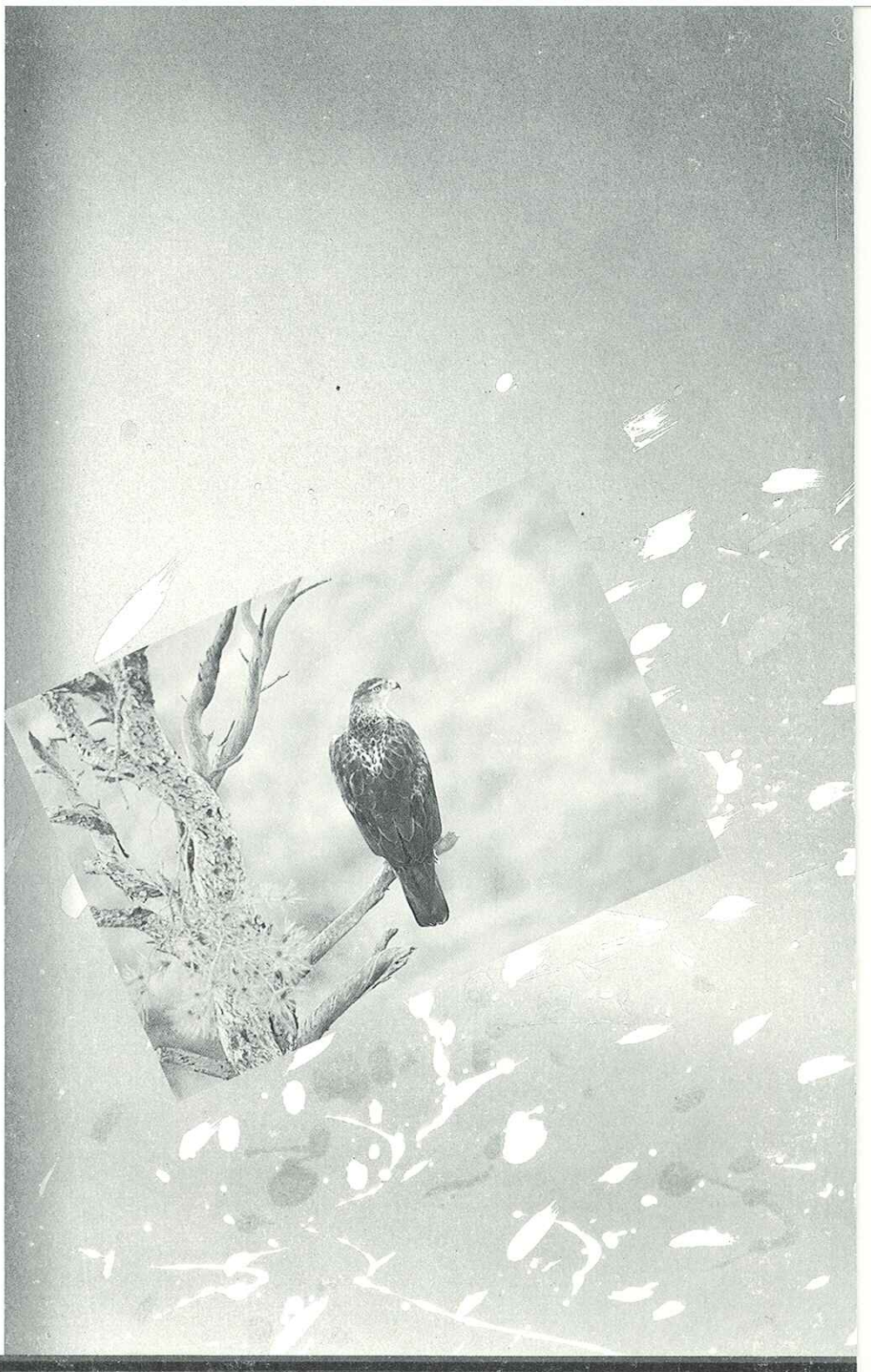


MEMORIAL



vol 2

SEPARATA
AÑO 1990

 GENERALITAT VALENCIANA
CONSELLERIA D'AGRICULTURA I PESCA

Dirección General de Política Forestal
y Pesquera

Servei Protecció i Recursos Naturals

VALÈNCIA

EFFECTO DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL SOBRE LAS SUPERFICIES FOLIARES DE *Pinus nigra* DE "ELS PORTS" (Castellón)

Isabel Picazo González*
Amparo Sanz Grau*

INTRODUCCIÓN

Los efectos negativos de la contaminación ambiental sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas se conocen desde hace muchos años: existen numerosas descripciones de principios de siglo de regiones devastadas en los alrededores de zonas altamente industrializadas (ASHMORE et al., 1988). Hasta hace poco tiempo estas regiones se encontraban localizadas en las cercanías de fuentes de contaminantes, por lo que era relativamente fácil establecer una relación causa-efecto. Puesto que la quema de combustibles fósiles y también de desechos industriales y urbanos se encuentran entre las principales fuentes de emisión de contaminantes a la atmósfera, el reconocimiento de este hecho y de su impacto sobre la vegetación circundante ha llevado a la tendencia a construir chimeneas cada vez más altas, con lo que en los últimos años nos encontramos con una contaminación a niveles más bajos pero más ampliamente distribuida. Los efectos de tales emisiones (contaminación crónica) son más difíciles de determinar y generalmente se producen a más largo plazo. En muchas ocasiones ya no existe una clara relación geográfica con las posibles fuentes de contaminación o con altos niveles de contaminantes, por lo que el diagnóstico se hace más difícil.

Por otra parte, los síntomas visuales que se presentan en la vegetación dañada (clorosis y necrosis foliares, cambios en la estructura y densidad de la copa de los árboles, fuerte pérdida de hojas, etc.) son de tipo inespecífico y pueden ser causados por diversos tipos de estrés.

Según BONNEAU (1988), se pueden establecer tres grandes grupos de factores que interactúan entre sí, dando lugar a los efectos observados:

*Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Ciencias Biológicas C/ Dr. Moliner, 50. 46100-Burjasot (Valencia)

- contaminación atmosférica.
- cuestiones climáticas, especialmente condiciones de sequía
- condiciones particulares del ecosistema, como tipo de suelo, etc.

Este autor señala que pueden ser convenientes medidas de tipo silvícola y de fertilización para optimizar el funcionamiento fisiológico de los árboles, de modo que puedan resistir mejor las condiciones externas adversas, en particular la contaminación, pero también la sequía o fríos intensos. Desgraciadamente, como indica COWLING (1988), "la incertidumbre científica sobre causa-efecto entre contaminantes ambientales y deterioro de los bosques está llevando a cierta reluctancia por parte de la industria y de los gobiernos para incrementar los esfuerzos de control de la contaminación, a pesar de los efectos mejor conocidos de muchos de estos contaminantes sobre la salud pública, la turbidez atmosférica, daños en materiales y acidificación de ecosistemas acuáticos".

Los óxidos de azufre y nitrógeno, junto con el ozono, se han descrito repetidamente como los principales causantes de daños en la vegetación. Los contaminantes pueden interactuar con los ecosistemas a través de la lluvia, nieve u otras formas de precipitación (contaminación húmeda) y también pueden depositarse en forma de partículas de diversos tamaños (contaminación seca), que es la forma mayoritaria en que se depositan el azufre y el nitrógeno. Además puede producirse también lo que se denomina contaminación oculta, que se refiere a la captura de agua de las nubes o la niebla por estructuras superficiales.

Tras la deposición en las superficies por cualquiera de las formas indicadas, los contaminantes pueden penetrar en las hojas a través de los estomas. Así, los factores que influyen en la apertura estomá-

tica (luz, humedad ambiental, temperatura, etc.) juegan un papel importante en la entrada de contaminantes en la planta. Estos intercambios están condicionados por diversos factores como la morfología de la hoja, la tensión superficial, la reactividad química, la permeabilidad cuticular, etc., por lo que resulta muy difícil determinar la dosis real de contaminante que perjudica a las plantas. En el caso de la contaminación húmeda, las gotas de agua pueden actuar no sólo como fuente de contaminantes sino que, por procesos de intercambio iónico, pueden también favorecer la salida de compuestos orgánicos e inorgánicos produciendo un lavado de elementos nutritivos y originando desequilibrios nutricionales.

TAMM y COWLING (1976) enumeraron los efectos fisiológicos de la contaminación húmeda (H_2SO_4 , HNO_3) o de depósitos secos acidificantes (SO_2 , NO_x) sobre la vegetación. Entre ellos cabe destacar:

1. Acción sobre las cutículas foliares causadas, bien por la erosión de la capa cerosa protectora, bien porque las gotas o partículas ácidas causan daños macro o microscópicos en las superficies celulares.
2. Interferencia con el funcionamiento de las células oclusivas. La turgencia de estas células está determinada por el pH citoplásmico, que puede ser modificado por las precipitaciones ácidas lo que a su vez produciría una disminución del control sobre la apertura estomática y sobre la tasa de transpiración y los intercambios gaseosos.
3. Daños en el metabolismo celular, que aunque no sean claramente manifiestos pueden llevar consigo modificaciones en la tasa fotosintética, respiratoria o de otros procesos metabólicos que se reflejan en modificaciones del crecimiento, disfunción del desarrollo e incluso senescencia prematura.
4. Alteración de la cantidad y calidad de los exudados foliares y radiculares, con posibles efectos secundarios sobre la microflora y microfauna de estas superficies.

Puesto que los contaminantes deben interactuar en primer lugar con las superficies sobre las que se depositan, de todos estos posibles efectos quizá sea la erosión de la cutícula el efecto primario que desencadena un mayor número de daños secundarios o indirectos (deficiencias nutricionales, dese-

quilibrios hídricos, aumento de la susceptibilidad a infecciones parasitarias, etc.), lo que conlleva, además, una interacción sinérgica de la contaminación con otros estreses ambientales.

El objetivo de este trabajo ha consistido en evaluar el posible impacto ambiental sobre la vegetación de la comarca de Els Ports. Se han puesto a punto las técnicas de microscopía electrónica de barrido que han permitido el estudio sistemático de las superficies foliares y, en particular las estomáticas, de acículas de pino. Se han realizado una comparación de las hojas muestreadas en esta zona de Castellón con hojas de árboles testigo de la provincia de Teruel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron superficies abaxiales y adaxiales de pequeños fragmentos foliares de la porción central de las acículas de *Pinus nigra* en un microscopio Jeol 25S del Servicio de Microscopía Electrónica

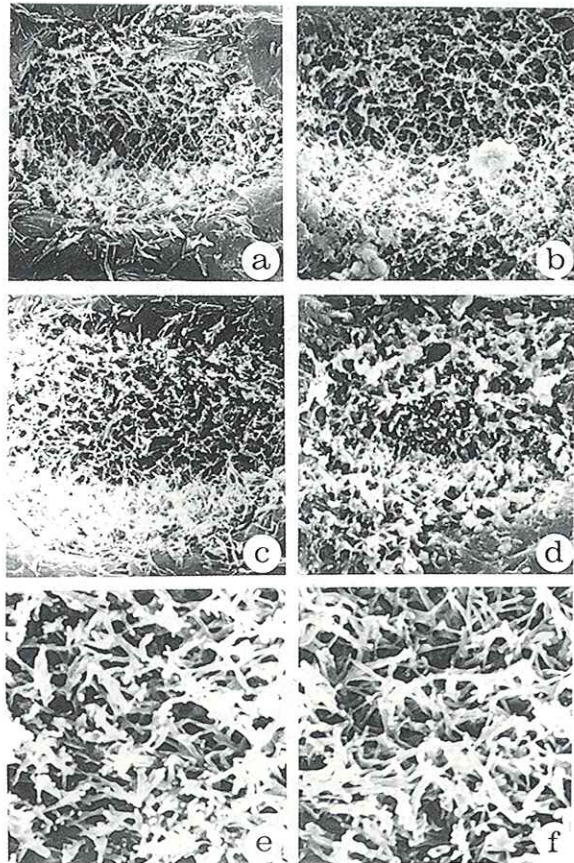


Fig. 1. Microfotografías electrónicas de aberturas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra*. Estadio I de degradación de las ceras: a, b, c y d, x3.500; e y f, x 12.250.

de la Universidad de Valencia. Para ello, las muestras, fijadas con glutaraldehído al 4% —método que menos modifica la estructura de las ceras superficiales (REED, 1982)—, fueron montadas en portas donde se recubrieron con una película de oro mediante un "ion sputter". Para estandarizar las observaciones, en todos los casos se estudiaron 30 estomas localizados en la zona central de cada uno de los fragmentos foliares.

La degradación de las ceras epistomáticas fue estimada mediante la escala arbitraria por SAUTER y VOß (1986), a la que se añadió un quinto nivel de erosión:

Estadio I. La estructura es cristalina o fibrilar, formando un retículo o malla (Fig. 1).

Estadio II. Se observa ligera fusión de las ceras tubulares, formando escamas o placas que no llegan a cubrir un tercio de la apertura estomática (Fig.2).

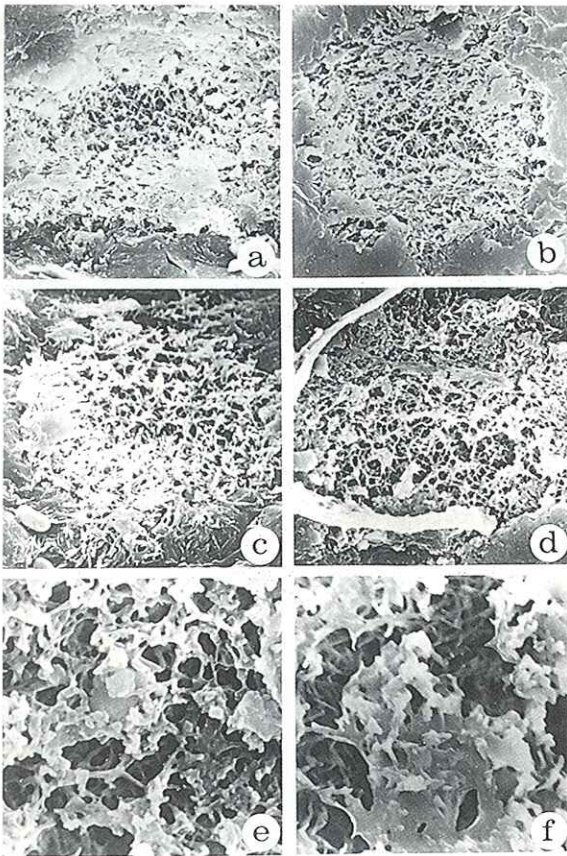


Fig. 2. Microfotografías electrónicas de aberturas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra*. Estadio II de degradación de las ceras: a, b, c y d, x 3.500; e y f, x 12.250.

Estadio III. Progresa la fusión de las ceras cristalinas y las placas cerasas llegan a tapar más de un tercio, pero menos de dos tercios de la superficie estomática. (Fig.3)

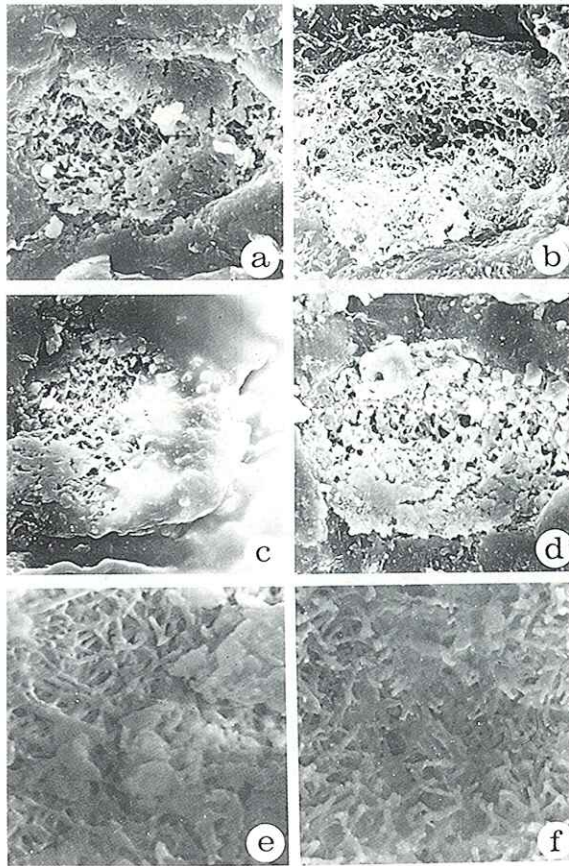


Fig. 3. Microfotografías electrónicas de aberturas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra*. Estadio III de degradación de las ceras: a, b, c y d, x 3.500; e y f, x 12.250.

Estadio IV. La cavidad epistomática queda totalmente obturada por un tapón céreo más o menos liso, formado por ceras amorfas. (Fig.4).

Estadio V. La cavidad epistomática pierde el tapón céreo que la obturaba (Fig.5)

Este tipo de escala, utilizada también por otros autores (CROSSLEY y FOWLER, 1986; TUOMISTO, 1988), se ha demostrado muy efectivo para la cuantificación de daños en superficies, superando a métodos como el análisis automatizado por medio de analizadores de imágenes dada la gran complejidad de las estructuras superficiales de las hojas y de los cambios que éstas sufren.

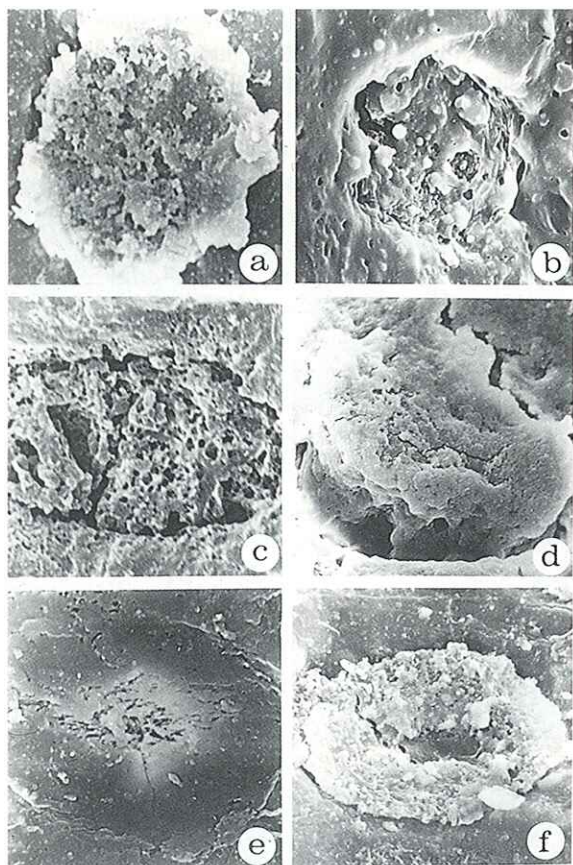


Fig. 4. Microfotografías electrónicas de aberturas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra*. Estadio IV de degradación de las ceras: a, b, c y d, e y f, x 3500.

RESULTADOS

Los estomas de *Pinus nigra* son estructuras hundidas en la epidermis foliar, con una cámara epistomática que protege al ostiolo de la intemperie y que, para cumplir mejor esta función, está rellena de ceras.

La observación detallada al microscopio electrónico de barrido muestra que estas ceras están constituidas por cristaloides en forma de varillas densamente entrecruzadas formando una malla a través de la cual se puede realizar el intercambio gaseoso, pero que a la vez, opone una resistencia que evita la pérdida excesiva de vapor de agua.

En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos al examinar la evolución de las ceras epistomáticas de acículas de árboles alejados de posibles focos de contaminación. Como se puede observar,

de los más de 500 estomas estudiados, en las acículas de un año, aproximadamente el 50 % de las cámaras epistomáticas no muestran síntomas de degradación (estadio I), el 40% presenta una fusión inicial de las varillas ceras (estadio II) y sólo el 10 % tiene fusionadas las ceras en una fase de erosión más avanzada, cubriendo más de un tercio de la superficie (estadio III). En las acículas de dos años, los estomas sin erosión aparente han desaparecido y los que muestran una fusión incipiente de las ceras

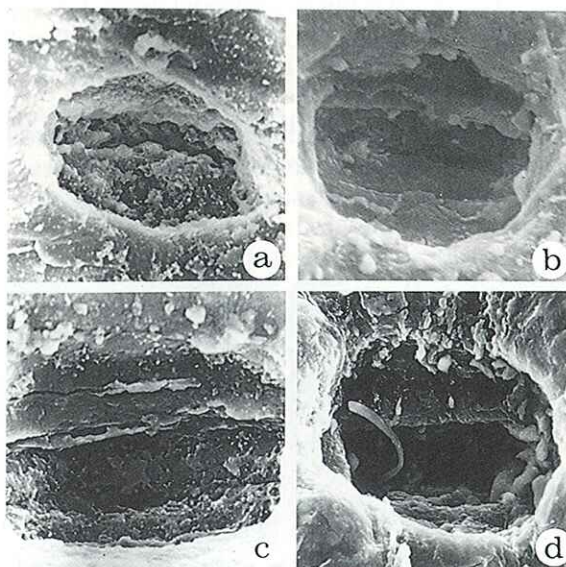


Fig. 5. Microfotografías electrónicas de aberturas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra*. Estadio V de degradación de las ceras: a, b, c y d, x 3.500.

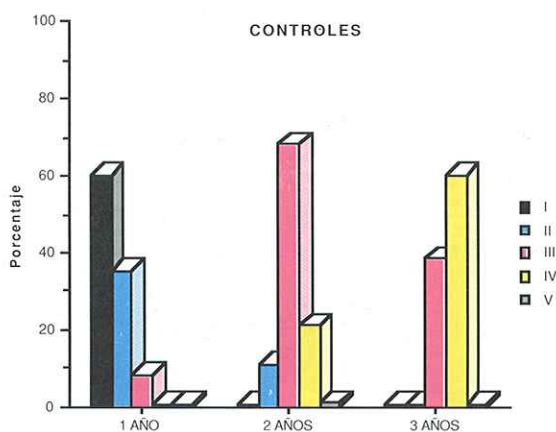


Fig. 6. Porcentajes de los distintos estados de degradación de las ceras según la edad de las hojas de *Pinus nigra*, tomadas de zonas control(Teruel).

(estadio II) representan sólo el 12 %. Los más frecuentes son aquellos en los que las placas ceras llegan a cubrir más de un tercio de la abertura estomática (estadio III, 65%) y se observa también un porcentaje importante de estomas totalmente obturados por una placa ceras (estadio IV, 23%). En el tercer año la frecuencia de estomas en esta fase de degradación aumenta hasta un 62%, mientras que el estadio III desciende al 38% y no aparecen estomas con estructuras ceras fibrilares.

Al realizar el análisis por separado de las superficies abaxial y adaxial de las acículas (Fig. 7), se observa un ligero —pero claro— mayor deterioro de las superficies adaxiales en los estadios más avanzados de degradación. Así, ya en las acículas de dos años, el estadio IV de degradación es del 38% en la superficie adaxial y sólo del 7% en la abaxial, lo que sugiere un mayor efecto ambiental sobre la superficie adaxial. No obstante, sería conveniente realizar una mayor exploración.

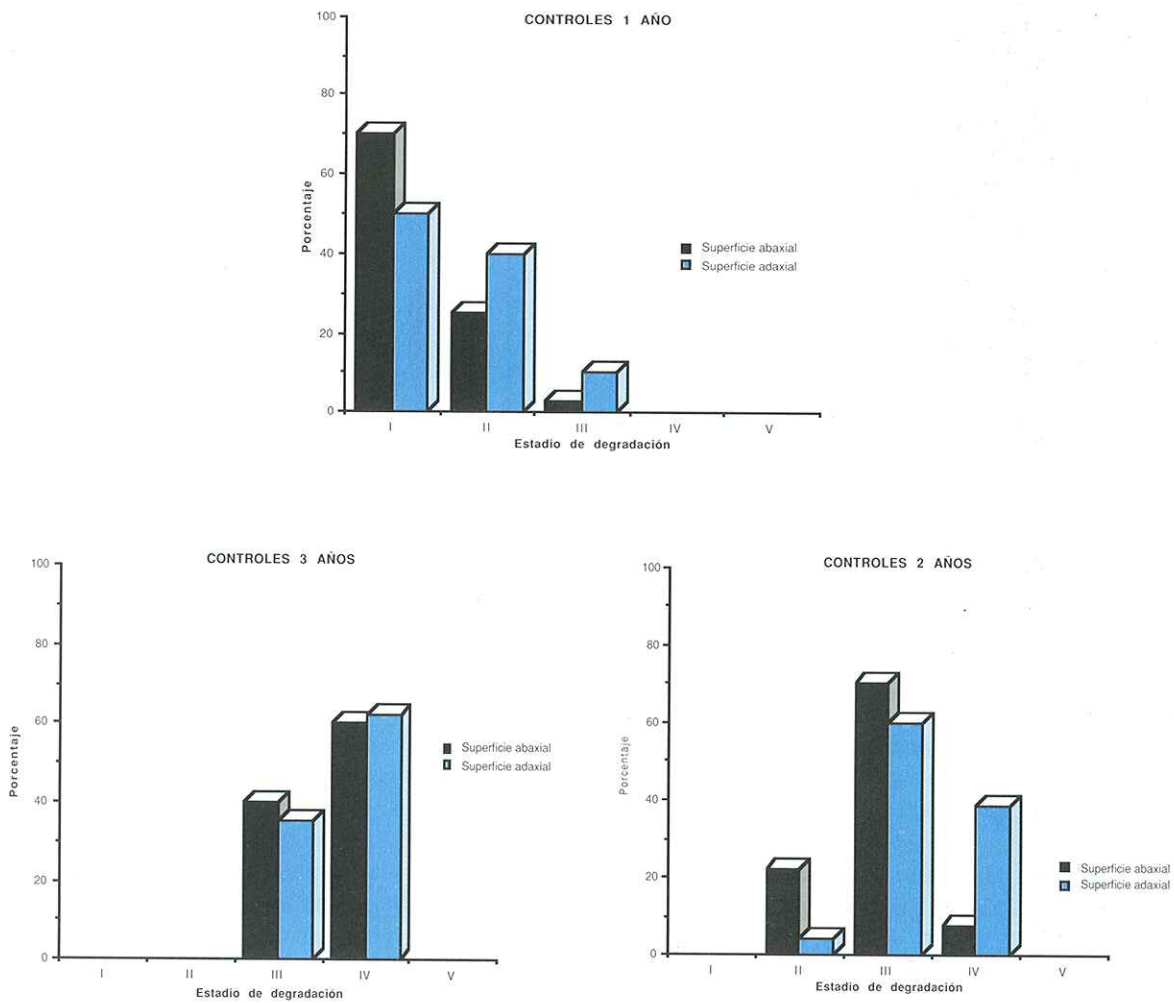


Fig. 7. Porcentajes de los distintos estados de degradación de las ceras epistomáticas en las superficies abaxial y adaxial en hojas de distinta edad de *Pinus nigra*, tomadas de zonas control(Teruel).

Cuando se estudió la degradación de las ceras epistomáticas en los distintos puntos de muestreo de la zona objeto de estudio (parcelas, 5, 32, 192, 202 y 224) observamos que, aunque no había alteraciones específicas, la pauta de aparición de los distin-

tos estadios de degradación se veía acelerada. En este sentido, en la figura 8 se puede comprobar que en ninguno de los lugares muestreados se observaron estomas sin erosión de ceras (estadio I) y ya en el primer año aparecen porcentajes nada despreciables de estomas totalmente obturados por las ceras fusionadas (estadio IV). Así mismo, en las acículas más viejas comienzan a ser observados estomas que han perdido la cubierta cérea, dejando libre la cavidad epistomática y desprotegido el ostiolo (estadio V). Cabe resaltar que en los puntos 192 y 202 sólo se pudieron muestrear acículas de hasta dos años por ausencia de más viejas, lo que no sorprende si observamos que en estos árboles las acículas de dos años ya presentaron estomas del estadio V.

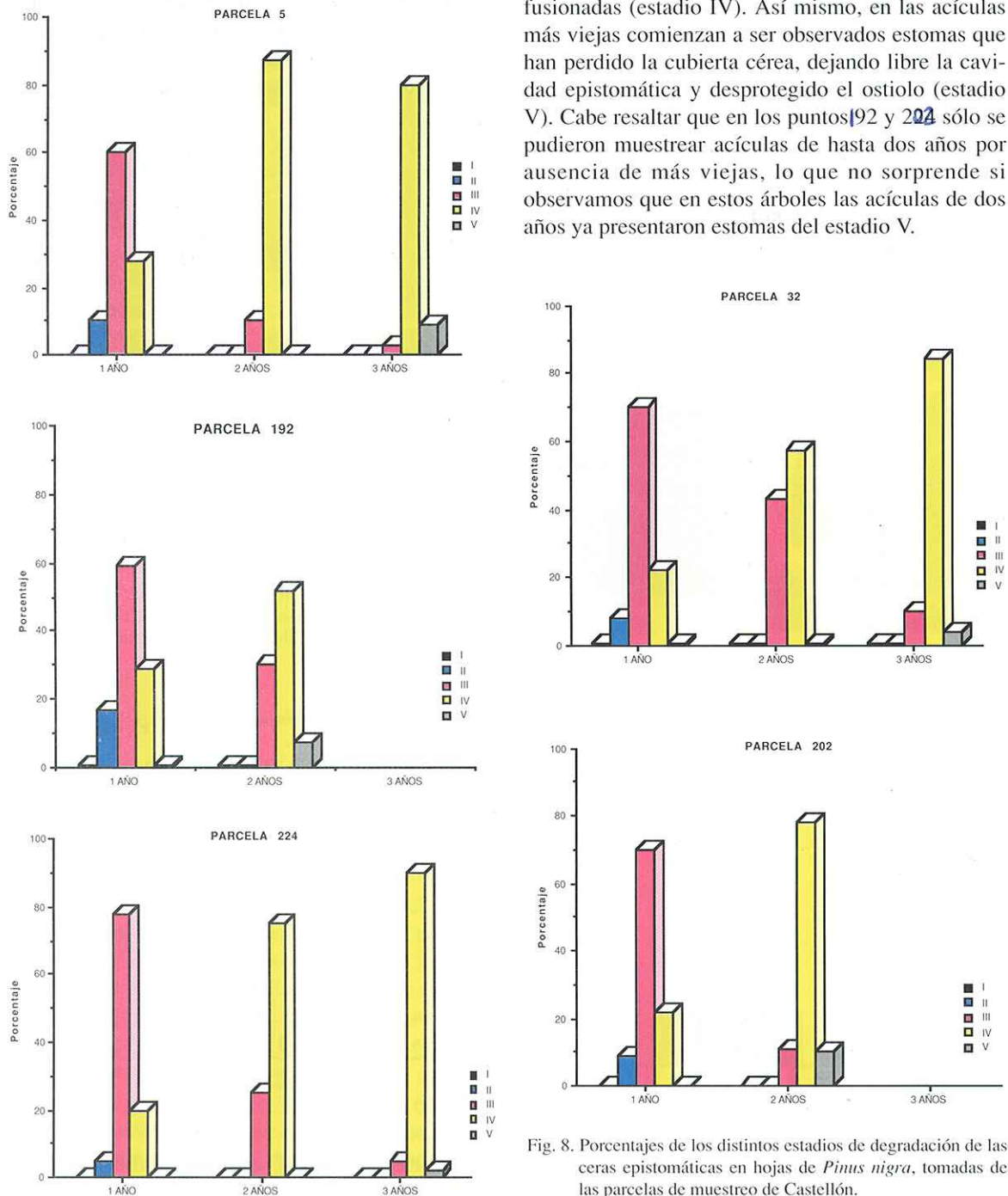


Fig. 8. Porcentajes de los distintos estadios de degradación de las ceras epistomáticas en hojas de *Pinus nigra*, tomadas de las parcelas de muestreo de Castellón.

Los resultados globales de los cinco puntos de muestreo (Fig. 9) revelaron que en las acículas de un año los estomas más frecuentes (67%) tenían obturada más de un tercio de la superficie de la cámara por placas de ceras fusionadas (estadio III), sólo el 9% correspondía a estomas con menos de un tercio de la superficie obstruída (estadio II) y, sin embargo, ya aparecía un 24% de estomas del estadio IV. En el segundo y tercer año la fusión y aglomeración de ceras fue aumentando progresivamente y es el estadio IV el más frecuente, llegando a representar el 71% para acículas de dos años y hasta el 87% en las de tres años. Paralelamente disminuyó el número de estomas que presentaba el estadio de degradación III hasta el 25% o el 8% respectivamente y aumentó del 3 al 6% el porcentaje de estomas desprovistos de ceras (estadio V).

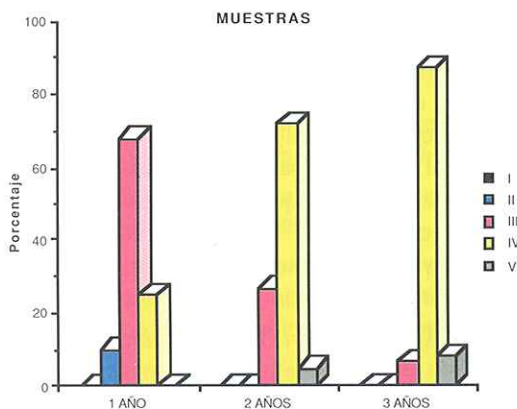


Fig. 9. Porcentajes de degradación de las ceras, según la edad de las hojas de *Pinus nigra*, tomadas de las parcelas de muestreo de Castellón.

DISCUSIÓN

Aunque de forma general se puede asumir que la morfología de las ceras epicuticulares está bajo control genético (BAKER, 1982), la configuración, el tamaño y la distribución de los cristales céreos puede verse modificado durante el crecimiento del vegetal, sobre todo por las condiciones ambientales en las que se desarrolla. En este sentido, existen numerosas experiencias que confirman el hecho de que manteniendo fijas algunas variables como edad de las hojas, época de muestreo, altitud de las zonas de muestreo, etc., en las coníferas la estructura original de las ceras es básicamente la misma y los

cambios son debidos principalmente a las condiciones ambientales (JEFFRE et al., 1976). Las ceras epicuticulares, al ser la capa más externa de las acículas, se van degradando progresivamente, degradación que es dependiente de la irradiación, la temperatura, de la climatología en general y también de los contaminantes del aire (FISH, 1972; CAPE y FOWLER, 1981; RIDING y PERCY, 1985; BAKER y HUNT, 1986).

La utilización de la microscopía electrónica de barrido ha permitido demostrar que son las ceras situadas en los alrededores y en el interior de las cavidades epistomáticas las que acusan en mayor grado los efectos del medio ambiente (GRILL y GOLOB, 1983; HUTTUNEN y LAINE, 1983; TUOMISTO, 1988). En este trabajo los resultados indican que el porcentaje de estomas con cámaras epistomáticas estructuralmente funcionales va disminuyendo con la edad de las acículas (Fig. 6), de forma que en las hojas de tres años no existen estomas representativos de los estadios I y II de degradación. Así mismo, el examen de las figuras 6 y 9 permite observar que la alteración estructural de las ceras epistomáticas es dependiente del lugar de muestreo y así, esta degradación es mucho más acusada en las acículas obtenidas de árboles que corresponden a zonas supuestamente afectadas por la contaminación ambiental. Resultados similares han sido publicados para otras especies de coníferas como *Picea abies* (KARHU y HUTTUNEN, 1986; BERNADINGER et al., 1988; TUOMISTO, 1988) o *Pinus sylvestris* (HUTTUNEN y LAINE, 1983; CROSSLEY y FOWLER, 1986).

La figura 7 muestra además que son las superficies adaxiales las más claramente afectadas, como ya ha sido sugerido por otros autores (SAUTER y VOB, 1986). Este aumento del número de estomas obturados lleva unida la aparición —aunque en baja proporción— de cavidades epistomáticas totalmente desprovistas de ceras (estadio V, fig. 5) en las que los estomas posiblemente habrían perdido la capacidad reguladora de la apertura estomática, disminuyendo la viabilidad de la acícula. Así vemos cómo en los lugares de muestreo 192 y 202 (Fig. 8), en que ya aparece este estadio de degradación en las acículas de dos años, no pudieron ser muestreadas acículas más viejas. La viabilidad de la antecámara estomática parece pues estar particularmente implicada en la longevidad de las acículas.

Estos resultados nos permiten sugerir, de acuerdo con otros autores, que la contaminación ambiental no produce daños específicos que permitan identificar de forma clara al agente contaminante responsable, pero sí origina una acusada aceleración de la degradación estructural de las ceras que se da durante el normal envejecimiento de las acículas.

La erosión de las ceras se produce principalmente como consecuencia de cambios en las propiedades físico-químicas de las ceras superficiales. Las estructuras tubulares observadas al microscopio electrónico de barrido parecen estar formadas por compuestos no polares tales como el alcohol secundario 10 nonacosanol en *Picea abies* y *Pinus cembra* (GÜNTHARD, 1985). La cuantificación mediante cromatografía en capa fina (CAPE, 1986) ha permitido constatar la disminución de alcoholes de cadena larga y cetonas, compuestos lípidos que se presentan en pequeña proporción respecto al total de ceras pero que parecen ser los responsables de la estructura tubular de las ceras. Las placas cerasas y las ceras amorfas son debidas, por el contrario, a un aumento en el contenido de alcoholes primarios y triterpenoides, respectivamente (BAKER, 1982).

La fusión de las fibrillas cerasas modifica el relieve de las superficies foliares y, por tanto, sus propiedades físicas. La disminución de rugosidad al ir desapareciendo las ceras tubulares y la formación de placas amorfas y lisas podría aumentar su humecta-

bilidad (RIDING y PERCY, 1985; TUOMISTO, 1988). En este sentido, CAPE et al. (1989) han sugerido que la rugosidad conferida por las ceras fibrilares y tubulares en el interior y rodeando a la cavidad epistomática puede formar pequeñas cámaras de aire atrapadas entre las gotas de agua, aumentando así la repulsión al agua de superficies que de por sí son ya hidrófobas. Cuando las superficies tubulares son erosionadas disminuye el ángulo de contacto (LEYTON y JUNIPER, 1963) hasta hacerse similar al de cutículas con pocas ceras (CAPE, 1983). Las gotas de agua de lluvia sobre las acículas jóvenes y sin erosionar estarían aisladas de la cutícula por las ceras epicuticulares, mientras que en las acículas erosionadas se formaría una fina película de agua sobre la superficie.

La principal cuestión radica en aclarar cuales son los factores que condicionan esta degradación de las ceras y, por tanto, el papel que desempeñarían los contaminantes del aire. En cualquier caso, la degradación estructural de las ceras epistomáticas observada y la consecuente oclusión mecánica de un número creciente de estomas de las acículas podría explicar, al menos en parte, los efectos de la contaminación sobre los bosques de *Pinus nigra* especialmente si se consideran las consecuencias fisiológicas negativas que se pueden producir —particularmente en interacción con otros estreses— a medida que aumenta la proporción de hojas deterioradas en el árbol.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer en primer lugar el uso de las instalaciones del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valencia, así como la ayuda prestada por D. Agustín Tato perteneciente a dicho Servicio.

A D. Juan Ferrer y a D. José M^a Peña por su desinteresado asesoramiento y ayuda en la búsqueda de los puntos de muestreo.

A D. Manuel Lluch y a D. Rodrigo González—Tomé por la ayuda en la toma y fijación de las muestras.

Y finalmente, a la Conselleria de Agricultura y Pesca de la Generalidad Valenciana sin cuya financiación no hubiera sido posible realizar este trabajo.

RESUMEN

Con la ayuda de la microscopía electrónica de barrido se han examinado las alteraciones que la contaminación ambiental puede ocasionar en las estructuras cerasas epistomáticas de acículas de *Pinus nigra* de "els Ports" (Castellón).

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de cámaras epistomáticas estructuralmente funcionales va disminuyendo con la edad de las acículas y que son las superficies adaxiales las más erosionadas. Asimismo, se ha podido comprobar que la alteración estructural de las ceras epistomáticas es mucho más acusada en las acículas obtenidas de árboles localizados en zonas afectadas por la contaminación ambiental.

SUMMARY

Possible alterations caused by air pollution in the wax structures of *Pinus nigra* needles, growing in "els Ports" location (Castellón), have been examined by scanning electron microscopy.

Our results show that the percentage of structurally functional epistomatic chambers decrease with needle age, being the adaxial surfaces preferentially eroded. Structural alterations of epistomatic waxes in needles from trees growing in this area are greatly enhanced in comparison to controls.

BIBLIOGRAFÍA

- ASHMORE MR, BELL JN, RUTTER AJ (1988) Effects of acid rain on trees and higher plants. En: Ashmore MR, Bell JN, Garretty C (eds.) *Acid rain and Britain's natural ecosystems*. Imperial College for Environmental Technology. pp 39-54.
- BAKER EA (1982) Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. En: Cutler DF, Alvin KL, Price CE (eds). *The plant cuticle*. Academic Press. pp 139-165.
- BAKER EA, Hunt GM (1986) Erosion of waxes from leaf surfaces by simulated acid rain. *New Phytol.*, 102: 161-173.
- BERNADINGER E, GRILL D, GOLOB P (1988) Influence of different air pollutants on the structure of needle wax of spruce (*Picea abies* (L.) Karsten). *Geojournal*, 17: 289-293.
- BONNEAU M (1988) Moyens preventifs et curatifs de lutte contre la pollution dans les ecosystemes terrestres, en particulier les forets. En: Mathy P (ed.) *Air pollution and ecosystems*. D. Reidel Publ. Co. pp 425-437.
- CAPE JN (1983) Contact angles of water droplets on needles of Scots pine (*Pinus sylvestris*) growing in polluted atmospheres. *New Phytol.*, 93: 293-299.
- CAPE JN (1986) Effects of air pollution on the chemistry of surface waxes of Scots pine. *Water, Air & Soil Pollut.* 31: 393-399.
- CAPE JN, FOWLER D (1981) Changes in epicuticular wax of *Pinus sylvestris* exposed to air pollution. *Silva Fenn.*, 15: 457-458.
- CAPE JN, PATERSON IS, WOLFENDEN J (1989) Regional variation in surface properties of Norway spruce and Scots pine needles in relation to forest decline. *Environ. Pollut.*, 58: 325-342.
- COWLING EB (1988) Ecosystems and their response to airborne chemicals: the current situation in North America and Europe. En: MATHY P (ed.). *Air pollution and ecosystems*. D. Reidel Publ. Co. pp 18-38.
- CROSSLEY A, FOWLER D (1986) The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air. *New Phytol.*, 103: 207-218.
- FISH BR (1972) Electrical generation of natural aerosols from vegetation. *Science* 175: 1239-1240
- GRILL D, GOLOB P (1983) SEM investigations of different dust depositions on the surface of coniferous needles and the effect on the needle-wax. *Aquilo, Ser. Bot.*, 19: 255-261.
- GÜNTHARD MS (1985) Entwicklung der Spaltöffnungen und der epicuticularen Wachsschicht bei *Pinus cembra* und *Picea abies*. *Botanica Helvetica*, 95: 125-137.
- HUTTUNEN S, LAINE K (1983) Effects of air-borne pollutants on the surface wax structure of *Pinus sylvestris* needles. *Ann Bot. Fennici*, 20: 79-86.
- JEFFRE CE, BAKER EA, HOLLOWAY PJ (1976) Origin of the fine structure of plant epicuticular waxes. En: Dickinson CH, Preece TF (eds.) *Microbiology of aerial plant surfaces*. pp 119-158.
- KARTHU M, HUTTUNEN S (1986) Erosion effects of air pollution on needle surfaces. *Water, Air & Soil Pollut.*, 31: 417-423.
- LEYTON L, JUNIPER BE (1963) Cuticle structure and water relations of pine needles. *Nature*, 198: 770-771.

- REED DW (1982) Wax alteration and extraction during electron microscopy preparation of leaf cuticles. En: Cutler DF, Alvin KL, Price CE (eds) *The plant cuticle*. Academic Press. pp 181-196.
- RIDING RT, PERCY KE (1985) Effects of SO₂ and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes on needles of *Pinus strobus* and *Pinus banksiana*. *New Phytol.*, 99: 555-563.
- SAUTER JJ, VOB J-V (1986) SEM observations on the structural degradation of epistomal waxes in *Picea abies* (L.) Karst. and its possible role in the "Fichtensterben". *Eur. J. For. Pathol.*, 16: 408-423.
- TAMM CO, COWLING EB (1976) Acidic precipitation and forest vegetation. *USDA For. Serv. Gen. Tech. Rep.*, NE-23, 845-855.
- TRESHOW M, ANDERSON FK (1989) *Plant stress from air pollution*. John Wiley and Sons. Ltd.
- TUOMISTO H (1988) Use of *Picea abies* needles as indicators of air pollution: epicuticular wax morphology. *Ann. Bot. Fennici*, 25: 351-364.