

IMPACTO DEL OZONO SOBRE EL POLEN DE *Pinus hartwegii* Lindl.

Tomás Hernández Tejeda¹, Roger M. Cox², John Malcolm²,
María de Lourdes de la Isla de Bauer³, Jesús Vargas Hernández⁴,
Alejandro Velázquez Martínez⁴, Dionicio Alvarado Rosales⁵

RESUMEN

La contaminación atmosférica, particularmente los oxidantes fotoquímicos, inducen cambios en los procesos reproductivos de las especies vegetales. En este estudio se determinó el efecto del ozono sobre el crecimiento del tubo polínico y la germinación de los granos de polen de *Pinus hartwegii* procedentes de tres áreas forestales ubicadas dentro de la Cuenca Atmosférica de la Ciudad de México, con diferencias en la exposición al ozono: Desierto de los Leones, Ajusco y Zoquiapan. Alrededor de 2,000 granos de polen se depositaron en cada gota de 50 µl de un medio de cultivo de tejidos (Solución Brewbaker) más un solidificante "Gelrite". Las gotas se colocaron sobre portaobjetos de vidrio, dentro de cajas de Petri, que se destaparon únicamente en ambos periodos de fumigación. El polen se fumigó artificialmente en cámaras especiales, con: 0.03 (testigo), 0.20 y 0.30 ppm de ozono, 3 horas diarias, durante 3 ó 6 días consecutivos. Los resultados indicaron que los granos de polen fueron afectados por el ozono con la misma intensidad, independientemente de su procedencia. La inhibición de la germinación y del crecimiento del tubo polínico del polen de *P. hartwegii* fue mayor en altas concentraciones de ozono; asimismo, el porcentaje de germinación decreció significativamente al prolongarse el periodo de exposición a ozono.

Palabras clave: Fumigación, germinación de polen, ozono, *Pinus hartwegii*, polen, tubo polínico.

Fecha de recepción: 14 de marzo de 2002.

Fecha de aceptación: 10 de febrero de 2004.

¹ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales (CENID-COMEF), INIFAP, Ave. Progreso No. 5, Viveros de Coyoacán 04110 México, D.F. hernandez_tomas@inifap.gob.mx

² Canadian Forest Service—Maritimes, Natural Resources Canada.

³ Colegio de Postgraduados. Programa de Hidrociencias.

⁴ Colegio de Postgraduados. Programa Forestal.

⁵ Colegio de Postgraduados. Programa de Fitopatología.

ABSTRACT

Air pollution, particularly photochemical oxidants, induces changes in the reproductive processes of vegetative species. In this study, the effect of ozone on germination and tube growth of *Pinus hartwegii* pollen grains was investigated. Pollen was collected from 3 forest areas in the Mexico City Air Basin with varying air pollution exposure levels: Desierto de los Leones, Ajusco and Zoquiapan. It was suspended in tissue culture media (Brewbaker solution) plus a solidifying agent (Gelrite) at a concentration near 2,000 grains per 50 μ l droplet. Droplets were deposited on glass slides, which were incubated in Petri dishes that served as humidity chambers. The Petri dishes were opened daily only during the periods of ozone fumigation. The pine pollen was artificially exposed in special fumigation chambers to: 0.03 (control), 0.20 and 0.30 ppm ozone for 3 hours per day, for 3 or 6 consecutive days. Results showed that pollen grains were equally affected by ozone, in spite of their site of origin. The inhibition of germination and tube growth of *P. hartwegii* pollen was greater at higher ozone concentrations, and pollen germination decreased significantly ozone exposure periods were longer.

Key words: Fumigation, pollen germination, ozone, *Pinus hartwegii*, pollen, pollinic tube.

INTRODUCCIÓN

Los cambios en los procesos reproductivos inducidos por la contaminación atmosférica no son tan fácilmente observables o reconocibles en los ecosistemas forestales, como ocurre con los síntomas foliares en las especies arbóreas. Sin embargo, se ha comprobado que este factor puede influir sobre la reproducción de las plantas al inhibir en mayor o menor grado la fotosíntesis y a la vez ocasionar cambios en la distribución de los metabolitos; además, los eventos críticos en los ciclos reproductivos pueden afectarse directamente por la exposición a los contaminantes atmosféricos. Asimismo, y de acuerdo con los resultados encontrados en *Pinus strobus* L., la exposición al ozono puede causar una reducción en la viabilidad del polen (Benoit *et al.*, 1983).

Wolters y Martens (1987) establecieron que la germinación y el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen son impactados por los contaminantes atmosféricos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos autores mencionaron que la estimulación o inhibición de ambos parámetros de viabilidad del polen dependen de la especie, así como del tipo de contaminante y su concentración, del tiempo de exposición y de la humedad relativa. La reducción de la capacidad germinativa y del crecimiento del tubo polínico de los granos de polen obviamente afecta

de manera negativa la producción de semillas y, por lo tanto, la capacidad reproductiva de los árboles.

Cox (1989) afirmó que, independientemente de la manera en que los contaminantes afectan al polen, la repercusión genética de la contaminación atmosférica también induce cambios en la competencia entre los granos de polen sobre el estilo, lo que da como resultado una reducción en la variación de los genotipos de la próxima generación. Smith (1981) aseguró que la reproducción sexual en las especies forestales es muy importante para mantener su flexibilidad genética y la persistencia de la mayoría de las especies en comunidades forestales naturales.

Diversos investigadores también han mencionado que la sensibilidad del polen a la exposición de ozono se correlaciona con la sensibilidad foliar al ozono en muchas variedades de cultivos agrícolas anuales (Feder, 1968; Feder y Sullivan, 1969; Mumford *et al.*, 1972; Harrison y Feder, 1974).

Dentro de la serie de estudios de los efectos de la contaminación atmosférica sobre polen figuran los realizados por Cox (1983, 1985, 1987, 1988 y 1992), quien ha observado que la aspersión simulada de lluvia ácida afecta la germinación y el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen en algunas especies forestales de Canadá. Asimismo, este autor ha señalado que la liberación prematura o retrasada del polen puede imposibilitar la fertilización del óvulo y afirmó que la posibilidad de recolonización de un área forestal decrecerá si la reproducción sexual se reduce.

Benoit *et al.* (1983) colectaron polen en árboles de *P. strobus* que se comportaron como sensibles, intermedios y tolerantes a la contaminación atmosférica por oxidantes fotoquímicos, de acuerdo con la manifestación de los síntomas foliares. Al fumigar los granos de polen pudieron reconocer que el porcentaje de germinación se redujo significativamente ($P \leq 0.05$) cuando se expusieron a 0.15 ppm de ozono durante 4 horas, bajo condiciones de alta humedad (agua libre). Sin embargo, la longitud promedio de los tubos polínicos no se redujo significativamente por el ozono.

Además, los autores citados anteriormente, comprobaron que la sensibilidad del polen al ozono no se correlacionó con la sensibilidad del follaje a este componente, quizá porque el polen de los pinos está menos hidratado que el polen de los cultivos agrícolas, que a su vez son más activos fisiológicamente, debido a sus períodos reproductivos cortos. En cambio, el polen y el follaje de los cultivos son igualmente sensibles (Benoit *et al.*, 1983).

Kormutak *et al.* (1994) estimaron la viabilidad de los granos de polen colectados en 16 árboles de *Abies alba* Mill., que crecían de manera natural en tres sitios con diferentes grados de contaminación atmosférica, generados por una

fábrica procesadora de aluminio, otra de químicos y por una carboeléctrica. Los autores identificaron que el porcentaje de germinación de los granos de polen y el crecimiento del tubo polínico variaron considerablemente entre árboles individuales; y en la mayoría de los casos la variación estuvo correlacionada positivamente con el grado de contaminación del sitio de prueba. Apreciaron que la germinación de los granos de polen fue más sensible a la contaminación atmosférica que el crecimiento de los tubos polínicos.

En la mayoría de las especies de pinos de nuestro país, la polinización ocurre en la primavera (Niembro-Rocas, 1986). En ese momento, las brácteas de los estróbilos femeninos están ligeramente separadas y los granos de polen penetran entre las brácteas y se anidan en el exudado micropilar (Mirov, 1969). El estado de receptividad de las flores femeninas por lo general dura de uno a tres días, al cabo de los cuales las escamas se cierran como resultado de su crecimiento (Niembro-Rocas, 1986). La mayoría de los granos de polen que entran a la cámara polínica inician su germinación unos días después, especialmente si la temperatura del óvulo es de 30 a 32°C (McWilliam, 1959); sin embargo solo unos cuantos sobreviven y llegan a emitir su tubo polínico (Stockwell, 1939, citado por Niembro-Rocas, 1986).

El crecimiento de esta última estructura sucede en completa oscuridad y posiblemente con baja concentración de oxígeno, debido a que el micrópilo se cierra después de terminada la polinización (McWilliam, 1960). El grano de polen crece muy lentamente durante los siguientes once meses posteriores a la polinización. Al llegar el invierno el proceso se detiene para reanudarse en la primavera del siguiente año (Niembro-Rocas, 1986).

El Gobierno de la Ciudad de México diariamente da a conocer la concentración de los contaminantes atmosféricos más importantes, entre los que destaca el ozono por su abundancia y distribución; sin embargo, no existen datos suficientes sobre el tipo y concentración de contaminantes atmosféricos presentes dentro de las áreas forestales aledañas. En la actualidad sólo se tiene una estación de monitoreo de ozono instalada desde 1990, en el ex-convento del Parque Nacional Forestal Desierto de los Leones, D. F., que registra los datos de ozono diariamente, a excepción de algunos periodos cortos, debido a obras de mantenimiento, reparación del equipo de monitoreo o falta de energía eléctrica. Con los datos obtenidos Miller *et al.* (1994) confirmaron el impacto negativo del ozono sobre la vegetación del Parque.

Con la ayuda de monitores pasivos se determinó la concentración del ozono dentro de tres áreas forestales de la Cuenca Atmosférica de la Ciudad de México (CACM), por un periodo de 18 meses (julio de 1997 a diciembre de 1998). La registrada (promedios de 14 días) en el Ajusco y en el Desierto de los Leones, D.F. varió de 0.09 a 0.12 ppm y en Zoquiapan, Méx., fue ligeramente menor

a la de las otras dos áreas (Hernández, Cox y Bauer. Datos no publicados).

En las áreas forestales del sur de la Ciudad de México se han observado los daños de los oxidantes fotoquímicos sobre la vegetación natural e introducida desde hace más de 20 años (Bauer y Hernández, 1986; Miller *et al.*, 2002); sin embargo, hasta la fecha nadie ha señalado el efecto del ozono sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen de *P. hartwegii*.

Se planteó la hipótesis de que la reducción en la viabilidad de los granos de polen, inducida por el ozono, es una de las causas más importantes de la falta de regeneración natural en los bosques de pino del sur de la Ciudad de México.

Los objetivos fueron determinar el efecto de la concentración de ozono y del tiempo de exposición, así como la variación entre las localidades, sobre el crecimiento del tubo polínico y la germinación de los granos de polen de *P. hartwegii* de la CACM.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal en estudio se colectó en rodales naturales de *Pinus hartwegii* ubicados dentro de la CACM, en tres áreas forestales conocidas: Zoquiapan, Méx., Ajusco, D. F. y Desierto de los Leones, D. F., que difieren tanto en la concentración y tiempo de exposición al ozono, como en el grado de daño consecuente por la contaminación atmosférica sobre la vegetación forestal y otras especies de plantas nativas.

El polen se extrajo de estróbilos masculinos maduros de árboles individuales de *P. hartwegii*. Los árboles se ubicaron a tres diferentes alturas sobre el nivel del mar (estratos), dentro de cada una de las tres localidades en estudio (Cuadro 1). Los estróbilos se colectaron y se etiquetaron en campo a finales de abril de 1998; fueron depositados en bolsas de papel y en el laboratorio permanecieron a temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) durante siete días, hasta que el polen se tamizó y se colocó en frascos individuales. A principios de mayo de 1998 se llevó el polen al laboratorio del Dr. Roger M. Cox, del Servicio Forestal Canadiense en Fredericton, New Brunswick, Canadá, donde se almacenó a 3.1°C , dentro de un desecador, en frascos de vidrio color ámbar de 100 ml, con las tapas flojas.

En mayo del mismo año se inició el estudio con algunas pruebas de laboratorio para seleccionar el mejor medio de cultivo, así como ensayos de temperatura, humedad relativa y viabilidad, para determinar las condiciones óptimas de desarrollo de los granos de polen.

El primer medio de cultivo experimental que se usó para conocer la viabilidad del polen, fue agua destilada. Se utilizaron portaobjetos de vidrio excavados

Cuadro 1. Ubicación de las procedencias y número de lotes (árboles) donde se colectó el polen de *Pinus hartwegii*

Localidad	Coordenadas	Estrato (msnm)	No. de lotes (árboles)
Zoquiapan, Méx.	19°19'24"N 98°43'08"W	Parte alta (3,320)	3
	19°18'28"N 98°42'32"W	Parte media (3,240)	3
	19°17'24"N 98°42'28"W	Parte baja (3,125)	3
Ajusco, D. F.	19°13'44"N 99°14'52"W	Parte alta (3,400)	2
	19°13'36"N 99°15'24"W	Parte media (3,225)	2
Desierto de los Leones, D. F.	19°16'44"N 99°19'36"W	Parte alta (3,540)	3
	19°16'20"N 99°19'34"W	Parte media (3,370)	1

y planos donde se colocaron gotas de 50 µl, que fueron inoculadas con granos de polen de diversos lotes. Debido a que todos ellos se concentraron en la parte más alta de la gota, no se pudo contabilizar el número de granos germinados, ni medir el crecimiento del tubo polínico. Además, desde los primeros días se produjo contaminación por hongos y bacterias.

El mejor medio de cultivo para germinar los granos de polen fue la solución de Brewbaker (Brewbaker y Kwack, 1963) más el solidificante Gelrite (Merck and Company, Inc. Kelco División), que además permitió un excelente crecimiento del tubo polínico. Se prepararon cuatro soluciones madre, de 125 ml de cada una, con agua destilada más 1.0% de H_3BO_3 , 4.32% de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$, 4.08% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ y 1.0% de KNO_3 , que se mantuvieron por separado y en refrigeración. Para preparar la solución Brewbaker se tomó 1 ml de cada solución madre y se aforó con agua destilada hasta 100 ml. El $Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ se agregó al final, con el fin de evitar su precipitación. A la solución se agregó 15% de sucrosa más 0.05% de Gelrite y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121.4°C y 16.6 psi. Finalmente se agregaron 15 ppm de micostatin y 15 ppm de cloranfenicol, para evitar la proliferación de hongos y bacterias en el medio de cultivo. La adición del Gelrite al medio de cultivo evitó la acumulación de los granos de polen en la parte alta de la gota.

Se llevaron a cabo dos experimentos paralelos de fumigación artificial con ozono a los granos de polen de *P. hartwegii*; en el primero, éstos fueron fumigados

durante tres horas diarias, por tres días consecutivos, con los tratamientos siguientes: 0.03 (testigo), 0.20 y 0.30 ppm. En el segundo experimento se utilizaron las mismas concentraciones de ozono y el mismo tiempo de exposición diaria, pero el período de exposición se incrementó a seis días consecutivos. El monitor de ozono empleado fue un "U.V. Photometric O₃ Analyzer" (Termo Environmental Instruments, Inc.) y el aparato productor de ozono fue un "Ozone Generator" (Grifing Technics Corporation).

Antes de iniciar los experimentos de exposición de los granos de polen al ozono, se aleatorizó la distribución de las cajas de Petri, que contenían los portaobjetos con la solución nutritiva, el gelatinizante y el polen, dentro de las tres cámaras especiales de fumigación diseñadas por el Dr. Roger M. Cox, una de las cuales sirvió como testigo. En cada caja se pusieron cuatro portaobjetos y a cada uno de ellos se le colocó una gota de 50 µl de solución nutritiva Brewbaker además del Gelrite. A cada gota se le aplicaron 2,000 granos de polen aproximadamente, que se distribuyeron de manera homogénea con un pincel de pelo de camello. Las exposiciones con ozono se iniciaron el mismo día que se inoculó el polen sobre las gotas de medio de cultivo.

Las cajas de Petri se destapaban durante tres horas, inclusive las testigos, con el objeto de que el polen y las gotas del medio de cultivo estuvieran expuestas, tanto a las condiciones de temperatura y contenido de humedad, como a las mismas concentraciones de ozono. Al terminar la exposición diaria, las cajas se tapaban y se dejaban dentro de la cámara de fumigación correspondiente, hasta concluir con su período de exposición, antes de ser transferidas a la cámara testigo.

El estudio incluyó tres diferentes concentraciones de ozono y el polen de 12 árboles de pino, el que se inoculó en cuatro portaobjetos por cada árbol, con el fin de usar dos portaobjetos para el experimento de tres días y dos para el de seis días, lo que da un número total de muestras de 144.

La temperatura al interior de las cámaras fue de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ y la humedad relativa se incrementó a $95 \pm 3\%$, con el objeto de que el polen germinara y emitiera su tubo polínico en óptimas condiciones. La fumigación con ozono, la temperatura y la humedad relativa, dentro de las cámaras se controlaron con un programa computarizado conocido como "CALNB94".

Al terminar ambos experimentos, es decir, 144 horas después de la inoculación del polen en las gotas de solución nutritiva, se les aplicaron 25 µl de ácido acético al 50%, con el fin de detener el proceso natural de desarrollo de los granos de polen, y así poder llevar a cabo el conteo de la germinación y la medición de la longitud del tubo polínico en todos los tratamientos. La primera se determinó en 10% de los granos de polen, con un microscopio de luz, en cinco diferentes campos y con ocular 10X. Se consideraron como germinados

aquellos granos de polen con tubos germinativos mayores a su propio diámetro. La medición del tubo polínico se realizó en 5% de los granos, con un microscopio de luz, en 10 diferentes campos, un ocular 10X y una tableta digitalizadora conectada a una computadora que usó el programa "Sigma-ScanTM", versión 3.90 (Jandel Scientific).

Los valores del porcentaje de germinación en ambos ensayos se transformaron con la función arco-seno, y los del crecimiento del tubo polínico, mediante el logaritmo natural base 10. Los datos calculados de cada experimento se sometieron a un análisis de varianza por separado, que incluyó los factores: dosis de ozono (0.03, 0.20 y 0.30 ppm), localidades (Desierto de los Leones, Ajusco y Zoquiapan) y estratos dentro de localidades (alto, medio y bajo), así como las interacciones entre otros factores. En el caso donde se encontraron efectos significativos se llevó a cabo una prueba de comparación de medias (Duncan Range Test).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de germinación (%G) y del crecimiento del tubo polínico (CT) de los granos de polen fumigados con ozono, mostró la existencia de diferencias estadísticas significativas únicamente entre tratamientos, tanto con los datos originales como con los transformados en ambos ensayos de fumigación (Cuadro 2). No se confirmaron diferencias entre localidades, ni estratos de colecta, ni tampoco una interacción significativa con los factores considerados. Al hacer la transformación de los datos, el coeficiente de variación se redujo; sin embargo, la comparación de medias con ambos tipos de datos produjo un comportamiento igual en los resultados y su significancia, razón por la cual se presentan los datos originales sin transformar (Cuadro 3).

Las diferencias mínimas significativas de los tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$), indican que la aplicación de 0.30 ppm de ozono durante seis días consecutivos redujo 45% la germinación de los granos de polen en comparación con el testigo que mostró 79%; en cambio, con la aplicación de 0.20 ppm, no se verificaron diferencias estadísticas significativas, a pesar de apreciarse una ligera reducción en la capacidad germinativa. Por otra parte, en el periodo de fumigación de tres días consecutivos no hubo diferencias significativas en el %G bajo ningún tratamiento (Cuadro 3).

Es posible que los granos de polen tratados por tres días consecutivos, con diferentes concentraciones de ozono, hayan recuperado su capacidad germinativa, puesto que se colocaron en la cámara de fumigación con aire limpio los siguientes tres días, antes de evaluar su germinación, junto con el experimento de seis días de exposición.

Cuadro 2. Análisis de varianza del porcentaje de germinación (%G) y el crecimiento del tubo polínico (CT) de los granos de polen de *Pinus hartwegii* fumigados con ozono.

Factor de variación	gl	CM			
		Tres días		Seis días	
		%G	CT	%G	CT
Tratamiento (T)	2	159.15	7,820.81**	5,124.71**	7,004.95*
Localidad (L)	2	75.58	686.86	195.78	2,375.60
T * L	4	23.99	225.36	91.95	258.75
Estrato (L)	4	183.42	1,193.80	215.66	751.86
Estrato * T (L)	8	7.18	795.67	103.16	625.77
Error	30	84.10	1,097.46	322.53	1,687.72
C V (%)		11.23	28.76	27.93	35.65

*Significativo ($P \leq 0.05$) **Altamente significativo ($P \leq 0.01$) CV = Coeficiente de variación.

Cuadro 3. Valores promedio del porcentaje de germinación (%G) y del crecimiento del tubo polínico en μ (CT) de los granos de polen de *Pinus hartwegii* fumigados con diferentes concentraciones de ozono.

Concentración de ozono (ppm)	Tres días		Seis días	
	%G	CT	%G	CT
0.03* ^b	84 a	133 a	79 a	133 a
0.20	81 a	120 a	67 a	119 a b
0.30	78 a	91 b	45 b	93 b
DMS (5 %)	6.7	24	13.2	30

Medias con la misma letra indican igual significancia. *Testigo. DMS = Diferencia mínima significativa.

Las diferencias mínimas significativas de los tratamientos, de acuerdo con la prueba de Duncan ($\alpha = 0.05$), señalan que la aplicación de 0.30 ppm de ozono durante seis días consecutivos reduce el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen hasta 93 μ , en comparación con el testigo que mostró una longitud promedio de 133 μ . Además, la exposición con 0.20 ppm también difirió estadísticamente del testigo. Por otra parte, en el período de tres días consecutivos, sólo con el tratamiento de 0.30 ppm se observó una reducción significativa en el crecimiento del tubo polínico (Cuadro 3).

El crecimiento del tubo polínico se redujo independientemente de la duración del tiempo de exposición; es decir, basta que se exponga el polen poco tiempo para ser afectado, sobre todo a altas concentraciones de ozono. Por otra parte, el porcentaje de germinación sólo se afecta drásticamente cuando el tiempo de exposición y la concentración de ozono aumentan en forma simultánea. De acuerdo con lo anterior, se puede asumir que el crecimiento de los tubos polínicos es más sensible al ozono que la germinación de los granos de polen de *P. hartwegii*.

En contraste, Benoit *et al.* (1983) observaron exactamente lo contrario en polen de *P. strobus* sometido a fumigaciones con ozono; cuyo tratamiento ocasionó una reducción en el porcentaje de germinación de los granos de polen humedecidos, aun con dosis de 0.15 ppm de ozono durante cuatro horas, pero sin afectar la longitud media de los tubos polínicos. Sin embargo, la misma dosis de ozono no redujo significativamente la germinación del polen en seco. Kornosky y Stairs (citados por Benoit *et al.*, 1983) reconocieron el mismo patrón de comportamiento cuando expusieron el polen de especies forestales a SO_2 .

De acuerdo con el análisis de varianza (Cuadro 2), no hubo diferencias significativas entre las localidades, ni entre los estratos, ni tampoco una interacción significativa de estos factores con los tratamientos de fumigación. La concentración de ozono impacta de igual manera la capacidad germinativa del polen de las diferentes localidades de la CACM. Asimismo, en los bosques del sur de la CACM, dicho factor es vertical y decrece ligeramente conforme aumenta la altura sobre el nivel del mar (Hernández, Cox y Bauer: Datos no publicados), lo que significa que todos los árboles de pino son potencialmente dañados por el ozono generado en la Ciudad de México, a pesar de la altitud diferencial donde se localizan.

La estación del Pedregal de la red de monitoreo de la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), registró concentraciones hasta de 0.30 ppm de ozono por tres horas o más en algunos días de enero a abril de 1998, período en el que se colectó el polen. En el año de 1997 el valor máximo, mínimo y promedio de ozono de la segunda concentración máxima anual en seis estaciones de monitoreo fue de 0.30, 0.20 y 0.25 ppm,

respectivamente (INEGI, 1999). Desde 1998 se ha observado una tendencia a la baja de las concentraciones de ozono registradas diariamente dentro de la ZMVM; sin embargo, se continúa rebasando la norma de calidad del aire en el 90% de los días del año.

Es indudable que los factores meteorológicos juegan un papel importante en el proceso natural de polinización y fertilización, tanto en los pinos como en todas las especies vegetales, entre las que destacan la humedad de la atmósfera y la temperatura. Durante ambos experimentos se mantuvo una humedad relativa alta ($95 \pm 3\%$), así como una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, dentro de las tres cámaras de fumigación, simulando condiciones naturales favorables, con el fin de no alterar el proceso de germinación y crecimiento del tubo polínico.

En experimentos previos se observó que a medida que disminuía la humedad relativa y se incrementaba la temperatura, los resultados eran negativos; es decir, el porcentaje de germinación se reducía y el crecimiento del tubo polínico se inhibía. Con una humedad relativa de 54% y una temperatura de 30°C no se detectó crecimiento del tubo polínico ni germinación de los granos de polen, después de 143 horas continuas (Hernández, Cox y Bauer. Datos no publicados).

Respecto a las localidades, es obvio que en aquellas con mayor concentración de ozono, los problemas potenciales en la capacidad germinativa y en el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen serán mayores, lo que repercutirá no sólo en la regeneración natural del bosque de pino, sino también en todos aquellos procesos fisiológicos, genéticos y de reproducción.

Posiblemente cuando los granos de polen están germinando y emitiendo su tubo polínico, manifiestan la mayor sensibilidad al ozono; sin embargo, debido al poco intercambio de gases con el ambiente (McWilliam, 1960), quizá se reduce dicho efecto. Tampoco se sabe si antes de la polinización pudiera ocurrir un impacto sobre el polen, ya que en la mayoría de los pinos el desarrollo completo de las flores masculinas dura aproximadamente un año (Niembro-Rocas, 1986).

Asimismo, no sólo los granos de polen podrían ser afectados por el ozono, sino también las flores femeninas, antes, durante y después de la polinización. Bramlett *et al.* (1977) mencionaron que se requiere de 12 a 16 meses, de acuerdo con la especie de pino, para que el tubo polínico se alargue y fertilice al óvulo, tiempo suficiente para que las concentraciones de ozono afecten negativamente la formación de la semilla de *P. hartwegii* de la CACM.

Es muy probable que los cambios en los procesos reproductivos sean complejos, puesto que involucran a la gametogénesis y los eventos reproductivos posteriores. Consecuentemente, uno de los efectos directos parece ser una reducción en la viabilidad del polen y, por lo tanto, en la eficiencia reproductiva (Cox, 1988, 1989 y 1992).

En la CACM, además de las altas concentraciones de ozono que se registran a diario, existen otros factores, tales como las royas y la sequía, que también intervienen negativamente en el proceso normal de la fecundación y formación de la semilla en los bosques de pino y otras especies forestales. Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que el ozono es un factor importante, ya que reduce en gran medida la capacidad germinativa de los granos de polen, fenómeno que se ha observado en diversas especies de pino de otros países (Benoit *et al.*, 1988; Cox, 1988).

En las áreas de interés existe una pobre o nula regeneración natural de los bosques de *P. hartwegii* debido a causas tan comunes como el sobre-pastoreo, los incendios, la colecta excesiva de semilla, la tala ilegal de los mejores árboles, el combate ineficiente de plagas y enfermedades forestales y la falta de un plan estratégico de manejo forestal. Además, la escasa regeneración natural en los bosques de *P. hartwegii* podría deberse también a un desfase entre la producción del polen y la receptividad de las flores femeninas, fenómeno de posible origen climático.

Bajo condiciones experimentales, bastan seis días consecutivos para que se reduzca significativamente el porcentaje de germinación y sólo tres días para reducir el crecimiento del tubo polínico. Por lo tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se confirma que ocurre un impacto negativo del ozono sobre los granos de polen de *P. hartwegii* de la CACM, específicamente sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico.

CONCLUSIONES

Los granos de polen de *P. hartwegii* son afectados por el ozono con la misma intensidad, sin importar la localidad o elevación del sitio de procedencia.

La aplicación de 0.30 ppm de ozono durante tres horas diarias por un periodo de seis días consecutivos redujo significativamente ($P \leq 0.05$) la germinación de 79 a 45% y el crecimiento del tubo polínico de 133 a 93 μ . En los granos de polen de *P. hartwegii* tratados. En contraste, la aplicación de 0.30 ppm de ozono, por tres horas diarias en un periodo de tres días consecutivos, fue suficiente para reducir significativamente el crecimiento del tubo polínico de 133 a 91 μ . A mayor tiempo de exposición y concentración de ozono se observó un daño más severo sobre la germinación y el crecimiento del tubo polínico de los granos de polen de *P. hartwegii* de la Cuenca Atmosférica de la Ciudad de México.

RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar un experimento para determinar el impacto del ozono sobre la producción y distribución del polen de las especies forestales mexicanas

más importantes. Además, se recomienda llevar a cabo otros experimentos, donde se evalúe la germinación y el crecimiento del tubo polínico diariamente, en todo el período de fumigación con ozono, con el objeto de evitar una posible recuperación de los granos de polen.

AGRADECIMIENTOS

Al M. C. Ignacio Benítez Riquelme un sincero agradecimiento por sus comentarios y sugerencias en el análisis estadístico y discusión de resultados.

REFERENCIAS

- Bauer, L. I. de y T. Hernández-Tejeda. 1986. Contaminación: Una amenaza para la vegetación en México. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 84 p.
- Benoit, L. F., J. M. Skelly, L. D. Moore and S. Dochinger. 1983. The influence of ozone on *Pinus strobus* L. pollen germination. Can. J. For. Res. 13:184-187.
- Bramlett, D. L., E. W. Belcher, G. L. DeBarr, G. D. Hertel, R. P. Karrfalt, C. W. Lantz, T. Miller, K. D. Ware and H. O. Yates. 1977. Cone analysis of southern pines: a guidebook. GTR SE-13. USDA-Forest Service. Southern Forest Experiment Station, Asheville, NC. USA. 28 p.
- Brewbaker, J. L. and B. N. Kwack. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany 50:859-869.
- Cox, R. M. 1983. Sensitivity of forest plant reproduction to long range transported air pollutants: *In vitro* sensitivity of pollen to simulated acid rain. New Phytologist 95:269-276.
- Cox, R. M. 1985. Determination of the sensitivity of pollination processes of different forest flora species to simulated rain. Report for the Canadian Forest Service. Contract Serial Number OSc81-00083. University of Toronto. Toronto, Canada. 44 p.
- Cox, R. M. 1987. The response of plant reproductive processes to acidic rain and other air pollutants. *In*: Hutchinson, T. C. and K. M. Meema. (Eds). Effects of atmospheric pollutants on forests, wetlands and agricultural ecosystems. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 155-170.
- Cox, R. M. 1988. The sensitivity of pollen from various coniferous and broad-leaved trees to combinations of acidity and trace metals. New Phytologist 109:193-201.
- Cox, R. M. 1989. Natural variation in sensitivity of reproductive processes in some boreal forest trees to acidity. *In*: Scholds, F., R. Gregorious and D. Rudin. (Eds). Genetic effects of air pollutants in forest tree populations. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Germany. pp. 77-88.

- Cox, R. M. 1992. The effects of wet deposition chemistry on reproductive processes in two species: apparent pollination effectiveness in relation to species pollen sensitivity. *Water, Air, and Soil Pollution* 62:213-226.
- Feder, W. A. 1968. Reduction in tobacco pollen germination and tube elongation, induced by low levels of ozone. *Science* 160:1122.
- Feder, W. A. and F. Sullivan. 1969. Differential susceptibility of pollen grains to ozone injury. *Phytopathology* 59:399.
- Harrison, B. H. and W. A. Feder. 1974. Ultrastructural changes in pollen exposed to ozone. *Phytopathology* 64:257-258.
- INEGI. 1999. Estadísticas del medio ambiente del Distrito Federal y área metropolitana 1999. Talleres Gráficos del INEGI. Aguascalientes, México. 231 p.
- Kormutak, A., J. Salaj and B. Vookova. 1994. Pollen viability and seed set of silver fir (*Abies alba* Mill.) in polluted areas of Slovakia. *Silvae Genetica* 43:68-73.
- McWilliam, J. R. 1959. Effect of temperature on pollen germination of *Pinus* and its bearing on controlled pollination. *Forest Science* 5:10-17.
- McWilliam, J. R. 1960. Pollen germination of *Pinus* as affected by the environment. *Forest Science* 6:26-39.
- Miller, P. R., L. I. de Bauer, A. Quevedo and T. Hernández-Tejeda. 1994. Comparison of ozone exposure characteristics in forested regions near Mexico City and Los Angeles. *Atmospheric Environment* 28:141-148.
- Miller, P. R., L. I. de Bauer and T. Hernández-Tejeda. 2002. Oxidant exposure and effects on pine forests in the Mexico City and Los Angeles, California air basins. In: Fenn, M. E., L. I. de Bauer, and T. Hernández-Tejeda (Eds). *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*. Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York, USA. pp. 225-242.
- Mirov, N. T. 1969. The genus *Pinus*. Ronald Press Co. New York, US. 413 p.
- Mumford, R. A., H. Lipke, D. A. Laufer and W. A. Feder. 1972. Ozone-induced changes in corn pollen. *Environ. Sci. Technol.* 6:427-430.
- Niembro-Rocas, A. 1986. Mecanismo de reproducción sexual en pinos. Editorial Limusa. México. 130 p.
- Smith, W. H. 1981. Air pollution and forests: Interactions between air contaminants and forest ecosystems. Springer-Verlag, New York, USA. 379 p.
- Wolters, J. H. B. and M. J. M. Martens. 1987. Effects of air pollutants on pollen. *The Botanical Review* 53:372-414.