



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

**“EFECTO DE EXPOSICIÓN A OZONO Y METIL JASMONATO
EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ALGODÓN PIMA (*Gossypium
barbadense*) Y EN LA INTEGRIDAD NUCLEAR DE SUS CÉLULAS
RADICULARES y FOLIARES.”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
Grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta

I. en A. César Aguilar Pérez

Santiago de Querétaro, Querétaro, Octubre de 2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Ambientales

**“EFECTO DE EXPOSICIÓN A OZONO Y METIL JASMONATO EN EL
CRECIMIENTO DE PLANTAS DE ALGODÓN PIMA (*Gossypium barbadense*) Y
EN LA INTEGRIDAD NUCLEAR DE SUS CÉLULAS RADICULARES.”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta:


I. en A. César Aguilar Pérez

Dirigido por:


Dr. Miguel Ángel Rea López

SINODALES:

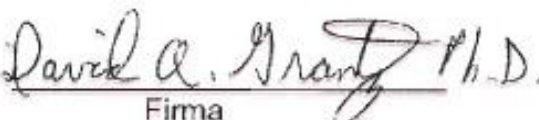
Dr. Miguel Ángel Rea López
Presidente


Firma

M.C. Ma. Eustolia Rodríguez Muñoz
Secretario


Firma

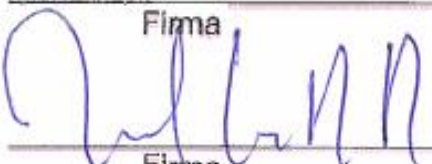
Dr. David Grantz
Vocal



Firma


M.C. Antonio Aranda Regalado
Suplente


Firma

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez
Suplente


Firma


M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad


Dra. Ma Guadalupe Flavía Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

RESUMEN

El ozono en la estratósfera funciona como un escudo protector contra los rayos ultravioleta. En la troposfera, el ozono (O_3) es considerado como el contaminante atmosférico secundario de mayor relevancia, y se forma cuando el monóxido de nitrógeno en conjunto con el oxígeno reacciona en presencia de luz solar. Al igual que otros contaminantes atmosféricos, el O_3 se transporta a través de las corrientes de aire llegando incluso a áreas alejadas al lugar donde se formó. En las plantas entra a través de los estomas causando diversos daños fisiológicos que finalmente se traducen en pérdida de biomasa y rendimiento. A nivel celular sus efectos aún no están bien identificados. En cultivos altamente susceptibles como el algodón existe un gran interés por conocer los mecanismos de acción del O_3 así como las posibles estrategias para modular sus efectos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar, en plantas de algodón Pima, el efecto del O_3 tanto a nivel celular como fisiológico, así como la posible mitigación de esos efectos por la hormona metil-jasmonato. Las plantas se expusieron a concentraciones de 4, 59 y 114 ppb de O_3 en cámaras cerradas bajo condiciones de invernadero. El tratamiento con metil-jasmonato (95%) se llevó a cabo mediante seis aplicaciones semanales de $160 \mu\text{l/planta}$. Los parámetros evaluados fueron fisiológicos y de crecimiento, así como parámetros de integridad nuclear de células foliares y radicales. Para estos últimos se evaluó la fragmentación de los núcleos celulares empleando electroforesis unicelular alcalina. Los resultados nos muestran que a medida que la concentración de O_3 aumenta, la fotosíntesis, conductividad estomatal, respiración radicular; así como el crecimiento y biomasa de las plantas se afectan significativamente. Bajo las condiciones del experimento, la aplicación de metil-jasmonato no moduló los efectos negativos del O_3 en los parámetros evaluados. En lo que se refiere a integridad nuclear de las células foliares se observó que la mayor fragmentación nuclear ocurrió a partir de la exposición a 59 ppb de O_3 . En esta concentración un 37% de las células tuvieron una fragmentación nuclear en el rango del 25 al 100%. En la concentración de 114 ppb el porcentaje de células en este rango fue prácticamente el mismo mientras que en la concentración de 4 ppb fue de un 21%. La integridad nuclear de células radicales también se vio mayormente afectada en la exposición a 59 ppb de O_3 . En esta concentración un 17% de las células tuvieron una fragmentación nuclear en el rango del 25 al 100%. En la concentración de 114 ppb el porcentaje de células en este rango fue de un 5% mientras que en la concentración de 4 ppb el porcentaje de células fue prácticamente nulo (0.2%). Estos resultados nos sugieren que a exposiciones de 59 ppb de O_3 , las células foliares y radicales de plantas de algodón Pima muestran mayor fragmentación nuclear, sin embargo por alguna respuesta aún no identificada por parte de la planta, la concentración alta (114 ppb) no acentúa el daño nuclear. Los resultados también nos reafirman observaciones previas donde el O_3 afecta el crecimiento y fisiología de las plantas de algodón; sin embargo nos indican que bajo estas condiciones experimentales, el metil-jasmonato no modula los efectos negativos del O_3 .

Palabras clave: ozono, algodón, metil-jasmonato, electroforesis unicelular alcalina

SUMMARY

Ozone in the stratosphere works as shield against UV rays. In the troposphere, is considered as the most relevant secondary atmospheric pollutant and it builds up when the nitrogen monoxide and oxygen react in the presence of solar light. As other atmospheric pollutants, O₃ travels through the airstreams affecting even areas that are far away from the buildup location. In plants O₃ enters through the stomata causing several physiological deficiencies that finally end up in biomass and yield loss. At cellular level, O₃ effects are not yet clearly identified. In highly susceptible crops as cotton, there is a great interest for knowing the actions mechanisms of O₃ as well as the possible mitigation strategies to modulate the O₃ effects. The present study had the main objective of evaluate, in Pima cotton plants, the effect of O₃ at cellular and physiological level, as well as possible mitigation effects with the application of methyl-jasmonate. The plants were exposed to 4, 59 and 114 ppb ozone concentrations in greenhouse O₃ exposure chambers. Methyl-jasmonate treatment (95%) was carried out administering 160 ul/plant every week for six consecutive weeks. Growth and physiological parameters were evaluated, as well as nuclear integrity of foliar and root cells. For cell integrity, nuclear fragmentation was evaluated using alkaline single cell gel electrophoresis. Results show that as O₃ concentration increases, the photosynthesis, stomata conductance, root respiration, plant growth and plant biomass all get affected significantly. Under the experiment's setting, the application of methyl-jasmonate did not modulate the negative effects of O₃ exposure in the parameters mentioned above. Concerning the integrity of foliar cells, the higher nuclear fragmentation took place from the 59 ppb O₃ exposure. In this concentration, 37% of cells had from 25 to 100% nuclear fragmentation. In the 114 ppb concentration, the percentage of cells in this range (25-100%) was practically the same, whereas in the 4 ppb concentration was 21%. The 59 ppb O₃ concentration was also the one that caused more damage in root cells. Under this treatment, 17% off cells had from 25 to 100% nuclear fragmentation. In the 114 ppb concentration, the percentage of cells in this range (25-100%) was 5%, whereas in the 4 ppb concentration was practically zero (0.2%). These results suggest that having O₃ exposures of 59 ppb, foliar and root cells show the highest rate of nuclear fragmentation, however and for an unknown response by the plant, the 114 ppb ozone concentration does not accentuates cell damage. Results also restate previous observations where O₃ affects growth and physiology of cotton plants; however they also suggest that under these experimental conditions, methyl-jasmonate does not modulate ozone negative effects.

Keywords: Ozone, cotton, methyl-jasmonate, alkaline single cell gel electrophoresis.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por haberme permitido estudiar en este Programa Académico y brindarme las facilidades para culminar mis estudios.

Al Instituto Tecnológico de Roque, parte del Tecnológico Nacional de México, por haberme brindado las facilidades y apoyo para culminar mis estudios.

A mi director de Tesis el Dr. Miguel Ángel Rea López y a la M.C. Ma. Eustolia Rodríguez Muñoz por haberme siempre acompañado en la realización de este trabajo, y por la gran paciencia y comprensión que en todo momento me demostraron. Sin lugar a duda este es un gran logro en mi vida profesional y me siento honrado por haberlos tenido como dirigentes de este trabajo.

Al Dr. David Grantz y Hai-Bang Vu del Centro Agrícola de Kearney de la Universidad de California por sus atenciones y por haberme permitido formar parte de sus trabajos de investigación en estudios de contaminación atmosférica.

A mis sinodales M.C. Antonio Aranda Regalado y Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez por sus valiosas aportaciones al presente trabajo.

A todos y cada uno de los profesores de este Programa. Gracias por haber compartido sus experiencias y conocimientos.

A mis compañeros y amigos de la maestría por las gratas experiencias que compartimos.

A mis padres y hermanos que nunca me han dejado de apoyar.

A mi esposa Rosa María e hijas por el cariño que siempre me han brindado y por el tiempo que les he robado.

A la familia Vázquez Aguilar por estar siempre junto a mí.

Índice

RESUMEN.....	iii
SUMMARY	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA	3
3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	3
3.1. Contaminación atmosférica.....	3
3.2. Ozono troposférico.	6
3.2.1 Formación.....	6
3.2.2. Interacción con otros contaminantes.	7
3.2.3. Tendencias globales	8
3.3. Efectos en plantas	10
3.3.1. Efectos forestales	11
3.3.2. Efectos en plantas cultivadas	12
3.3.2.1. Efecto en algodón.	13
3.4. Efectos en Seres Humanos	15
3.5. Vigilancia de los niveles de ozono	17
3.5.1. Métodos de monitoreo	18
3.5.2. Biomonitoreo	19
3.6. Normatividad	19
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Interacción ozono - metil-jasmonato y sus efectos en parámetros fisiológicos de plantas de algodón Pima.....	22
6.1.1. Cultivo de plantas de algodón	22
6.1.2. Exposición de plantas a ozono - metil-jasmonato	23
6.1.3. Determinación de efectos fisiológicos.....	23
6.1.3.1. Fotosíntesis y conductividad estomatal.....	23

6.1.3.2. Respiración radicular	24
6.1.3.3. Área foliar y número de hojas	24
6.1.3.4. Biomasa foliar y radicular.....	25
6.1.3.5. Relación raíz/parte aérea.....	25
6.2. Efectos del ozono en la integridad nuclear de células radiculares de algodón Pima	25
6.2.1. Cultivo de plantas de algodón	25
6.2.2. Exposición de plantas a ozono.....	25
6.2.3. Procesamiento de plantas.....	26
6.2.4. Electroforesis unicelular alcalina.....	27
6.2.5. Observación microscópica y análisis de imágenes.	28
6.3. Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1. Interacción ozono - metil-jasmonato y sus efectos en parámetros fisiológicos de plantas de algodón Pima.....	30
7.2. Efecto del ozono en la integridad nuclear de células de algodón Pima.....	39
8. Conclusiones	52
9. REFERENCIAS	53
10. APÉNDICE.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Efecto del O ₃ e interacción O ₃ -Me-Ja en la fotosíntesis y conductividad estomatal de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.	32
2	Efecto del O ₃ e interacción O ₃ – Me-Ja en la respiración radicular de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.	33
3	Efecto del O ₃ e interacción O ₃ – Me-Ja en área foliar y número total de hojas en plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.	36
4	Efecto del O ₃ e interacción O ₃ – Me-Ja en la biomasa de hojas verdes y biomasa radicular de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.	37
5	Porcentaje de células en cinco rangos de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O ₃ en hojas de algodón Pima (Cuadro “A”, Gráfica “B”).	41
6	Porcentaje de células en cinco rangos de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O ₃ en raíces de algodón Pima (Cuadro “A”, Gráfica “B”).	44
7	Valores promedio de fragmentación nuclear en células de hojas de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O ₃ . A, longitud de cauda (μm); B, momento de cauda (adimensional).	47
8	Valores promedio de fragmentación nuclear en células de hojas de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O ₃ . Momento de cauda (adimensional).	48
9	Valores promedio de fragmentación nuclear en células de raíces de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O ₃ . A, longitud de cauda (μm); B, momento de cauda (adimensional).	50
10	Valores promedio de fragmentación nuclear en células de raíces de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O ₃ . Momento de cometa (adimensional).	51

1. INTRODUCCIÓN

A grandes alturas (estratosfera), el ozono funciona como un escudo protector contra los rayos ultravioleta emitidos por el sol, los cuales promueven cáncer de piel, cataratas, supresión inmunológica y otros problemas a la salud humana (EPA, 1999). A nivel de la troposfera, el ozono se considera como el contaminante secundario de mayor relevancia y es el principal componente del smog fotoquímico. Su formación ocurre cuando compuestos orgánicos volátiles (VOC's) reaccionan con óxidos de nitrógeno (NOx's) en presencia de luz solar. Esa reacción se da principalmente en lugares con alto tráfico vehicular y altas emisiones industriales. Sin embargo, debido a que los NOx's pueden ser transportados por el viento, cientos de kilómetros de su fuente de origen, el ozono también se puede formar en áreas rurales.

En organismos superiores, las propiedades toxicológicas del ozono se deben a su capacidad oxidativa, aunque quizá pudiera actuar a través de otros mecanismos. A concentraciones por arriba de 52 ppb durante 8hrs, el umbral de protección establecido por la EPA, causa daño en la mayoría de los seres vivos. En humanos, el ozono entra al organismo por las vías respiratorias causando principalmente irritación de las vías aéreas, disminución de la capacidad pulmonar, asma e incrementa la susceptibilidad a enfermedades respiratorias como neumonía y bronquitis (WHO, 2003; Mudway y Kelly, 2004). En plantas, la entrada de ozono ocurre por los estomas (pequeños poros localizados en la superficie de las hojas donde se realiza el intercambio de gases) y afecta la capacidad fotosintética y el transporte de carbono a los diferentes órganos (Grantz y Farrar, 1999), entre otros. Condiciones de estrés por agua incrementan la susceptibilidad a ozono (Shimizu y Feng 2007). Los efectos negativos resultan en una reducción de biomasa, lesiones necróticas, clorosis y disminución de la relación raíz-parte área (Grantz y Yang, 1996). Esos efectos se traducen principalmente en una disminución de rendimiento y subsecuentemente en pérdidas económicas. Entre los cultivos con mayor

susceptibilidad se encuentra el algodón. En el valle de San Joaquín, California, por ejemplo, se estiman pérdidas en el rendimiento de algodón de hasta un 23% (Olszyk y col., 1993). Además de los daños directos del ozono sobre la planta y debido a las diferentes capacidades de tolerancia entre especies, el cultivo de algodón también pierde habilidad de competencia con malezas (Grantz y Shrestha, 2006).

En la actualidad se han realizado diferentes estudios para determinar el efecto del ozono en plantas de algodón. Esos estudios han documentado afectación en las principales funciones fisiológicas de las plantas incluyendo disminución de fotosíntesis, daño a células mesofílicas, transporte de carbono, pérdida de biomasa, capacidad estomatal; así como daño en células foliares. Sin embargo son necesarios otros estudios que consideren factores que puedan modular el efecto del ozono en las plantas de algodón, además de investigaciones que vayan más allá de los estudios fisiológicos y que nos permitan tener una mejor perspectiva de cómo el ozono afecta las plantas de algodón. El presente estudio evalúa las respuestas fisiológicas de plantas de algodón resultantes de la interacción de una hormona vegetal inducida (metil-jasmonato) y el ozono. Lo anterior se considera debido a que otros autores reportan que la aplicación de metil-jasmonato modula los efectos del ozono en plantas de tabaco. Para tener una mejor perspectiva de cómo el ozono afecta las plantas de algodón, en la presente tesis, las plantas se exponen a tres diferentes concentraciones de ozono con la finalidad de determinar la integridad nuclear de células radiculares utilizando la técnica de electroforesis unicelular alcalina. Adicional al ensayo cometa, se evalúan los principales parámetros de crecimiento de la planta.

2. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA

La formación de ozono es producto de la reacción química de contaminantes atmosféricos con en presencia de la luz solar. Esta condición es muy común en ciudades industrializadas y altamente pobladas lo que hace inminente la formación de ozono cuando las condiciones son las propicias, afectando la calidad de vida de los seres humanos así como el desarrollo de los cultivos que están expuestos. A pesar de diversos estudios científicos realizados en plantas expuestas a ozono, poco se sabe sobre el mecanismo de afectación de ese contaminante en plantas de algodón; por consiguiente, hay desconocimiento sobre procesos o sustancias que pudieran mitigar los daños fisiológicos y celulares que ocasiona el ozono en este importante cultivo.

En este estudio se prueban diferentes dosis de metil jasmonato en plantas de algodón expuestas a ozono. Este compuesto orgánico volátil, que es generado por las mismas plantas en condición de estrés, activa mecanismos defensa que coadyuvan al desarrollo óptimo de las plantas, lo que sugiere que pueda mitigar el daño del ozono en plantas de algodón. Ampliar el conocimiento en este ámbito permitiría aportar nuevos elementos a la constante tarea de eficientar la producción en los cultivos mediante prácticas que respeten el entorno y los principios naturales de protección vegetal.

3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1. Contaminación atmosférica.

De acuerdo a la Agencia Norteamericana de Protección al Ambiente (EPA), contaminación es la presencia de una sustancia en el ambiente que debido a su composición química o cantidad altera el funcionamiento de procesos naturales y provoca efectos no deseables en el ambiente y a la salud. La contaminación

atmosférica ocurre tanto por procesos naturales como por actividades relacionadas con el hombre. La contaminación antropogénica ha existido desde que el hombre empezó a utilizar el fuego; a partir de entonces, los avances tecnológicos y las primeras actividades industriales como la minería y la fundición de metales contribuyeron a la contaminación de la troposfera. Efectivamente, estudios glaciológicos realizados en las capas de hielo de Groenlandia, correspondientes al periodo 3000 a 500 años antes de nuestra era, muestran ya un incremento en las concentraciones de plomo. De acuerdo con Hong y col. (1994) ese incremento se debió a las actividades industriales (como la fundición) que los griegos y los romanos desarrollaban. A partir de la invención de la máquina de vapor y la subsecuente revolución industrial las emisiones de plomo a la atmósfera se incrementaron 40-80 veces (Weiss y col., 1999). La contaminación es una característica inherente a los seres humanos y resulta de la necesidad que nosotros como individuos tenemos de bienes y servicios. Es decir, la comodidad y la calidad de vida de la que gozamos actualmente —proporcionadas en gran medida por los bienes y servicios a los que tenemos acceso— tienen un costo ambiental. En la actualidad, las diferentes actividades industriales y el transporte motorizado son las principales fuentes emisoras de contaminantes a la atmósfera.

La EPA y la Organización Mundial de la Salud, (WHO por sus siglas en inglés) consideran que los principales contaminantes dañinos para la salud pública y el medio ambiente son monóxido de carbono, plomo, dióxido de nitrógeno, materia particulada suspendida, ozono y óxidos de azufre. Esos compuestos químicos son considerados los contaminantes criterio para definir la calidad del aire. Los efectos a la salud son muy variados y van desde simples molestias respiratorias hasta la alteración de funciones pulmonares y afectación al sistema cardiovascular. Fusco y col. (2001) realizaron un estudio en hospitales de la Ciudad de Roma y encontraron una alta correlación entre ingresos por problemas respiratorios y los días con altos niveles de contaminación. De forma similar, un estudio epidemiológico en el estado de California correlacionó los ingresos hospitalarios con problemas

cardiovasculares con días con altas concentraciones de monóxido de carbono (Mann y col. 2002). Exposiciones crónicas a otros contaminantes como la materia particulada suspendida reducen la expectativa de vida por un año, o más (WHO, 2004). Otros autores han estimado un incremento de 0.5% en muertes por cada incremento de 10 mg/m³ en los niveles diarios de materia particulada en la atmósfera (Künzli y Tager, 2005).

Una de las formas de contaminación que causan mayor afectación al medio ambiente es la “precipitación ácida” derivada de las emisiones de dióxidos de azufre y óxidos de nitrógeno. Esa precipitación afecta principalmente bosques y lagos de Europa y Norte América (UNEP, 2002). En los bosques, el daño depende de la capacidad que tienen las hojas para absorber agua, por lo que varía ampliamente entre especies (Haines y col., 1985). Mientras mayor sea la capacidad de absorción, la planta es más susceptible. Bosques con grandes periodos de niebla y cercanos a fuentes emisoras son los más vulnerables debido al mayor contacto que tienen los contaminantes con la hoja. En los lagos, la afectación se da debido al cambio de pH y las especies más afectadas son las que no toleran pH's ácidos (<5.5). Adicionalmente al daño ambiental, también se registra daño a monumentos debido a reacción de los ácidos con materiales alcalinos.

Los efectos globales de la contaminación atmosférica contribuyen también al calentamiento global del planeta, derivado de la emisión de gases invernadero

Como consecuencia de los efectos adversos de los contaminantes, a partir de los años 70's la comunidad internacional empezó a desarrollar e implementar políticas para abatir la contaminación atmosférica, basándose principalmente en el mejoramiento de tecnología, en sanciones económicas para reducir las emisiones (UNEP, 2002), pero también en beneficios económicos como los bonos de carbono.

3.2. Ozono troposférico.

El ozono es un gas altamente reactivo compuesto por tres átomos de oxígeno. A diferencia del ozono estratosférico (Capa de ozono), la formación del ozono troposférico se deriva de actividades antropogénicas y tiene lugar de los 0 a los 17 km de altitud. El potencial oxidativo y los efectos adversos a la salud humana del ozono troposférico se reconocieron a partir de mediados del siglo diecinueve (Farell, 2005). En la actualidad es considerado como el contaminante atmosférico secundario que mayor daño causa al ser humano y al medio ambiente.

3.2.1 Formación.

En la tropósfera, el ozono se forma cuando óxidos de nitrógeno (NOx's) y compuestos orgánicos volátiles (VOC's), principalmente hidrocarburos, reaccionan con la luz solar. El NO₂ se disocia a NO en una reacción catalizada por luz ultravioleta del sol dando como resultado un átomo de oxígeno, el cual reacciona con oxígeno molecular formando O₃. Las principales fuentes emisoras de NO₂ y VOC's son los vehículos automotores y las actividades industriales. Por esa razón, el ozono se forma principalmente en las grandes ciudades. Sin embargo, debido a la movilidad de los NOx's también puede formarse en áreas rurales. La variación en las concentraciones de ozono en un punto geográfico específico depende de la cercanía de fuentes emisoras de contaminantes precursores, de la orografía del lugar y de factores meteorológicos, como radiación solar, velocidad del viento, temperatura, humedad relativa y recirculación de masas de aire, principalmente (Castell y col. 2007, Uwe e Ingeborg, 2001). Condiciones de alta radiación solar y bajas velocidades de vientos reducen la dispersión de contaminantes precursores, incrementando la probabilidad de reacción y formación de O₃ (Castell y col., 2007). Además de esos factores que favorecen la formación antropogénica del ozono, hay incremento de las concentraciones ambientales de ozono que se deriva del intercambio de O₃ entre estratosfera y tropósfera (Monks, 2000).

Una vez que se ha formado, el ozono puede transportarse e incrementar la concentración atmosférica en lugares ubicados a cientos de kilómetros de su área de origen. Un estudio realizado por Giovanelli y col. (1985) muestra que el ozono puede ser transportado por la brisa del mar desde una planta petroquímica localizada mar adentro hasta tierra firme; una distancia total de 5 km. Por su parte, Creilson y col. (2003) concluyeron que con condiciones meteorológicas favorables el ozono troposférico formado en el Este de Norteamérica puede transportarse a través del Océano Atlántico e incrementar la concentraciones de ozono en el Continente Europeo.

3.2.2. Interacción con otros contaminantes.

Por si solo, el ozono tiene efectos negativos en el medio ambiente y en la salud humana. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, el ozono interactúa con otros contaminantes y los efectos negativos combinados pueden incrementarse o potenciarse. Una de las formas en las que el ozono se presenta en la atmósfera es como smog fotoquímico, una mezcla de cientos de compuestos químicos entre los que figuran como los más importantes nitratos de peroxiacetilo (PAN), óxidos de nitrógeno y ozono. La formación de esos contaminantes es común en ciudades que están rodeadas de montañas y donde además existen inversiones térmicas (Kumar y Mohan 2002). Entre las ciudades más afectadas con smog fotoquímico se encuentran las ciudades de Los Ángeles (Estados Unidos), Tokio (Japón), Cd. México y Johannesburgo (Sudáfrica). Cada uno de esos países, y otros, han implementado programas para disminuir la formación de smog fotoquímico incluyendo, disminución forzada del tráfico vehicular, entre otros programas como la verificación vehicular en la Ciudad de México. Esos programas se basan principalmente en disminuir las emisiones a la atmósfera de los contaminantes precursores como óxidos nítricos, VOC's e hidrocarburos. Las lluvias, por su parte, limpian el aire mediante la precipitación de los contaminantes atmosféricos. Un

estudio realizado en plantas de frijol por Nouchi y Toyama (1988) comparó los efectos del O₃ y PAN por separado. Los autores observaron que los mecanismos de acción del ozono en dichas plantas son diferentes, lo que sugiere que estando los contaminantes combinados, las plantas serían afectadas de diferentes maneras lo que aumenta las posibilidades de deterioro en las mismas.

Además de los efectos aditivos del PAN y O₃, entre ambos contaminantes existe otro tipo de relación. De acuerdo con Beine y col. (1997) y con Carter y col. (1981), la descomposición térmica del PAN produce NO_x lo que da como resultado un incremento en las concentraciones atmosféricas de ese compuesto, lo que a su vez contribuye a la formación de ozono.

Lewis y col. (2000) evaluaron el efecto combinado del ozono y otros contaminantes aerobiológicos (alérgenos) en el número de admisiones hospitalarias por asma. Sus resultados no mostraron una asociación.

3.2.3. Tendencias globales

En los Estados Unidos se han implementado más de una docena de programas con el objetivo de reducir la emisión de contaminantes precursores de ozono. En 1990, el Acta de Aire Limpio se modificó con la finalidad de proponer niveles máximos de emisiones atmosféricas y un sistema de beneficios económicos a quién contamina menos. Ese mecanismo funciona a partir del canje de contaminantes atmosféricos emitidos por fuentes estacionarias y móviles. De acuerdo con la EPA (2007), a partir de 1997 y hasta 2006, este y otros programas han reducido las emisiones de NO_x's en el Este de E.U. en un 30%. De la misma manera, las emisiones de VOC's se redujeron un 20% en el mismo periodo. En lo que respecta a la Unión Europea, a partir de 1988, se han implementado programas para disminuir la emisión de contaminantes precursores de ozono. Efectivamente, de 1990 a 2004, la Agencia Ambiental Europea (EEA, 2007) reportó una disminución

del 36% en la emisión de dichos contaminantes. Entre los países con mayor reducción de NOx se encuentran: Alemania (55%), el Reino Unido (50%) y Holanda (44%). Por su parte España (13%), Grecia (11%) y Portugal (8%) son los países que menores resultados han obtenido. Sin embargo, a pesar de la eficacia de los programas para la reducción de las emisiones de NOx's obtenida por 32 países de la Unión Europea, no se observa una disminución proporcional en los niveles de ozono. La EEA atribuye ese fenómeno a la variabilidad meteorológica y al transporte transfronterizo de ozono.

En países en vías de desarrollo se empiezan a implementar programas para reducir las emisiones de contaminantes atmosféricos. En Brasil (1986) se creó el Programa Nacional para el Control de la Contaminación por Vehículos Automotores (PROCONVE). Un análisis de los resultados de ese programa, realizado con herramientas de modelación por Sánchez y col. (2007), sugiere que el programa no solo da resultados positivos en la reducción de contaminantes primarios, sino también en los niveles de ozono de la Ciudad de Sao Paulo.

Por otra parte, un análisis del programa "Hoy no circula" de la Ciudad de México realizado por Davis (2006) sugiere que no hay evidencia de que el programa tiene un impacto favorable en la calidad del aire de la Ciudad de México. El autor atribuye esos resultados a que la población no utiliza el metro ni los autobuses públicos como alternativa de transporte y ha substituido el uso de sus vehículos por taxis. Ese programa ha funcionado por 17 años desde 1990.

En el continente Asiático los países con mayores emisiones de NOx son China (43%), la India (18%) y Japón (13%). Un estudio realizado por Aardenne y col. (1999) estima que de no tomarse las medidas necesarias, en el continente asiático las emisiones de NOx para el año 2020 podrían incrementarse hasta un 350%, con referencia a las emisiones de 1990.

3.3. Efectos en plantas

Los efectos adversos del smog en plantas se percibieron a partir de los años 40's. Sin embargo, sólo hasta mediados de los años 60's se dedujo que el ozono, el principal componente del smog, era el responsable de la mayoría del daño del smog en plantas. En ese tiempo también se desconocía el mecanismo de entrada del ozono a la planta. Los primeros daños que se observaron fueron foliares, pérdida de biomasa, reducción de rendimientos e incremento en la susceptibilidad a estrés ambiental, plagas y enfermedades. En la actualidad se han realizado estudios en una gran variedad de plantas y coinciden en que el ozono entra a la planta vía estomas durante el intercambio de gases que la planta realiza. Debido a que la entrada de ozono depende de la apertura de los estomas, factores meteorológicos como temperatura ambiental, diferencia de presión de agua entre la hoja, el aire circundante y la concentración de CO₂ atmosférico determinan los efectos del ozono (Fiscus y col. 2005). Otro factor determinante en los efectos del ozono es la humedad del suelo. En algunas especies, una humedad en el suelo baja promueve el cierre de estomas, un mecanismo fisiológico de la planta para evitar pérdida de agua. Esa disminución en el intercambio de gases disminuye la entrada de ozono y el daño foliar. Sin embargo, en otras especies el efecto es opuesto, posiblemente debido a que la condición de estrés por agua disminuye la tolerancia de la planta al ozono (Bungener y col. 1999).

No obstante, el mecanismo de entrada de ozono es el mismo para todas las plantas, es claro que en cada especie puede haber diferentes mecanismos de acción. Se sabe que el ozono afecta el proceso fotosintético en plantas, sin embargo es incierto si ese es un efecto directo o bien es un efecto secundario producto de la modificación en el transporte de carbono a los diferentes órganos de la planta. Algunos autores (Baier y col., 2005) reportan hasta siete posibles mecanismos mediante los cuales el O₃ actúa a nivel celular.

La susceptibilidad al ozono entre especies es muy variada. En años recientes se han identificado plantas susceptibles que abarcan una gran variedad de especies forestales, de uso alimenticio, de uso ornamental y otras.

3.3.1. Efectos forestales

Los bosques están compuestos por una gran variedad especies que conforman los diferentes estratos. Dichas especies van desde pastos, herbáceas, arbustivas y arbóreas de diferentes tamaños. Toda esa variedad de especies mantiene a los bosques en equilibrio, por lo que la alteración de una especie puede tener efectos secundarios en otras, o incluso en ecosistemas completos.

Barbo y col. (1997) realizaron un estudio de “desarrollo sucesivo” de plantas en el que observaron que comunidades de plantas expuestas a concentraciones altas y constantes de ozono tienen una estructura menos diversa que las comunidades expuestas a concentraciones bajas. Esa propiedad del ozono de simplificar la estructura de las comunidades de plantas también tiene consecuencias secundarias: alteración de poblaciones de insectos, disminución en la disponibilidad de nutrientes y disminución en las poblaciones de microorganismos en el suelo (Karnosky y col. 2005). Todas esas respuestas son de gran relevancia en la salud de ecosistemas y permiten predecir cambios en la funcionalidad del entorno ambiental.

El efecto del ozono en los bosques no solo es directo sino que también hace a las plantas más susceptibles a estrés ambiental. Brown y col. (1987) realizaron un estudio en pináceas (*Picea abies*) en el que observaron un incremento a la susceptibilidad a heladas los árboles expuestos a concentraciones de ozono por arriba de 95 ppb. Esos autores especulan que la sensibilidad a heladas pudo haber influido en la decadencia de bosques de Europa Central que estuvieron expuestos a ozono troposférico a principios de los años 70's.

3.3.2. Efectos en plantas cultivadas

El ozono es el contaminante atmosférico que mayores efectos tiene sobre los cultivos. Los efectos y las pérdidas económicas resultantes de exposición a ozono dependen de la concentración de ozono y de la susceptibilidad de la planta. En plantas como las hortalizas, en las que su valor en el mercado depende de la apariencia, pequeñas manchas foliares (daño necrótico) tienen grandes impactos económicos. En otros cultivos la afectación en el proceso de fotosíntesis tiene como consecuencia una reducción en la tasa de crecimiento que implica pérdida de biomasa y disminución en el rendimiento. En Estados Unidos se estiman pérdidas anuales en cultivos de 3 a 6 billones de dólares, solamente por ozono generado a partir de emisiones de vehículos automotores (Murphy y col. 1999).

Para minimizar las pérdidas por ozono en cultivos es necesario conocer la susceptibilidad de las plantas, incluso plantas de la misma especie pueden tener susceptibilidades diferentes. De esa forma, las plantas más tolerantes pueden cultivarse en lugares con altas concentraciones ambientales de ozono. Con este objetivo Saitanis y Karandinos (2002) evaluaron el efecto del ozono en siete variedades de tabaco. Los autores observaron grandes diferencias de susceptibilidad a ozono entre las diferentes variedades y que la variedad Bel-W3, empleada como bioindicador de ozono, es la más susceptible. Estos autores identificaron también que la variedad K63 es la más tolerante. De la misma manera, Guzy y Heath (1993) evaluaron doce variedades de frijol y especulan que la susceptibilidad de las plantas se debe a las diferencias de conductividad estomatal entre las variedades. De las doce variedades evaluadas, solo una presentó altos niveles de actividad fotosintética, lo que los autores atribuyeron a la capacidad de reparación de daño de la planta.

Además de la susceptibilidad inter-especie, la edad de las plantas también es un factor que determina la susceptibilidad de los cultivos. En un estudio realizado por Lyons y Barnes (1998) en plantas medicinales (*Plantago major*) para evaluar el

efecto del ozono en etapas progresivas del desarrollo de las plantas, observaron que el impacto del ozono disminuye a medida que la planta se desarrolla. Los autores atribuyeron esa resistencia a cambios ontogénicos y a la aclimatación de las plantas que les permite tener un crecimiento compensatorio como respuesta.

Con la finalidad de mitigar el daño en los cultivos, se ha evaluado la relación entre el efecto del ozono y la disponibilidad de nutrientes básicos. Bielenberg y col. (2001) observaron que una disminución en la disponibilidad de nitrógeno en el suelo afecta la capacidad de respuesta de la planta al ozono. Según los autores, esa disminución está directamente asociada con el tamaño de la planta. De la misma manera, Mckee y Long (2001) observaron que la aplicación de “Ethephon”, un regulador de crecimiento, proporciona protección a plantas de trigo expuestas a ozono.

Las plantas por su parte, como respuesta a situaciones de estrés, producen compuestos que mitigan daños fisiológicos y celulares. Entre estos compuestos se encuentra la hormona metil-jasmonato que activa el sistema defensivo de la planta al inducir la expresión de genes defensivos. De acuerdo con Farmer y Ryan (1990), esta hormona es capaz de transmitirse por el medio ambiente y es capaz de alertar y preparar a la planta ante posibles eventos adversos. Lárus y col. (1997) aplicaron jasmonatos a plantas de tabaco y las expusieron a altas concentraciones de O₃ (250 a 500 ppb) encontrando que las plantas tratadas tuvieron una mayor resistencia al O₃. Siguiendo el mismo principio indujeron la producción de jasmonatos mediante pequeños cortes en la hojas y encontraron que estas plantas tuvieron mayor resistencia al O₃.

3.3.2.1. Efecto en algodón.

Debido a su gran importancia textil, el cultivo del algodón es considerado como un producto agrícola básico. Los principales productores de algodón a nivel mundial

son China, Estados Unidos, India y Pakistán. En el estado de California, el cultivo del algodón, ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada con alrededor de 250,000 hectáreas anualmente. El algodón es una planta con altos requerimientos de agua, por lo que solamente puede cultivarse bajo condiciones de riego. Esas condiciones de humedad y la susceptibilidad de la especie hacen del algodón un cultivo sensible al ozono. En el valle de San Joaquín, California, se estiman pérdidas de hasta un 23% en el rendimiento (Grantz y Shrestha, 2006) del algodón por exposición a ozono. En la actualidad, se investigan los mecanismos de acción del ozono en el algodón con la finalidad de proponer alternativas de manejo que permitan mantener una producción rentable incluso en regiones con problemas de ozono. Grantz y Yang (1996) realizaron un estudio para evaluar el efecto del ozono en la arquitectura hidráulica de la planta de algodón y observaron que el ozono inhibe el transporte de carbono al sistema radicular afectando la conductividad hidráulica de las raíces (capacidad para mover agua hacia órganos superiores). Estos autores también observaron como mecanismo de defensa al ozono que la planta cierra los estomas para evitar la pérdida de agua. Esos fenómenos fisiológicos, sin embargo, tienen como consecuencias secundarias una afectación en la conductividad estomatal. Efectivamente, Grantz y Farrar (1999) observaron que concentraciones altas de ozono por periodos cortos dañan las células mesofílicas de las hojas. A partir de esos hallazgos, los autores asumen que el ozono afecta directamente la capacidad fotosintética de las plantas. Para comprobar esa hipótesis Grantz y Yang (2000) realizaron un estudio para evaluar si la disminución en la tasa fotosintética afecta el transporte de carbono y la conductividad hidráulica a otros órganos, sin embargo no encontraron relación alguna y descartaron la afectación a la fotosíntesis como efecto primario del ozono. Posteriormente, Grantz y Col (2003) observaron un incremento en la tasa de respiración de raíces de algodón expuestas a ozono. Esos autores especulan que el incremento se debe, posiblemente, a la demanda de nutrientes en el área foliar o al movimiento de material fitotóxico del área foliar hacia las raíces, lo que promueve un efecto de reparación mediante el incremento en la respiración.

También se ha evaluado la competencia entre el algodón y algunas malezas como el coquillo amarillo (*Cyperus esculentus*). Esos estudios han confirmado la alta susceptibilidad de las plantas de algodón en comparación con otras especies, lo que pone a las plantas y a los cultivos de algodón todavía en una situación más desfavorable (Grantz y Shrestha 2006).

3.4. Efectos en Seres Humanos

El ozono es considerado el contaminante secundario que mayores efectos negativos tiene en el ser humano. El ozono entra al organismo principalmente por inhalación, ya sea por la boca o por las vías nasales. El rango de absorción en los pulmones varía entre individuos y depende directamente del volumen de aire que entra al organismo. Debido a esto, las personas que realizan actividad física intensa en lugares con altas concentraciones de ozono son más susceptibles. La afectación a los pulmones se debe a una inhibición de la actividad macrófaga y al daño que el ozono causa a los linfocitos circulantes. Sin embargo, la susceptibilidad individual depende de factores genéticos, edad y la pre-existencia de enfermedades pulmonares. Con la finalidad de hacer recomendaciones a los grupos susceptibles, se han retomado resultado de estudios de poblaciones expuestas. Esos estudios han permitido tener una visión más clara de los efectos adversos del ozono en el organismo humano. Chen y col. (1999) evaluaron los efectos del ozono en las funciones pulmonares de niños en la Ciudad de Taiwán mediante el uso de espirómetros y observaron que hay un decremento en las funciones pulmonares a concentraciones de 80 ppb. Esa observación muestra como concentraciones aún por debajo de los estándares para la calidad del aire (120 ppb para la Cd. de Taiwán) tienen efectos adversos en la salud de los infantes. De forma similar, en un estudio realizado por Medina-Ramón y Col. (2006) se evaluó el efecto del ozono y PM10 (materia particulada mayor a 10 micras) en las admisiones hospitalarias (1986 a 1999) por problemas respiratorios en 36 ciudades de Estados Unidos. Los autores

observaron que un incremento de 5 ppb (acumulado en dos días en la estación de verano) en las concentraciones ambientales de ozono contribuyó con un 0.27% en el incremento en las admisiones por enfermedades crónicas de obstrucción pulmonar y con un 0.41% en las admisiones por pulmonías. En una población de 1 millón esos incrementos significan la aparición de 2,700 y 4,100 casos de obstrucción pulmonar y pulmonías, respectivamente. Sin embargo, los autores también observaron que ese fenómeno difiere entre las ciudades estudiadas y depende principalmente de la variabilidad meteorológica.

En lo referente a estudios de efectos cardiovasculares, Gong y col. (1998) evaluaron el efecto del ozono en la hemodinámica cardiovascular de personas hipertensas y sanas. Sus resultados sugieren que exposiciones a ozono pueden incrementar la labor miocárdica y afectar a personas con historial de problemas cardiovasculares.

Otros estudios sugieren una relación entre el ozono y la incidencia de asma. Clifford y col. (1995) realizaron un estudio en la Cd. de Nueva Jersey, Estados Unidos, en los veranos de 1986-1990. Los autores observaron que la frecuencia de visitas al departamento de emergencias por asma incrementó en 28% cuando los niveles de ozono rebasaron 0.06 ppm. En otro estudio similar realizado en la Ciudad de Saint John, Canadá, de 1984 a 1992 por Stieb y col. (1996) se observó un incremento de 33% en las visitas al departamento de emergencias por asma cuando las concentraciones ambientales rebasaron los 75 ppb. Estos resultados indican que existe una gran similitud de los efectos adversos del ozono entre una ciudad y otra.

El ozono no solo afecta las funciones fisiológicas de los organismos, sino que también es un factor que influye en la mortalidad de poblaciones expuestas. La incidencia máxima de muertes por exposición a ozono se observa principalmente en los meses de verano, y las personas mayores de 65 años son las más susceptibles (Goldberg y col., 2001). En un estudio realizado en 23 ciudades

europeas por Gryparis y col. (2004) se observó que si la concentración límite para una hora de exposición de ozono se incrementa en 5 ppb, las muertes por problemas cardiovasculares y las asociadas a problemas respiratorios incrementan 0.45 y 1.13%, respectivamente. Los autores sólo observaron esa relación en los meses más calientes.

Para modular el daño del ozono en poblaciones expuestas, entre otras prácticas, se ha estudiado la relación entre el consumo de antioxidantes y el efecto del ozono en la salud humana. Samet y col. (2001) evaluaron el efecto que tiene el consumo de una mezcla de ácido ascórbico, α -tocoferol y carotenoides en las funciones pulmonares de personas sanas expuestas a ozono. Los autores observaron que la suplementación ejerce un efecto protector en el sistema respiratorio. Un estudio similar realizado en la Ciudad de México con trabajadores expuestos a altas concentraciones de ozono y suplementados mediante un complejo de vitamina E, C y β -caroteno, sugiere que a concentraciones atmosféricas de 70 ppb de ozono, el complejo vitamínico atenúa el detrimento de las funciones pulmonares entre un 3 y 6% (Romieu y col., 1998).

3.5. Vigilancia de los niveles de ozono

Actualmente, existen diferentes métodos para vigilar las concentraciones atmosféricas de ozono. Los hay para determinar concentraciones globales, así como flujos de ozono intercontinentales. Esos métodos se basan principalmente en instrumentos satelitales. También hay estaciones de monitoreo y equipos portátiles que se utilizan para determinar concentraciones en sitios más localizados. Además de los equipos de monitoreo, también se han identificado especies de plantas sensibles a ozono que, sobre todo en áreas rurales, se usan como biomonitores para determinar la presencia de ozono.

3.5.1. Métodos de monitoreo

El ozono troposférico tiene movimiento y distribución intercontinental. Debido a esto, surge la necesidad de determinar concentraciones globales y tendencias en el movimiento del ozono que permitan una apreciación global de la distribución y comportamiento del ozono troposférico, así como evaluar los resultados de los programas internacionales para la disminución de contaminantes precursores de ozono. Con tales fines, en 2004, la NASA puso en órbita el satélite Aura (aire en latín) que, además de medir ozono, mide la radiación infrarroja emitida por vapor de agua, compuestos fluorocarbonados y compuestos de nitrógeno. El satélite tiene también un espectrómetro de emisiones troposféricas (TES) que permite medir monóxido de carbono, metano y óxidos de nitrógeno, compuestos que juegan un rol importante en el calentamiento global de la tierra. Además, cuenta el Instrumento de Monitoreo de Ozono (OMI) que genera diariamente mapas de alta resolución de las concentraciones globales de ozono (NASA, 2006). Además de ese satélite existen otros que se enfocan en dar seguimiento a los niveles de ozono estratosférico (capa de ozono).

Para medir concentraciones de forma directa, el método más común es el de luminiscencia química con etileno. Ese método es específico para ozono y fue adoptado por la EPA en 1985 como el método de referencia para determinar concentraciones ambientales de ozono. Para la determinación, el aire y el etileno se conducen simultáneamente a la cámara de mezclado del analizador, donde el ozono en el aire reacciona con el etileno emitiendo una luz que se detecta a través de un tubo fotomultiplicador. La intensidad de la luz emitida es proporcional a la concentración de ozono. La calibración de esos analizadores de ozono, se realiza por fotometría ultravioleta, que se basa en la generación de concentraciones de ozono en un sistema de diluciones.

3.5.2. Biomonitorio

El biomonitorio es usado como una estrategia alternativa al monitorio convencional. Se basa en la utilización de especies biológicas sensibles para determinar la presencia e intensidad de un contaminante. En el caso del ozono, se utilizan especies vegetales que reúnen las siguientes características: alta sensibilidad a ozono, estabilidad genética y una respuesta de la planta distintiva y verificable con los efectos de estrés ambiental, plagas y enfermedades. La planta de tabaco y en específico la variedad Bel-W3 es categorizada como hipersensible y es utilizada en diferentes regiones para el monitorio de ozono. Diversos estudios coinciden en que la variedad Bel-W3 puede utilizarse como un indicador de calidad del aire y no para determinar concentraciones ambientales de ozono. En las áreas agrícolas, otro de los cultivos utilizados como biomonitorio de ozono es el frijol ejotero (Burkey y col. 2005). Para biomonitorio los niveles de ozono en algunas zonas desérticas se puede considerar al líquen *Romalina maciformis*, ya que según un estudio realizado por Garty y col. (2001) es una planta desértica sensible a ozono.

3.6. Normatividad

A nivel internacional, el ozono es regulado de forma independiente entre las diferentes organizaciones, sin embargo, existe una gran similitud en los valores de exposición recomendados. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y las guías para la calidad del aire de Europa establecen como nivel guía 57 ppb para una exposición promedio de 8 horas. Por su parte la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) establece como nivel guía 76 ppb para una exposición promedio de 8 horas. Diversas organizaciones médicas, basadas en estudios clínicos y epidemiológicos, sugieren que el valor de 76 ppb recomendado por la EPA puede tener efectos adversos en poblaciones expuestas, sobre todo en aquellas personas con previos problemas respiratorios.

En el caso de México, la Norma Oficial Mexicana 020-SSA1-1999, establece que la concentración de ozono promedio para ocho horas de exposición debe ser menor o igual a 76 ppb, y al igual que la EPA, como método de referencia, utiliza luminiscencia química, método establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-036-ECOL-1993.

4. HIPÓTESIS

La exposición a concentraciones ambientales de O₃ afecta la integridad nuclear de células foliares, radicales y fisiología, en plantas de algodón Pima. Este daño fisiológico puede ser modulado por Metil-Jasmonato.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la integridad nuclear de células foliares y radicales; así como la fisiología y modulación por metil-jasmonato en plantas de algodón Pima (*Gossypium barbadense*) expuestas a concentraciones ambientales de ozono.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Exponer, mediante el uso de cámaras cerradas, plantas de algodón Pima (*Gossypium barbadense*) a concentraciones de ozono de 4, 59 y 114 ppb.
2. Determinar el efecto de la interacción de metil jasmonato y ozono en el crecimiento de plantas de algodón Pima (*Gossypium barbadense*).
3. Determinar el efecto del ozono en la integridad nuclear de células foliares y radicales en plantas de algodón Pima (*Gossypium barbadense*) empleando el método de electroforesis unicelular alcalina.

6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en colaboración con el Centro Agrícola de Kearney de la Universidad de California, en cuyos invernaderos y laboratorios se realizaron los dos experimentos que en esta tesis se presentan. El primer experimento consistió en exponer plantas de algodón Pima a concentraciones ambientales de ozono y metil-jasmonato en cámaras cerradas. Este experimento tuvo como propósito evaluar si el metil-jasmonato modula los efectos de concentraciones ambientales de ozono sobre plantas de algodón Pima, para lo cual se evaluaron parámetros meramente fisiológicos. En el segundo experimento se expusieron plantas de algodón Pima a concentraciones ambientales de ozono con la finalidad de determinar si este contaminante ejerce efectos en la integridad nuclear de las células foliares y radicales. En este segundo experimento también se evaluaron parámetros fisiológicos. La determinación de los parámetros de integridad nuclear se realizó en las instalaciones del Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental, CEACA, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

6.1. Interacción ozono - metil-jasmonato y sus efectos en parámetros fisiológicos de plantas de algodón Pima

6.1.1. Cultivo de plantas de algodón

Previo a la exposición de ozono y metil-jasmonato se cultivaron, bajo condiciones de invernadero (27°C, fotoperiodo 12 h, humedad relativa 30%), plantas de algodón Pima (*Gossypium barbadense*) empleando como sustrato una arcilla (Quick-Sorb, all purpose absorbent) y macetas cónicas de 30 cm de profundidad por 5 cm de diámetro. Durante esta etapa de crecimiento, las plantas se regaron diariamente mediante un sistema automatizado que también se utilizó para aplicar fertilizante (Miracle-Grow) a razón de 1.3 gL⁻¹. Durante el cultivo de las plantas no se aplicó ningún tipo de plaguicida. Para los tratamientos con ozono y metil-

jasmonato se emplearon grupos de plantas con crecimiento uniforme que habían desarrollado la primera hoja verdadera (aproximadamente 3 semanas de cultivo).

6.1.2. Exposición de plantas a ozono - metil-jasmonato

Diez y ocho plantas se colocaron en 9 cámaras de exposición cerradas (dos plantas por cámara) donde se expusieron a concentraciones medias diarias de ozono de 4, 59 y 114 ppb. La concentración de 59 ppb representa el valor típico medio de un día contaminado por ozono. Las concentraciones de 4 y 114 ppb representaron el control negativo y positivo respectivamente. El ozono fue alimentado a las cámaras mediante un generador de ozono (G22, Pacific Ozone Technology) producido a partir de oxígeno (AS-12, AirSep). La concentración de ozono dentro de la cámara de exposición se monitoreó y reguló por medio de un monitor de ozono (49C Termo Environmental Instruments) localizado en cada cámara. A una semana de exposición a ozono se realizó la primera aplicación de metil-jasmonato (95%) a razón de 160 μl /planta. Las aplicaciones se repitieron semanalmente por seis ocasiones más. La aplicación se realizó directamente en las hojas de mayor tamaño (totalmente expandidas) con una pipeta.

6.1.3. Determinación de efectos fisiológicos

Los efectos de la interacción ozono – metil-jasmonato en la fisiología de las plantas de algodón Pima se determinaron a las 6 semanas de exposición.

6.1.3.1. Fotosíntesis y conductividad estomatal

La fotosíntesis (A_n) y la conductividad estomatal (g_s) fueron los primeros parámetros que se evaluaron debido a que no involucró el sacrificio de las plantas. Estos parámetros fueron determinados entre las 11:00 y 15:00 hrs en el invernadero

mediante un sistema portátil para la medición de intercambio de gases (LI-6400 LICOR Inc Lincoln NE). Para estas mediciones se tomó en cuenta la hoja más joven que estuviera completamente desarrollada. Una vez colectados los datos, éstos se vaciaron a un equipo de cómputo para su análisis.

6.1.3.2. Respiración radicular

Para hacer esta determinación, el área radicular de la planta (incluyendo maceta) se sumergió en agua con la finalidad de separar la arcilla de la raíz. Una vez separada todo el sustrato de la raíz, se cortaron 3 cm de raíz por planta, tomándose en cuenta solamente raíces finas y tiernas en buen estado. Las muestras de raíces se colocaron en respirómetros (Oxigraph Oxigen Electrode System PP Systems Haverhill MA) conectados en paralelo con una computadora para la adquisición de datos. Terminada la determinación, las raíces se extrajeron de los respirómetros y se registraron sus pesos frescos. Posteriormente las muestras se colocaron en un horno de secado a una temperatura de 60 °C por 7 días para posteriormente registrar su peso seco. Los datos finales se expresaron en $\mu\text{mol O}_2/\text{gr}/\text{min}$.

6.1.3.3. Área foliar y número de hojas

Para determinar este parámetro, a cada planta se le cortaron las hojas y cotiledones. Dichos órganos se colocaron en un medidor de área foliar (Li-3000 LICOR Inc. Lincoln NE) el cual, mediante la refracción de luz, determinó los cm^2 de follaje por planta. Terminada esta medición, las hojas, cotiledones y tallos de cada planta se colocaron en bolsas de papel y se situaron en un horno de secado a una temperatura de 60 °C por 7 días para posteriormente registrar su peso seco.

6.1.3.4. Biomasa foliar y radicular

La determinación de la biomasa se llevó a cabo mediante una balanza analítica considerando los valores de los pesos secos, tanto del área foliar como radicular.

6.1.3.5. Relación raíz/parte aérea

La relación raíz/parte aérea se obtuvo dividiendo el peso seco de la raíz entre el peso seco de la parte aérea para cada planta.

6.2. Efectos del ozono en la integridad nuclear de células radiculares de algodón Pima

6.2.1. Cultivo de plantas de algodón

El cultivo de plantas de algodón previo a la exposición de ozono se realizó de la misma manera que el experimento de metil-jasmonato. Debido a que en este experimento se evaluó la integridad nuclear de células de raíces finas y tiernas, en las macetas, se utilizó como sustrato una mezcla especial para plantas que no dañara el ápice de las raíces.

6.2.2. Exposición de plantas a ozono

Diez y ocho plantas se colocaron en 9 cámaras de exposición cerradas (dos plantas por cámara) donde se expusieron a concentraciones medias diarias de ozono de 4, 59 y 114 ppb. La concentración de 59 ppb representó el valor típico medio de un día contaminado por ozono. Las concentraciones de 4 y 114 ppb representaron el control negativo y positivo, respectivamente. El ozono fue alimentado a las cámaras mediante un generador de ozono (G22, Pacific Ozone Technology) producido a partir de oxígeno (AS-12, AirSep). La concentración de

ozono dentro de la cámara se monitoreó y reguló por medio de un monitor de ozono (49C Termo Environmental Instruments) localizado en cada cámara de exposición.

6.2.3. Procesamiento de plantas

Esta etapa consistió en toma de muestras, tanto de hojas como de raíces. Primeramente se procesaron las hojas, para lo cual se escogió la más joven que estuviera completamente desarrollada. La hoja se colocó sobre una superficie de corcho y mediante un perforador se extrajeron dos pequeñas circunferencias de 0.7 cm diámetro cada una. Estas muestras se obtuvieron sin tocar la vena central de las hojas y se colocaron en una caja Petri con 300 μ L de Buffer Tris 0.4 M. Se seccionaron mediante una navaja afilada hasta que se obtuvo una suspensión verdosa. 90 μ l de esta suspensión se colocaron en tubos Eppendorf y se mezclaron con 90 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) previamente temperada a 37°C. Las muestras se mantuvieron a 37° hasta la preparación de las laminillas.

Para procesar las raíces, el área radicular de cada planta, junto con la maceta, se sumergieron en un recipiente con agua con la finalidad de separar el sustrato de la raíz. Una vez limpia, la raíz se separó de la parte aérea y se situó en una bandeja con agua y hielo. Las células radiculares se aislaron bajo condiciones de luz tenue mediante disección, una por una, de las raíces secundarias de cada planta. Para este estudio solamente se utilizaron raíces finas y tiernas completas. La disección se realizó utilizando una navaja de rasurar afilada, pinzas sujetadoras y una caja Petri con 300 μ L de Buffer Tris 0.4 M. Cada raíz se colocó dentro de la solución buffer para cortar y eliminar la parte oscura del ápice (~1 mm). Una vez eliminada la parte apical, se hicieron cortes finos y continuos en los siguientes 2 milímetros de raíz con la finalidad de liberar las células en la solución. La parte restante de la raíz se desechó. Una vez agotadas todas las raíces finas y tiernas, la suspensión de células (90 μ l) se colocó en tubos Eppendorf y se mezcló con 90 μ l de agarosa de

bajo punto de fusión (LMP) previamente temperada a 37°C. Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 37°C, hasta la preparación de laminillas.

6.2.4. Electroforesis unicelular alcalina

Los efectos del ozono en la integridad nuclear de células foliares y radicales se determinaron empleando la técnica de electroforesis unicelular alcalina de acuerdo al método de Singh y col. (1988)

Preparación de laminillas. Las laminillas, se marcaron y prepararon un día antes de la extracción de muestras. Para esto, en cada laminilla, se colocó una capa delgada y homogénea de 110 µl de agarosa de punto de fusión normal (NMP).

Colocación de las muestras en las laminillas. Se depositaron 90 µl de suspensión por laminilla (dos laminillas por muestra). Después de solidificar, se colocó una tercera capa de 110 µl de agarosa de bajo punto de fusión.

Electroforesis. Para la realización de esta etapa las laminillas, sin cubreobjetos, se colocaron en cajas Coplin forradas de papel aluminio con 50 ml de solución de lisis fría ((NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Tris 10mM; 1 % Triton X-100 y 10% DMSO, pH 10, 4°C). Posteriormente se situaron en el refrigerador por un día. Después de transcurrido ese periodo, las laminillas se sacaron de la caja Coplin y se colocaron en una cámara de electroforesis. Posteriormente, se adicionó cuidadosamente buffer de electroforesis (NaOH, 300 mM, EDTA 1 mM) hasta que el nivel del líquido rebasó ~2 mm de las laminillas. Después de 20 minutos de reposo (~4 °C), las laminillas se sometieron a electroforesis (25 voltios, 300 mA) por 20 minutos. Terminada la electroforesis, las laminillas se neutralizaron (3x, 5 min) con una solución buffer (Trizma 0.4 M, pH 7.5), se fijaron con metanol y se dejaron secar por 12 horas bajo condiciones de obscuridad a temperatura ambiente.

6.2.5. Observación microscópica y análisis de imágenes.

Para la observación microscópica, las laminillas se teñieron con 70 μL de bromuro de etidio (0.02 mg/l), se cubrieron con un cubreobjetos y se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Instrumentos). La adquisición de imágenes se realizó empleando una cámara AxioVision (Zeiss Instruments), considerando solamente 50 células por laminilla. Para cada imagen se determinó la longitud de cauda, momento de cauda y momento de cometa empleando el software Comet (Delta Sistemi, 7.0).

6.3. Análisis estadístico

Los datos de los efectos fisiológicos y su modulación por metil-jasmonato fueron evaluados mediante la prueba de X^2 con un nivel de confianza del 95%.

Los valores promedio obtenidos de los parámetros empleados para evaluar el daño en la integridad nuclear (longitud de cauda, momento de cauda y momento de cometa) para las tres concentraciones de O_3 fueron comparados usando la prueba de Wilcoxon para datos no paramétricos.

El arreglo experimental fue en parcelas divididas en un diseño de bloques al azar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Interacción ozono - metil-jasmonato y sus efectos en parámetros fisiológicos de plantas de algodón Pima.

Fotosíntesis

Para medir el efecto del ozono en los parámetros fisiológicos del algodón Pima, primeramente se evaluó la fotosíntesis (como asimilación de CO₂) y la conductividad estomatal porque la medición de esos parámetros no implicó el sacrificio de las plantas. Con respecto al efecto en la fotosíntesis (Fig. 1), se observó que las plantas tratadas con O₃ y O₃-Me-Ja fueron afectadas significativamente en la asimilación de CO₂, siendo la combinación de 114 ppb de O₃ y Me-Ja la que más efecto tuvo, -redujo la asimilación de CO₂ en más del 50%. Esta respuesta de las plantas de algodón al O₃ concuerda con los estudios realizados en 2003 por Grantz y Silva quienes observaron un decremento de cerca del 50% en la asimilación de CO₂ en plantas de algodón expuestas a una concentración de 143 ppb de O₃. De acuerdo con esos autores, el O₃ reduce el movimiento de fotosintatos hacia las partes bajas de la planta afectando el crecimiento de raíces y por consiguiente restringiendo la captación de nutrientes.

En lo que respecta al efecto del metil-jasmonato (Fig.1), no se observó que esa hormona module los efectos del O₃ en la fotosíntesis. A diferencia de esas observaciones, estudios realizados en plantas de tabaco expuestas a altas concentraciones de O₃ y tratadas con Me-Ja sugieren que la hormona modula los efectos del ozono (Lárus y Col, 2007). Esos investigadores observaron que el Me-Ja, ya sea inducido ó aplicado, reduce el daño por necrosis en el follaje. En el presente experimento se utilizaron cámaras cerradas en las que se colocaron tanto las plantas tratadas con Me-Ja como los testigos. Debido a la alta volatilidad del Me-Ja algunos autores reportan que este compuesto puede tener efectos en plantas aún cuando no sea aplicado directamente (Farmer y Ryan, 1990)

Conductividad estomatal

En lo referente a la conductividad estomatal se observó un comportamiento similar a lo observado para la fotosíntesis (Fig.1). La capacidad de los estomas para intercambiar agua se redujo hasta un 70% con la concentración media de O₃ (59 ppb). En la concentración alta (114 ppb) no se observó mayor daño que la observada en la concentración inmediata anterior probada. Estos resultados coinciden con las observaciones de Grantz y Yang (1996) donde concentraciones ambientales de O₃ redujeron a valores cercanos al 50% la conductividad estomatal de plantas de algodón Pima. De acuerdo a esos autores, esa disminución de la conductividad estomatal se debe a una medida de la planta para protegerse de la pérdida de agua; sin embargo esto trae consigo reducción de biomasa y por consiguiente disminución en el rendimiento. En lo que atañe a la modulación del Me-Ja sobre el efecto del O₃, no se observó un efecto combinado, ni modulación del efecto del ozono.

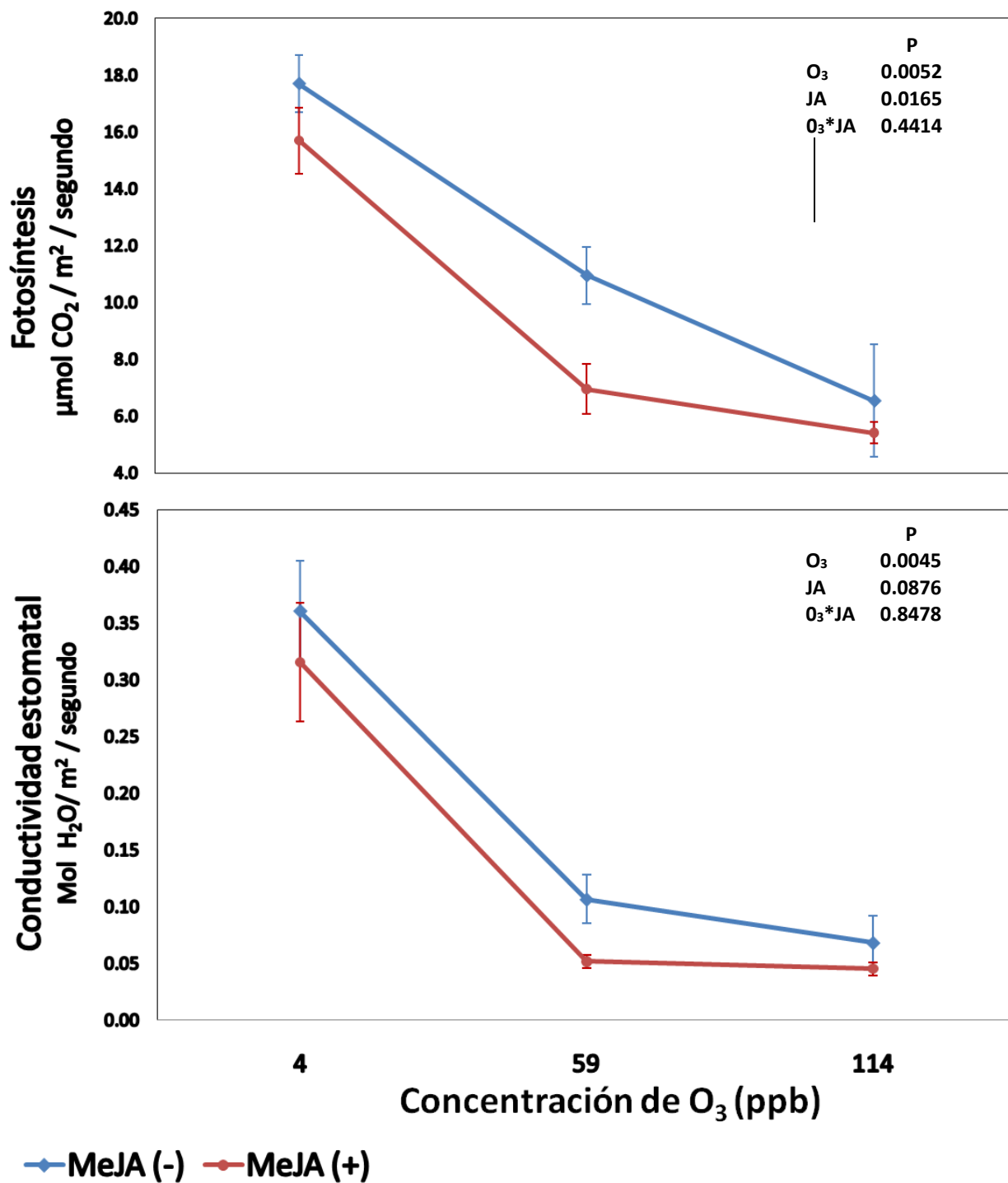


Fig. 1. Efecto del O₃ e interacción O₃-Me-Ja en la fotosíntesis y conductividad estomatal de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.

Respiración radicular

En lo que a respiración radicular respecta, no se observó efecto alguno en la respiración radicular de las plantas tratadas con O₃ o O₃-Me-Ja, ya que aún cuando el O₃ disminuyó la asimilación de O₂ en las raíces, dicha afectación no es significativa (Fig. 2).

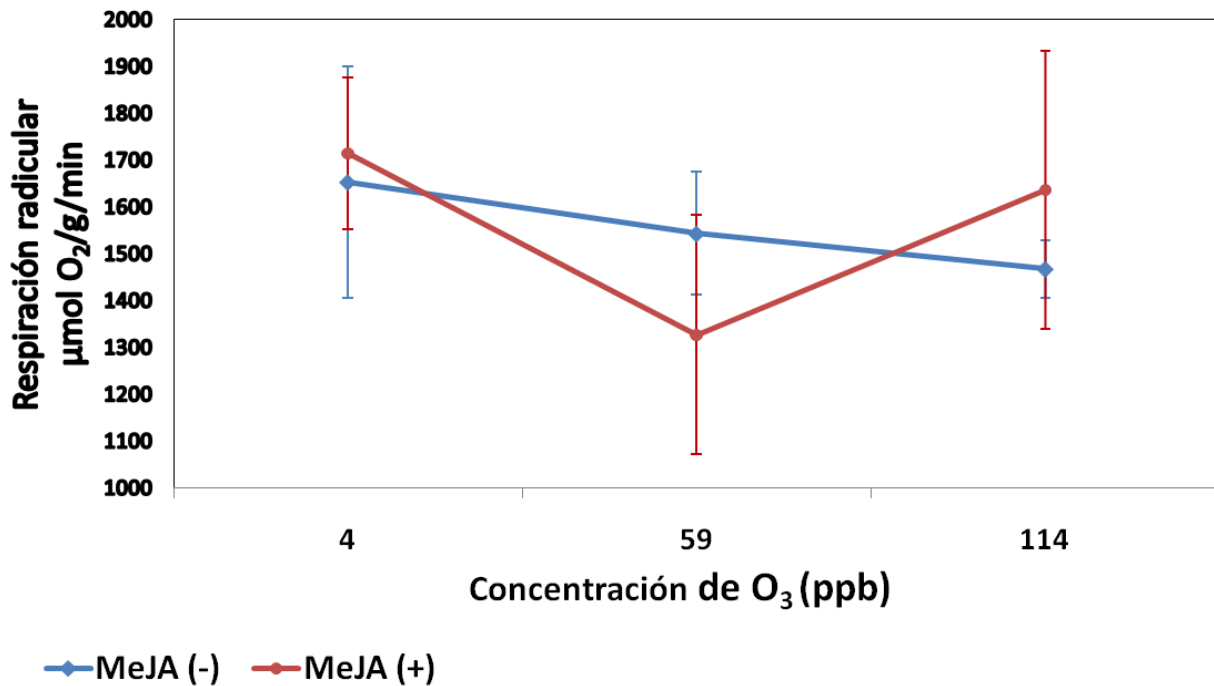


Fig. 2. Efecto del O₃ e interacción O₃ – Me-Ja en la respiración radicular de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.

Área foliar y número de hojas por planta

Se observó que la concentración media de O₃ (58 ppb) afectó el desarrollo foliar en un 16% y la concentración alta de O₃ (114 ppb) lo redujo en un 30%. Por su parte, el Me-Ja tiende a modular el efecto del O₃ en su concentración media. Esta observación podría indicar que el Me-Ja protege a la planta en esta concentración de O₃, sin embargo este efecto no es significativo. A diferencia de esas observaciones, no se percibió la misma tendencia del efecto del Me-Ja en la concentración alta de O₃. Lo anterior debido a que esa combinación afectó el desarrollo foliar en un 38%. Estos resultados no muestran modulación del Me-Ja en el efecto que el O₃ ejerce en el área foliar de las plantas (Fig. 3), sin embargo refuerzan las observaciones de Grantz y Yang (1996) en el sentido de que el O₃ afecta significativamente este parámetro fisiológico (reportaron un decremento del 83%). Tal y como lo exponen estos autores, dicha afectación tiene efectos secundarios en la fotosíntesis, ya que a menor área foliar menor asimilación de CO₂ por parte de la planta.

Debido a que son parámetros muy relacionados, el número de hojas por planta (Fig. 3) tuvo un comportamiento similar al área foliar, -de forma proporcional, las concentraciones media y alta de O₃ disminuyeron el número de hojas por planta-. A diferencia del área foliar, y como se observa en la figura 3, esta afectación solo fue significativa en la concentración alta de O₃. De acuerdo con Grantz y Farrar (1999), esta respuesta es consecuencia del efecto que el O₃ ejerce en la transferencia de azúcares del citoplasma al floema, que afecta en general a todos los parámetros de crecimiento. Como efecto colateral, y debido a la disminución de superficie foliar, la capacidad de asimilación de CO₂ de la planta se ve afectada debilitándola y haciéndola susceptible a factores de estrés ambiental y a factores de competencia.

En lo que respecta a la interacción O₃-Me-Ja se observó una tendencia de la hormona a modular los efectos adversos de la concentración media de O₃, sin

embargo este efecto no fue significativo. La aplicación de Me-Ja en la concentración alta de O₃ no mostró modulación alguna.

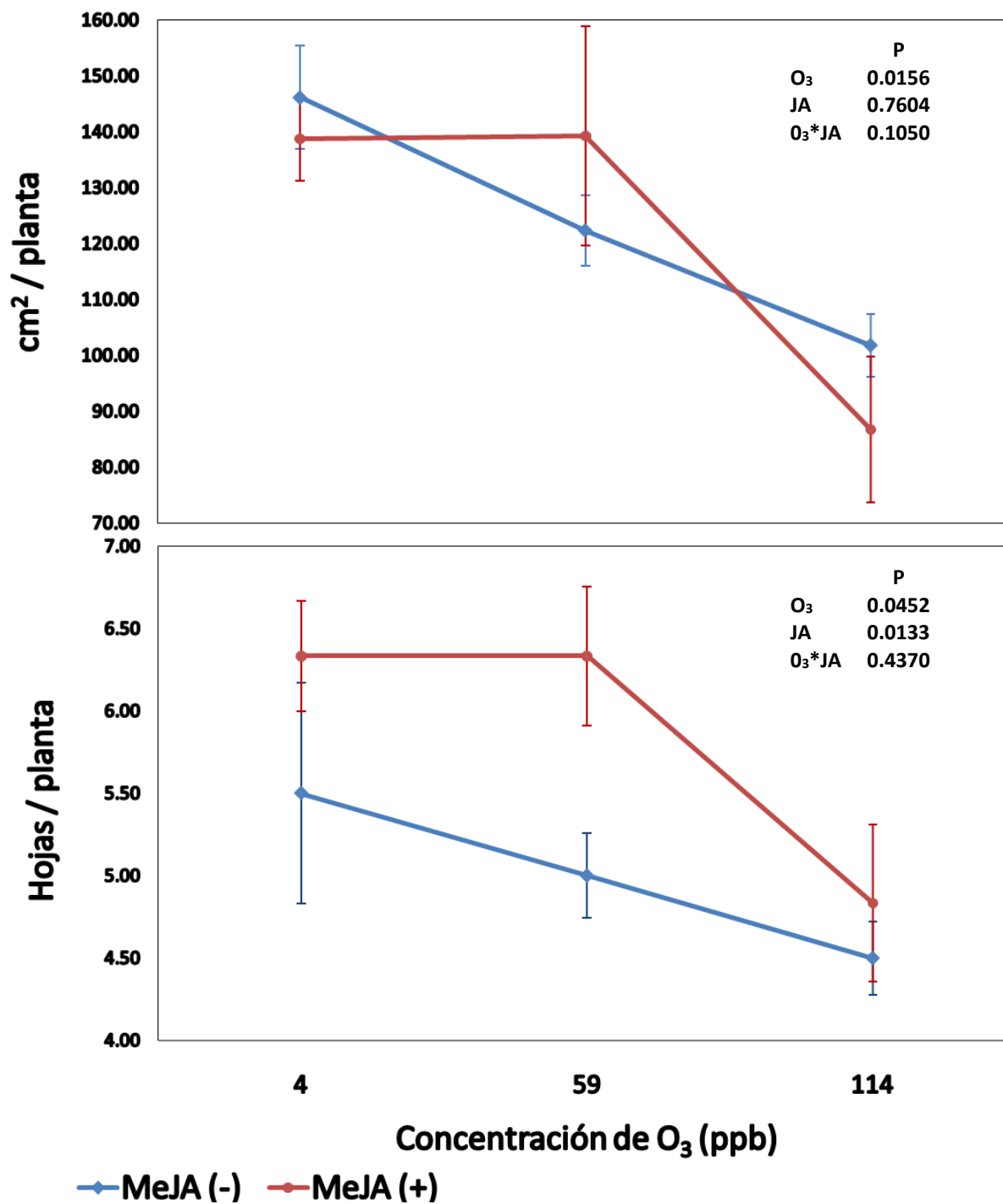


Fig. 3. Efecto del O₃ e interacción O₃ – Me-Ja en área foliar y número total de hojas en plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.

Biomasa foliar y radicular

La figura 4 muestra el efecto del O₃ e interacción O₃ – Me-Ja en la biomasa de hojas verdes; así como en la biomasa radicular. En la gráfica superior se observa que a medida que la concentración de O₃ incrementa, la biomasa foliar decrece. Esta observación está directamente relacionada y concuerda con el efecto del O₃ en área foliar y número de hojas por planta. En los que respecta al Me-Ja no se observó que ejerza un efecto modulador sobre las diferentes concentraciones de O₃ estudiadas.

En la misma figura (gráfica inferior) se muestra el efecto del O₃ e interacción O₃ - Me-Ja en la biomasa radicular. Al igual que el efecto en la biomasa foliar, se apreció una disminución en el crecimiento de las raíces a medida que aumentó la concentración de O₃. De acuerdo con Grantz y Farrar (1999) la cantidad de carbohidratos (CHO) disponibles para exportar hacia los tejidos bajos (raíces) se reduce por acciones directas e indirectas del O₃. El efecto de esta repercusión es de vital importancia ya que limita la captación de nutrientes y agua por parte de las raíces, además de favorecer el acame de las plantas. Como se aprecia en la misma gráfica, el Me-Ja no moduló los efectos negativos del O₃ en el crecimiento radicular.

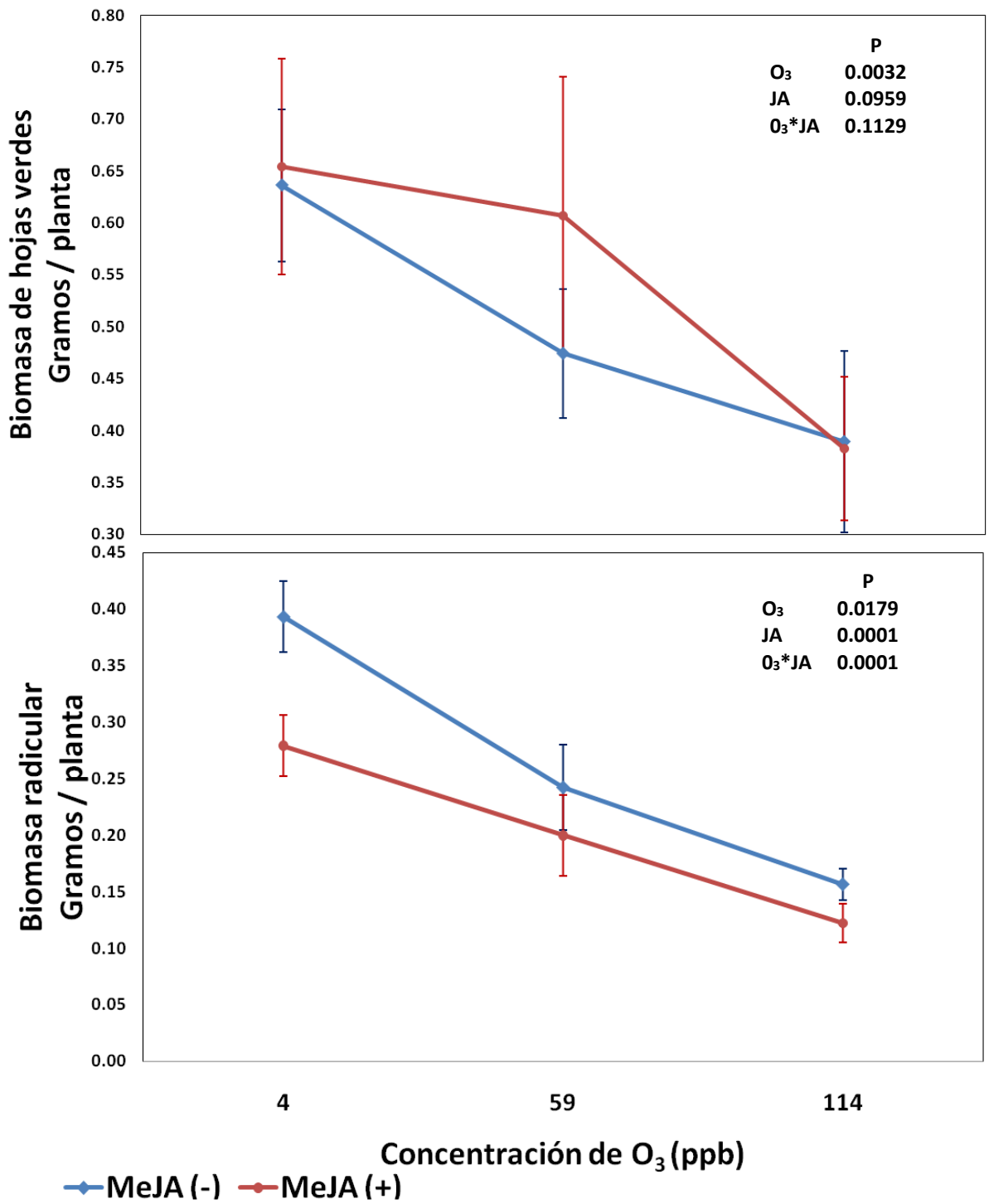


Fig. 4. Efecto del O₃ e interacción O₃ – Me-Ja en la biomasa de hojas verdes y biomasa radicular de plantas de algodón Pima. Los valores representan la media y el error estándar para cada concentración estudiada.

7.2. Efecto del ozono en la integridad nuclear de células de algodón Pima.

Integridad nuclear en hojas de algodón expuestas a O₃

El efecto del O₃ en la integridad nuclear se evaluó inicialmente en células foliares. En la figura 5 (A y B), se muestra el porcentaje de células en cada uno de 5 rangos de porcentaje de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O₃. Se puede apreciar que en la concentración de 4 ppb de O₃ el 0.86% de las células no tuvieron daño alguno (0% de fragmentación nuclear), el 77.91% de las células se ubicaron en el rango de 0-25% de fragmentación nuclear, el 10.78% se situaron en el rango del 25 al 50%, el 9.25% en el rango del 50-75% y 1.20% del total de las células en esta concentración se situaron en el rango del 75-100% de fragmentación nuclear. En la concentración de 59 ppb de O₃ se observó la misma tendencia, pero a diferencia de la concentración de 4 ppb, se encontró un mayor porcentaje de células en los rangos del 25-50%, 50-75% y 75-100%. Para valores de fragmentación menores al 75%, la concentración alta de O₃ (113 ppb) presentó la misma tendencia que las concentraciones anteriores y los valores de fragmentación fueron sólo ligeramente superiores a la concentración de 59 ppb. En la concentración de 113 ppb de O₃ sólo 0.33% de las células exhibieron porcentajes de fragmentación mayores al 75%. Esos resultados se pueden apreciar gráficamente en la figura 5B. Estas observaciones nos muestran que aún cuando las plantas de algodón no fueron expuestas a ozono, sus células presentaron fragmentación nuclear. Lo anterior puede deberse a que en todo organismo las células se degeneran como consecuencia de los factores metabólicos del organismo. De la misma manera se puede apreciar una mayor fragmentación nuclear a partir de la concentración de 59 ppb de O₃. Sin embargo al comparar la concentración de 59 y 114 ppb de O₃ no se observa una marcada diferencia. Estos datos nos sugieren que la planta de algodón implementa un mecanismo de defensa para impedir un mayor daño por O₃. Este puede ser la regulación de intercambio de gases a través de los estomas para

impedir un mayor pase de O_3 hacia el interior de la planta, o algún otro mecanismo de defensa metabólico o fisiológico.

	INTERVALOS DE % DE ADN EN CAUDA				A
	A	B	C	D	E
	(0%)	(0-25%)	(25-50%)	(50-75%)	(75-100%)
Concentración de O ₃ (ppb)	% de células en intervalo				
4	0.86	77.91	10.79	9.25	1.20
59	0.50	62.83	18.17	17.00	1.50
114	0.33	62.17	19.33	17.83	0.33

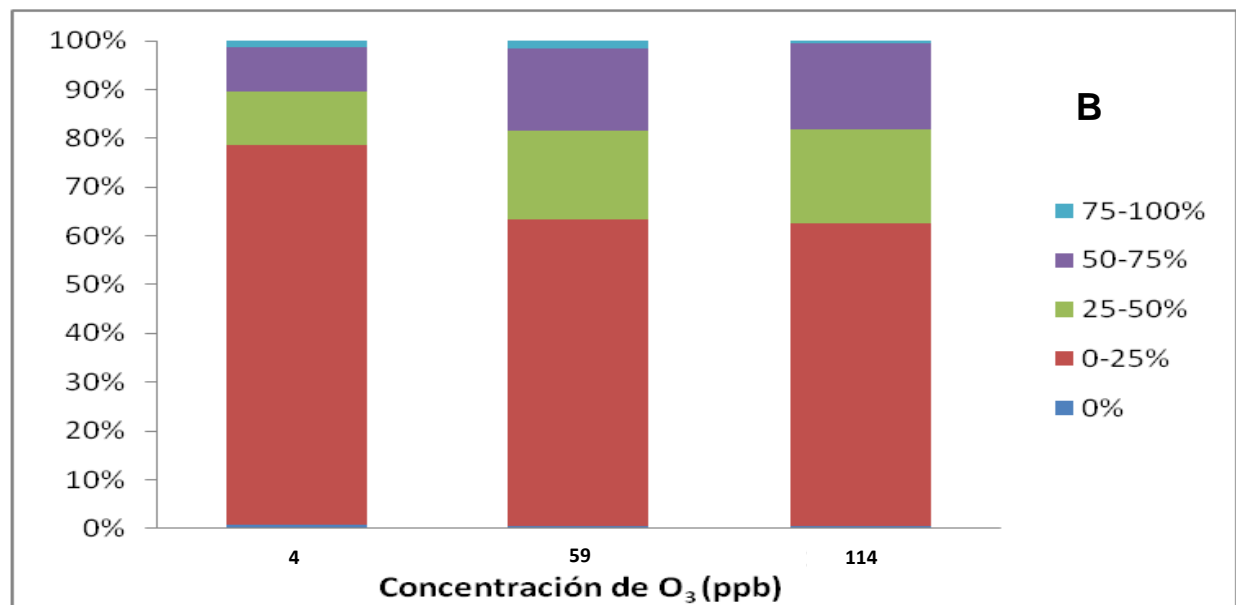


Fig. 5. Porcentaje de células en cinco rangos de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O₃ en hojas de algodón Pima (Cuadro “A”, Gráfica “B”)

Integridad nuclear en raíces finas y tiernas de algodón expuestas a O₃

Haciendo referencia al efecto del O₃ en la integridad nuclear de células radiculares, en la figura 6 (A y B) se muestran los porcentajes de células de acuerdo a rangos de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O₃. Se puede apreciar que en la concentración baja de O₃ (4 ppb) el 0.7% de las células no tuvieron daño alguno (0% de fragmentación nuclear). El 99.07% del total de las células se situaron en el rango del 0-25% y el 0.23% se ubicó en el rango de 25-50% de fragmentación nuclear. En lo que respecta a la concentración media (59 ppb) se puede observar que -al igual que la concentración baja- el mayor porcentaje de células se ubica en el rango del 0-25% de fragmentación nuclear; sin embargo el porcentaje de células en este rango es 16 puntos porcentuales menor que en la concentración baja. Esta misma diferencia se observa en el rango de 25-50% donde ahora la concentración media tiene mayor porcentaje de células. En lo que respecta a la concentración alta de O₃ (114 ppb) se puede apreciar que, al igual que en la concentración baja y media de O₃, tiene el mayor porcentaje de células en el rango de 0-25% de fragmentación nuclear. Comparándola con la concentración baja de O₃ se observa que tiene 5% más células en el rango del 25-50% de fragmentación nuclear, sin embargo en el mismo rango es 10 puntos porcentuales menor respecto a la concentración media. En estas tres concentraciones prácticamente no hubo fragmentación nuclear en los rangos de 50-75% y 75-100%. Esos resultados se pueden apreciar gráficamente en la figura 6B.

Con estos datos se puede apreciar que aún cuando las plantas de algodón no son expuestas a O₃, las células radiculares muestran en grado menor fragmentación nuclear. Al igual que en el experimento con las células foliares, estos datos nos sugieren que en todo organismo las células se degeneran como consecuencia de los factores metabólicos del organismo, lo cual se ve reflejado en la integridad nuclear de sus células. También se puede observar que es en la concentración de 59 ppb de O₃ cuando se aprecia mayor fragmentación nuclear;

sin embargo, no hay gran diferencia con el testigo ya que solo un muy bajo porcentaje de células se ubica en el rango de 25-50% de fragmentación nuclear y prácticamente 0% de las células presenta altos porcentajes de fragmentación nuclear. En la concentración de 114 ppb de O₃ se puede apreciar una respuesta por parte de la planta que impide un mayor daño celular. Estos datos coinciden con los del experimento con las células foliares; y al igual que en éste, esta respuesta se le puede atribuir a mecanismos de defensa por parte de la planta aún no identificados.

En el caso de las células radiculares el efecto O₃ es secundario, una vez que el contaminante no entra a través de las raíces. Estudios realizados en plantas de algodón por Grantz y Col. (2003) exponen que el O₃ aumenta la respiración de las células de raíces finas. Cambios metabólicos como éste pueden derivar en debilitar la planta haciendo sus células más susceptibles a la fragmentación nuclear.

Concentración de O ₃ (ppb)	INTERVALOS DE % DE ADN EN CAUDA (μm)				
	A	B	C	D	E
	(0%)	(0-25%)	(25-50%)	(50-75%)	(75-100%)
	% de células en intervalo				
4	0.70	99.07	0.23	0.00	0.00
59	0.17	83.17	15.67	1.00	0.00
114	0.15	94.62	5.23	0.00	0.00

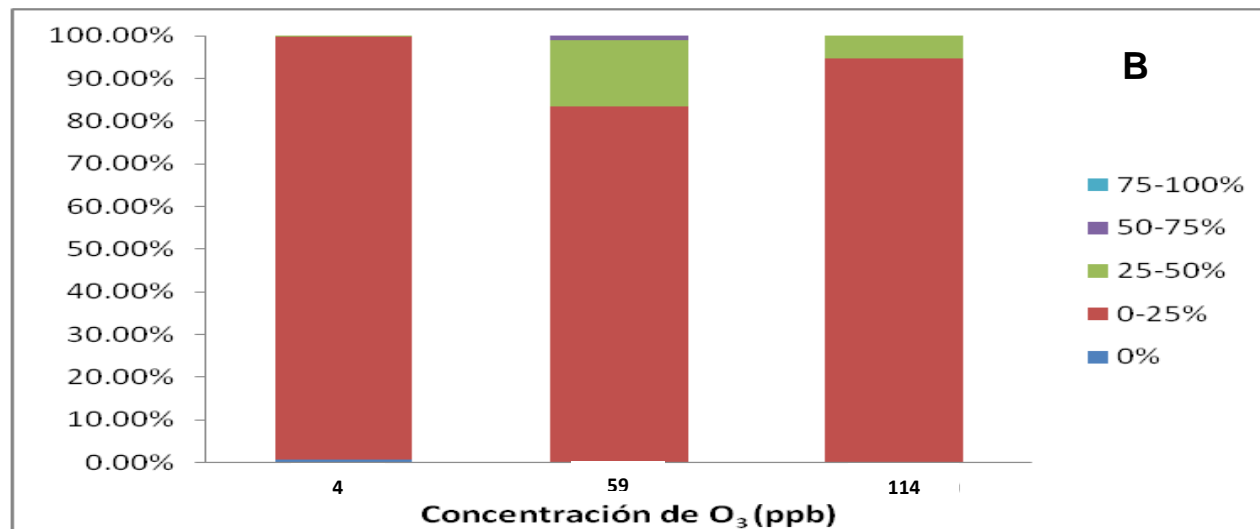


Fig. 6. Porcentaje de células en cinco rangos de fragmentación nuclear (porcentaje de ADN en cauda) para cada una de las concentraciones de O₃ en raíces de algodón Pima (Cuadro “A”, Gráfica “B”)

Para evaluar el efecto del O₃ en la integridad nuclear se tomaron en cuenta los parámetros de longitud de cauda y momento de cauda. El primer parámetro representa la longitud de la fragmentación nuclear sin embargo no considera la cantidad de material genético en cauda, el cual está representado por la fluorescencia. El segundo parámetro (momento de cauda) considera, en un solo valor, tanto la longitud de la fragmentación nuclear como la cantidad de material genético. Debido a esto es considerado un parámetro apropiado para evaluar daño genético a nivel celular.

Los resultados del efecto del O₃ en la integridad nuclear de células foliares se muestran en la figura 7 expresados como longitud de cauda (Figura 7A) y momento de cauda (Figura 7B). Para ambos casos (Figura 7A y B), se puede observar que las concentraciones media y alta de O₃ tienen un efecto negativo sobre las células foliares ya que, como se aprecia en la figura, el daño celular medio (expresado como longitud de cauda) es, en ambos casos, aproximadamente 40% mayor que en la concentración baja. Esos datos no siguen una distribución normal por lo que se usó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para comparar la media de las tres concentraciones estudiadas.

Al comparar el efecto de la concentración baja (4 ppb) y el de la concentración media (59 ppb) se observó una diferencia altamente significativa ($p < 0.005$). Al comparar el efecto de la concentración baja y el de la concentración alta (114) se observa el mismo grado de significancia. No se observó diferencia significativa al comparar las concentraciones media y alta.

Otro parámetro evaluado fue el momento de cometa cuyos resultados se muestran en la figura 8. Este parámetro considera el producto de la fluorescencia en la cauda del cometa (fluorescencia en la cauda) y la longitud de la cauda medida desde el borde final de la cabeza. Al igual que el momento de cauda, el momento de cometa es ampliamente usado para evaluar daño genético a nivel celular.

Los resultados que se observan (fig. 8) son muy similares al efecto del O₃ en el momento de cauda. Las concentraciones media y alta tienen un efecto negativo sobre las células foliares ~37% mayor que la concentración baja. De acuerdo al análisis no paramétrico (Wilcoxon), al comparar el efecto de la concentración baja (4 ppb) con el de la concentración media (59 ppb) se observó que hay una diferencia altamente significativa ($p < 0.005$). El mismo grado de significancia se observó al comparar el efecto de la concentración baja con el de la concentración alta. Al comparar la concentración media con la concentración alta no se observa diferencia significativa ($p > 0.05$).

Tanto los resultados en momento de cauda como en momento de cometa nos sugieren que el daño en la integridad nuclear ocurre a partir de la concentración media, sin embargo por alguna respuesta fisiológica, aún no identificada, no se acrecienta en la concentración alta de O₃. Concentraciones de ≥ 59 ppb son muy comunes en ciudades industrializadas, así como en áreas rurales y contribuyen a la disminución de rendimientos en especies vegetales de interés agrícola e industrial.

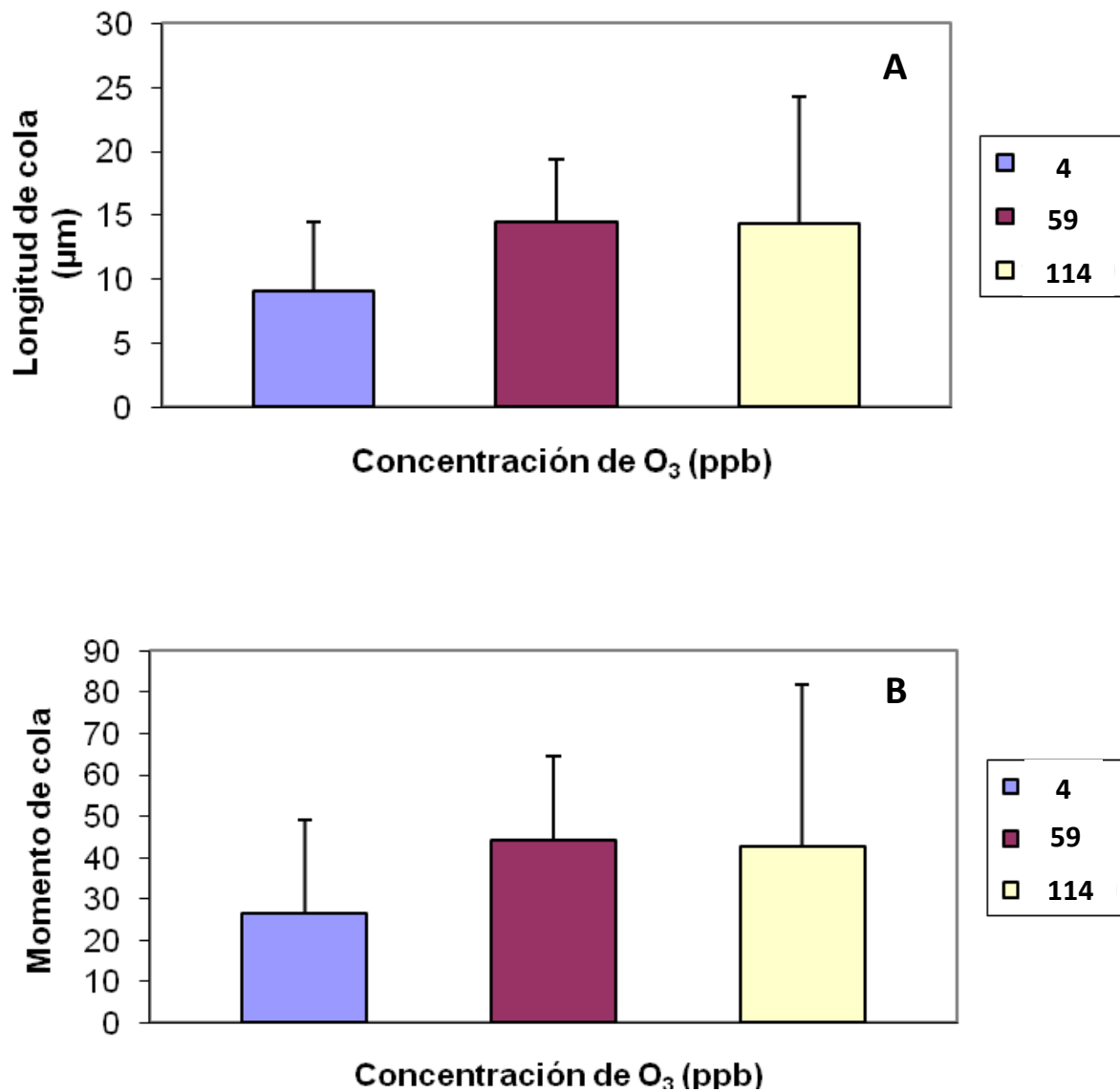


Fig. 7. Valores promedio de fragmentación nuclear en células de hojas de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O₃. A, longitud de cauda (μm); B, momento de cauda (adimensional).

Los valores representan la media y error estándar

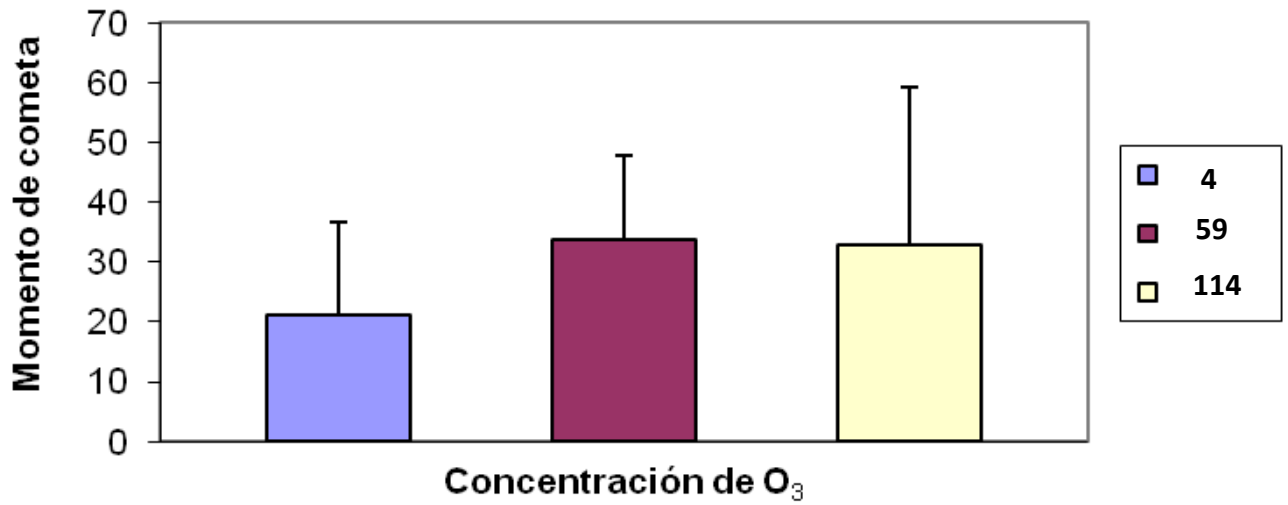


Fig. 8. Valores promedio de fragmentación nuclear en células de hojas de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O₃. Momento de cometa (adimensional).

Los valores representan la media y error estándar

El efecto del O₃ en la integridad nuclear de células radiculares expresado como longitud de cauda y momento de cauda se ilustra en la figura 9. Tomando en cuenta que los datos obtenidos no siguen una distribución normal y de acuerdo a la prueba de Wilcoxon donde las comparaciones entre las tres concentraciones son estadísticamente diferentes ($p < 0.005$), se puede teorizar que la concentración media de O₃ es la que mayor daño causa a las células radiculares. Con referencia a la concentración baja, la concentración media incrementa 10 veces la longitud de cauda y 23 veces el valor de momento de cauda. En este experimento no se observó un efecto mayor a medida que la concentración de O₃ aumentó. Por el contrario, el efecto de la concentración media fue 2 veces mayor en longitud de cauda y 2.3 veces mayor en el valor de momento de cauda que los obtenidos con la concentración alta.

En lo que respecta al parámetro de momento de cometa (figura 10), se puede observar que prácticamente los valores son iguales con respecto al momento de cauda.

Al igual que el efecto en el área foliar, en este experimento la concentración media es la que mayor daño celular causó. Lo anterior nos indica que el efecto del O₃ a nivel celular no sigue una relación dosis respuesta, a diferencia de lo que se encontró a nivel de parámetros fisiológicos.

Es posible que a nivel celular, la planta presente mecanismos de defensa para contrarrestar los efectos del O₃. Esa respuesta defensiva puede deberse a la regulación del paso del O₃ por parte de los estomas o a otro mecanismo de defensa no identificado. A nivel fisiológico, si se observa una relación dosis-respuesta.

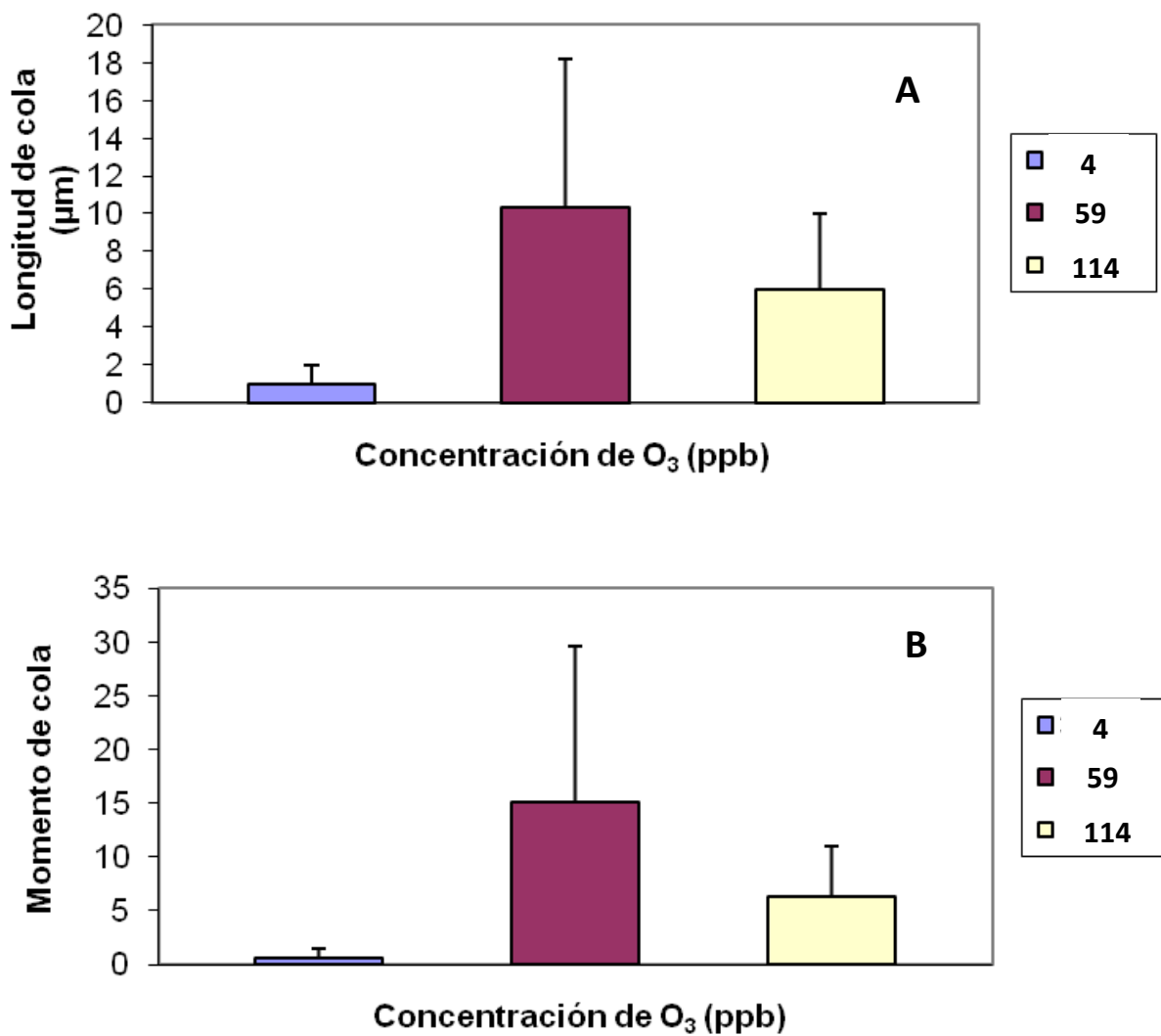


Fig. 9. Valores promedio de fragmentación nuclear en células de raíces de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O₃. A, longitud de cola (µm); B, momento de cola (adimensional).

Los valores representan la media y error estándar

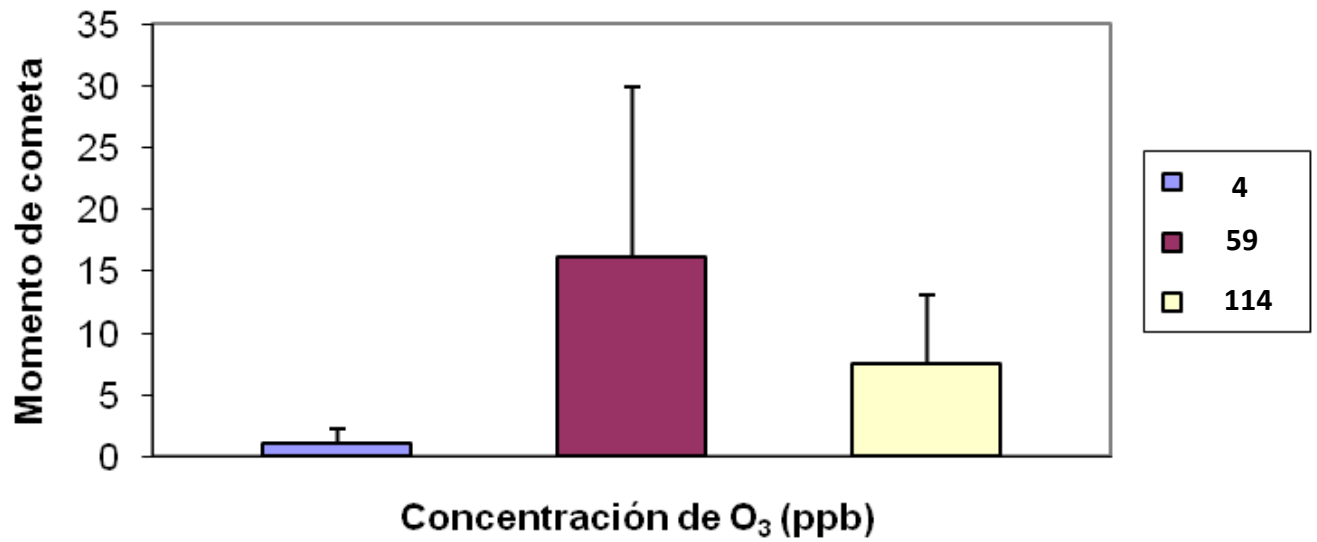


Fig. 10. Valores promedio de fragmentación nuclear en células de raíces de algodón expuestas a concentraciones ambientales de O₃. Momento de cometa (adimensional).

Los valores representan la media y error estándar

8. Conclusiones

1. La fisiología de plantas de algodón Pima es afectada en exposiciones a 59 ppb de O₃ y esta afectación se incrementa en exposiciones a 114 ppb de O₃.
2. Bajo las condiciones experimentales de la presente investigación, el metil-jasmonato no modula los efectos negativos del O₃ en plantas de algodón Pima.
3. Para futuras pruebas con metil-jasmonato es recomendable considerar un arreglo espacial donde se considere la volatilidad del compuesto
4. La integridad nuclear de células foliares y radicales de plantas de algodón Pima es mayormente afectada en exposiciones a 59 ppb O₃. Por alguna respuesta por parte de la planta, la exposición a 114 ppb de O₃ no acentúa el daño celular.

9. REFERENCIAS

- Aardenne, J. A., Carmichael, G. R., Levy, H., Streets, D. G., y Hordijk, L. (1999) Anthropogenic. Emissions in Asia in the period 1990-2020. *Atmos. Environ.* 33 (4), 633-646.
- Baier, M., Kandlbinder, A., Golldack, D. y Dietz, K.J. (2005) Oxidative stress and ozone: perception, stress and response. *Plant, Cell and Environment* 28, 1012-1020
- Barbo, D. N., Chappelka, A.H., Somers, G. L., Miller-Goodman, M. S., y Stolte K. (1998) Diversity of an early successional plant community as influenced by ozone. *New Phytol.* 138, 653–662.
- Beine, H. J., Jaffe, D. A., Herring, J.A., Kelley, J. A., Krognes, T. y Stordal, F. (1997) High Latitude Springtime Photochemistry Part I: NO_x, PAN and Ozone Relationships. *J .Atm. Chemistry* 27, 127-153.
- Bell, M. L., McDermott A., Zeger, S. L., Samet, J. M., y Dominici, F. (2004) Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987-2000. *JAMA.* 292, 2372-2378.
- Bielenberg, D. G., Lynch, J. P., y Pell, E. J. (2001) A decline in nitrogen availability affects plant responses to ozone. *New Phytol.* 151, 413-425.
- Brown, K. A., Roberts, T. M., y Blank, L. W. (1987) Interaction between ozone and cold sensitivity in Norway spruce: a factor contributing to the forest decline in central Europe? *New Phytol.* 105, 149–155.
- Bungener, P., Nussbaum, S., Grub, A., y Fuhrer, J. (1999) Growth response of grassland species to ozone in relation to soil moisture condition and plant strategy. *New Phytol.* 142, 283–293.
- Burkey, K. O., Millar, J. E., y Fiscos, E. L. (2005) Assessment of ambient ozone effects on vegetation using snap bean as a bioindicator species. *J. Environ. Qual.* 34, 1081-1086.
- Carter, W. P. L., Winer, A. M., y Pitts J. N. (1981) Effects of peroxyacetyl nitrate on the initiation of photochemical smog, *Environ. Sci. Technol.* 15 (7), 831-834.
- Castell, N., Mantilla, E., y Millan, M. M. (2007) Analysis of tropospheric ozone concentration on a Western Mediterranean site: Castellon (Spain). *Environ. Monit. Assess.* 136.
- Chen, P. C., Lai, Y. M., Chan, C. C., Hwang, J. S., Yang, C.Y., y Wang, J.D. (1999) Short-term effect of ozone on the pulmonary function of children in primary school. *Environ Health Perspect.* 107, 921–925.

- Clifford, P. W., Ronald, P. C., y Paul, J. L. (1995) Relationship between Summertime Ambient Ozone Levels and Emergency Department Visits for Asthma in Central New Jersey. *Environ. Health Perspect.* 103 (2), 97-102.
- Creilson, J. K., Fishman, J. y Wozniak, A. E. (2003) Intercontinental transport of tropospheric ozone: A study of its seasonal variability across the North Atlantic utilizing tropospheric ozone residuals and its relationship to the North Atlantic Oscillation, *Atmos. Chem. Phys.* 3, 2053-2066.
- Davis, L. W. (2006) The Effect of Driving Restrictions on Air Quality in Mexico City," *J. of Political Econ.* forthcoming.
- EEA. (2007) Air Pollution in Europe. EEA Report No. 2/2007
- EPA. (1999) Ozone and your health. EPA-452/F-99-003.
- EPA. (2007) NOx budget trading program. 2006 Program compliance and environmental results.
- Farell, A. E. (2005) Learning to See the Invisible: Discovery and Measurement of Ozone. *Environ. Monit. and Assess.* 106, 1-3(22), 59-80.
- Farmer, E. E y Ryan, C. A. (1990) Interplant communication: Air born methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 87, 7713-7716
- Fiscus, E. L., Booker, F. L., y Burkey, K. O. (2005) Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant Cell and Environ.* 28, 997-1011.
- Fusco, D., Forastiere, F., Michelozzi, P., Spadea, T., Ostro, B., Arcà, M., y Perucci, C.A. (2001) Air pollution and hospital admissions for respiratory conditions in Rome, Italy. *Eur Respir J.* 17, 1143-1150.
- Garty, J., Levin, T., Cohen, Y., y Lehr, H. (2002) Biomonitoring air pollution with desert lichen. *Ramalina maciformis*. *Physiol. Plantarum* 115 (2), 267-275.
- Giovanelli, G., Georgiadis, T., Fortezza, F., y Strocchi, V. (1985) Transport of photochemical ozone along the western Adriatic shore near a petrochemical plant. *Il Nuovo Cimento.* 8 (6), 727-742.
- Goldberg, M. S., Burnett, R. T., Brook, J., Bailar, J.C., Valois, M. F., y Vincent, R. (2001) Associations between daily cause-specific mortality and concentrations of ground-level ozone in Montreal, Quebec. *Am J. Epidemiol.* 154, 817-826.
- Gong, H. Jr., Wong, R., Sarma, R. J., Linn, W. S., Sullivan, E. D., y Shamoo D. A., Anderson, K. y Prasad, S. B. (1998) Cardiovascular effects of ozone exposure in human volunteers. *Am J Respir. Crit. Care Med.* 158, 538-546.

- Grantz, D. A., y Farrar, J. F. (1999) Acute exposure to ozone inhibits rapid carbon translocation from source leaves of Pima cotton. *J. of Exp. Bot.* 50, 1253–1262.
- Grantz, D. A., y Shrestha, A. (2006). Ozone reduces crop yields and alters competition with weeds such as yellow nutsedge. *California Agriculture* 59, 137-143.
- Grantz, D. A., Silva, V., Toyota, M. y Ott, N. (2003). Ozone increases root respiration but decreases leaf CO₂ assimilation in cotton and melon. *J. of Exp. Bot.* Vol. 54, 391, 2375-2384.
- Grantz, D. A., y Yang, S. (2000). Ozone impacts on allometry and root hydraulic conductance are not mediated by source limitation nor developmental age. *J. of Exp. Bot.* Vol. 51, 346, 919-927.
- Grantz, D. A., y Yang, S. (1996) Effect of O₃ on hydraulic architecture in pima cotton. *Plant Physiol* 112, 1649–1657.
- Gryparis, A., Forsberg, B., Katsouyanni, K., Analtis, A., Touloumi, G., Schwartz, J., Samoli, E., Medina, S., Anderson, H. R., Niciu, E. M., Wichmann, H. E., Kriz, B., Kosnik, M., Skorkovsky, J., Vonk, M. y Dortbudak, Z. (2004) Acute effects of ozone on mortality from the "Air pollution and health: a European approach" Project. *Am J Respir Crit Care Med.* 170, 1080–1087.
- Guzy, M. R., y Heath, R. L. (1993) Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol.* 124, 617-625.
- Haines, B. L., Jernstedt, J. A., y Neufeld, H. S. (1985) Direct foliar effects of simulated acid rain II. Leaf surface characteristics. *New Phytol.* 99, 407–416.
- Hong, S., Candelone, J., Patterson, C., y Boutron, C. (1994) Greenland Ice Evidence of Hemispheric Lead Pollution Two Millennia Ago by Greek and Roman Civilizations. *Science* 265 (5180), 1841 – 1843.
- Karnosky, D. F., Pregitzer, K. S., Zak, D. R., Kubiske, M. E., Hendrey, G. R., Weinstein, D., y Nosal, M. (2005) Scaling Ozone Responses of Forest Trees to the Ecosystem Level in a Changing Climate. *J. of Plant Cell and Environ.* 28 (8), 965-981.
- Kumar, P., y Mohan, D. (2002) Photochemical smog mechanism, ill-effects and control, *TIDEE* 1(3), 445-456.
- Kunzli, N. y Tager, I. B. (2005) Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med Wkly.* 10 (135), 697-702.
- Lárus, B., Orvar, Mc Pherson, J. y Ellis, B., E. (1997). Proactivating wounding response in Tobacco prior to high level ozone exposure prevents necrotic injury. *The Plant Journal* 11 (2) 203-212.

- Lewis, S. A., Corden, J. M., Forster, G. E., y Newlands M. (2000). Combined effects of aerobiological pollutants, chemical pollutants and meteorological conditions on asthma admissions and A & E attendances in Derbyshire UK, 1993-96. *Clin Exp Allergy*. 30(12), 1724–1732.
- Lyons, T. M., y Barnes, J. D. (1998). Influence of plant age on ozone. resistance in *Plantago major*. *New Phytol*. 138, 83–89.
- Mann, J. K., Tager, I.B., Lurmann, F., Segal, M., Quesenberry, C. P., Lugg, M. M., Shan, J. y Van Den Eeden, S, K. (2002) Air pollution and hospital admissions for ischemic heart disease in persons with congestive heart failure or arrhythmia. *Environ Health Perspect*. 110, 1247–52.
- McKee, I. F., y Long, S. P. (2001). Plant growth regulators control ozone damage to wheat yield. *New Phytol*. 152, 41-51.
- Medina-Ramón, M., Zanobetti, A., y Schwartz, J. (2006). The Effect of Ozone and PM10 on Hospital Admissions for Pneumonia and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A National Multicity Study. *Am.J. of Epidem*. 163 (6)
- Monks, P. S. (2000). A review of the observations and origins of the spring. *Atm. Environ*. 34, 3545-3561.
- Mudway, I. S. y Kelly F. J. (2004). An Investigation of Inhaled Ozone Dose and the Magnitude of Airway Inflammation in Healthy Adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*.169, 1089-1095.
- Murphy, J. J., Mark, A. D., Donald, R. M., y Kim, H. J. (1999). The Cost of Crop Damage Caused by Ozone Air Pollution from Motor Vehicles. *J. of Environ. Manage*. 55, 273–289.
- NASA (2006) Earth observing system. Aura. NASA Earth Science Enterprise. Brochure.
- Nouchi, H, y Toyama, S. (1988) Effects of O₃ and peroxyacetylNitrate on polar lipids and fatty acids in leaves of morning glory and kidney bean. *Plant Physiol*. 87, 638–646.
- Olszyk, D., Bytnerowicz, A., Kats, G., et al. (1993) Cotton yield losses and ambient ozone concentrations in California's San Joaquin Valley. *J Environ Qual*. 22, 602–11.
- Romieu, I., Meneses, F., Ramirez, M., Ruiz, S., Perez-Padilla, R., Sienna, J. J., Gerber, M., Grievink, L., Dekker, R., Walda, I. y Brunekreef, B. (1998) Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am J Respir Crit Care Med*. 158, 226–232.
- Saitanis, C. J., y Karandinos, M. G. (2002) Effects of ozone on tobacco (*Nicotiana tabacum*. L.) varieties. *J. Agron. Crop Sci*. 188, 51-58.

Samet, J. M., Hatch, G. E., Horstman, D., Steck-Scott, S., Arab, L., Bromberg, P. A., Levine, M., McDonnell, W. F., y Devlin, R. B. (2001) Effect of antioxidant supplementation on ozone-induced lung injury in human subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 819–825.

Sánchez-ccoillo, O. R., Martins, L. D., Ynoue, R. Y. y Andrade, M. F. (2007) The impact on tropospheric ozone formation on the implementation of a program for mobile emissions control: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Fluid Mechanics* 7, 95-119.

Shimizu, H., y Feng, Y. W. (2007) Ozone and/or Water Stresses Could have Influenced the *Betula ermanii* Cham. Forest Decline Observed at Oku-Nikko, Japan *Environ. Monit. and Assess.* 128 (1-3), 109-119.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. et al. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184–191.

Stieb, D. M., Burnett, R. T., Beveridge, R. C., y Brook JR. (1996) Association between ozone and asthma emergency department visits in Saint John, New Brunswick, Canada. *Environ Health Perspect.* 104(12), 1354–1360.

UNEP. 2002. *Global Environment Outlook 3. Past, present and future prospectives.* Earthscan Publications, London.

Uwe, V., e Ingeborg, H. M. (2001) Influence of different meteorological parameters on the development of an ozone gradient between the soil surface and a level of 250 cm. *Meteorologische Zeitschrift.*10(4), 277-281.

Weisel, C. P., Cody, R. P., y Lioy, PJ. (1995). Relationship between summertime ambient ozone levels and emergency department visits for asthma in central New Jersey. *Environ Health Perspect.* 103 (2), 97–102.

Weiss, D., Shotyk, W., Appleby, P.G., Kramers, J. D., y Cheburkin, A. K. (1999) Atmospheric Pb Deposition since the Industrial Revolution Recorded by Five Swiss Peat Profiles: Enrichment Factors, Fluxes, Isotopic Composition, and Sources. *Environ. Sci. Technol.* 33 (9), 1340-1352.

WHO (2003) Health aspects with particle matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group. Bonn, Alemania. 13–15.

WHO (2004) Health aspects of air pollution. Results from the WHO project “Systematic review of health aspects of air pollution in Europe”.

10. APÉNDICE

Antes de la obtención de los resultados de integridad nuclear de células radiculares y foliares presentados en la esta tesis, se realizaron 5 experimentos, todos con el fin de corroborar los resultados de un primer experimento donde se observó un efecto del O₃ en la integridad nuclear de células radiculares. Los resultados de estos experimentos no se tomaron en cuenta para esta tesis debido a que no fueron consistentes. Lo anterior lo atribuimos a que el manejo que se les dio a las plantas de algodón, antes y en el momento de procesar las células, fue diferente al del primer experimento. Por esta razón se realizó un sexto experimento en el cual se replicó la técnica utilizada en el primer experimento. A continuación se presenta un resumen de los seis experimentos:

Experimento 1. Considerando el parámetro de longitud de cauda en células radiculares, se observa que la concentración media (59 ppb) causa 13% más fragmentación nuclear que la concentración baja (4 ppb). Sin embargo, la concentración alta (114 ppb) no sigue la misma tendencia y causa 2.5% menos fragmentación que la concentración media.

Experimento 2. En todas las concentraciones, incluyendo el testigo, no se observó una marcada diferencia en la fragmentación nuclear. El promedio en las tres concentraciones fue de ~40 µm de longitud.

Experimento 3. En este experimento, las concentraciones media y alta de O₃ causaron mayor fragmentación nuclear que la concentración baja de O₃. Esta diferencia fue de un 20%, sin embargo no fue estadísticamente diferente. La longitud promedio de caudas en la concentración baja fue de 5.8 µm, mientras que en la concentración media y alta fue de 7.3 µm

Experimento 4. Considerando la longitud de cauda, en este experimento se observaron diferencias de aproximadamente 0.5 µm en la medida que la concentración fue mayor. Sin embargo esta diferencia sólo representó una

diferencia estadística significativa. Los valores promedio de longitud de cauda anduvieron entre los 5 y 6 μm de longitud

Experimento 5. En este experimento, la concentración alta de O_3 fue la que causó menor fragmentación nuclear con valores de cauda promedio de 8 μm de longitud. Las concentraciones baja y media tuvieron caudas con valores promedio de 13 μm de longitud.

Experimento 6. Al igual que en el experimento 5, se observó que la concentración alta de O_3 fue la que menor fragmentación nuclear causó con valores promedio de longitud de cauda de 19 μm . En promedio las células expuestas a la concentración baja tuvieron un valor promedio de 21 μm de longitud de cauda, mientras que las expuestas a la concentración media tuvieron un valor promedio de 24 μm de longitud de cauda. No hubo diferencias estadísticas significativas.