





Predicción *in vitro* del estrés de *Vallisneria americana* Michx. por enriquecimiento de iones amonio y nitrato

In vitro prediction of *Vallisneria americana* Michx. stress by enrichment of ammonium and nitrate ions

Violeta Ruiz-Carrera^{1*} ,
 Alberto J Sánchez¹ ,
 Wilfrido M Contreras-Sánchez¹ ,
 Miguel A Salcedo-Meza¹ 

¹División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas. CP. 86150. Villahermosa, Tabasco, México.

*Autor de correspondencia: violeta@ujat.mx

Artículo científico

Recibido: 05 de julio 2020

Aceptado: 14 de enero 2021

Como citar: Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ, Contreras-Sánchez WM, Salcedo-Meza MA (2020) Predicción *in vitro* del estrés de *Vallisneria americana* Michx. por enriquecimiento de iones amonio y nitrato. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* Núm. Esp. I: e2673. DOI: 10.19136/era.a8n1.2673

RESUMEN. El enriquecimiento de nutrientes es un factor de estrés involucrado en la declinación de vegetación sumergida. Sin embargo, la sensibilidad fisiológica o toxicológica de los genotipos varía debido a las interacciones microbióticas y el desbalance fisicoquímico del agua, las cuales han sido abordadas mediante una aproximación reduccionista y experimentos controlados. El objetivo del estudio fue evaluar, en un modelo de cultivo *in vitro* de *Vallisneria americana*, diferentes fuentes y concentraciones de N sobre la supervivencia y el crecimiento de hojas y raíces. Las plantas juveniles *in vitro* se expusieron a concentraciones de 500 a 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de N total con fuentes de NH_4 , NO_3 y $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ (1:1) en un diseño factorial 4 x 3, en evaluaciones de corto y mediano plazo. La supervivencia fue inversamente proporcional a los síntomas de clorosis, necrosis o ruptura de tejidos. La primera elongación foliar se midió con un método no destructivo. Mientras que a los 25 días, se cuantificó la longitud individual y promedio de hojas y raíces, número de hojas regeneradas y número de raíces. Las plantas no mostraron síntomas de vulnerabilidad. El NH_4 en todas sus concentraciones inhibió el crecimiento de los nueve parámetros analizados. En contraste, el $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ causó dos inhibiciones a nivel de hoja y el NO_3 estimuló todos los crecimientos de hojas y raíces. La predicción de crecimiento resulta prometedora para discriminar factores de estrés sobre la vegetación sumergida de los Pantanos de Centla.

Palabras clave: Cintilla, estrés *in vitro*, inhibición fisiológica, macrófita sumergida, N inorgánico.

ABSTRACT. Nutrient enrichment is an environmental stress factor involved in the decline of submerged vegetation. However, the physiological or toxicological sensitivity of the genotypes varies due to microbiotic interactions and physicochemical imbalance of water, which have been studied through a reductionist approach and controlled experiments. The objective of the study was to evaluate, in an *in vitro* culture model of *Vallisneria americana*, the increase of different sources and concentrations of N on the survival and growth of leaves and roots. Juvenile plants *in vitro* grew at concentrations of 500 to 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of total N with sources of NH_4 , NO_3 and $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ (1:1) in a factorial design 4 x 3, in short- and medium-term evaluations. Survival was inversely proportional to symptoms of chlorosis, necrosis, or tissue rupture. The first foliar elongation was measured with a non-destructive method. While at 25 days, the individual and average length of leaves and roots, number of regenerated leaves and number of total roots were quantified. The plants did not show symptoms of vulnerability. NH_4 in all its concentrations inhibited the growth of the nine parameters analyzed. In contrast, $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ caused two inhibitions at the leaf level and NO_3 stimulated leaf and root growth. The growth prediction proved promising to discriminate stress factors on the submerged vegetation of the Pantanos de Centla.

Key words: Watercelery, *in vitro* stress, physiological inhibition, submerged macrophyte, inorganic N.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los humedales fluviales en las planicies costeras del mundo registran alta concentración de nutrientes relacionadas con la eutrofización que provoca declinación o pérdida de macrófitas sumergidas enraizadas (Salk *et al.* 2018, Cruz-Ramírez *et al.* 2019). La explicación de los efectos de la eutrofización sobre esta vegetación se complica por estresores aditivos como salinidad, nutrientes, pH, oxígeno disuelto y luz, incluidos los parámetros reguladores como perifiton, fitoplancton, sólidos totales suspendidos y concentración de clorofila, y más reciente el incremento de CO₂ atmosférico que eleva la temperatura en los ecosistemas acuáticos (Moreno-Marín *et al.* 2018, Li *et al.* 2019, Tootoonchi *et al.* 2020). La drástica reducción de biomasa sumergida impacta en la provisión de alimento y de hábitat estructurados, lo que favorece la riqueza y dominancia de los productores primarios, así como los procesos biogeoquímicos asociados que influyen en la asimilación de nutrientes, la mejora en la calidad del agua y el incremento de fauna acuática (Yang *et al.* 2008, Kouamé *et al.* 2011, Lone *et al.* 2014). En consecuencia, el fenómeno de eutrofización altera el ciclo del nitrógeno y los procesos ecológicos de los sistemas acuáticos que benefician la dinámica de las especies nativas y la economía local, lo cual causa daños irreversibles a la calidad ambiental con los riesgos potenciales para la salud humana (Salcedo *et al.* 2012, Sánchez *et al.* 2012, Cruz-Ramírez *et al.* 2019). Adicionalmente, en la literatura prevalece la hipótesis que la pérdida de vegetación sumergida ha ocurrido por el enriquecimiento de N (Naiman y Dudgeon 2011, Le Moal *et al.* 2019). Este enriquecimiento ha sido principalmente asociado con los escurrimientos de áreas agropecuarias y la descarga de aguas residuales municipales con deficiente o nulo tratamiento (Cordovil *et al.* 2018).

La supervivencia y el crecimiento de macrófitas sumergidas enraizadas en experimentos de enriquecimiento de N en mesocosmos y campo presenta diferentes tipos y magnitudes de estrés por el estado redox de los iones N y las interferencias de

factores bióticos y abióticos implicados (Leoni *et al.* 2008, Zaman y Asaeda 2013, Gao *et al.* 2019). Las plantas adultas de *Vallisneria natans* (Lour.) H.Hara manifestaron estrés fisiológico en mesocosmos y estrés tóxico en campo en concentración moderada de N usando soluciones de NH₄Cl y NaNO₃, respectivamente (Cao *et al.* 2007, 2009). En contraste, *V. spinulosa* S. Z. Yan superó el estrés tóxico con suministro de NH₄NO₃ pero el crecimiento vegetativo fue inhibido (Zhao *et al.* 2016). Una alternativa experimental para sustentar hipótesis ambientales son las predicciones reduccionistas a escala *in vitro* (Ruiz-Carrera y Sánchez 2008, Teh *et al.* 2014, Bautista-Regil *et al.* 2016). Principalmente en la etapa juvenil, cuando decae el éxito reproductivo en campo (McFarland 2006) y la repoblación con germinados es poco exitosa (Schloesser y Manny 2007, Johnson *et al.* 2019) es imperativo definir el mecanismo fisiológico por el cual el enriquecimiento de N afecta el estado ecológico de las poblaciones de *V. americana* Michx. La condición aséptica inherente al cultivo *in vitro* favorece la exclusión de microorganismos que reducen NO₃ y oxidan NH₄ en el ambiente (Padgett y Leonard 1993), reducen los efectos individuales y combinados de los factores ambientales o nutricionales previamente señalados como causantes de la declinación de vegetación sumergida, y evitan la herbivoría involucrada en la pérdida de su potencial reproductivo (Balestri y Cinelli 2003).

En las poblaciones vegetales en proceso de declinación crítica con amplias variaciones locales y baja persistencia localizadas en Áreas Naturales Protegidas, como en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla (Sánchez *et al.* 2012), un problema a resolver es determinar el impacto directo del enriquecimiento de N con especies iónicas de NH₄ y NO₃ en la supervivencia o el crecimiento de *V. americana* de Pantanos de Centla. El objetivo de este estudio fue discriminar los efectos del enriquecimiento de las diferentes fuentes iónicas de N sobre la supervivencia de germinados y las respuestas de crecimiento de hojas y raíces mediante el uso de un modelo de cultivo *in vitro* de del ecotipo de *V. americana* (Ruiz-Carrera y Sánchez 2008). En

esta escala reduccionista, la hipótesis fue que el crecimiento de hojas y raíces de *V. americana* disminuye con incrementos de NH_4 y el co-suministro de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$, pero sin afectar la sobrevivencia. La hipótesis se resolvió mediante el registro de la supervivencia y los marcadores de elongación foliar, longitud individual y promedio de hojas y raíces, número de hojas regeneradas y número de raíces totales en dos evaluaciones experimentales *in vitro*, de corto y mediano plazo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ecotipo y preparación de semillas

La angiosperma sumergida enraizada *V. americana* (cintilla silvestre) de la familia Hydrocharitaceae es dominante en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla ($17^\circ 57' 53''$ y $18^\circ 39' 03''$ N, $92^\circ 06' 39''$ y $92^\circ 47' 58''$ O), que está localizada en la cuenca baja de los ríos Usumacinta y Grijalva. Las poblaciones de *V. americana* han registrado amplias variaciones en su abundancia y área de los parches, que han implicado su desaparición temporal en algunos sitios (Sánchez *et al.* 2012).

Los frutos de *V. americana* fueron recolectados en la Laguna de San Pedrito ($54^\circ 25' 50''$ N - $20^\circ 30' 63.2''$ O) en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla, para luego transportarlos al laboratorio a temperatura ambiente y sumergidos en agua de la laguna. La superficie longitudinal del fruto se cortó con bisturí para extraer las semillas y conservarlas en refrigeración a temperatura de $12 \pm 2^\circ\text{C}$ con el mucílago acompañante y con recambio diario de agua de la llave durante una semana.

Regeneración *in vitro*

Las plantas *in vitro* de *V. americana* se regeneraron de semillas asépticas en medio de cultivo de doble fase (columna de agua y soporte) sin N (Ruiz-Carrera y Sánchez 2008). En la asepsia de las semillas se usó 0.6% de NaClO durante 10 min y tres lavados de agua estéril. La fase de soporte y la fase acuosa presentaron una relación de 3.6:1 cm de altura. El soporte fue preparado con 4% de agar-agar y se esterilizó en tubo de ensayo (TE 25 x

150 mm) cubierto de papel aluminio. Un mililitro de la fase acuosa estéril se agregó al tubo con soporte de agar por medio de una jeringa desechable estéril. Máximo siete semillas asépticas fueron sembradas en la unidad bifásica de cultivo. El número de semillas fue variable por el inconveniente del tamaño pequeño, su elevada adherencia y para evitar su deshidratación durante transferencias prolongadas. Las plantas se regeneraron a $30 \pm 5^\circ\text{C}$ en un cuarto de crecimiento con 16 h de iluminación tenue (flujo de fotones de $1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad. En esta condición las plántulas desarrollaron raíces, lo que indicó en operación la fase de crecimiento autotrófico. El volumen original del medio acuoso fue sustituido y duplicado por medio acuoso nitrogenado cuando la primera hoja del brote alcanzó la interfase agua-aire. La fase acuosa se renovó usando los procedimientos de la condición de regeneración. Las soluciones con N se prepararon de estándares de NH_4Cl y NaNO_3 de 1 mg mL^{-1} . En la preparación de las dos fases y los estándares se utilizó agua dulce semidura reconstituida en agua desionizada cumpliendo con los parámetros de pH, conductividad y alcalinidad y de sales inorgánicas recomendados para bioensayos de organismos acuáticos (Eaton *et al.* 2000). El intervalo de pH inicial y final de cada una de las diferentes fases con N fueron de 7.2-7.8 y 7.8-8.4, sin registrar diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). La esterilización de materiales, solución de estándares y fases se realizó en autoclave a 121°C y 104 kPa por 15 min.

Evaluaciones de estrés

Las unidades de cultivo con plantas *in vitro* regeneradas en medio bifásico libre de N que mostraron adecuados desarrollos de hojas y raíces se seleccionaron para realizar las evaluaciones de enriquecimiento de N de corto y mediano plazo. Los efectos individuales e interactivos de la concentración de N y la fuente de N se analizaron en un experimento factorial aleatorizado (4×3). En la concentración de N se usaron niveles de 500, 1 000, 1 500 y 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ N Total (NT). Las fuentes de N fueron NH_4 , NO_3 y el co-suministro 1:1 de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$. El estrés tóxico se evaluó con síntomas que disminuyen la superviven-

cia, como la clorosis foliar, necrosis o ruptura de tejidos. El efecto de estrés fisiológico se estimó en la planta completa con cinco marcadores de crecimiento de hojas y cuatro de raíces.

A corto plazo se registró la elongación de la primera hoja emergida de cada individuo a 2, 5 y 8 días de cultivo, usando un método no destructivo, que consistió en marcar sobre la superficie del tubo la posición inicial y final de la hoja erguida de cada individuo usando diferentes colores hasta la interfase agua - aire de la columna de agua con N. La medición de elongación foliar se realizó con un vernier (precisión 0.05 mm). Las hojas curvadas durante el transcurso del experimento se descartaron, lo cual cambió el diseño experimental a un arreglo desbalanceado. Las mediciones de elongación foliar variaron de 4 a 13 por tratamiento en mínimo tres repeticiones de la unidad de cultivo. El bioensayo de mediano plazo inició a los 10 días de la primera evaluación y transcurridos 25 días se extrajo la planta completa, se colocó sobre una caja de Petri y el gel adherido a las raíces se separó de forma manual. Los parámetros de crecimiento registrados en las hojas (excluido el coleóptilo) fueron la longitud de la primera hoja (LH_1), longitud de la segunda hoja (LH_2), longitud foliar promedio ($LF = H_1 + H_2 / 2$) y el número de nuevas hojas $NH = (H_2 + H_3 + H_n)$. Mientras que las mediciones en las raíces fueron la longitud de la primera raíz (LR_1), longitud de la segunda raíz (LR_2), longitud promedio de raíces ($LR = R_1 + R_2 / 2$), y el número total de raíces ($TR = R_1 + R_2 + R_n$). Durante las dos evaluaciones experimentales, los cultivos permanecieron en un cuarto de crecimiento con $20 \mu\text{mol}$ de fotonos $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin modificar el resto de los parámetros ambientales usados en la germinación.

Análisis estadístico

En la elongación foliar se aplicó un ANOVA factorial para estimar los efectos de la fuente y concentración de N, y un ANOVA simple para el tiempo; mientras que los cambios en longitud y número de estructuras vegetales se determinaron con ANOVA o MANCOVA usando como covariable el número de germinados por unidad experimental (G). La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y la homo-

geneidad de varianzas de Cochran C se aplicaron a las variables y covariable. Con base en los resultados se usó la prueba de Kruskal-Wallis (H) para la LH_2 y las comparaciones post-hoc para la prueba de Fisher LSD ($p < 0.05$). Todos los datos se analizaron con el procedimiento de MGL del software Statistica (Statsoft 2007).

RESULTADOS

Las plantas juveniles sometidas a enriquecimiento de N en la columna de agua en concentraciones de 500 a 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ NT y fuentes de NH_4 , NO_3 y $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ crecieron *in vitro* mostrando fenotipos normales, por lo que se descartó el estrés tóxico visible. Los efectos significativos ($p = 0.0001$) se registraron para la elongación foliar por la fuente iónica de N, la concentración de N y su interacción (Tabla 1, Figura 1). La elongación de la primera hoja presentó un promedio bajo con NH_4 y alto con $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ y NO_3 ($p < 0.05$). Mientras que, la interacción provocó elongaciones menores ($p < 0.05$) en tres concentraciones de NH_4 (500, 1 500 y 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$), una de NO_3 (500 $\mu\text{g L}^{-1}$) y dos de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ (500 y 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$). La elongación foliar fue significativa en el curso del tiempo ($p = 0.0001$) y mantuvo ascenso constante con las tres fuentes de N ($p < 0.05$).

Tabla 1. Variación en la elongación foliar de *Vallisneria americana*. FN = fuente de N, CN = concentración de N, T = tiempo de cultivo. $^a = p < 0.0001$.

Modelo	Estimador	GL	Parámetro estadístico			
			SC	CM	F	P
ANOVA	FN	2	63	3.17	58.34	0.0001 ^a
	CN	3	1.5	0.5	9.19	0.0001 ^a
	FN x CN	6	2.2	0.37	6.75	0.0001 ^a
	Error	273	14.82	0.05		
ANOVA	Tiempo	2	7.23	3.63	57.05	0.0001 ^a
	Error	282	17.96	0.06		

A mediano plazo, el crecimiento en longitud y número de hojas o raíces fue afectado por la fuente iónica de N (Tabla 2, Figura 2) y la interacción con la concentración de N influyó en el TR (Tabla 2, Figura 3). Las variaciones de mayor significancia de los iones N fueron registradas en LF y LH_1 ($p < 0.0001$).

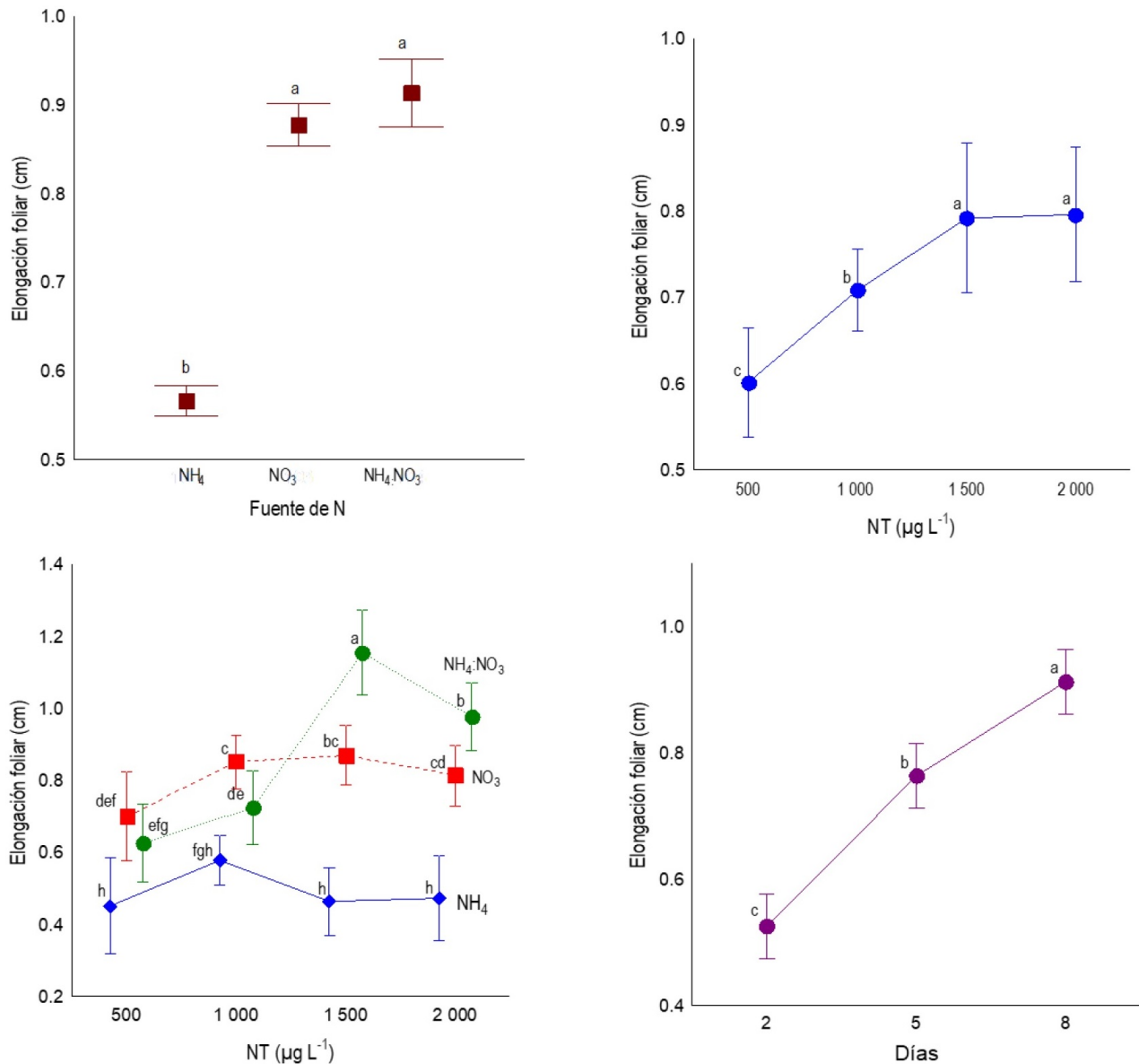


Figura 1. Evaluación a corto plazo: Elongación foliar de *Vallisneria americana*. a) Fuente de N, b) Concentración de N, c) Fuente de N x Concentración N y d) Tiempo de cultivo. Líneas verticales = promedios ± error estándar. Promedios con literales distintas muestran diferencias significativas (p < 0.05).

El NH₄, como fuente única de N en la columna de agua, produjo disminución en todos los parámetros de crecimiento de hojas y raíces; en cambio la fuente de NH₄:NO₃ benefició el crecimiento en magnitud similar a NO₃, excepto en la LH₂ y NH. Únicamente, la LR₁ fue similar estadísticamente entre las fuentes de N (p > 0.05). El ión NO₃ fue superior en el 90% de

los crecimientos estimados. Por la interacción de la fuente de N y concentración de N, el promedio de TR en 2 000 µg L⁻¹ de NH₄ fue el más bajo (p < 0.05) y los promedios más altos coincidieron en 500 y 1 500 µg L⁻¹ de NH₄ y las concentraciones de 500 a 2 000 µg L⁻¹ de NO₃ y NH₄:NO₃.

Tabla 2. Variación en el crecimiento de hojas y raíces de *Vallisneria americana* en la evaluación a mediano plazo. FN = Fuente de N, CN = Concentración de N, G = covariable (^c = p < 0.05, ^b = p < 0.001, ^a = p < 0.0001).

Tejido	Estimador (cm o No).	Factor(s)	Parámetros estadísticos				
			GL	SC	CM	F o H	p
Hojas	LF	FN	2	0.48	0.24	12.36	0.0003 ^b
		CN	3	0.08	0.03	1.40	0.271
		FN x CN	6	0.20	0.03	1.71	0.170
		Error	20	0.390	0.02		
	LH ₁	FN	2	2.37	1.19	23.25	0.0001 ^a
		CN	3	0.38	0.13	2.51	0.087
		FN x CN	6	0.64	0.11	2.086	0.1
		Error		1.02	0.05		
	LH ₂	FN	2(32)			6.65	0.036 ^c
		CN	3(32)			0.76	0.857
	NH	FN	2	0.96	0.48	4.36	0.027 ^c
		CN	3	0.16	0.05	0.47	0.704
		FN x CN	6	0.77	0.13	1.16	0.365
		Error	20	2.21	0.11		
Raíces	LR	FN	2	2.96	1.48	5.91	0.01 ^c
		CN	3	0.79	0.26	1.05	0.392
		FN x CN	6	1.64	0.27	1.09	0.401
		Error	20	5.02	0.25		
	LR ₁	G	1	1.70	1.70	5.34	0.01 ^c
		FN	2	2.96	1.48	4.64	0.053
		CN	3	0.75	0.25	0.78	0.518
		FN x CN	6	1.03	0.17	0.54	0.773
	LR ₂	Error	19	6.06	0.32		
		FN	2	3.30	1.65	7.55	0.004 ^b
		CN	3	0.30	0.10	0.46	0.711
		FN x CN	6	2.16	0.36	1.65	0.186
	TR	Error	20	4.36	0.22		
		FN	2	0.73	0.37	10.79	0.0007 ^b
		CN	3	0.07	0.02	0.71	0.557
		FN x CN	6	0.672	0.11	3.26	0.021 ^c
	Error	20	0.681	0.03			

DISCUSIÓN

En la predicción *in vitro*, el ecotipo local de *V. americana* presentó variación en el crecimiento con los diferentes niveles de enriquecimiento de NH₄, NO₃ y NH₄:NO₃ sin manifestar síntomas de estrés tóxico en etapa juvenil. En el caso del incremento de N de NH₄, la hipótesis se corroboró en el crecimiento de hojas y raíces con la inhibición de la elongación foliar y del brote completo. Estos resultados difieren con los hallazgos en campo de Cao *et al.* (2007), respecto a la mortalidad por estrés tóxico de *V. natans* por la amonificación en la columna de agua del sistema acuático, ya que, en el caso del sistema predictivo *in vitro*, las plantas de *V. americana* sobrevivieron frente al suministro de NH₄. En cambio, los resultados de Li *et al.* (2008) y Zhao *et al.* (2016) con *V. spi-*

nulosa y los experimentos de este estudio coincidieron con la ausencia de toxicidad bajo el enriquecimiento iónico de NH₄ y de inhibición del crecimiento vegetativo con NO₃. Las divergencias en las manifestaciones de estrés tóxico o fisiológico pueden ser atribuibles a los genotipos y a la condición ecológica general del ecosistema. El menor crecimiento foliar de *V. americana* en todas las concentraciones de NH₄ confirma los efectos deletéreos del enriquecimiento de N en la columna de agua, pero los factores aditivos del sedimento pueden causar mayor impacto (Gu *et al.* 2016). Como ejemplo, los procesos de amonificación y amoxidación en el sedimento, incluidas la nitrosificación y nitrificación, se han vinculado al aumento dramático de la concentración N en el agua, convertido en amoníaco, que propicia la invasión exógena de la bacteria *Escheri-*

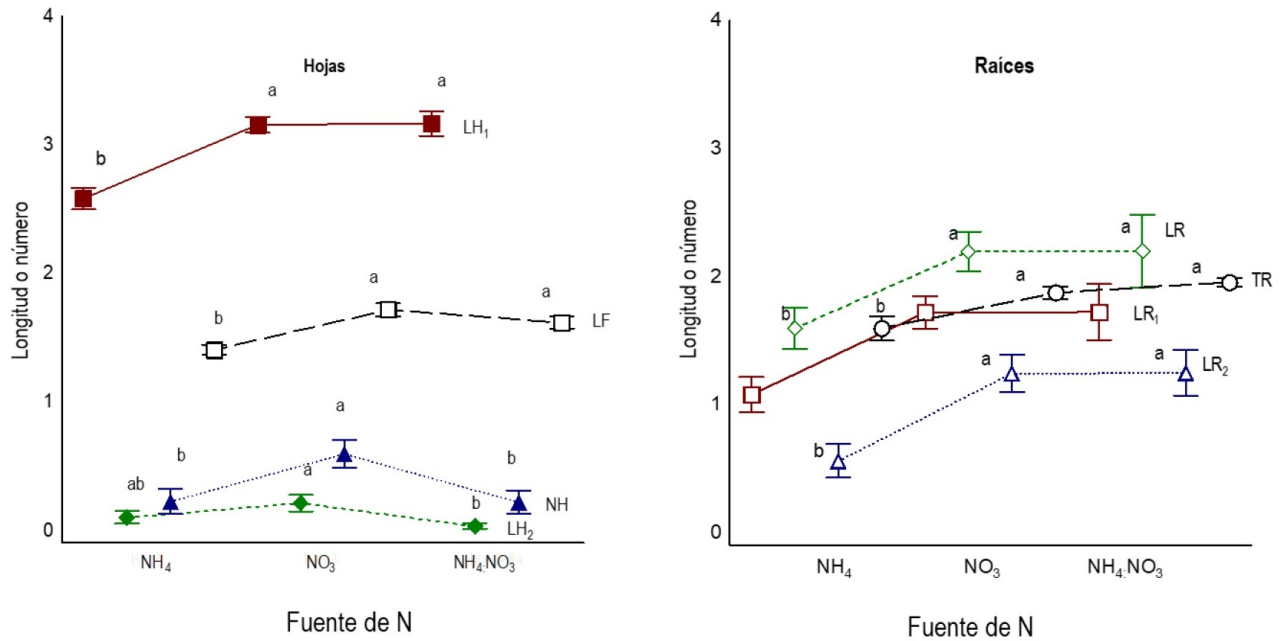


Figura 2. Evaluación a mediano plazo: Crecimiento de hojas y raíces de *Vallisneria americana* cultivada en ambientes enriquecidos con iones NH_4 , NO_3 y $\text{NH}_4:\text{NO}_3$. Líneas verticales = promedios \pm error estándar. Promedios con literales distintas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

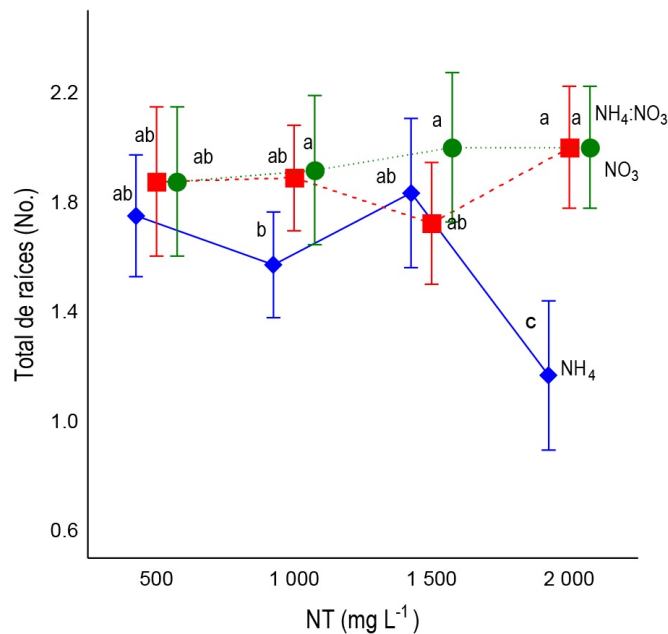


Figura 3. Evaluación a mediano plazo: Efecto combinado de la fuente de N y la concentración de N en el número de raíces totales de *Vallisneria americana*. Líneas verticales = promedios \pm error estándar. Promedios con literales distintas muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

chia coli en la vegetación sumergida de ecosistemas de agua dulce, así como el cambio significativo de la composición bacteriana en las biopelículas foliares y biopelículas de los sedimentos (Gu *et al.* 2020).

En el experimento de este estudio fue mayor el crecimiento de *V. americana* en concentración moderada de NH_4 en combinación con una proporción baja de NO_3 . Este efecto positivo en la elongación foliar y en el número de raíces con suministro de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ fue pronunciado en concentraciones mayores de N externo y fue sobresaliente con suministro único de NO_3 . Lo que contradice el paradigma de la preferencia nutricional de las hidrófitas que reconoce al NH_4 como la fuente principal de N (Cao *et al.* 2011, Piyant *et al.* 2011). Aunque, las preferencias aparentes por fuentes de N resultan complejas (Hachiya y Sakakibara 2017). Por lo que el sistema *in vitro* y el aislamiento de factores ambientales interferentes pueden considerarse propicios para el crecimiento de *V. americana* con enriquecimiento de N en la columna de agua. La respuesta de crecimiento con suministro de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ se explica porque estas dos especies iónicas de N se forman durante el ciclo estacional del humedal (Kronzucker *et al.* 1999, Brix *et al.* 2002, Romero *et al.* 2006). Pero, la preferencia que manifiestan las especies vegetales por una fuente de N necesita interpretaciones más profundas en sistemas ecológicos como los humedales, debido a la variabilidad estructural y espacio-temporal inherente a los ecosistemas (Britto *et al.* 2013, Hachiya y Sakakibara 2017).

En las evaluaciones *in vitro*, las concentraciones de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ de máxima elongación foliar registradas se mantuvieron entre 1 500 y 2 000 $\mu\text{g L}^{-1}$, las cuales son equivalentes a 54 μM (42 μM de NH_4 y 12 μM de NO_3) y 72 μM (56 μM de NH_4 y 16 μM de NO_3), respectivamente. Estas dos concentraciones de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ en magnitud micromolar contienen 3.5 veces más NH_4 en relación al NO_3 , por lo que el resultado obtenido se puede explicar por las mayores tasas de adquisición de N, debido a los iones NH_4 y NO_3 en las raíces de diversas especies acuáticas (Tylova-Munzarova *et al.* 2005). Mientras que en *Oryza sativa* fue sobresaliente la relación 3:1 de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ en función de la acumu-

lación de N (Duan *et al.* 2007). En la misma especie, el suministro 100 μM con una fuente dual de N fue sustancialmente mayor en la adquisición neta de N y la translocación a los brotes comparado con concentraciones equivalentes de NO_3 o NH_4 individuales (Kronzucker *et al.* 1999). El máximo crecimiento y rendimiento obtenido con la combinación de estas dos fuentes de N ha sido atribuido a la desregulación de la entrada y metabolismo de NH_4 por NO_3 (Kronzucker *et al.* 1999, Duan *et al.* 2007, Hachiya y Sakakibara 2017). Algunos mecanismos moleculares que explican la naturaleza sinérgica de los iones NH_4 y NO_3 en el crecimiento de las plantas fortalecen la interpretación del resultado obtenido con *V. americana* a corto y mediano plazo.

Por consiguiente, la elongación foliar a corto plazo y los marcadores de hojas y raíces a mediano plazo fueron predictores de estrés útiles para describir los impactos del enriquecimiento de N con fuentes de N oxidado y N reducido en el crecimiento de *V. americana*, tal como se reporta para monocotiledóneas terrestres (Bernstein *et al.* 1993, Rodríguez *et al.* 2004, Bultynck *et al.* 2004, Kavanová *et al.* 2006). La predicción reduccionista es útil para aplicaciones a estrés múltiple y como herramienta para regenerar o propagar angiospermas sumergidas encaminadas a acciones de repoblación y biomonitorio del estado ecológico del ecosistema (Ailstock *et al.* 2010, Zarranz *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

El crecimiento *in vitro* de plantas juveniles *V. americana* declinó principalmente por enriquecimiento de NH_4 , sin mostrar síntomas de estrés tóxico en las evaluaciones de corto y mediano plazo. Adicionalmente, se comprobó la hipótesis de inhibición en el crecimiento del brote completo con NH_4 y en la regeneración de hojas con $\text{NH}_4:\text{NO}_3$, pero sin discriminar la influencia de la concentración de N. En contraste, la elongación foliar y el número de raíces fueron marcadores sensibles al incremento de N, siendo menores en concentraciones altas de NH_4 similares a las registradas en condiciones eutróficas en ecosistemas acuáticos de agua dulce. El

conocimiento de estos efectos del enriquecimiento de N en la fisiología del crecimiento de *V. americana* ofrece una base de información bioecológica para re-

cuperar sus poblaciones a nivel global, en particular en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla.

LITERATURA CITADA

- Ailstock MS, Shafer D, Magoun AD (2010) Protocols for use of *Potamogeton perfoliatus* and *Ruppia maritima* seeds in large-scale restoration. *Restoration Ecology* 18: 560-573.
- Balestri E, Cinelli F (2003) Sexual reproductive success in *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany* 75: 21-32.
- Bautista-Regil J, Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ, Salcedo-Meza AM, Florido R (2016) Stress to microscale of *Vallisneria americana* by enrichment of nutrients with stoichiometry N:P. *Hidrobiológica* 26: 53- 60.
- Bernstein N, Läuchli A, Silk WK (1993). Kinematics and dynamics of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Leaf development at various Na/Ca salinities: I. Elongation growth. *Plant Physiology* 103:1107-1114.
- Brix H, Kirsten D, Lorenzen B (2002) Root-zone acidity and nitrogen source affects *Typha latifolia* L. growth and uptake kinetics of ammonium and nitrate. *Journal of Experimental Botany* 53: 2441-2450.
- Britto DT, Kronzucker HJ (2013) Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of Botany* 112: 957-963.
- Bultynck L, ter Steege MW, Schortemeyer M, Poot P, Lambers H (2004) From individual leaf elongation to whole shoot leaf area expansion; a comparison of three Aegilops and two Triticum species. *Annals of Botany* 94: 99-108.
- Cao T, Xie P, Ni L, Wu A, Zhang M, Wu S, Smolders AJP (2007) The role of NH₄⁺ toxicity in the decline of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* in lakes of the Yangtze River basin, China. *Marine and Freshwater Research* 58: 581-587.
- Cao T, Xie P, Li Z, Ni L, Zhang M, Xu J (2009) Physiological stress of high NH₄⁺ concentration in water column on the submersed macrophyte *Vallisneria natans* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 296-9
- Cao TE, Ni L, Xie P, Xu J, Zhang M (2011) Effects of moderate ammonium enrichment on three submersed macrophytes under contrasting light availability. *Freshwater Biology* 56: 1620-1629.
- Cordovil CMDS, Cruz S, Brito AG, Cameira MDR, Poulsen JR, Thodsen H, Kronvang B (2018) A simplified nitrogen assessment in Tagus River Basin: A management focused review. *Water* 10: 406. Doi: 10.3390/w10040406.
- Cruz-Ramírez AK, Salcedo MA, Sánchez AJ, Barba E, Mendoza JD (2019) Relationship among physicochemical conditions, chlorophyll-a concentration, and water level in a tropical river-floodplain system. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 3869-3876.
- Duan HY, Zhang LY, Ye TL, Fan RX, Xu HG, Shen RQ (2007) Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. *Annals of Botany* 99: 1153-1160.
- Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE (2000) Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Ed. American Public Health Association (APHA). Maryland. Joint Editorial Board. Washington D.C. 139p.
- Gao J, Ren P, Zhou Q, Zhang J (2019) Comparative studies of the response of sensitive and tolerant submerged macrophytes to high ammonium concentration stress. *Aquatic Toxicology* 211: 57-65.

- Gu J, Xu Z, Jin H, Ning X, He H, Yu J, Jeppesen E, Li K (2016) Response of *Vallisneria natans* to increasing nitrogen loading depends on sediment nutrient characteristics. *Water* 8: 563. Doi: 10.3390/w8120563.
- Gu L, Wu J, Hua Z, Chu K (2020) The response of nitrogen cycling and bacterial communities to *E. coli* invasion in aquatic environments with submerged vegetation. *Journal Environmental Management* 261, 110204. Doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110204.
- Hachiya T, Sakakibara H (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 68: 2501-2512.
- Johnson AJ, Orth RJ, Moore KA (2019) Herbivory regulates the establishment of a native species of submerged aquatic vegetation (SAV) in a tidal estuary of the USA. *Oecologia* 190: 639-650.
- Kavanová M, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Schnyder H (2006) Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiology* 141: 766-775.
- Kouamé MK, Diétoa MY, Edia EO, Da Costa SK, Ouattara A, Gouréne G (2011) Macroinvertebrate communities associated with macrophyte habitats in a tropical man-made lake (Lake Taabo, Côte d'Ivoire). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 400: 1-18.
- Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM, Kirk GJD (1999) Nitrate-ammonium synergism in rice: A subcellular analysis. *Plant Physiology* 119: 1041-1046.
- Le Moal M, Gascuel-Oudou C, Ménesguen A, Souchon Y, Étrillard C, Levain A, Pinay G (2019) Eutrophication: a new wine in an old bottle? *Science of the Total Environment* 651: 1-11. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.139.
- Leoni V, Pasqualini V, Pergent-Martini C, Vela A, Pergent G (2008) Morphological responses of *Posidonia oceanica* to experimental nutrient enrichment of the canopy water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 339: 1-14.
- Li W, Zhang Z, Jeppesen E (2008) The response of *Vallisneria spinulosa* (Hydrocharitaceae) to different loadings of ammonia and nitrate at moderate phosphorus concentration: a mesocosm approach. *Freshwater Biology* 53: 2321-2330.
- Li Y, He Q, Ma X, Wang H, Liu C, Yu D (2019) Plant traits interacting with sediment properties regulate sediment microbial composition under different aquatic DIC levels caused by rising atmospheric CO₂. *Plant and Soil* 445: 497-512.
- Lone PA, Bhardwaj AK, Shah KW (2014) Macrophytes as powerful natural tools for water quality improvement. *Research Journal of Botany* 9: 24-30.
- McFarland D (2006) Reproductive ecology of *Vallisneria americana* Michaux. SAV Technical Notes Collection (ERDC/TNSAV-06-04). Vicksburg, MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center. EE.UU. 27p.
- Moreno-Marín F, Brun FG, Pedersen MF (2018) Additive response to multiple environmental stressors in the seagrass *Zostera marina* L. *Limnology and Oceanography* 63: 1528-1544.
- Naiman RJ, Dudgeon D (2011) Global alteration of freshwaters: influences on human and environmental well-being. *Ecological Research* 26: 865-873
- Padgett EP, Leonard TR (1993) Contamination of ammonium-based solutions by nitrifying organisms and the conversion of ammonium to nitrate. *Plant Physiology* 307: 127-135.
- Piyanart S, Prasit W, Arunothai J (2011) Growth, morphology, ammonium uptake and nutrient allocation of *Myriophyllum brasiliense* Cambess, under high NH₄⁺ concentrations. *Ecotoxicology* 20: 2011-2018.

- Rodríguez AA, Córdoba RA, Ortega L, Taleisnik E (2004) Decreased reactive oxygen species concentration in the elongation zone contributes to the reduction in maize leaf growth under salinity. *Journal of Experimental Botany* 55: 1383-1390.
- Romero J, Lee KS, Pérez M, Mateo MA, Alcoverro T (2006) Nutrient dynamic in seagrass ecosystems. In: Larkum AWD, Orth RJ, Duarte C (eds) *Biology, Ecology and Conservation Seagrasses*. Springer Netherlands. Holland. pp: 159-192.
- Ruiz-Carrera V, Sánchez AJ (2008) Development of a model for *in vitro* culture of *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y Ciencia* 24: 205-218.
- Salcedo MA, AJ Sánchez, de la Lanza G, Kampichler C, R Florido (2012) Condición ecológica del humedal tropical Pantanos de Centla. In: Sánchez AJ, Chiappa-Carrara X, Brito PR (eds) *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste Volumen II. CONCYTEY*. Mérida. México. 1096p.
- Salk KR, Bullerjahn GS, McKay RML, Chaffin JD, Ostrom NE (2018) Nitrogen cycling in Sandusky, Bay Lake Erie: oscillations between strong and weak export and implications for harmful algal blooms. *Biogeosciences* 15: 2891-2907.
- Sánchez AJ, Florido R, Salcedo MA, Ruiz-Carrera V, Montalvo-Urgel H, Raz-Guzman A (2012) Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. in a tropical wetland, Southern Gulf of Mexico. In: Mahamane A (ed) *Ecosystems I*. InTech. Rijeka, Croatia. pp: 1-26.
- Schloesser DW, Manny BA (2007) Restoration of Wildcelery, *Vallisneria americana* Michx., in the Lower Detroit River of the Lake Huron-Lake Erie Corridor. *Journal of Great Lakes Research* 33: 8-19.
- Teh CY, Mahmood M, Shaharuddin NA, Ho CL (2014) *In vitro* rice shoot apices as simple model to study the effect of NaCl and the potential of exogenous proline and glutathione in mitigating salinity stress. *Plant Growth Regulation* 75: 771-781.
- Tootoonchi M, Gettys LA, Thayer KL, Markovich IJ, Sigmon JW, Sadeghibaniani S (2020) Ecotypes of aquatic plant *Vallisneria americana* tolerate different salinity concentrations. *Diversity* 12: 65. Doi: 10.3390/d12020065.
- Tylova-Munzarova E, Lorenzen B, Brix H, Votrubova O (2005) The effects of NH_4^+ and NO_3^- on growth, resource allocation and nitrogen uptake kinetics of *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. *Aquatic Botany* 81: 326-342.
- Yang X, Wu X, Hao H, He Z (2008) Mechanisms and assessment of water eutrophication. *Journal of Zhejiang University Science B* 9: 197-209.
- Zaman T, Asaeda T (2013) Effects of $\text{NH}_4\text{-N}$ concentrations and gradient redox level on growth and allied biochemical parameters of *Elodea nuttallii* (Planch.). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 208: 211-219.
- Zarranz ME, González-Henríquez N, García-Jiménez P, Robaina RR (2010) Restoration of *Cymodocea nodosa* seagrass meadows through seed propagation: germination *in vitro*, seedling culture and field transplants. *Botanica Marina* 53: 173-181.
- Zhao S, Yin L, Chang F, Olsen S, Søndergaard M, Jeppesen E, Li W (2016) Response of *Vallisneria spinulosa* (Hydrocharitaceae) to contrasting nitrogen loadings in controlled lake mesocosms. *Hydrobiologia* 766: 215-223.