Al-Abbas; F.L. Crane. 1972. The ultrastructure of chloroplasts in mineral deficient maize leaves. *Plant Physiol.* 50:404-409.
- Hanson, G.P.; D. Stewart. 1970. Photochemical oxidants: effect on starch hydrolysis in leaves. *Science* 68:1223-1224.
- Harris, W.M. 1971. Ultrastructural observations on the mesophyll cells of pine leaves. *Can. J. Bot.* 49:1107-1109.
- Heath, R.L. 1975. Ozone. En: J.B. Mudd (Ed.). *Responses of plants to air pollution*. Academic Press. Nueva York.
- Heath, R.L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Phys.* 31:395-431.
- Hernández, T.T.; M.L. De la Isla de Bauer. 1984. Evolución del daño por gases oxidantes en Pinus hartwegii y P. montezumae en el Ajusco, D.F. *Agrociencia* 56:183-194.

- Hernández, T.T.; M.L. De la Isla de Bauer. 1986. Photochemical oxidant damage on Pinus hartwegii at the Desierto de los Leones, D.F. *Phytopathology* 73:377.
- Hill, A.C.; M.R. Pack; M. Treshow; R.J. Downs; L.G. Transtrum. 1961. Plant injury induced by ozone. *Phytopathology* 51:356-363.
- Howell, R.K.; D.K. Kremer. 1973. The chemistry and physiology of pigmentation in leaves injured by air pollution. *J. Environ. Qual.* 2:434-438.
- Howell, R.K. 1974. Phenols, ozone and their involvement in pigmentation and physiology of plant injury. En: M. Dugger (Ed.). *Air Pollution Effects on Plant Growth*. ACS Symposium Series No. 3:94-105.
- Jasso, J.; J. López. 1991. El mejoramiento forestal en la conservación y restauración de áreas forestales. Memorias del Primer Simposio Nacional Agricultura Sostenible: una opción para el desarrollo sin deterioro ambiental. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc.Graw Hill. Nueva York.
- Kainulainen, P.; J.K. Holopainen; H. Hyttinen; J. Oksanen. 1994. Effect of ozone on the biochemistry and aphid infestation of Scots pine. *Phytochemistry* 35:39-42.
- Karenlampi, L. 1986. Relationship between macroscopic symptoms of injury and cell structural changes in needles of Ponderosa pine exposed to air pollution in California. *Ann. Bot. Fennici* 23:255-264.
- Keen, N.T.; O.C. Taylor. 1975. Ozone injury in Soybeans. Isoflavonoid accumulation is related to necrosis. *Plant Physiol.* 55:731-733.
- Kozłowski, T.T.; H. Constantinidou. 1986. Responses of woody plants to environmental pollution. *Forestry Abst.* 47:5-51.
- Linzon, S.N. 1967. Ozone damage and semimature-tissue needle blight of eastern white pine. *Can. J. Bot.* 45:2047-2061.
- Lucas, P.W.; L. Rantanen; H. Mehlhorn. 1993. Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral content, pigmentation and ascorbic acid. *New Phytol.* 124:264-275.
- Macías, S.J.; B.J. Tovar. 1987. Evaluación mediante fotografía aérea infrarroja de la mortalidad de Abies religiosa en el Parque Desierto de los Leones. Memorias del IV Simposio Nacional sobre Patología Forestal. Dgo, México.
- Madrigal, S.X. 1964. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (Abies religiosa (H.B.K) Schl. et Cham) en el Valle de México. Tesis de Licenciatura UNAM. México.

- Malhotra, S.S.; A.A. Khan. 1984. Biochemical and physiological impact of major pollutants. En: M.Treshow (Ed.). Air pollution and plant life. John Wiley and Sons Ltd. Chichester, UK.
- Manzanilla, H. 1974. Investigaciones epidemétricas y silvícolas en bosques mexicanos de Abies religiosa. INFI/BM. Mexico.
- Mauseth, J.D. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin/Cummings Publishing Company. California, USA.
- Miller, P.R. Comunicación personal. Pacific Southwest Research station USDA. Forest Service, Riverside, CA, USA.
- Miller, P.R.; L.S. Evans. 1974. Histopathology of oxidant injury and winter fleck injury en needles of western pines. *Phytopathology* 64:801-806.
- Miller, P.R.; M.L. De la Isla de Bauer; N.A. Quevedo; T.T. Hernández. 1994. Comparison of ozone exposure characteristics in forested regions near Mexico City and Los Angeles. *Atmos. Environ.* 28:141-148.
- Miyake, H.; A. Furukawa; T. Totsuka; E. Maeda. 1984. Differential effects of ozone and sulfure dioxide on the fine structure of spinach leaf cells. *New Phytol.* 96:215-228.
- Miyake, H.; H. Matsumara; Y. Fujinuma; T. Totsuka. 1989. Effects of low concentrations of ozone on the fine structure of radish leaves. *New Phytol.* 111:187-195.
- Mollenhauer, H.H.; C.Totten. 1971. Studies on seeds I. Fixation of seeds. *J. Cell Biol.* 48:387-394.
- Muhlethaler, K. 1971. The ultrastructure of plastids. En: M. Gibbs (Ed.) Structure and function of chloroplasts. Springer Verlag. Nueva York, USA.
- Muñoz, V.R. 1987. Los insectos en el bosque de oyamel del Desierto de los Leones. IV Simposio Nacional sobre Parasitología Forestal, Dgo. México.
- Noble, R.; D. Pechak; K. Jensen. 1980. Ozone effects on the ultrastructure of the chloroplasts from hybrid poplar leaves. *Micron* 11:13-14.
- Ojanperä, K.; S. Sutinen; H. Pleijel; G. Selldén. 1992. Exposure of spring wheat, Triticum aestivum L., cv. Drabant, to different concentrations of ozone in open-top chambers. Effects on the ultrastructure of flag leaf cells. *New Phytol.* 120:39-48.
- Paz, E.D. 1989. Sistema de calificación de riesgo para estimar la muerte de oyamel en el Parque Cultural y Recreativo Desierto de los Leones. Tesis de Licenciatura. Chapingo, México.
- Pell, E.J.; W.C. Weissberger. 1976. Histopathological characterization of ozone injury to soybean foliage. *Phytopathology* 66:856-861.
- Pell, E.J.; N.S. Pearson. 1983. Ozone induced reduction in quantity of RuDP carboxylase in alfalfa foliage. *Plant Physiol.* 73:185-187.

- Rabe, R.; K.H. Keeb. 1979. Enzyme activities and chlorophyll and protein content in plants as indicators of air pollution. *Environ. Pollut.* 19:119-137.
- Rich, S. 1964. Ozone damage to plants. *Ann. Rev. Phytopath.* 2:253-266.
- Robinson, T. 1993. *The Organic Constituents of Higher Plants. Their Chemistry and Interrelationships.* Cordus Press. Massachusetts, USA.
- Rodea, C.P. 1987. Balance de radiación en el Parque Nacional Desierto de los Leones D.F. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Rosenkranz, B.E.; A. Schiffgens y C. Lutz. 1990. Cytological observations on spruce needles after prolonged treatment with ozone and acid mist. *Environ. Pollut.* 64:323-335.
- Ruiz, S.L. Comunicación personal. Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM, México.
- Runeckles, V.C.; B.I. Chevone. 1992. Crop responses to ozone. En: A.F. Leñohn (Ed.). *Surface level ozone exposures and their effects on vegetation.* Lewis Pub. USA.
- Sakaki, T.; N. Kondo; M. Yamada. 1990. Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigates spinach leaves. *Plant Physiol.* 94:773-780.
- Schiffgens-Gruber, A.; C. Lutz. 1992. Ultrastructure of mesophyll cell chloroplasts of spruce needles exposed to ozone, sulfur dioxide and nitrogen dioxide alone and in combination. *Environ. Exper. Bot.* 32:243-254.
- Schmieden, U.; A. Wild. 1994. Changes in levels of alpha-tocopherol and ascorbate in spruce needles at three low mountain sites exposed to Mg²⁺- deficiency and ozone. *Zeitschrift fuer naturforschung section c biosciences* 49:171-180.
- Schuck, E.A. 1973. Chemical basis of the air pollution problem. En: J.A. Naegele (Ed.). *Air pollution damage to vegetation. Advances in Chemistry Series No. 122.* Am Chem Soc. Washington, D.C. USA.
- SEDUE. 1983. Sistema nacional de areas protegidas. Folleto informativo. Subsecretaría de Ecología, Dirección General de Parques, Reservas y Areas Ecológicas Protegidas.
- Senser, M.; F. Schötz, y E. Beck. 1975. Seasonal changes in structure and function of spruce chloroplasts. *Planta* 126:1-10.
- Soikkeli, S. 1978. Seasonal changes in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce (*Picea abies*). *Can. J. Bot.* 56:1932-1940.
- Soikkeli, S.; L. Karenlampi. 1984. Cellular and ultrastructure effects. En: M.Treshow (Ed.) *Air pollution and plant life.* John Wiley and Sons. Chichester.
- Soikkeli, S. 1981. Comparison of cytological injuries in conifer needles from several polluted industrial environments in Finland. *Ann. Bot. Fennici* 18:47-61.
- Stephens, E.R. 1969. Chemistry of atmospheric oxidants. *J Air Pollut. Contr. Asso.* 19:181-185.

- Stewart, D.; M. Treshow; F.M. Harner. 1973. Pathological anatomy of conifer needle necrosis. *Can. J. Bot.* 51:983-988.
- Sutinen, S. 1987. Cytology of Norway spruce needles. I. Changes during aging. *Eur. J. For. Path.* 17:65-73.
- Sutinen, S.; L. Skärby; G. Wallin y G. Selldén. 1990. Long term exposures of Norway spruce, *Picea abies* (L.) Karst., to ozone in open-top chambers. II. Effects on the ultrastructure of needles. *New Phytol.* 115:345-355.
- Swanson, E.S.; W.W. Thomson. 1973. The effect of ozone on leaf cell membranes. *Can. J. Bot.* 51:1213-1219.
- Taylor, O.C. 1973. Acute responses of plants to aerial pollutants. En: J.A. Naegele (Ed.). *Air pollution damage to vegetation. Advances in Chemistry Series No. 122.* Am. Chem. Soc. Washington, D.C.
- Thomson, W.W.; W.M. Dugger; R.L. Palmer. 1966. Effects of ozone on the fine structure of the palisade parenchyma cells of bean leaves. *Can. J. Bot.* 44:1677-1682.
- Thomson, W.W. 1975. Effects of air pollutants on plant ultrastructure. En: J.B. Mudd (Ed.). *Responses of plants to air pollution.* Academic Press. Nueva York.
- Tingey, T.D. 1974. Ozone induced alterations in the metabolite pools and enzyme activities of plants. En: M. Dugger (Ed.). *Air pollution effects on plant growth. Advances in Chemistry Series, Symposium series No. 3:*40-57.
- Tingey, D.T.; R.C. Fites; C. Wickliff. 1975. Activity changes in selected enzymes from soybean leaves following ozone exposure. *Physiol. Plant.* 33:316-320.
- Tingey, D.T.; R.G. Wilhour; C. Standley. 1976a. The effect of chronic ozone exposures on the metabolite content of Ponderosa pine seedlings. *Forest Sci.* 22:234-241.
- Tingey, D.T.; R.C. Fites; C. Wickliff. 1976b. Differential foliar sensitivity of soybean cultivars to ozone associated with differential enzyme activities. *Physiol. Plant.* 37:69-72.
- Tingey, D.T.; G.E. Taylor. 1982. Variation in plant response to ozone: a conceptual model of physiological events. En: M.H. Unsworth; D.P. Ormrod (Eds.). *Effects of gaseous air pollution in agriculture and horticulture.* Butterworth Scientific. Londres.
- Tolbert, N.E. 1973. Activation of polifenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51:234-244.
- Tomlinson, H.; Rich, S. 1969. Relating lipid content and fatty acid synthesis to ozone injury on tobacco leaves. *Phytopath.* 59:1284-1286.
- Treshow, M. 1984. Diagnosis of air pollution effects and mimicking symptoms. En: M. Treshow (Ed.) *Air pollution and plant life.* John Wiley and Sons Ltd. Chichester, UK.

- Vargas, J.J.; Velázquez, A. 1991. La deforestación y su contribución al deterioro ambiental. Memorias del Primer Simposio Nacional sobre Agricultura Sostenible. Comisión de Estudios Ambientales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Vázquez, S.J. 1987. El saneamiento y la limpia forestales en el Desierto de los Leones. DDF, COCODER. México, D.F.
- Vázquez, S.J. 1988. Los tratamientos silvícolas del Desierto de los Leones, sus fundamentos. DDF, COCODER. México, D.F.
- Wellburn, F.; A.R. Wellburn. 1994. Atmospheric ozone affects carbohydrate allocation and winter hardiness of Pinus halepensis. J. Exp. Bot. 45:607-614.
- Winner, W.E.; Ch.J. Atkinson. 1986. Absorption of air pollution by plants and consequences for growth. Tree 1:15-18.
- Wolfenden, J.; A.R. Wellburn. 1991. Effects of summer ozone on membrane lipid composition during subsequent frost hardening in Norway spruce (Picea abies (L.) Karst). New Phytol. 118:323-329.

FIGURAS

FIG. 1A. TLAMACAS 1 AÑO. Cloroplasto (C) tipo A con granos de almidón (A), plastoglobuli (P) densos. Citosol (Ci) claro y abundante. Mitocondrias (M) alargadas o redondeadas con ambas membranas (m) evidentes, crestas (CR) con dilatación normal. 10,395x.

FIG. 1B. CEMENTERIO 2 AÑOS. Cloroplasto (C) tipo B, tilacoides (Ti) alargados sin formar grana, plastoglobuli (P) densos. Citosol (Ci) claro. Vacuola con cristal de tanino (Cr). Plasmalema (pm) y pared (pa) en buen estado. 16,000x.

FIG. 1C. TLAMACAS 1 AÑO. Cloroplastos (C) tipo C, tilacoides (Ti) formando pequeñas agrupaciones pero no verdaderos grana, plastoglobuli (P) densos. Mitocondrias (M) con crestas (CR) bien dilatadas. Citosol (Ci) claro. Vacuola con cristal (Cr). Plasmalema (pm) en buen estado. 7,875x.

FIG. 1D. TLAMACAS 2 AÑOS. Cloroplastos (C) tipo D con tilacoides formando verdaderos grana (g), estroma (e) claro, plastoglobuli (P) densos, grano de almidón (A) de gran dimensión. Mitocondria (M) alargada, crestas (CR) dilatadas, envoltura (m) densa. Citosol (Ci) claro. Núcleo (Nu), plasmalema (pm) y pared (pa) en buen estado. 15,200x

FIG 1E. TLAMACAS 2 AÑOS. Cloroplastos (C) tipo F de grana (g) anchos con tilacoides (Ti) claros pero no muy contrastados, grandes granos de almidón (A). Citosol (Ci) denso. 12,800x.

FIG. 1F. CEMENTERIO 1 AÑO. Cloroplastos (C) tipo F con grana (g) angostos y muy claros, estroma (e) denso, plastoglobuli (P) claros. Citosol (Ci) denso. Vacuola (V) clara. 18,900x.

FIG. 1G. CEMENTERIO 3 AÑOS. Cloroplastos (C) tipo G con escasos grana (g) angostos que sufren desvanecimiento, abundantes plastoglobuli (P) claros. 16,800x.

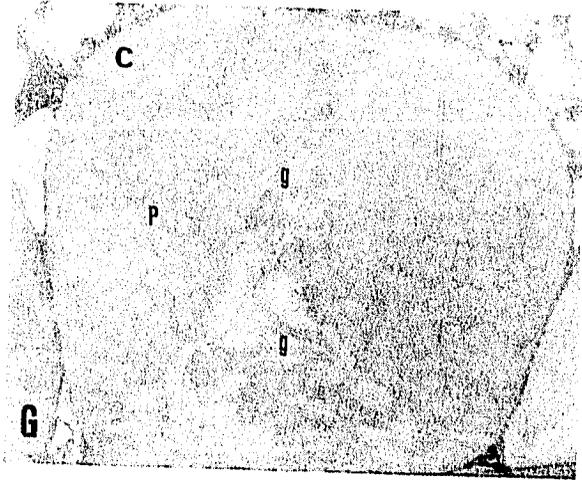
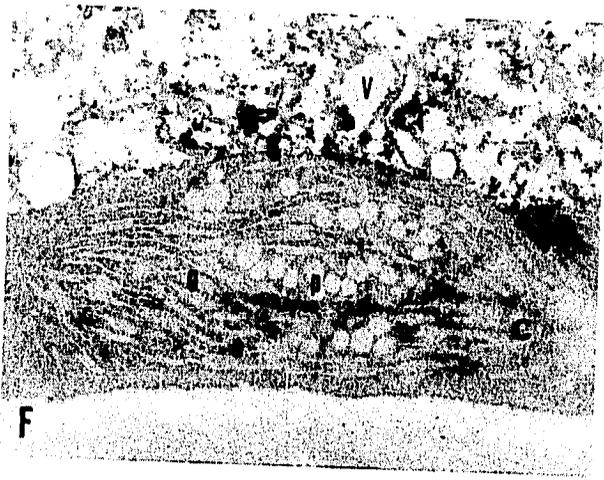
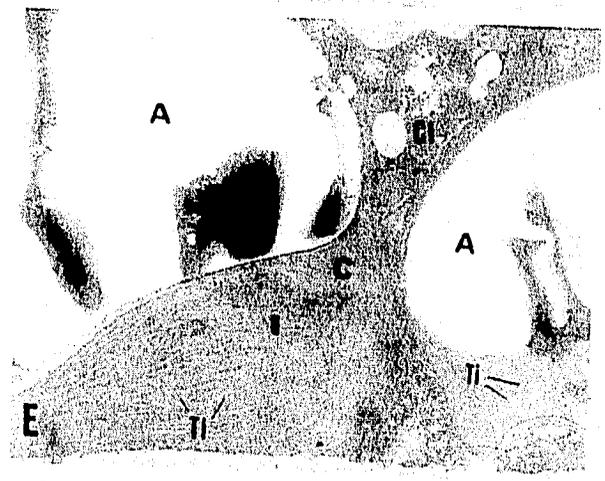
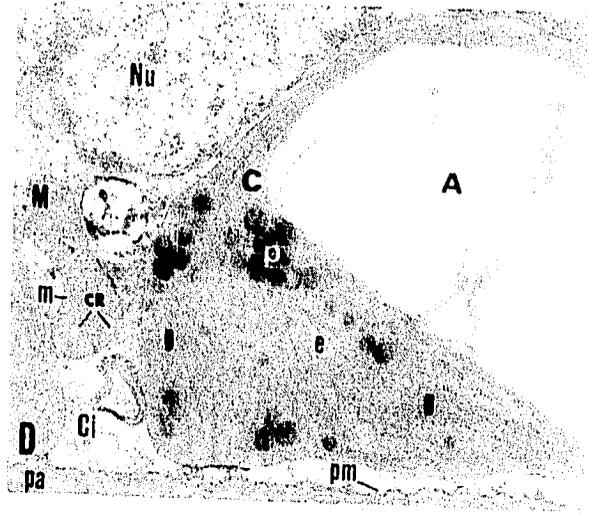
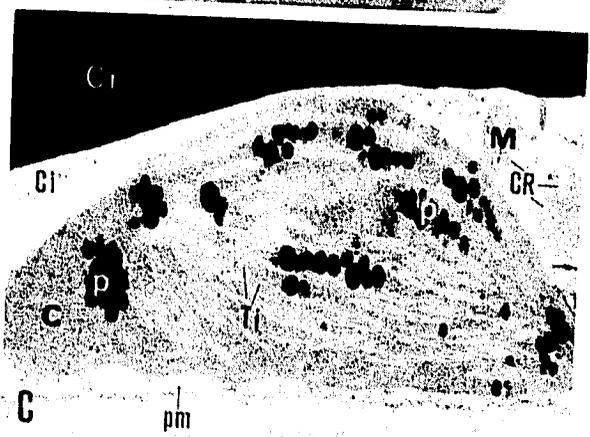
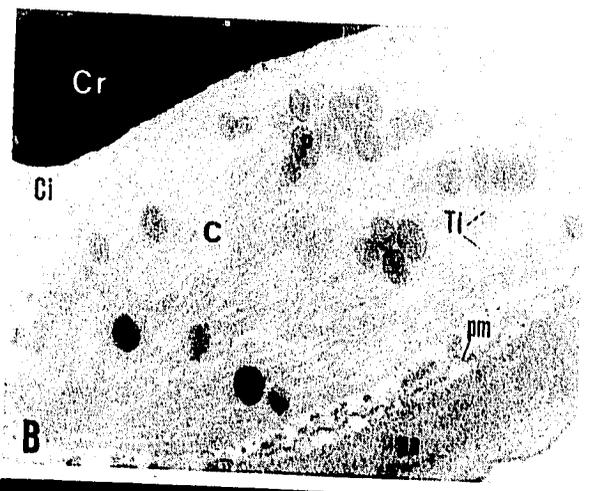
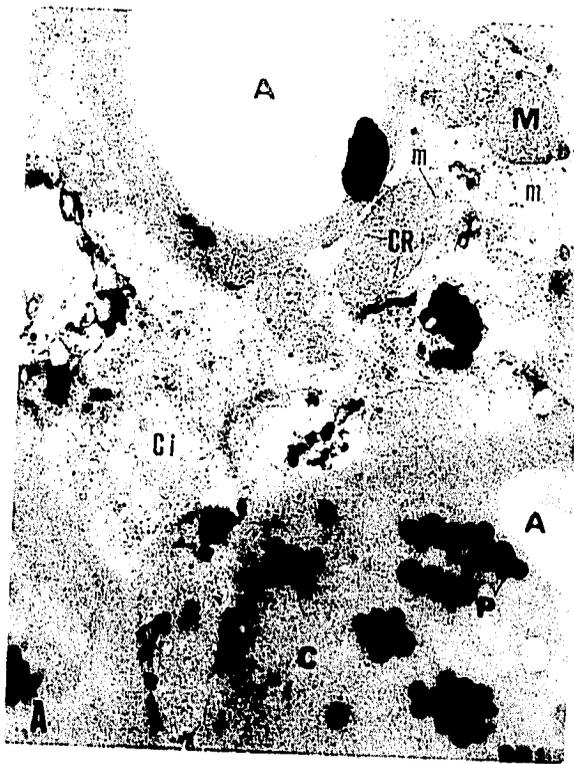


FIG. 2A. CEMENTERIO 3 AÑOS. Cloroplastos (C) tipo H, los grana han desaparecido y los plastoglobuli (P) claros abundan. Citosol (Ci) denso se confunde con taninos (T) de la periferia. 16,800x.

FIG. 2B. CEMENTERIO 1 AÑO. Cloroplastos (C) tipo H' que han perdido toda estructura, sus plastoglobuli (P) claros y desvanecidos se confunden con el cloroplasto. Vacuola (V) clara. 17,640x.

FIG. 2C. LOBOS 1 AÑO. Cloroplastos (C) tipo I. con tilacoides (Ti) dilatados, conservan su grano de almidón (A). Citosol (Ci) y vacuola (V) en degradación. En el extremo inferior izquierdo células con plasmólisis (Pl), aún se conserva cierta estructura de los cloroplastos (C). Presencia de vesículas (ve) dentro de la vacuola (V). 5,140x.

FIG. 2D. LOBOS 3 AÑOS. Degradación de la célula con separación del plasmalema (pm) de la pared (pa). Cloroplastos (C) tipo J en los que permanecen los granos de almidón (A), los plastoglobuli (P), los tilacoides (Ti) pero sin conservar la estructura de grana y las membranas externas (m), pero rotas. No existen otras estructuras evidentes. 6,930x.

FIG. 2E. CEMENTERIO 1 AÑO. Cloroplasto (C) normal de una célula de matriz de la endodermis; tilacoides (Ti) muy bien definidos, alargados sin formar grana. Escasos plastoglobuli (P). Citosol (Ci) claro. Mitocondrias (M) en buen estado. 20,000x.

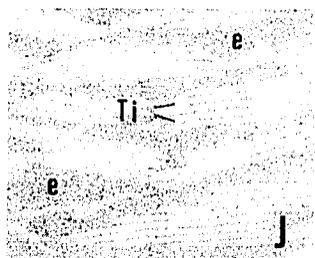
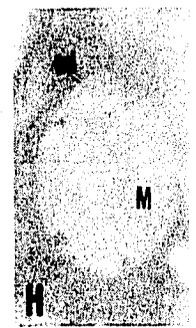
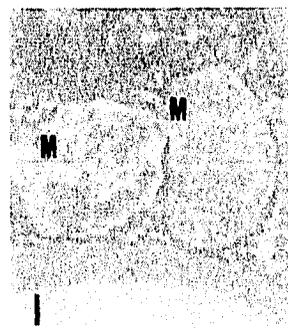
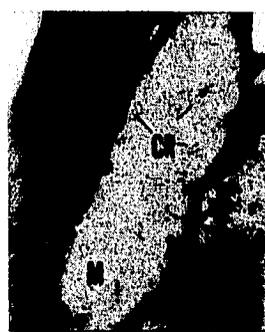
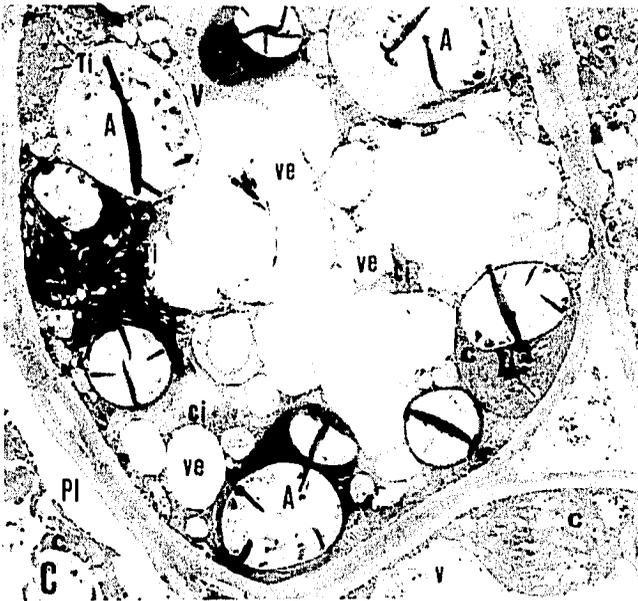
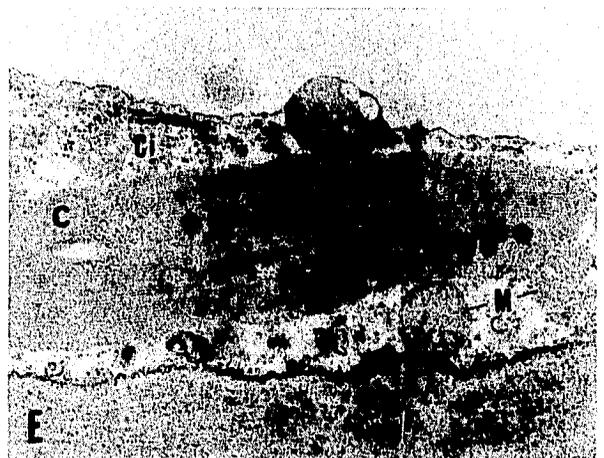
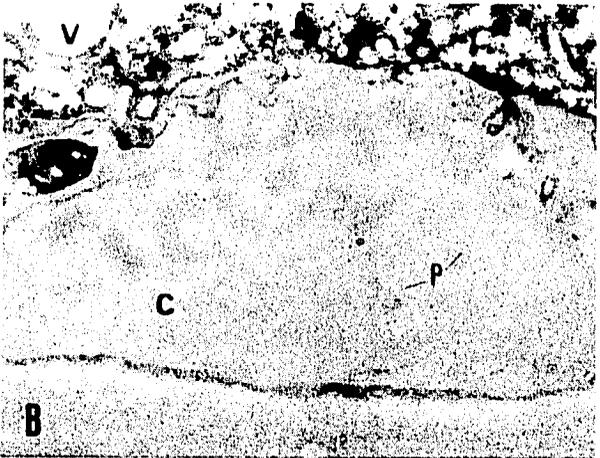
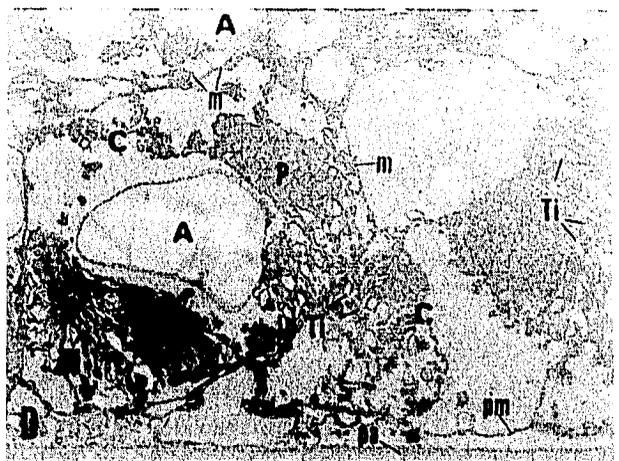
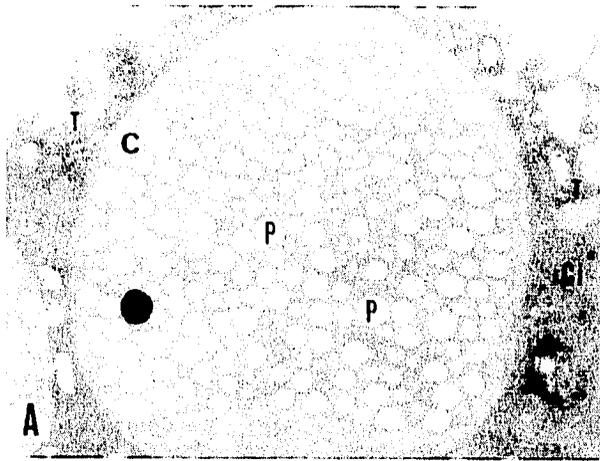
FIG. 2F. LOBOS 2 AÑOS. Mitocondria (M) alargada pero con crestas (CR) deprimidas. No se distinguen sus membranas externas. 61,500x.

FIG. 2G. CASAMANERO 1 AÑO. Mitocondria (M) redondeada sin crestas evidentes, membranas externas (m) visibles. Citosol (Ci) claro. 24,250x.

FIG. 2H. CEMENTERIO 3 AÑOS. Mitocondria (M) redondeada sin estructura y sin membranas externas evidentes, por lo que se aprecia como contorno difuso (cd). 25,600x.

FIG. 2I. LOBOS 3 AÑOS. Mitocondrias (M) en degradación. 19,305x.

FIG. 2J. CASAMANERO 1 AÑO. Tilacoides (Ti) claros con estroma (e) denso. 52,000x.



NOTA TEMA DE LA
 VIDA DE LA ESCUELA

FIG. 3A. CASAMANERO 1 AÑO. Células jóvenes, una en división (di) según se observa por su pared (pa) y otra con formación de cristal de tanino (cr). Cloroplastos (C) tipo C con granos de almidón (A). Protoplasma abundante con citosol (Ci) claro. 2,380x.

FIG. 3B. TLALMACAS 2 AÑOS. Cloroplastos (C) abundantes del tipo F con grana (g) anchos y claros, y grandes granos de almidón (A). Vacuola (V) densa. Protoplasma en cantidad moderada con citosol (Ci) denso. 2,560x.

FIG. 3C. CASAMANERO 3 AÑOS. Células con escaso protoplasma (pr). Pocos cloroplastos (C), del tipo G principalmente, acumulados en el extremo inferior de una de ellas. Vacuolas (V) claras. 3,750x.

FIG. 3D. CEMENTERIO 3 AÑOS. Cloroplastos (C), del tipo H principalmente, en el extremo inferior de la célula. Mitocondrias (M) en degradación. Vacuola (V) clara con taninos (T) que empiezan a desplazarse a la periferia y con vesículas (ve). 4,250x.

FIG. 3E. CEMENTERIO 2 AÑOS. Células con cloroplastos (C) escasos, del tipo H. Protoplasma no evidente. Vacuolas (V) granulares con gran vacuolación o vesiculación (ve) y taninos (T) en la periferia. 4,250x.

FIG. 3F. LOBOS 3 AÑOS. Cloroplastos (C) tipos G y H, con tendencia a desplazarse hacia el centro celular. Aún conservan sus granos de almidón (A). Vacuola (V) granular. 4,620x.

FIG. 3G. CASAMANERO 2 AÑOS. Tanino esférico (TE) de tejido de transfusión. Cloroplastos (C) apenas evidentes, con plastoglobuli (P) claros. Protoplasma (pr) muy escaso. 5,250x.

FIG. 3H. CASAMANERO 2 AÑOS. Tanino esférico (TE) con inicios de reticulación en célula de endodermis. 5,250x.

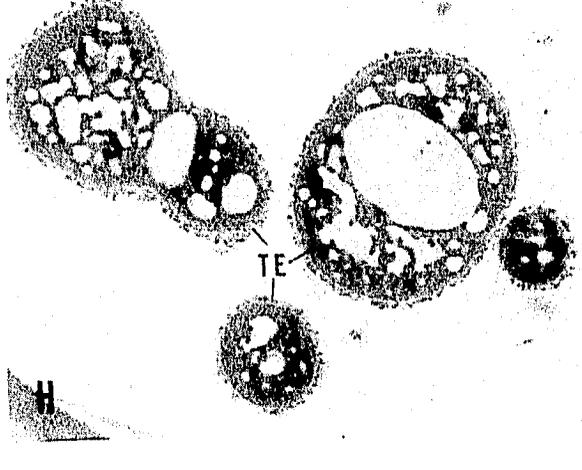
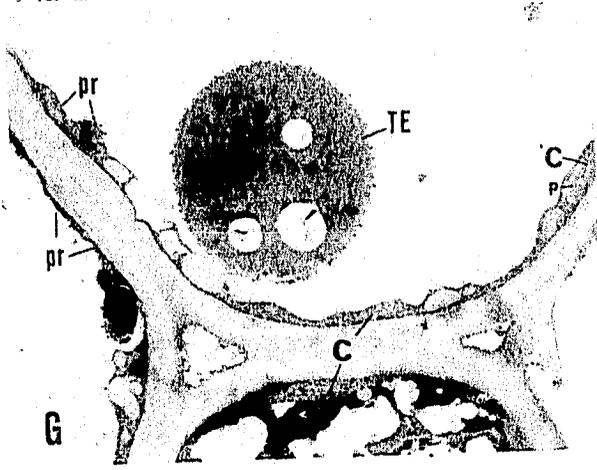
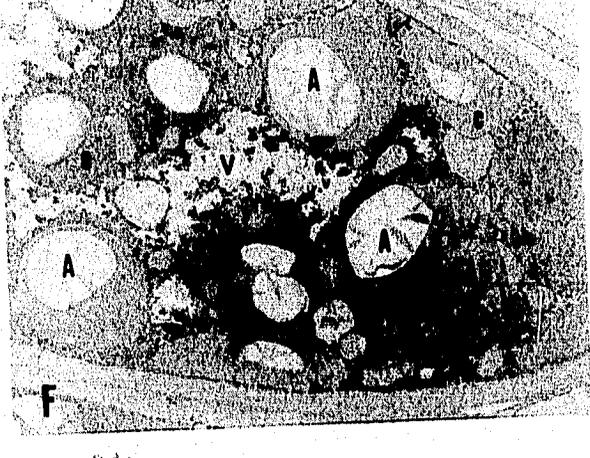
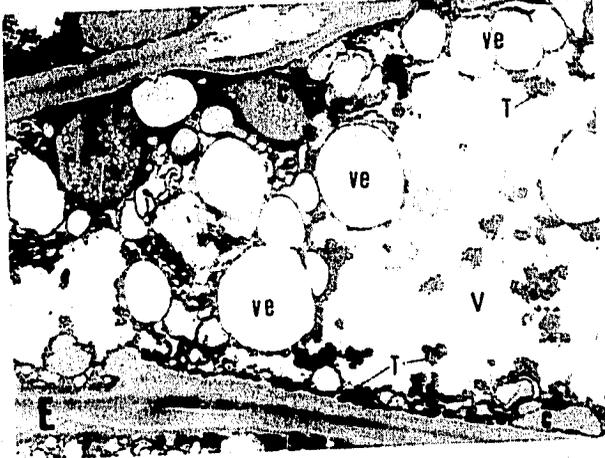
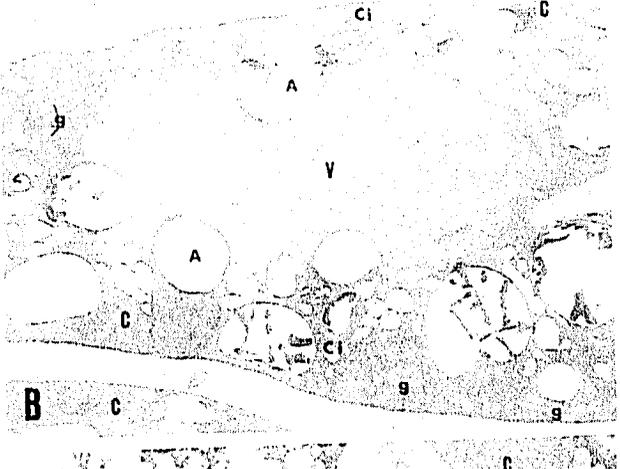


FIG. 4A. CASAMANERO 3 AÑOS. Tanino reticulado (TR) de parénquima esponjoso. Cloroplasto (C). apenas evidente. Pared (pa) en buen estado. 6,500x.

FIG. 4B. LOBOS 2 AÑOS. Técnica con OsO₄. Distribución de compuestos fenólicos a manera de taninos esféricos (TE) o granulares (T), en endodermis (E), tejido de transfusión (TT) y parénquima esponjoso (S). 40x.

FIG. 4C. TLAMACAS 1 AÑO. Glóbulos lipídicos en forma de gotas (G) asociadas a retículo endoplásmico (RE) de células de matriz de la endodermis. Pared (pa) en buen estado. 13,000x.

FIG. 4D. CEMENTERIO 2 AÑOS. Lípidos como manchas (Mn) en células de matriz de la endodermis. Citosol (Ci) claro. 10,400x.

FIG. 4E. TLAMACAS 3 AÑOS. Lípidos (L) de célula de tejido de transfusión. Cloroplastos (C) con grandes granos de almidón (A). Taninos (T) en la vacuola. 6,500x.

FIG. 4F. TLAMACAS 1 AÑO. Glóbulos lipídicos densos de células albuminosas. Citosol (Ci) claro con abundantes ribosomas (R). Mitocondrias (M), núcleo (Nu) y plasmalema (pm) en buen estado. 6,500x.

FIG. 4G. TLAMACAS 1 AÑO. Glóbulos lipídicos (L) del floema; posiblemente asociados a proteínas y/o carbohidratos. Citosol (Ci) claro con abundantes ribosomas (R). Numerosas mitocondrias (M). Pared (pa). 3,250x.

FIG. 4H. CEMENTERIO 2 AÑOS. Contenido globular (gl) presente en los espacios intercelulares entre estoma (st) y parénquima esponjoso (S). Cloroplastos (C) tipo B con almidón (A) y citosol claro en el primero, y cloroplasto (C) tipo F y protoplasma (pr) obscurecido en el segundo. 4,750x.

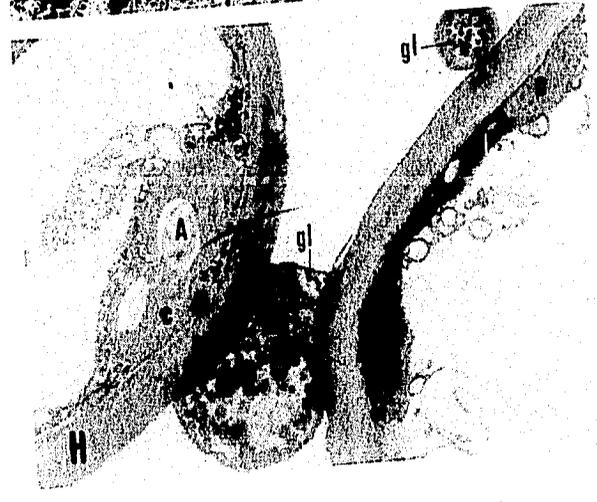
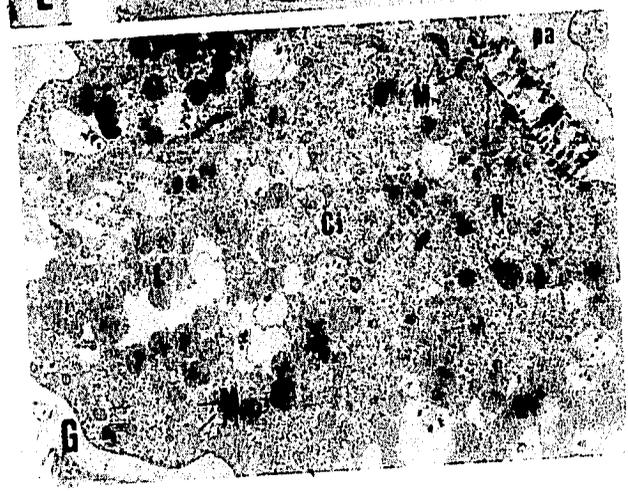
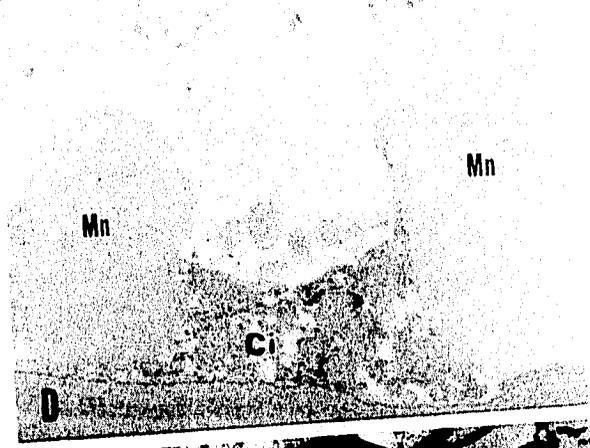
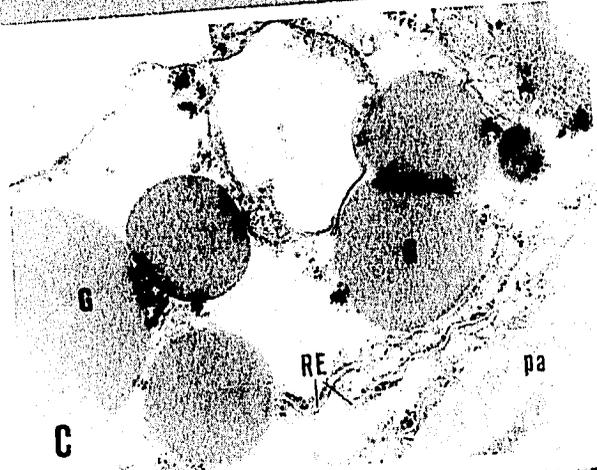
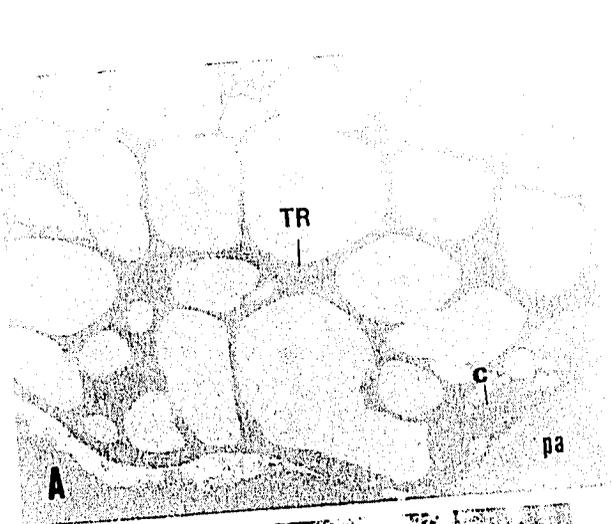


FIG. 5A. TLAMACAS 2 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células con vacuolas (V) densas. Abundantes cloroplastos (C), con grandes granos de almidón (A). Núcleo (Nu). Lípido (L). 160x.

FIG. 5B. CASAMANERO 2 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células con vacuolas (V) claras y granulares. Escasos cloroplastos (C), sin almidón. Núcleo (Nu). Lípido (L). 160x.

FIG. 5C. TLAMACAS 3 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células con vacuolas (V) densas. Abundantes cloroplastos (C), bordeando toda la periferia celular, sin almidón. Núcleo (Nu). Lípido (L). 160x.

FIG. 5D. CEMENTERIO 3 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células con vacuolas (V) granulares. Pocos cloroplastos (C), sin almidón. Depósitos de cristales de oxalato de calcio (Ox) en las paredes. Hipodermis (H). Núcleo (Nu). Lípido (L). 160x.

FIG. 5E. LOBOS 3 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células plasmolisadas (Pl) con degradación del protoplasma en donde se distinguen restos de cloroplastos (C), y células necrosadas (N) con restos de pared engruesada (Ep). Hipodermis (H). 160 x.

FIG. 5F. TLAMACAS 1 AÑO. Cilindro central. Glóbulos lipídicos en forma de pequeñas gotas (G) en endodermis (E); lípidos (L) en tejido de transfusión (TT) y células albuminosas (Ab). Grandes granos de almidón (A) en cloroplastos. Xilema (X). Floema (F). 160x.

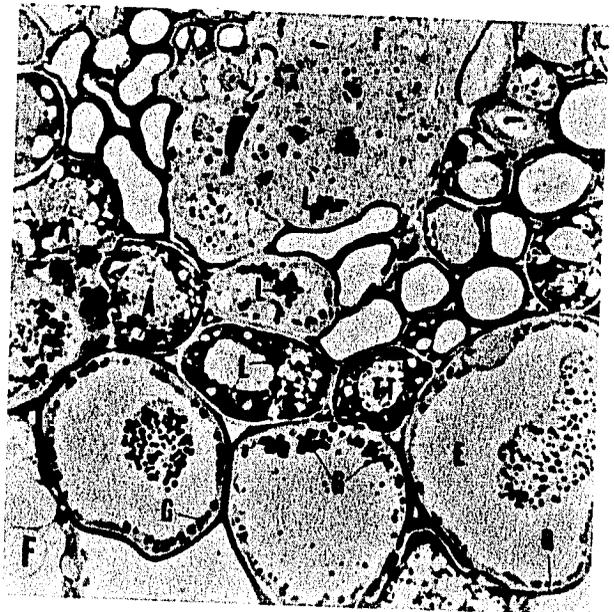
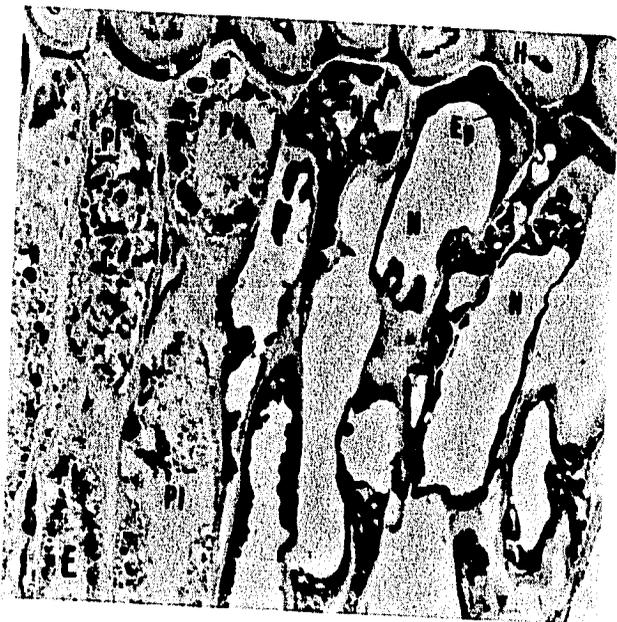
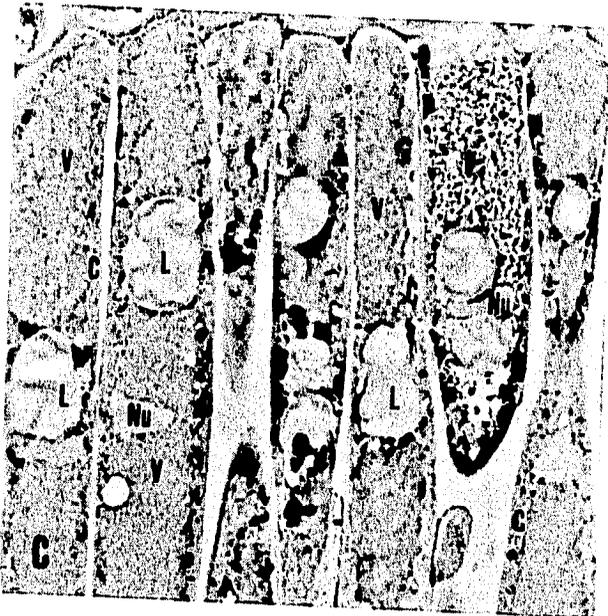
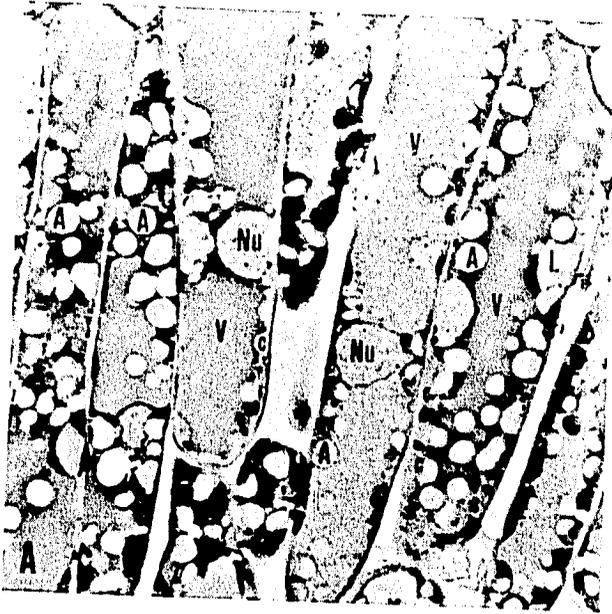


FIG. 6A. CEMENTERIO 1 AÑO. Cilindro central. Lípidos a manera de manchas (Mn) en células de endodermis (E). Sin lípidos en tejido de transfusión (TT) , ni en floema (F); escasos en células albuminosas (Ab). Ausencia de almidón en cloroplastos (C). 160x.

FIG. 6B. LOBOS 1 AÑO. Cilindro central. Células de endodermis (E), de tejido de transfusión (TT) y del floema (F) sin lípidos, apenas existentes (L) en células albuminosas (Ab). Granos de almidón (A) en los cloroplastos. Parénquima esponjoso (S). Núcleo (Nu). 160x.

FIG. 6C. TLAMACAS 3 AÑOS. Cilindro central. Presencia de lípidos a manera de gotas pequeñas (G) en endodermis (E) y (L) en tejido de transfusión (TT), células albuminosas (Ab) y floema (F). Granos de almidón (A) en los cloroplastos. 160x.

FIG 6D. CEMENTERIO 3 AÑOS. Cilindro central. Células de endodermis (E) con lípidos a manera de manchas (Mn). Pocos lípidos (L) en células albuminosas (Ab), tejido de transfusión (TT) sin ellos. Cloroplastos (C) sin granos de almidón. Célula de endodermis (E) con taninos a manera de cuerpos esféricos y esféricos-reticulados (TE). 160x.

FIG. 6E. CASAMANERO 3 AÑOS. Cilindro central. Escasos lípidos a manera de manchas (Mn) en células de endodermis (E), el resto de los tejidos sin lípidos. Cloroplastos (C) sin almidón. Tejido de transfusión (TT) y parénquima esponjoso (S) con taninos granulares (T). Floema (F). 160 x.

FIG. 6F. LOBOS 3 AÑOS. Cilindro central. Lípidos (L y Mn -a manera de mancha-) y almidón (A) prácticamente inexistentes en los tejidos. Taninos esféricos (TE) y reticulares (TR) en tejido de transfusión (TT). Floema (F). Células albuminosas (Ab). Endodermis (E). 160x.

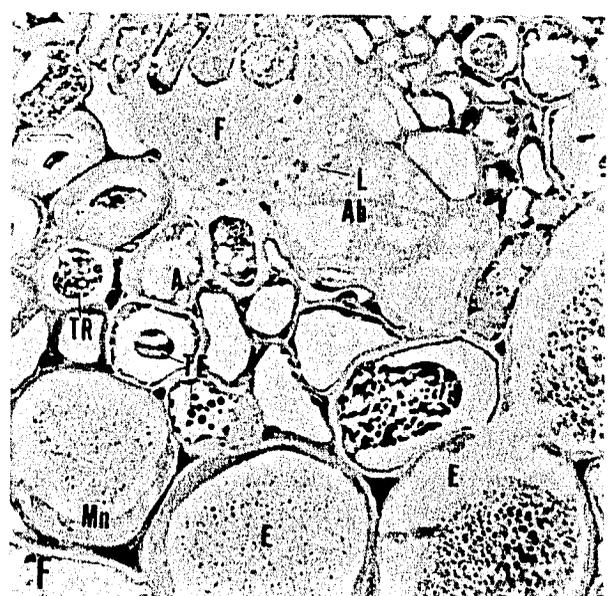
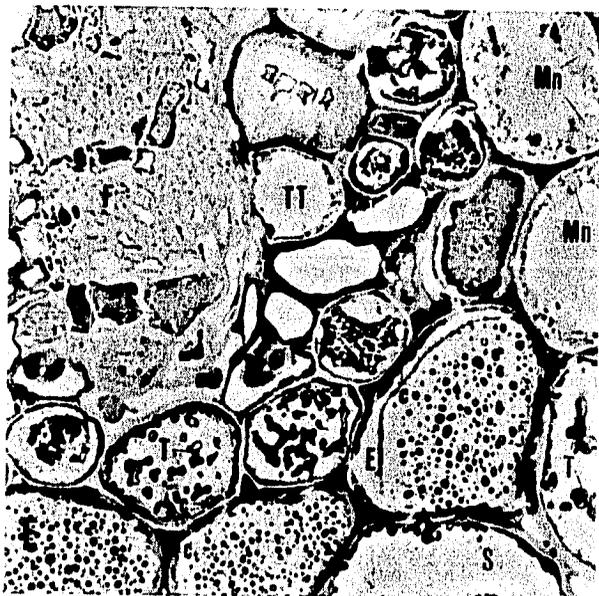
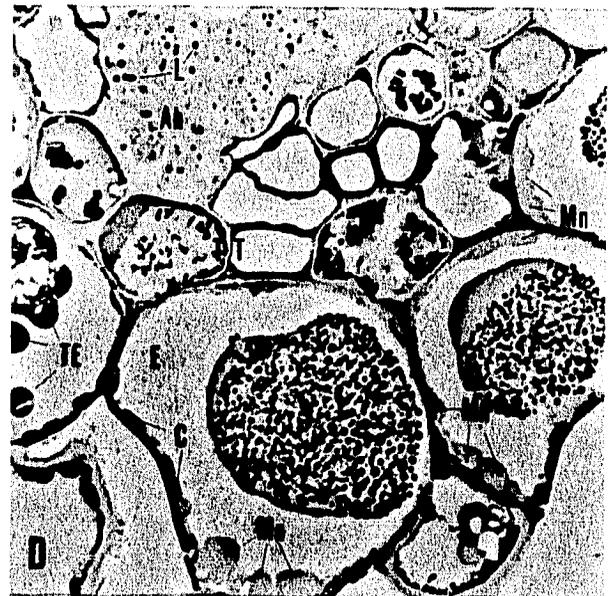
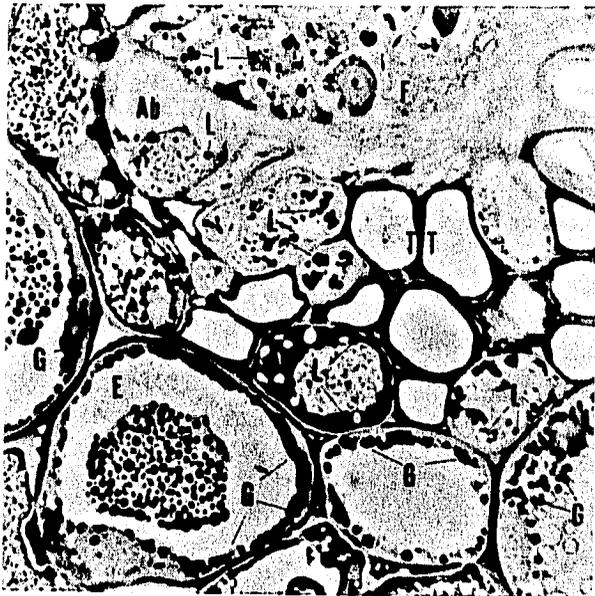
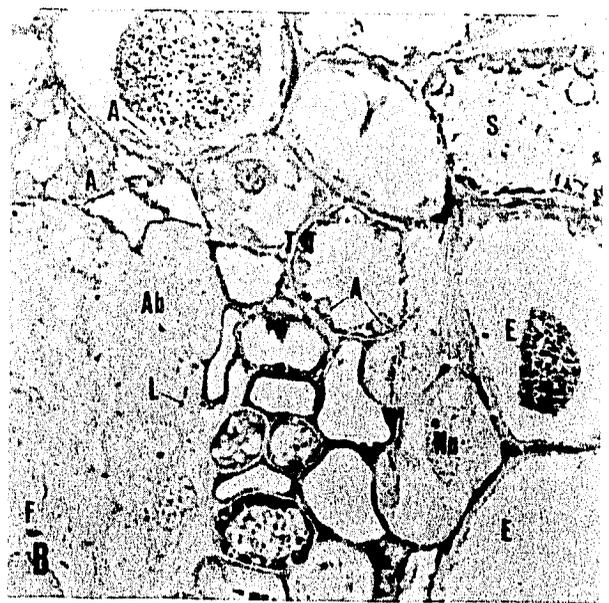
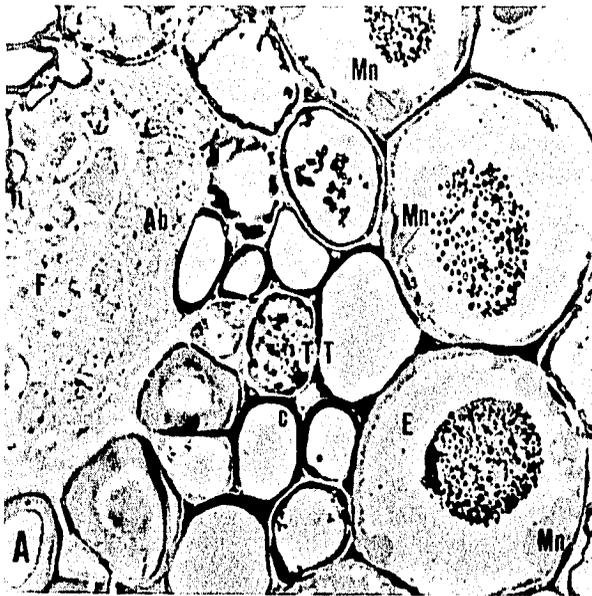


FIG. 7A. TLAMACAS 2 AÑOS. Granos de almidón teñidos de rosa en parénquima en empalizada (Em), endodermis (E) y tejido de transfusión (TT). Carbohidratos del floema (F) como pequeños puntos. 40x.

FIG. 7B. CASAMANERO 2 AÑOS. Ausencia de carbohidratos en los tejidos de parénquima en empalizada (Em), parénquima esponjoso (S), endodermis (E), tejido de transfusión (TT) y floema (F). 40x.

FIG. 7C. TLAMACAS 3 AÑOS. Granos de almidón en parénquima en empalizada (Em) y parénquima esponjoso (S). En el primero, con tendencia a distribuirse heterogeneamente hacia las células que se encuentran en las zonas más laterales e internas de la acícula. Epidermis (Es). Hipodermis (H). 40x.

FIG. 7D. CASAMANERO 3 AÑOS. Ausencia de almidón en los tejidos (mismas abreviaturas). 40x.

FIG. 7E. LOBOS 2 AÑOS. Almidón en parénquima en empalizada (Em), parénquima esponjoso (S) y tejido de transfusión. Su contenido en estos tejidos es mayor en el primero, aún cuando sufre necrosis (N), y menor en el último. Endodermis (E) sin almidón. 40x.

FIG. 7F. CEMENTERIO 1 AÑO. Parénquima en empalizada. Células en desarrollo con vacuolas (V) reducidas en cuyo interior se encuentran cristales de taninos (cr), y abundantes cloroplastos (C) rojos con granos de almidón (A) como manchas claras en su interior. Epidermis (Es). 160x.

FIG. 7G. TLAMACAS 3 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células maduras con vacuolas (V) densas y abundantes cloroplastos (C) verdes bien evidentes. 160x.

FIG. 7H. CEMENTERIO 2 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células maduras con vacuola (V) en degradación. Cloroplastos (C) rojizos poco evidentes. Hipodermis (H). Núcleo (Nu). 160x.

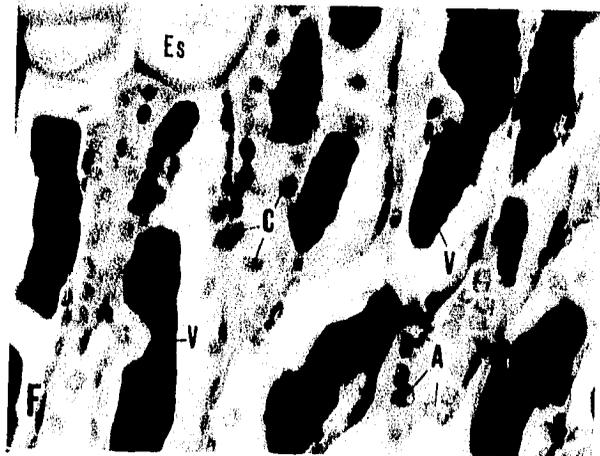
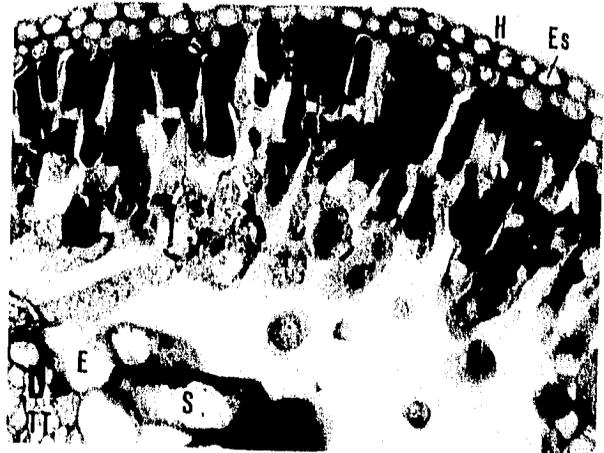
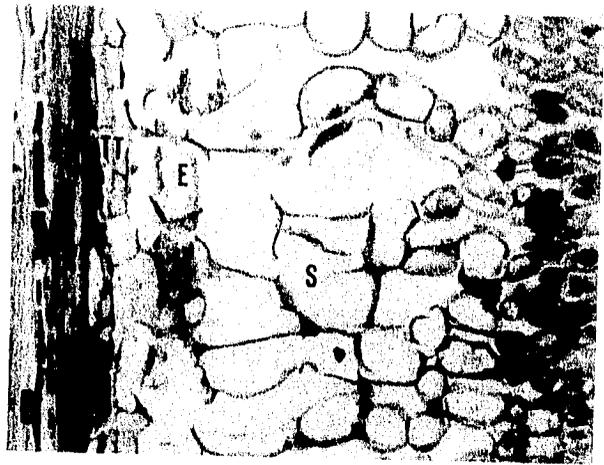
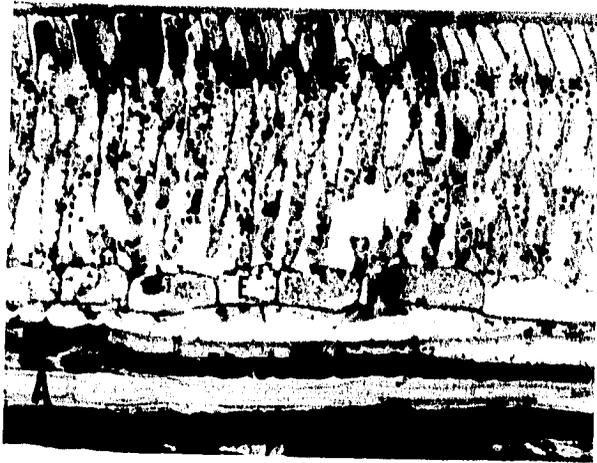


FIG. 8A. LOBOS 3 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células maduras con vacuolas (V) densas, moderadamente densas y claras. Cloroplastos (C) poco evidentes. Núcleo (Nu). 160x.

FIG. 8B. LOBOS 2 AÑOS. Parénquima en empalizada. Células necrosadas (N) con restos de pared impregnados de un material de origen fenólico (Ep). Hipodermis (H). 160x.

FIG. 8C. PLANTULA DE LOBOS 3 AÑOS. Células necrosadas (N) de parénquima en empalizada (Em) (a la izquierda) con restos de pared engruesados (Ep). Compuestos fenólicos en forma de cuerpos esféricos (TE) distribuidos en los tejidos de parénquima en empalizada (Em), endodermis (E), tejido de transfusión (TT) y epidermis (Es). 40x.

FIG. 8D. CASAMANERO 2 AÑOS. Células de parénquima en empalizada necrosadas (N) (a la izquierda) con restos de pared engruesados (Ep) y evidencia de daño por insecto desfoliador (D) hacia el envés (a la derecha). Parénquima esponjoso (S). 40x.

FIG. 8E. CASAMANERO 1 AÑO. Acículas con puntos blanquecinos en el haz, particularmente distribuidos hacia la base.

FIG. 8F. CASAMANERO 2 AÑOS. Los puntos han coalescido y se han transformado en lesiones pigmentadas -picado-, principalmente evidentes en la base, pero extendiéndose lateralmente.

FIG. 8G. CEMENTERIO 2 AÑOS. Las lesiones pigmentadas se han extendido a toda la acícula, la cual ha tomado una coloración rojiza pero lateralmente, ya que la zona de la hendidura -cilindro central- permanece verde.

FIG. 8H. CASAMANERO 2 AÑOS. Envés de acículas con síntomas especialmente conspicuos en los márgenes. Su coloración se ve ligeramente afectada con tendencia al amarillamiento.

FIG. 8I. TLAMACAS 2 AÑOS. Acículas sanas, no hay evidencia de daño en el haz.

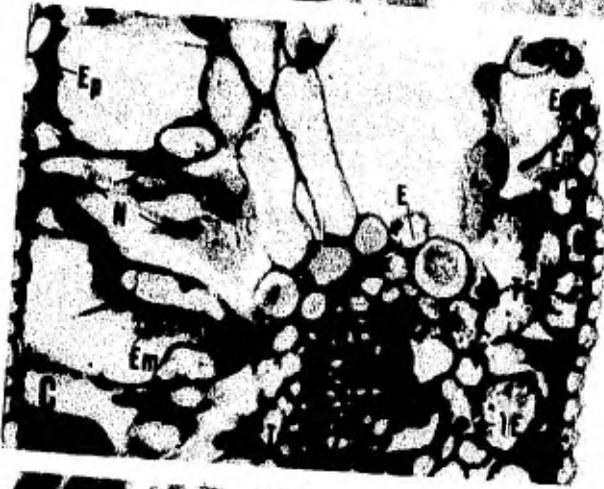
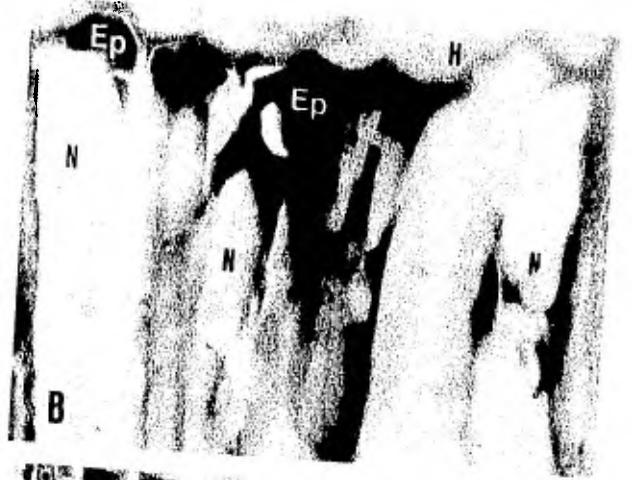


FIG. 9A. Vista panorámica de uno de los cementerios en que se aprecia la mortandad del arbolado, misma que es mayor en la ladera -con orientación directa hacia la (ZMCM)-.

FIG. 9B. Vista de la zona metropolitana de la Cd. de México (ZMCM) desde "El Cementerio" del Desierto de los Leones, D.F.

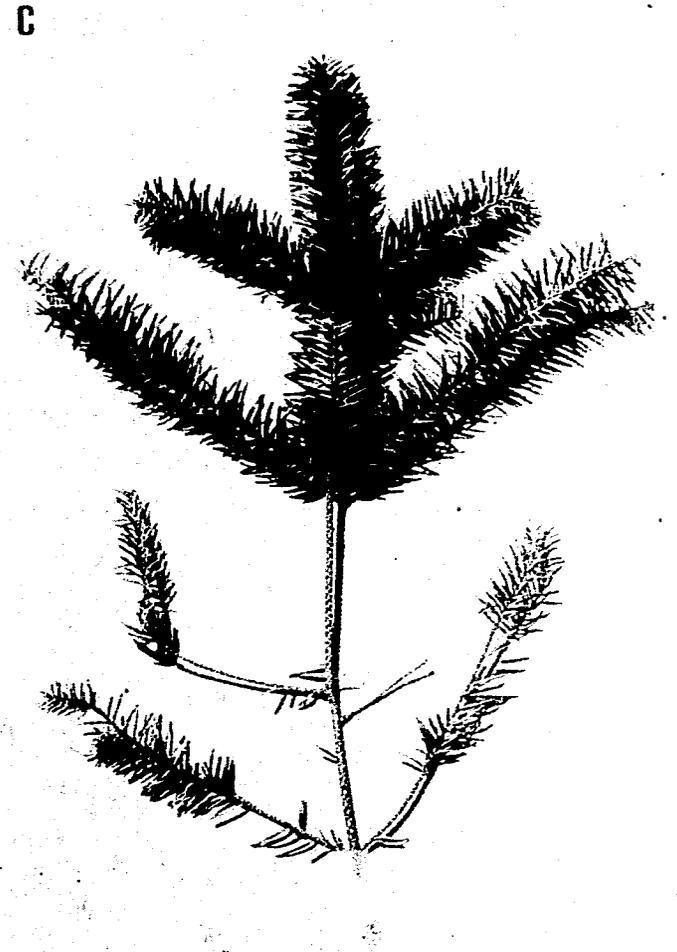
FIG. 9C. CASAMANERO. Retención de acículas hasta por 2 años, muy escasas de 3 años.

(SIGUIENTE PAGINA DE ILUSTRACIONES).

FIG. 10A. Vista del arbolado de Tlamacas, México.

FIG. 10B. Vista del arbolado de "Casamanero" en el Desierto de los Leones. Árboles con un patrón de muerte ascendente acelerada y ascendente lateral principalmente. Follaje original muy deteriorado, crecimiento de nuevas ramas que conforman una copa secundaria.

FIG. 10C. Vista del arbolado de "Lobos", con las mismas características de deterioro que en "Casamanero". Algunos árboles muertos.



A



B



C

