



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco



División Académica de Ciencias Biológicas

**Estrés fisiológico microclonal de *Vallisneria americana* por la
variación ambiental C/N/P**

Tesis

**Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Ambientales**

Presenta

Biol. Jesús Bautista Regil

Directora

Dra. Violeta Ruiz Carrera

Co-Director

Dr. Alberto J. Sánchez Martínez

Villahermosa, Tabasco

2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION



JUNIO 09 DE 2017

C. JESÚS BAUTISTA REGIL
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **“ESTRÉS FISIOLÓGICO MICROCLONAL DE *Vallisneria americana* POR LA VARIACIÓN AMBIENTAL C/N/P”**, asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrea y Dr. Alberto de Jesús Sánchez Martínez, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Miguel Ángel Salcedo Meza, MIA. Jesús Manuel Carrera Velueta, Dra. Violeta Ruiz Carrea, Dr. Nicolás Álvarez Pliego y M. en C. Rosa Amanda Florido Araujo.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

CARTA AUTORIZACIÓN

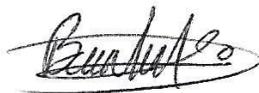
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“ESTRÉS FISIOLÓGICO MICROCLONAL DE *Vallisneria americana* POR LA VARIACIÓN AMBIENTAL C/N/P”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 09 de Junio de 2017.

AUTORIZO



JESÚS BAUTISTA REGIL

Dedicatoria

La divinidad se ha manifestado ante mí, en forma de padres Iturbide de la Cruz Alamilla y Rosa Regil Suárez; abuelos Isabelino, Tila, Manuel y victoria, tías Cleotilde y María del Carmen; hermanos Alexander de la Cruz Regil y Avril Isabel de la cruz Regil y amigos auténticos.

A ellos dedico el presente esfuerzo con mucho cariño.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Agradecimientos

A mi casa de estudios, la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), por el recurso económico otorgado a los egresados por medio del Programa Institucional de Superación Académica (PISA) 2015; por el apoyo y patrocinio para la elaboración de la presente tesis que formó parte del proyecto de investigación *Flavonoides en Vallisneria americana como biomarcadores de estrés por eutrofización* (Clave UJAT-2014-1A-09) y por el apoyo con gastos de traslado para mi estancia en Córdoba, España, con el proyecto *Fortalecimiento de la maestría en ciencias ambientales para su permanencia en el padrón nacional de posgrados de calidad del CONACYT* (Clave: TAB-2014-C01-245836 aportación CONACYT).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca de manutención que me dio la oportunidad de perseverar para obtener el grado de maestría.

De particular importancia a la Dra. Violeta Ruiz Carrera quien se ha convertido para mí en excelente referente para la vida profesional y personal. Agradezco su confianza, paciencia, esfuerzo y consejos que me han servido para materializar este logro profesional.

A los Doctores Alberto J. Sánchez Martínez y Miguel Ángel Salcedo Meza por sus constantes ánimos para seguir dedicándome a la ciencia y sus valiosas intervenciones en mi trabajo de investigación.

Al Comité Sinodal, quienes le dieron valor agregado desde sus intervenciones en las presentaciones tutoriales hasta sus valiosas sugerencias en la escritura de la tesis.

Al Dr. Emilio Fernández Reyes, quien además de aceptar mi estancia académica en el Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad de Córdoba. España, puso a disposición el laboratorio y equipo de investigación. Gracias por su interés para llevar a cabo mi investigación.

Al Cuerpo Académico *Diagnóstico y Manejo de Humedales Tropicales* que se mantuvo atento y mostró disposición de apoyo a los requerimientos de esta investigación.

A los laboratorios de Bioquímica y Genómica que por mantener activa la productividad institucional sostuvimos cooperación mutua y formamos importantes lazos de amistad.

A mis compañeros de laboratorio de Biotecnología, porque además de la colaboración profesional hicieron amenos los momentos de convivencia durante mis estudios de posgrado. De manera muy especial a Geni, Daniel y Jorge que me ayudaron desde el principio hasta el final de este proyecto. A quienes llegaron después y aportaron ayuda valiosa en mis experimentos y han ganado mi aprecio a Fabiola, José, Eloísa, Isidro, Wendy, Sara y Quetzally, Juan y Susan.

A mis amistades valiosas, a los que agradezco sus constantes ánimos dentro y fuera de la universidad. Por discreción omitiré sus nombres.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE

	Pag.
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	11
MÉTODO.....	13
<i>Colecta y manejo de material vegetal</i>	13
<i>Germinación aséptica.</i>	13
<i>Preparación de medio de cultivo y soluciones concentradas</i>	14
<i>Pre-acondicionamiento de la plantas</i>	14
<i>Crecimiento clonal</i>	14
<i>Evaluación experimental</i>	14
<i>Mediciones fisiológicas y fisicoquímicas</i>	16
<i>Análisis estadístico</i>	17
RESULTADOS.....	19
<i>Sobrevivencia</i>	19
<i>Crecimiento clonal</i>	22
<i>Parametros fisicoquimicos y fisiologicos por tratamientos.</i>	25
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS.....	38
ANEXOS: <i>Gráficas de residuos</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
<i>Tabla 1. Combinación entre los niveles de N/P y C (a) y codificación de las variables naturales N: P y C (b).</i>	16
<i>Tabla 2. Supervivencia de Vallisneria americana. Comparación estadística entre grupos de plantas madre PM1 y PM2 y fuentes de NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄ a través del tiempo.....</i>	19
<i>Tabla 3. Significancia y parámetros de los modelos de regresión mejorados para la supervivencia.</i>	20
<i>Tabla 4. Pérdida y ganancia de Unidades de Crecimiento de Vallisneria americana. Comparación estadística entre grupos de plantas madre PM1 y PM2 y Fuentes de NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄ a través del tiempo</i>	22
<i>Tabla 5. Significancia y parámetros de los modelos de regresión mejorados para la pérdida y ganancia de unidades de crecimiento.</i>	23
<i>Tabla 6. Comparación por tratamientos de N/P: C de la supervivencia, ganancia de unidades de crecimientos de Vallisneria americana y fisicoquímicos de los nutrientes agotados en los suministros de NO₃, NH₄, NO₃:NH₄.</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de sobrevivencia de *Vallisneria americana*. a) grupos de plantas madre PM1 y PM2 y b) Fuentes de NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 19

Figura 2. Superficies de respuesta de la sobrevivencia de *V. americana* por la relación N/P y concentración de C en fuentes NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 21

Figura 3. Cinética de pérdida y ganancia de unidades de crecimiento (UC) en las plantas de *V. americana*. a) plantas madre PM1 y PM2 y b) fuentes de N. 23

Figura 4. Superficies de respuestas de pérdida y ganancia de unidades de crecimiento (UC) de *V. americana* por la relación N/P y concentración de C en fuentes NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 24

Figura 5. pH por tratamiento N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$)..... 26

Figura 6. Eh por tratamiento N/P:C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$)..... 27

Figura 7. OD por tratamiento N/P: C en las fuentes N. (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). 27

Figura 8. STD por tratamiento N/P: C en las fuentes N. (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). ... 28

Figura 9. Sobrevivencia y ganancia de unidades de crecimiento por tratamiento N/P: C..... 29

Introducción

Justificación

Objetivos

Proverbios 8.

¹⁰ Adquiere mi disciplina antes que el dinero, elijan la ciencia y no el oro.

¹¹ La sabiduría es más útil que las perlas, ¿Qué tesoros podrían pagarla?

¹² Yo la sabiduría, convivo con el buen juicio y tengo la llave de la ingeniosidad.



*Parece más sabio asumir lo peor desde el principio
y dejar que lo mejor llegue como una sorpresa. Julio Verne*

INTRODUCCIÓN

La cantidad de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) en los ecosistemas acuáticos ha incrementado por la eutrofización acelerada. En particular, el N es el protagonista de muchas hipótesis que explican la declinación de poblaciones de vegetación sumergida (VS) en los ecosistemas eutrofizados (Ghaly y Ramakrishnan, 2015). Entre las hipótesis ecológicas que sustentan el fenómeno de estrés de la VS por eutrofización destaca la acidificación del agua, el enriquecimiento de nutrientes y/o de N, la toxicidad de NH_4 y en menor medida de NO_3 , el desbalance de la relación N/P y entre otras se menciona el enriquecimiento de P (Lambert y Davy, 2011; Bautista-Regil *et al.*, 2016), así como el estrés oxidativo que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y de N (RNS) (Zhang *et al.*, 2010; Steffens *et al.*, 2013). Pero las hipótesis requieren comprobación científica frente a los efectos actuales y futuros del cambio climático, puesto que puede potencializar los efectos de la eutrofización sobre la VS representativa de los ecosistemas tropicales costeros.

El cambio climático, señalado como uno de los principales factores responsables de la pérdida actual de biodiversidad (Harley, 2011; Alaa y Zaki, 2010) presenta en los ecosistemas acuáticos eventos climáticos extremos que tienden a incrementar en intensidad y frecuencia, lo cual dificulta la planificación para enfrentarlos (IPPC, 2014). Por el cambio climático se ha elevado la concentración global promedio de CO_2 que supera los 360 ppm, que sin reducción de emisiones de CO_2 , puede alcanzar 450 ppm en el 2040 y exceder 700 ppm en el 2100, lo que conduce a un mayor incremento de su concentración en aguas superficiales (Houghton *et al.*, 1996) y amenaza los procesos biogeoquímicos resilientes del ambiente acuático (Hasler *et al.*, 2016)

En la actualidad, los ciclos biogeoquímicos de N y C son los más alterados globalmente (Suddick *et al.*, 2013; Duckworth *et al.*, 2016; Tanner *et al.*, 2016). En el medio acuático las formas iónicas de N más abundantes se encuentran entre la gama de valencias de -3 (NH_4) a +5 (NO_3) (Van de Wal, 2007; Andrews *et al.*, 2013) o forman RNS en el sistema biológico (Henssen, 2013). Los iones de NH_4 y

NO_3 son los nutrientes usados por la VS en diferentes preferencias y proporciones, de tal forma que el incremento de N las afecta de varias maneras (Köln *et al.*, 2007). El impacto del N sobre organismos depende de factores como el tiempo de exposición, la cantidad, la sensibilidad de la especie, la forma nitrogenada y además de la biodisponibilidad de otros elementos como el P y C.

El ciclo biogeoquímico de C impacta en la ecología de sistemas (Matveev y Robson, 2014). Así, el incremento en la disponibilidad de C por el cambio climático tiene implicaciones puntuales en la salud del ecosistema y las actividades humanas. La presión selectiva por la mayor disponibilidad de CO_2 en ambientes acuáticos ha desarrollado el mecanismo de absorción de HCO_3 en muchas especies de VS. Este mecanismo se ha catalogado como un factor determinante en el crecimiento, competitividad y composición de las comunidades. El impacto de la mayoría de las variables del cambio climático es más similar dentro de las comunidades de plantas sumergidas, marinas o de agua dulces, que entre sumergidas vs comunidades de plantas emergentes. Sin embargo, son las sumergidas las que han recibido los impactos de N sobre la transparencia del agua y de un modo bastante diferenciado entre especies y ecotipos.

A causa del cambio climático, el debate respecto a las variaciones e intensidad de las fuentes de NO_3 y NH_4 en la respuesta de estrés se ha centrado en explicar la influencia de la sinergia C/N/P sobre la variabilidad adaptativa entre especies y ecotipos, hasta ahora desconocidas (Xing *et al.*, 2015; Malyshev *et al.*, 2016). Debido a la alta variación intraespecífica vs interespecífica de las plantas se ha enfatizado la importancia de incluir ambas variabilidades en las hipótesis ecológicas (Luo *et al.*, 2010), así como en las aplicaciones prácticas que atañen a la biodiversidad y a la conservación y recuperación de vegetación funcional en los ecosistemas acuáticos impactados.

Vallisneria americana Michx. (Hydrocharitaceae) es una especie herbácea perenne, integrante de la VS típica de la zona costera del Continente Americano (Novelo, 2006). Sus poblaciones colonizan comúnmente sedimentos suaves de aguas poco profundas de energía baja a moderada (Copertino *et al.*, 2016). La

especie es una monocotiledónea enraizada, de hábitat preferencial limnético y con tolerancia al estuarino (Lowden, 1982; Novelo, 2006). Esta angiosperma acuática es una representante del metabolismo fotosintético CAM; sin embargo presenta los mecanismos de asimilación de CO_2 y HCO_3^- en función del pH ambiental (Nishihara y Ackerman, 2007). Por ejemplo, en agua dulce de alcalinidad baja, la VS tiene mayor acceso al CO_2 disuelto.

Las plantas acuáticas CAM habitan en cuerpos de agua someros moderadamente fértiles, sitios donde la fotosíntesis potencialmente está limitada por el C (Keeley, 1998). Ellas experimentan fluctuaciones extremas por la disponibilidad de C y toman ventaja de los niveles elevados de CO_2 nocturnos en estos hábitats.

La VS constituye un hábitat de compleja interacción con los componentes físicos, químicos y biológicos del ecosistema (Gao *et al.*, 2016), por ejemplo, destaca su función como barrera de dosel que mitiga el impacto de las olas, protege de la erosión la costa y los fondos de poca profundidad, deposita materia suspendida entre el follaje al reducir la velocidad de la corriente y aumenta la transparencia del agua. Atrapa y estabiliza a los sedimentos mediante el rizoma, contribuyendo en la acumulación de materia orgánica y el secuestro de C (Copertino *et al.*, 2016); de hecho, su presencia aumenta la probabilidad de convertir los cuerpos de agua en sumideros de C (Jeppesen *et al.*, 2016). La VS controla parte de la oxigenación, el contenido de nutrientes y la mitigación de contaminantes exógenos como insecticidas (Brogan y Relyea, 2017). Por la arquitectura foliar y la red clonal que forma sobre el sedimento, sus poblaciones funcionan como hábitat que proporciona sombra, refugio y alimento a la fauna plantónica y béntica, representada por invertebrados y peces (Catling *et al.*, 1994; Aguilar, 2005; Lindig y Zambrano, 2007; Madsen, 2014). Por lo tanto, sostiene la cadena alimenticia de muchos organismos de importancia comercial, aves acuáticas y especies en peligro de extinción (Sánchez *et al.*, 2012; Copertino *et al.*, 2016). Por sus aportaciones ecológicas en la estructura y funcionamiento del ecosistema acuático la VS es reconocida como un ingeniero ecológico natural.

En *V. americana*, el mecanismo de propagación vegetativa o clonal es más común que el sexual (Glover *et al.*, 2015). Las plantas clonales en ambientes heterogéneos, pueden compartir nutrientes y carbohidratos (Salman, 1985; Xiao *et al.*, 2011; Wolfer *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2014); incluso se ha documentado que transportan formas específicas de N a través de rametes interconectados (Dong *et al.*, 2014); este rasgo fisiológico favorece su colonización o escape de ambientes con exceso o deficiencia de nutrientes (Xiao *et al.*, 2011). No obstante, el beneficio de la integración clonal puede ser diferentes entre especies acuáticas (Pennings y Callaway, 2000). En consecuencia, el declive de la salud ambiental y de la superficie de colonización o la pérdida de las poblaciones por el incremento de N y C pueden alterar las funciones ecológicas que estas ejercen en los ecosistemas acuáticos (Touchette y Burkholder, 2007, Touchette y Steudler, 2009).

Las altas concentraciones de N consiguen beneficiar a muchas plantas porque lo absorben directamente del ambiente (Rabalais, 2002; Ghaly y Ramakrishnan, 2015); sin embargo varias especies de la VS han reportado toxicidad o inhibición fisiológica por la nutrición de diferentes formas de N (Sarasketa *et al.*, 2016). En especies marinas, estuarinas y limnéticas como *Posidonia oceanica*, *Potamogeton densus*, *Ruppia drepanensis*, *V. natans*, y *Zostera marina*, el efecto tóxico o fisiológico puntual de NH_4 y el NO_3 es reconocido (Touchette y Burkholder 2007; Cao *et al.*, 2007). Sin embargo, *V. spinulosa* superó el efecto tóxico de N en concentraciones de 2.5 a 10 mg L^{-1} frente a cargas de P moderadamente altas (Li *et al.*, 2008). En cambio, el incremento en las relaciones de NH_4 y NO_3 fueron tóxicas o disminuyeron los parámetros morfológicos y fisiológicos de *V. natans* (Dou *et al.*, 2013).

A escala *in vitro*, las plantas de *V. americana* presentaron estrés letal con el incremento de N- NO_3 total incluso en niveles bajos de relación N/P (Bautista-Regil *et al.*, 2016) y clonaron en concentración de nutrientes de un ambiente limnético con la relación 16:1 (Bautista-Regil, 2014). Las investigaciones de estrés en aproximación reduccionista ofrecen ventajas ecológicas, incluso respecto a los estudios en microcosmos (Ruiz-Carrera y Sánchez, 2008). El diagnóstico de

estrés *in vitro* es una herramienta que contribuye a reducir la incertidumbre en la toma de decisiones para el manejo de los ecosistemas acuáticos frente al cambio global actual y venidero.

El incremento de la eutrofización y del CO₂, también propicia el desequilibrio ecológico nutrimental entre múltiples elementos químicos (Sterner y Elser, 2002). La combinación de los efectos acumulados de la eutrofización antropogénica sobre los procesos biogeoquímicos producidos en aguas limnéticas modifican la estequiometría ecológica (C/N/P). Este desequilibrio consigue alterar la estructura y sustentabilidad de un ecosistema en el sistema biológico y el estatus nutricional con repercusiones en la sobrevivencia y el proceso de clonación de las VS. No obstante, los patrones globales de la estequiometría N/P en ambientes limnéticos y la relación entre macrófitas y eutrofización antropogénica son en gran parte desconocidos (Yan *et al.*, 2016). De hecho, para reflexionar sobre los ciclos biogeoquímicos en la era del cambio global son las lagunas costeras de agua dulce las que constituyen el ejemplo ideal, debido a que la gama de las condiciones redox que existe en lagos permite la observación de numerosos procesos químicos y bioquímicos que ocurren en los sistemas marinos y terrestres.

En particular, el mecanismo fisiológico de resistencia adaptativa por NO₃ y NH₄ en estequiometría C/N/P requiere más evidencias en especies sumergidas (Wang *et al.*, 2008, 2012; Xing *et al.*, 2015), ya que el incremento en las concentraciones de estas fuentes iónicas de N y del C en el ecosistema han registrado estrés en el metabolismo y crecimiento de muchas especies (Duan *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2016), pese a que en las etapas de crecimiento y desarrollo las plantas son más dependientes a la interacción C:N a través de la fotosíntesis (Raven *et al.*, 2011; Sardans *et al.*, 2012). El suministro de N en exceso controla la capacidad de fijar C (Foyer *et al.*, 2001) y en consecuencia afecta la provisión de fuerza reductora y ATP (Adenosín trifosfato) para culminar el proceso de asimilación de N reflejado en su crecimiento clonal.

Desde la perspectiva del patrón de asimilación de N, la clonación de *Vallisneria* y prácticamente de la mayoría de las especies sumergidas con rametes interconectados (crecimiento modular) se ha investigado poco (Li y Wang, 2011) y aún menos su efecto interactivo con el incremento de C acuático. Además, como el proceso de reproducción asexual domina diversos hábitats, ha aumentado el interés por profundizar en la comprensión metabólica y ecológica de la integración clonal (Roiloa *et al.*, 2014, Dong *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Adicionalmente, con fines prácticos se ha sugerido abordar en las interpretaciones de estrés vegetal las comparaciones estequiométricas de C/N/P, la construcción de redes metabólicas y el estudio de estas redes en el crecimiento y desarrollo (Elser *et al.*, 2010; Cease y Elser, 2013).

El crecimiento clonal de la VS depende del ciclaje de C, N y P del ecosistema por sus implicaciones directas en la fotosíntesis, síntesis de aminoácidos y la acumulación de almidón y viceversa. Por lo tanto, un desbalance estequiométrico ambiental puede provocar transformaciones aceleradas de nutrientes o incluso alterar los procesos de ciclaje en el ecosistema, provocando desconexiones y restructuración entre las interacciones tróficas (Woodward *et al.*, 2010; Glibert, 2012), la distribución taxonómica de diferentes especies (Sardans *et al.*, 2012) e incluso la pérdida de las poblaciones existentes.

De otro modo, la asimilación de C altera la condición redox celular, lo que influye en el ciclo de nutrientes, de tal forma que los elementos pueden tener efectos indirectos sobre el reciclamiento de C o pueden ser nocivos para las macrófitas sumergidas al estar ligados metabólicamente; y aunque sus ciclos tienen estrecha relación las modificaciones que provoca el incremento de N no han sido aún resueltas (Touchette y Burkholder, 2007; Touchette y Steudler, 2009)

Actualmente algunos estudios proponen considerar la estequiometría ecológica como un parámetro importante en las predicciones ante las consecuencias ecológicas del cambio global (Woodward *et al.*, 2010). Por ello, algunas investigaciones han centrado el interés en el papel de la estequiometría ecológica en las tasas de crecimiento (Allen y Gillooly, 2009; Sardans *et al.*, 2012). Para la

diversidad de la comunidad planctónica se ha asumido un promedio específico de 106:16:1 C/N/P de acuerdo a la relación Redfield. Aunque en diversos estudios a nivel de muestreo y experimental se encontraron fuertes diferencias en la composición molar C/N/P de los organismos, estas diferencias se han observado a nivel de las funciones, morfologías e incluso en el tipo de reproducción de las plantas; y a escala global al tipo de roca y el nivel de impacto antropogénico (Romero *et al.*, 2006; Elser *et al.*, 2009; Sardans *et al.*, 2012).

Esta investigación enfatiza la importancia de estudiar a *V. americana*, por ser la angiosperma sumergida más vulnerada en los ecosistemas acuáticos de Centro y Norte América a causa del enriquecimiento de N (Morris *et al.*, 2003; Lauer *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2012), así como ha sido *V. natans* en Asia (Chen *et al.*, 2013; Gu *et al.*, 2016). Además, porque las variables externas, eutrofización e incremento CO₂ acuático, muestran pronósticos de incremento en su intensidad durante las próximas décadas (MEA, 2005; Dokulil y Teubner, 2010; Raven *et al.*, 2011; Alexandre *et al.*, 2012) se requiere hallar un modelo matemático que explique el comportamiento de las mismas en el proceso de propagación clonal.

De acuerdo con lo anterior, resulta imperativo diferenciar el estrés causado por el incremento en la concentración de NH₄ y NO₃ y distinguir el beneficio o perjuicio del efecto combinado del C inorgánico disuelto en el proceso de propagación clonal de *V. americana* (Ruiz-Carrera, 2009). Una estrategia multiparamétrica de biomonitorio de los ecosistemas afectados por el enriquecimiento de N y/o C ambiental requiere de marcadores de estrés clonal integrados a las variaciones estequiométricas C/N/P y las fisicoquímicas del medio; estos estudios en *V. americana* resultan impostergables, por ser una especie emblemática en los humedales (Elser *et al.*, 2010; Cease y Elser, 2013).

JUSTIFICACIÓN

Los bioelementos C, N y P se encuentran acoplados ecológica y metabólicamente en relaciones estequiométricas. La estequiometría C/N/P es actualmente el factor más investigado en las interacciones que involucran a los procesos ecológicos, y ha resultado satisfactoria para explicar muchos fenómenos en todos los niveles de la biología, desde genes y moléculas hasta organismos enteros e incluso a escala de ecosistemas y la biosfera (Gliber, 2012). Existen evidencias de las implicaciones de este principio en los mecanismos de regulación biológica, que inciden en sus procesos fisiológicos. La alteración de este equilibrio generalmente afecta a la cadena trófica de los ecosistemas limnéticos, proveedores de servicios ambientales.

Vallisneria americana, y una gran parte de la VS global, sufren un proceso de declinación en los ecosistemas. Hoy en día se reconoce que esta angiosperma enfrenta estrés agudo o crónico por la carga de N total (Morris *et al.*, 2003, Cao *et al.*, 2009 y 2011, Ruiz-Carrera y Sánchez, 2012a y 2012b, Bautista-Regil *et al.*, 2016). Sin embargo, los efectos del estrés fisiológico por enriquecimiento de N con diferentes valencias de N en especies acuáticas han sido poco descritos en la literatura especializada. A su vez, en este dilema ambiental hay insuficientes análisis de los efectos causados por desbalance C/N/P sobre el proceso clonal. Sin embargo, diferentes mecanismos pueden jugar un papel central en la adaptación de las plantas al estrés lo que involucra a la reorganización genómica heredable (Lerner, 1999).

Para un acercamiento práctico y rápido al problema resulta útil la aproximación experimental. Esta estrategia de investigación enfrenta las debilidades propias del aislamiento del individuo, pero la manipulación del ambiente biológico ha logrado muchos progresos en la investigación científica. Por ello, representa una herramienta valiosa para predecir la resistencia máxima que manifiesta *V. americana* en su mecanismo clonal frente a las formas oxidadas y/o reducidas de N en escenarios de cultivo que muestran fluctuaciones en la concentración de N y C inorgánico disuelto. Al igual que en el ecosistema natural, es factible discernir en

condiciones *in vitro* los efectos entre variables externas, como pH, temperatura, sólidos totales y potencial redox, que influyen en el proceso clonal.

Vallisneria spp. ha registrado elevada vulnerabilidad por altas concentraciones de N en la columna de agua (μM), mismos que no representan los umbrales de N del sedimento (mM). Por lo mismo, resultó imprescindible profundizar el conocimiento sobre el estrés de esta especie en su crecimiento clonal. En este estudio, para analizar a las fuentes de N_{ox} (NO_3) y N_{red} (NH_4), se usaron medios acuosos en concentraciones de nutrientes parecidas al agua intersticial. La hipótesis experimental sometida fue que el estrés en el crecimiento clonal de *V. americana* por fuentes individuales o combinadas de N_{ox} y N_{red} , se explica a través de modelos matemáticos cuadráticos.

La información servirá como base para la selección de individuos tolerantes a las condiciones extremas de la eutrofización con N oxidado y/o reducido, y al aumento de C acuático o en sus interacciones C/N/P y para desarrollar un micromodelo biogeoquímico de *V. americana*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar en aproximación *in vitro* el estrés en el crecimiento clonal de *Vallisneria americana* con incrementos de N oxidado y reducido y de carbono inorgánico disuelto evaluando las relaciones estequiometricas C/N/P.

Objetivo específico

Establecer las plantas *in vitro* en crecimiento clonal activo

Estudiar el estrés con incremento de la concentración, individual y co-proporcional de NH_4 y NO_3 con variación C/N/P.

Determinar la resistencia máxima en la sobrevivencia y el crecimiento clonal.

Relacionar los cambios fisicoquímicos del medio acuoso con la resistencia máxima de crecimiento clonal.

MÉTODO

Colecta y manejo de material vegetal

Las vainas maduras de *Vallisneria americana* Michx fueron recolectadas en la laguna Santa Anita (051° 39' 43" N - 20° 29' 756" O) del Golfo de México, México, en el segundo hidropereodo de 2015. La laguna registró en esta temporada profundidad promedio de 2.4 ± 0.2 m con una transparencia de 0.3- 0.5 m, pH de 6.6 – 8.2 , oxígeno disuelto de 6.6 – 8.2 mg L⁻¹, temperatura de 26.0 – 32.0 C° y $372 - 513 \mu\text{S cm}^{-1}$ y presentó condiciones hipereutróficas de acuerdo con el índice de Estado Trópico (Carlson, 1977; Brezonik, 1984), al registrarse valores de 0.62 ± 0.6 mg L⁻¹ y 37.4 ± 16.9 $\mu\text{g L}^{-1}$ para N y Cl_a.

Las vainas fueron transportadas a temperatura ambiente inmersas en agua local. En el laboratorio fueron lavadas al chorro de agua por una hora y se mantuvieron refrigeradas a 5°C durante siete días.

Germinación aséptica.

Las semillas con mucílago fueron retiradas de la vaina con el bisturí y refrigeradas nuevamente siete días. Para establecer el cultivo aséptico de semillas, estas se desinfectaron en NaClO (10% de Cloralex®) durante 10 min en agitación de 125 rpm. Enseguida fueron lavadas tres ocasiones en 50 ml de agua destilada estéril. Las semillas (~ 20 semillas) fueron cultivadas en ambiente aséptico (cámara de flujo laminar) en medio de cultivo bifásico compuesto de agua artificial dura estéril La formulación del agua dura fue (mg L⁻¹) de 192 NaHCO₃, 88 CaSO₄.2H₂O, 489 MgSO₄ y 8 KCl (Eaton *et al.*, 2000), en la fase acuosa y el soporte (4 % agar-agar). La unidad de cultivo fue de vidrio (6.5 cm de alto x 5.5 cm de ancho) con tapa de policarbonato (Magenta). Cada unidad de cultivo se preparó en proporción de 2/1 (v/v) de las fases (N=20). Las plántulas (edad 21 días) emergieron en ambiente autótrofo, controlado en temperatura de 30 ± 5 °C y bajo condiciones de luz tenue de acuerdo a Ruiz-Carrera y Sánchez (2008).

Preparación de medio de cultivo y soluciones concentradas

El medio de cultivo MS_{1/16} y MS_{1/8} (6.25 y 12.5% de sales básicas) sin NH₄ se preparó a pH 7.5 de acuerdo a Bautista-Regil *et al.* (2016). La relación N/P fue establecida con KNO₃ y KH₂PO₄. La fuente de C fue NaHCO₃ (C-HCO₃). Las soluciones concentradas de N fueron de NH₄Cl (1M) y KNO₃ (1 M) en agua destilada. Todas las soluciones permanecieron almacenadas a 5°C.

Las variaciones experimentales de Nitrógeno Total (mM de NT) se realizaron adicionando a los medios de cultivos alícuotas calculados de la solución concentrada de N.

Pre-acondicionamiento de la plantas

Para graduar la respuesta fisiológica de las plántulas, en las unidades de cultivo bifásico fue sustituida la fase líquida con medio MS_{1/16}, en estequiometría N/P de 12/1 con C-HCO₃ (0.299 mM). Los cultivos permanecieron en régimen de lote intermitente (15 días) durante 30 días en un cuarto de ambiente controlado con luz de 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo fijado de 16h luz. Todas las plantas prosperaron en esta condición de cultivo.

Crecimiento clonal

El crecimiento clonal se realizó en cultivo líquido (monofásico estático) de acuerdo al protocolo de Bautista-Regil (2014). La relación N/P fue de N/P 12/1 y C-HCO₃ (1.142 mM). En las unidades de cultivo se colocaron en promedio cinco plántulas pre-acondicionadas. El nivel de la intensidad de luz fue 100 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Al mes las plantas mostraron crecimiento desigual. Las plantas vigorosas fueron seleccionadas para desarrollar el experimento.

Evaluación experimental

La hipótesis experimental sometida fue que el estrés en el crecimiento clonal de *V. americana* por fuentes individuales o combinadas de Nox y Nred, se explica a través de modelos matemáticos de segundo orden. Para ello se usó la

metodología de superficies de respuesta (MSR) con el diseño de composición central circunscrito. Las variables independientes fueron la relación N/P de 5, 10, 20, 30 y 35 y C-HCO₃ de 0.857, 1.142, 1.713, 2.284 y 2.569 mM. El periodo de estrés fue de un mes.

Las variables independientes fueron la relación N/P de 5, 10, 20, 30 y 35 y C-HCO₃ de 0.857, 1.142, 1.713, 2.284 y 2.569 mM, en MS_{1/8}. Como referencia se usó la estequiometría N/P de la ecuación de metabólica indicada para pastos marinos (Romero *et al.*, 2006). Cada unidad de cultivo presentó dos plantas clasificadas por su estado de clonación, en plantas madre con rametes (PM1) y sin rametes (PM2). Para evitar el agotamiento de nutrientes fueron renovados los medios de cultivos experimentales a los 14 días del periodo experimental (Ruiz-Carrera *et al.*, 2012). Por lo anterior, en lo sucesivo se hará referencia al primer suministro del medio fresco, al aplicado en el día cero y el segundo suministro del medio fresco al aplicado en el día 14 y se identificó como el medio agotado al término del primer y segundo medio.

El modelo matemático $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \beta_4 X_{12} + \beta_5 X_{22} + \epsilon$ fue diseñado con puntos centrales para estimar el error puro y axiales con el fin de obtener una varianza consistente y estable de la respuesta en los puntos de interés. Para estandarizar las distancias dimensionales del MSR los niveles de la relación N/P y concentración de C fueron codificados en 1.414, -1.414, -1, +1 con dos repeticiones de 0 en el punto central (Tabla 1b). El sistema experimental resultó en nueve combinaciones entre los niveles de C y N/P (Tabla 1a), con 4 réplicas por tratamiento. Los días seleccionados para el análisis de los efectos binarios C y N en superficie de respuesta fueron los que registraron máxima resistencia en sobrevivencia para las fuentes de NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄ respectivamente. Se verificó el ajuste del modelo mediante el análisis estadístico de varianza, y se redujo despreciando los términos que no fuesen significativos ($p < 0.05$), de acuerdo a la Tabla 3.

Tabla 1. Combinación entre los niveles de N/P y C. (a) y codificación de las variables naturales N: P y C (b). N/P= relación molar Nitrógeno y Fósforo y C=carbono.

a	Tratamiento	N/P	Carbono	b	Código	N/P	C
	-1, -1	10	1.142		-1.4	5	0.857
	1, -1	30	1.142		-1	10	1.142
	-1, 1	10	2.284		0	20	1.713
	1, 1	30	2.284		1	30	2.284
	0, -1.4	20	0.857		1.4	35	2.569
	0, 1.4	20	2.569				
	-1.4, 0	5	1.713				
	1.4, 0	35	1.713				
	0, 0	20	1.713				

Mediciones fisiológicas y fisicoquímicas

Las variables fisiológicas fueron la sobrevivencia (%), pérdida y ganancia de unidades (\pm) de crecimiento, por estado de clonación de la planta madre. La pérdida de sobrevivencia fue indicada por la presencia de plantas con hojas despigmentadas y la desintegración de la biomasa. El crecimiento clonal fue estimado sumando las yemas de rizoma y rametes (No. por individuo). La sobrevivencia se determinó en resistencia mínima y máxima (>50 % y <50, respectivamente) a través de los registros a 7, 14, 21 y 28 días. De igual forma se registró el crecimiento clonal en el mismo periodo.

Los parámetros fisicoquímicos, potencial de hidrógeno (pH; unidades), potencial redox (Eh; mV), oxígeno disuelto (OD; ppm) y sólidos totales disueltos (STD; ppm) de los medios de cultivos fresco y agotado fueron medidos en el primer y segundo suministro con el equipo multiparamétrico Hanna (HI2898). Las mediciones del medio agotado fueron de cuatro réplicas por tratamiento. El registro del medio fresco, no presentó repeticiones debido a que se realizó sobre el volumen total de medio de cultivo preparado y fue usado solo como referencia.

Análisis estadístico

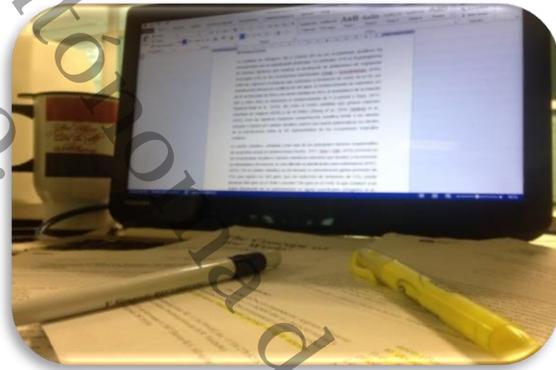
El análisis de los datos se realizó con STATISTICA 8v. La normalidad y homocedasticidad fue verificada con pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran. En los parámetros fisiológicos se usó la prueba de Mann Whitney (para el estado clonación), Kruskal Wallis (entre fuentes de N y para las mediciones fisicoquímicas). El ANOVA fue aplicado para comparar los tratamientos de ambas variables fisiológicas por fuente de N, en pruebas independientes. Como criterio para seleccionar el mejor ajuste del modelo de sobrevivencia y crecimiento clonal por fuente de N y tratamientos C/N/P se usaron los tiempos definidos de sobrevivencia máxima. Con el análisis de regresión cuadrática se construyeron seis superficies de respuesta, aplicadas a la sobrevivencia y el crecimiento clonal. En cada caso se determinó la significancia del modelo, los valores de R^2 ajustada y R^2 predicha, la pérdida de ajuste y los coeficientes significativos del mismo.

México. Universidad Autónoma de Tabasco.

Resultados
Discusión
Conclusiones

Proverbios 9

⁵ Vengan a comer mi pan y a beber mi vino que he preparado!



RESULTADOS

Sobrevivencia

Los sobrevivientes (Sb) entre los grupos de plantas madre con rametes (PM1) y sin rametes (PM2), fueron similares en los diferentes registros de tiempo mostrando en promedio porcentajes de 60.26 y 60.73% (Tabla 2 y Fig. 1). En tanto que la pérdida de Sb incrementó finalizando en 60.7%, 42% y 62% en NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, respectivamente (Fig. 1b). En fuente de NO_3 , las plantas presentaron menor resistencia (0-100% Sb) en todo el periodo. Con NH_4 , la declinación de Sb fue rápida, manifestando resistencia máxima desde los 14 días (0 a 50% Sb), y mortandad total a los 21 días. La fuente de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ presentó umbrales de resistencia máxima a la sobrevivencia desde los 21 días de cultivo (Fig. 1).

Tabla 2. Sobrevivencia de *Vallisneria americana*. Comparación estadística entre grupos de plantas madre PM1 y PM2 y fuentes de NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$. a través del tiempo.

Día	Plantas madre				Fuentes N				
	Prueba		Suma de rangos		Prueba		Suma de rangos		
	U	p	PM1	PM2	H	p	NO_3	NH_4	$\text{NO}_3:\text{NH}_4$
0	1800.0	1	3630.0	3630.0	0.000	1	2420.0	2420.0	2420.0
7	1736.0	0.70	3694.0	3566.0	43.91	< 0.001	3357.0 ^a	1525.5 ^c	2377.5 ^b
14	1729.5	0.71	3559.5	3700.5	36.76	< 0.001	3352.0 ^a	1628.5 ^c	2279.5 ^b
21	1721.5	0.68	3551.5	3708.5	41.08	< 0.001	3435.5 ^a	1623.5 ^c	2201.0 ^b
28	1786.0	0.94	3616.0	3644.0	24.01	< 0.001	3070.5 ^a	1695.5 ^c	2494.0 ^b

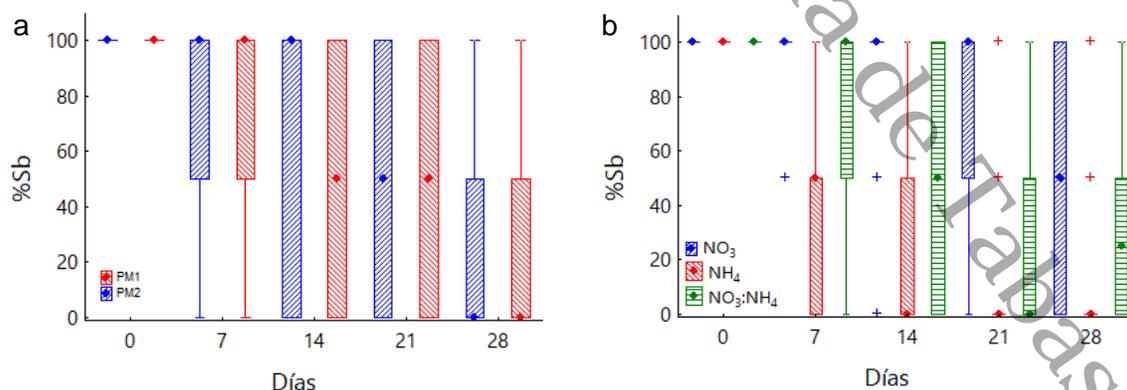


Figura 1. Cinética de sobrevivencia de *Vallisneria americana*. a) grupos de plantas madre PM1 y PM2 y b) Fuentes de NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$. Símbolos: (●) Valor medio (□) 25%-75% de distribución, (T) Limite de rango (+) Valores extremos

En NO_3 , la sobrevivencia fue modificada por el efecto lineal de significancia marginal de la relación N/P, siendo significativo el efecto cuadrático del C, a su vez N/P y C ejercieron acción recíproca. La sobrevivencia por la relación N/P fue disminuyendo con la mitad de la magnitud presentada por el efecto cuadrático del C. Con esta fuente de N, la zona crítica de sobrevivencia fue localizada en la relación alta de N/P y concentración de C. La sobrevivencia óptima de 87.5% se localizó en los tratamientos 30N/P: 1.142C y 10N/P: 2.284C. Con fuente de NH_4 individual o combinado con NO_3 , tanto el efecto lineal y cuadrático de la relación N/P y lineal del C mostraron significancia. La sobrevivencia de las dos fuentes con NH_4 fue similar a NO_3 , presentó mortandad masiva con disminución a menor relación de la relación N/P altas que fue menos drástica en régimen alto de C. (Fig. 2).

Tabla 3. Significancia y parámetros de los modelos de regresión mejorados para la sobrevivencia.

Fuente	NO_3	NH_4	NO_3 y NH_4
Día	30	15	30
R^2	0.35	0.43	0.67
R^2 aj.	0.30	0.38	0.64
Modelo residual	$p=0.001$ F=6.494	$p=0.000$ F=9.079	$p=0.000$ F=24.74
Modelo Error puro	$p=0.002$ F=6.21	$p=0.000$ F=10.502	$p=0.000$ F=27.387
Falta de ajuste	$p=0.619$ F=0.743	$p=0.106$ F=1.940	$p=0.170$ F=1.639
intercepto	$p=0.000$ F=22.102	$p=0.039$ F=4.574	$p=0.000$ F=24.198
Block			
N/P	$p=0.081$ F=3.214	$p=0.000$ F=14.731	$p=0.000$ F=65.182
N/P^2		$p=0.012$ F=6.858	$p=0.046$ F=4.270
C		$p=0.022$ F=5.647	$p=0.035$ F=4.796
C^2	$p=0.004$ F=9.159		
$\text{N/P}*\text{C}$	$p=0.011$ F=7.109		

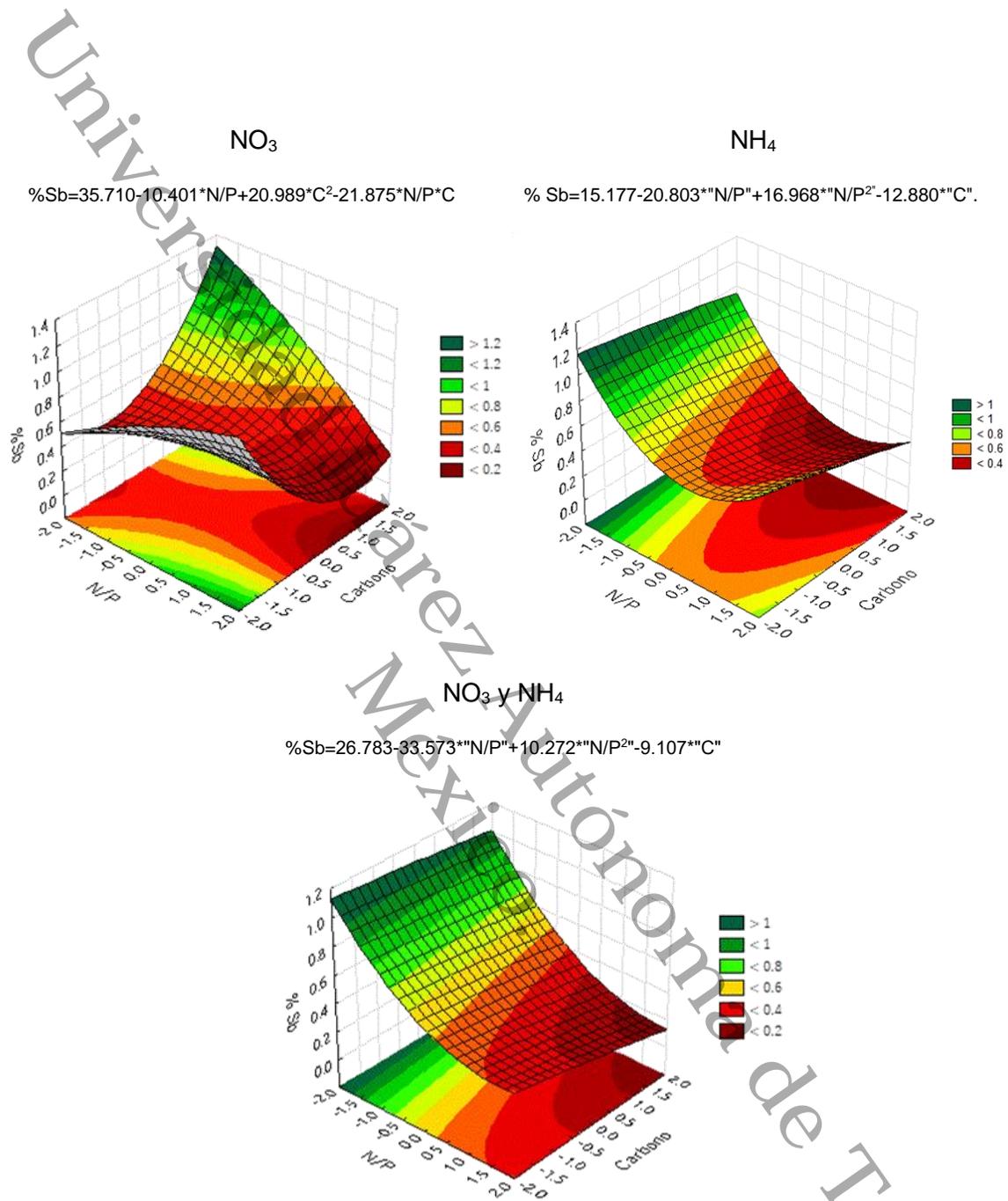


Figura 2. Superficies de respuesta de la sobrevivencia de *V. americana* por la relación N/P y concentración de C en fuentes NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄.

Crecimiento clonal

El estrés clonal de *V. americana* fue mayor sobre el grupo de plantas madres PM1 a 21 días y más significativo al finalizar el periodo de cultivo (Tabla 4, Fig. 3a). En el intervalo de estrés, la pérdida de rametes en PM1 se estimó de 16%, respecto a la ganancia de 15% de PM2. A su vez, el crecimiento clonal mostró diferencias entre las fuentes N (Tabla 4, Fig. 3b). Al inicio, el NO₃:NH₄ fue superior comparado con NO₃, pero invariablemente el NH₄ mostró crecimientos negativos. Con NO₃, se elevó el número de unidades de crecimiento a los 7 y 21 días. Mientras que NH₄ y NO₃:NH₄ mantuvieron equilibrio entre pérdida y ganancia de unidades. Conforme a la Figura 3, algunas observaciones (7-10 de 120) que resultaron atípicas en las tres fuentes de N, que determinaron a los casos de mayor tolerancia.

Tabla 4. Pérdida y ganancia de unidades de crecimiento de *Vallisneria americana*. Comparación estadística entre grupos de plantas madre (PM1 y PM2) y Fuentes de (NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄) a través del tiempo

Día	Plantas madres				Fuentes N				
	Prueba		Suma de rangos		Prueba		Suma de rangos		
	U	p	PM1	PM2	H	p	NO ₃	NH ₄	NO ₃ :NH ₄
0	1800.0	1.00	3630.0	3630.0	0.00	1	2420.0	2420.0	2420.0
7	1711.0	0.64	3719.0	3541.0	6.39	0.04	2500.5 ^a	2047.0 ^b	2712.5 ^a
14	1607.0	0.31	3823.0	3437.0	5.53	0.06	2708.5 ^a	2071.0 ^a	2480.5 ^a
21	1454.5	0.07	3284.5	3975.5	27.33	<0.001	3235.5 ^a	1717.5 ^c	2307.0 ^b
28	967.0	<0.01	2797.0 ^b	4463.0 ^a	22.59	<0.001	3107.5 ^a	1700.5 ^c	2452.0 ^b

Los modelos matemáticos cuadráticos de crecimiento clonal por cada fuente de N fueron mejorados para validar el modelo mediante la elección de la ecuación más parsimoniosa a la hipótesis de falta de ajuste (Fig. 4). El único modelo de crecimiento mejorado y significativo fue obtenido con NO₃:NH₄. El modelo de regresión cuadrática mostró efecto lineal en la relación N/P, con tendencia a disminuir las unidades de crecimiento en magnitudes mayores (Tab.5, Fig. 4). Con esta fuente de N quedaron descartados los efectos del suministro del C.

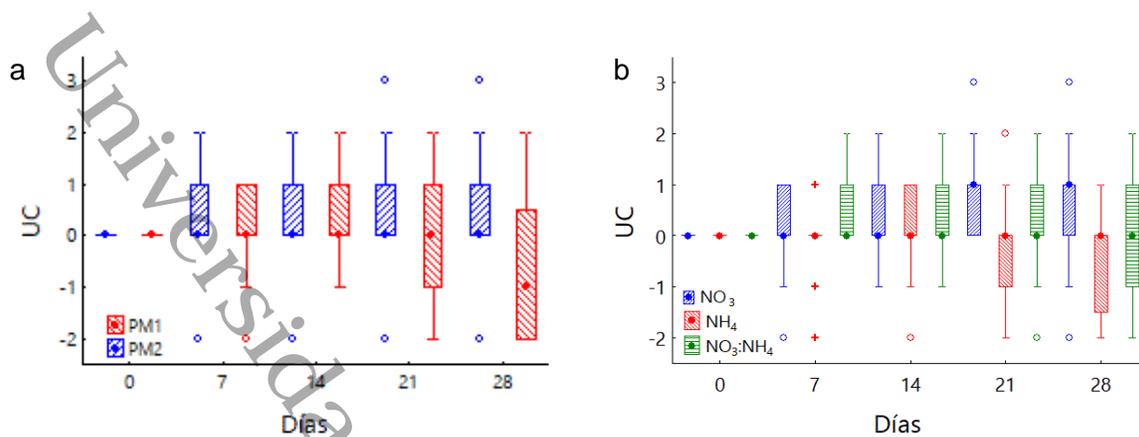


Figura 3. Cinética de pérdida y ganancia de unidades de crecimiento (UC) en las plantas de *V. americana*. Comparación a) plantas madre PM1 y PM2 y b) fuentes de N. Símbolos: (•) Valor medio (\square) 25%-75% de distribución, (\perp) Límite de rango (+) Valores extremos.

Tabla 5. Significancia y parámetros de los modelos de regresión mejorados para la pérdida y ganancia de unidades de crecimiento.

Fuente	NO ₃	NH ₄	NO ₃ y NH ₄
Día	30	21	30
R²	0.148	0.147	0.241
R² aj.	0.077	0.076	0.178
Modelo residual	p=0.119 F=2.087	p=0.119 F=2.083	p=0.017 F=3.827
Modelo Error puro	p=0.115 F=2.140	p=0.170 F=1.789	p=0.024 F=3.617
Falta de ajuste (Gl=6)	p=0.35 F=1.154	p=0.987 F=0.152	p=0.673 F=0.670
intercepto	p=0.330 F=0.971	p=0.042 F=4.443	p=0.883 F=0.021
Block		p=0.234 F=1.463	
N/P	p=0.141 F=2.260	p=0.039 F=4.574	p=0.006 F=8.252
N/P²		p=0.646 F=0.213	
C			p=0.449 F=0.585
C²	p=0.107 F=2.729		
N/P*C	p=0.266 F=1.272		p=0.112 F=2.645

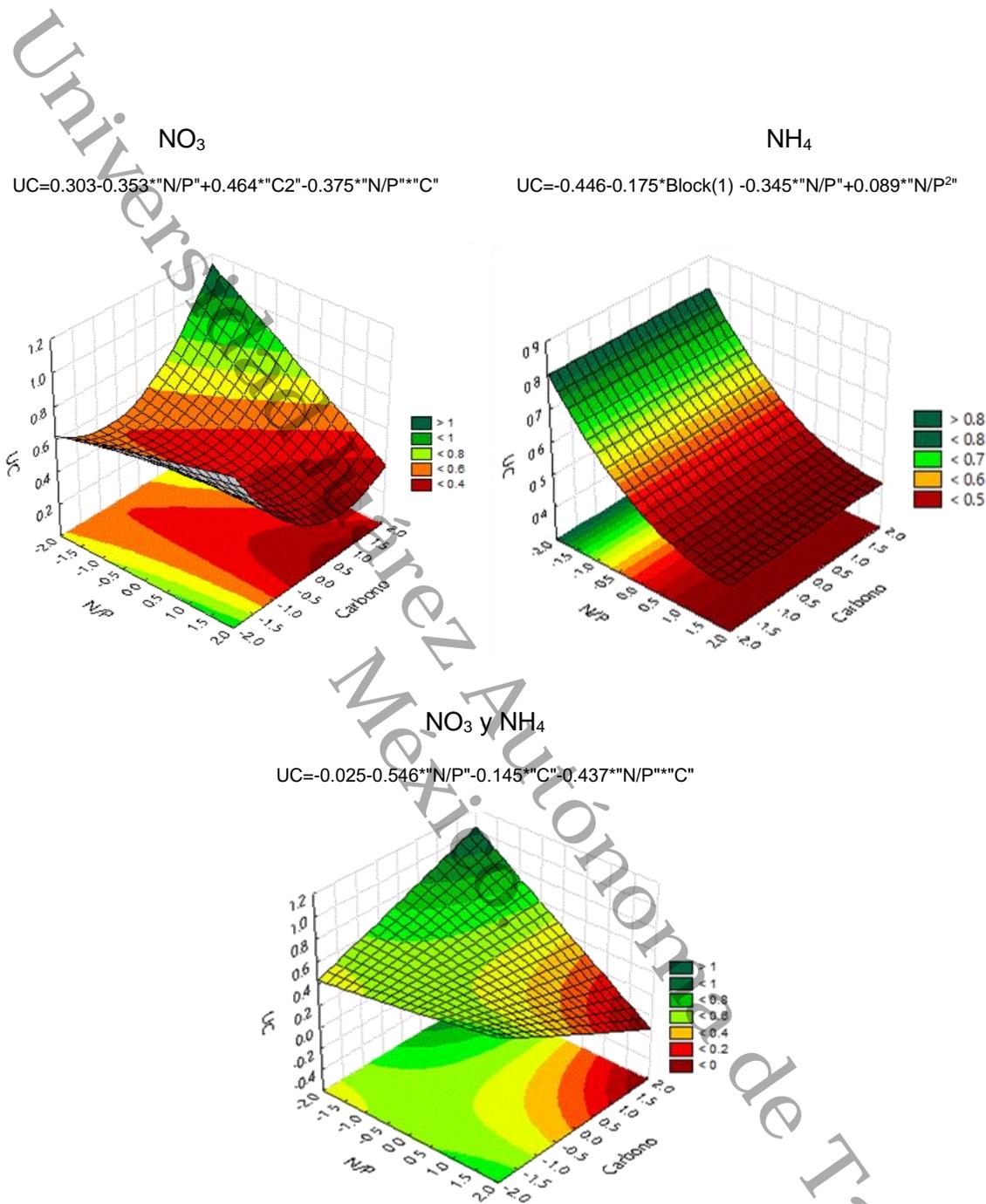


Figura 4. Superficies de respuestas de pérdida y ganancia de unidades de crecimiento (UC) de *V. americana* por la relación N/P y concentración de C en fuentes NO₃, NH₄ y NO₃:NH₄.

Parámetros fisicoquímicos y fisiológicos por tratamientos.

Los parámetros fisicoquímicos pH, Eh y OD mostraron variaciones diferentes ($p < 0.05$) entre las fuentes N en medios agotados de sus respectivos periodos de máxima resistencia (Tabla 6), Asu vez los parámetros fisiológicos sobrevivencia y Ganancia de unidades de crecimiento también mostraron diferencias entre las fuentes N descritas en secciones anteriores.

Tabla 6. Comparación por tratamientos de N/P: C en la sobrevivencia, ganancia de unidades de crecimientos de *Vallisneria americana* y fisicoquímicos de los nutrientes agotados en los suministros de NO_3 , NH_4 , $\text{NO}_3:\text{NH}_4$. p =probabilidad, F = prueba Fisher y H =prueba Kruskal-Wallis. SB=sobrevivencia y GUC= Ganancia de unidades de crecimiento.

	Fuente N		NO_3		NH_4		$\text{NO}_3:\text{NH}_4$	
	p		p	prueba	p	Prueba	p	Prueba
SB	<0.001	F=3.93	0.01	F=2.98	<0.001	F=5.57	<0.001	F=11.5617
GUC	0.016	H=8.19	0.25	F=1.16	0.68	F=0.70	0.02	F=2.65
Ph	<0.001	H=20.79	0.137	H=12.32	<0.001	H=26.99	0.063	H=14.794
STD	0.404	H=1.81	<0.001	H=10.98	<0.001	H=32.65	<0.001	H=36.613
Eh	0.0222	H=7.61	0.771	H=4.86	<0.001	H=25.49	0.041	H=16.078
OD	<0.001	H=17.45	0.175	H=11.49	<0.001	H=26.99	0.0107	H=19.906

Las diferencias de pH se registraron entre las fuentes NO_3 y NH_4 , los valores de medios agotados en NO_3 tendieron a aumentar respecto al medio fresco; en NH_4 la variación se mantuvo entre el valor fijado en el medio fresco (7.5) y cercano al valor neutro (7), a excepción de los tratamientos con 2.28 y 2.56 mM de HCO_3 que estuvieron ligeramente aumentados pero cercanos a 7.5; con $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ las pequeñas variaciones tendieron al aumento, pero el tratamiento con 0.85Mm de HCO_3 varió entre 7.5 y 7 (Fig. 5).

Los registros de Eh fueron negativos, las diferencias al igual que el pH fueron registradas entre las fuentes NO_3 y NH_4 . La mayor variación y los valores más negativos se registraron en NO_3 con mínimos y máximos de -11 a -122; con NH_4 la variación fue más reducida con -46 a -91 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, también mostró variación amplia de -9 a -95 (Fig. 6).

En la variación de OD fueron las fuentes NO_3 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ similares entre sí, pero diferentes a NH_4 . La fuente de NO_3 mostró porcentajes mayores en los medios agotados aunque en valores inferiores (44-95%) respecto al medio fresco (73-138%); con NH_4 se registraron los porcentajes más bajos (30 y 80 %) del medio agotado y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ mantuvo porcentajes intermedios (44 - 91%) (Fig. 7).

Los STD no mostraron diferencias entre las fuentes N (Tabla 6). En cambio, dentro de los tratamientos de cada fuente N los STD variaron por efecto de la cantidad N y C agregada a los medios frescos (Fig. 8).

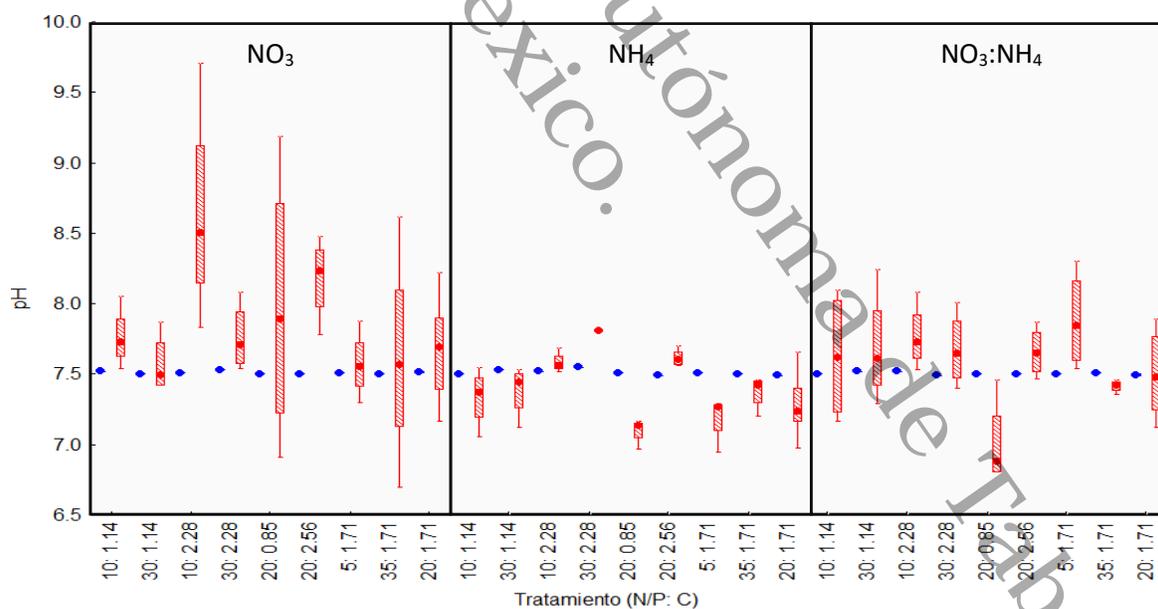


Figura 5. pH por tratamiento N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). Medio de cultivo fresco , medio de cultivo agotado .

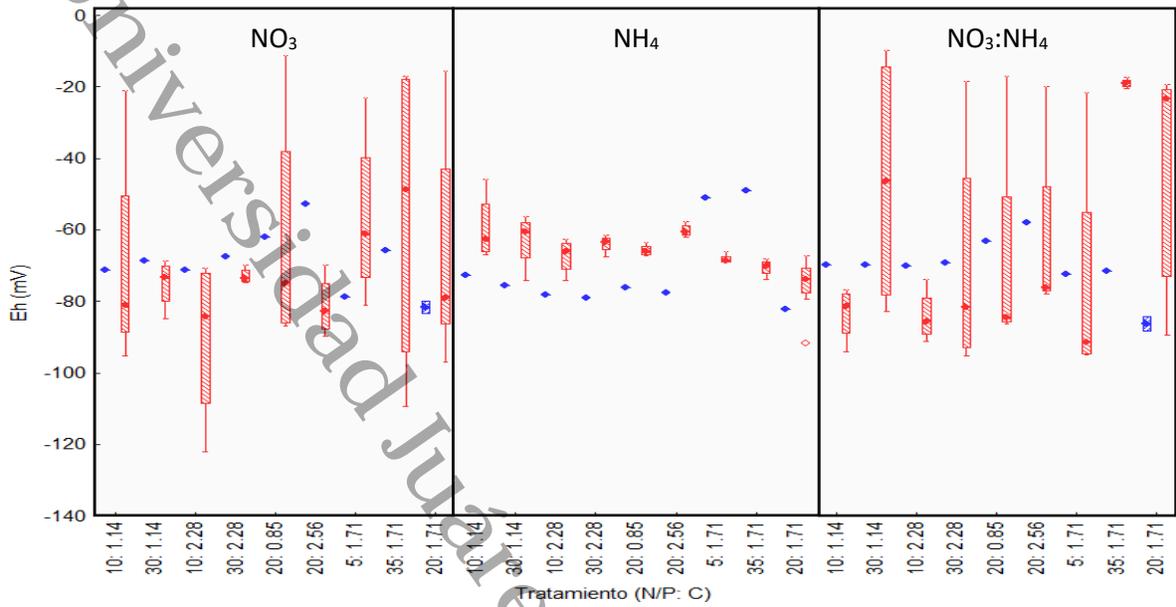


Figura 6. Eh por tratamiento N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). Medio de cultivo fresco , medio de cultivo agotado .

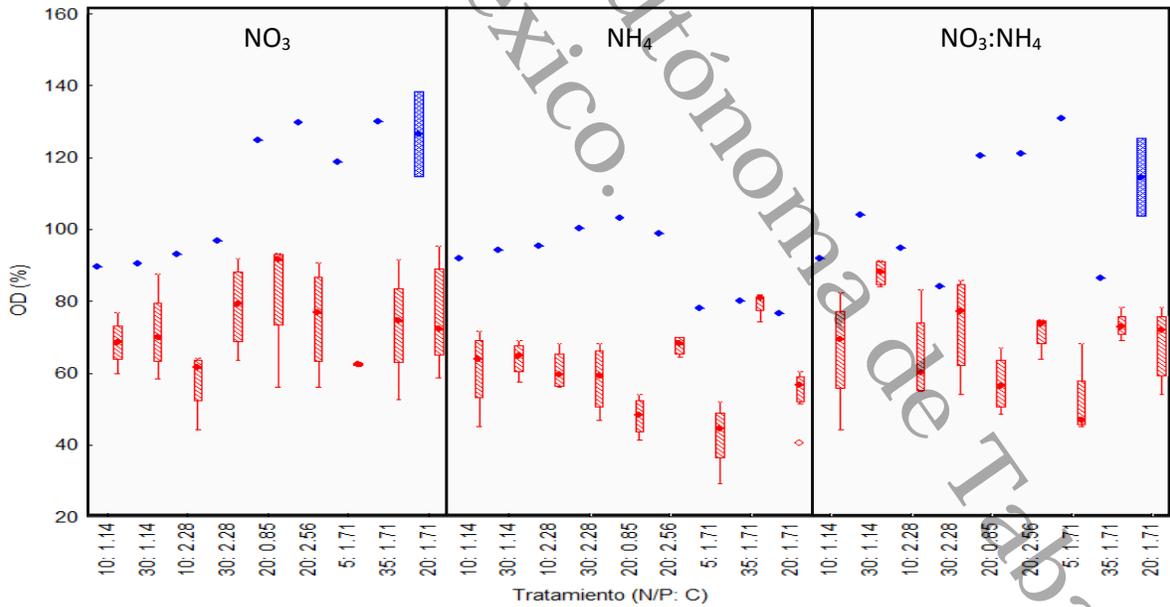


Figura 7. OD por tratamiento N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). Medio de cultivo fresco , medio de cultivo agotado .

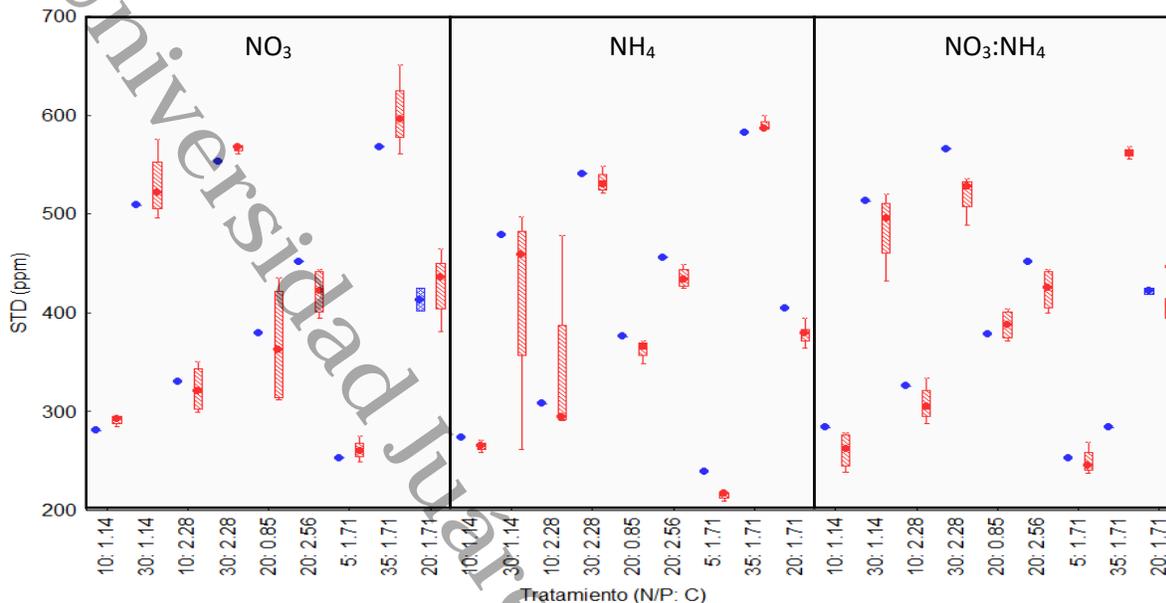


Figura 8. STD por tratamiento N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$). Medio de cultivo fresco ■, medio de cultivo agotado ■.

Las comparaciones por tratamiento de N en sobrevivencia máxima evidenciaron el efecto dañino del Nred comparado con el Nox, y solo uno de NH_4 (5N/P: 1.713C) y tres $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ (5N/P: 0.857C, 10N/P: 1.142 y 10N/P: 2.284C) fueron equivalente a NO_3 . Mientras que respecto a la ganancia de unidades de crecimiento por su mayor valor sobresalieron dos en $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ (5N/P: 1.713C y 10N/P: 2.28 C) (Tabla 6, Fig. 9). Los tratamientos de NO_3 destacados en mejor sobrevivencia fueron dos, 10N/P: 2.28C y 30NP -1.142C, entre estos tratamientos los valores de STD mostraron diferencias de alrededor de 200 ppm, a favor del último (Fig. 9).

Aunque la sobrevivencia fue similar entre los tratamientos de NO_3 , en 35NP-1.713C su promedio fue el más bajo en contraste con los valores altos de STD (560- 650 ppm). Los registros de mayor sobrevivencia no coincidieron con valores mínimos o máximos de STD. En NH_4 la mayor sobrevivencia fue en 5NP-1.713C que coincide con los valores mínimos de STD (209-219) y OD (2.4-4.2) y con valores neutros de pH, la pérdida de sobrevivencia fue registrada en los tratamientos 30N/P-2.28, 35N/P-1.71C y 35N/P -1.71 C con los valore máximos de

STD (425-600ppm) en la fuente $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, los porcentajes de máxima sobrevivencia se encontraron en ambientes con 10NP-1.142C, 10NP-2.284C y 5NP- 0.857C, con unidades de pH entre 7 y 8 y valores de STD bajos (238-334ppm), y los ambientes más negativos de esta fuente (-73 a -94). Cabe señalar que el primer ambiente es cercano al usado en la inducción del proceso clonal.

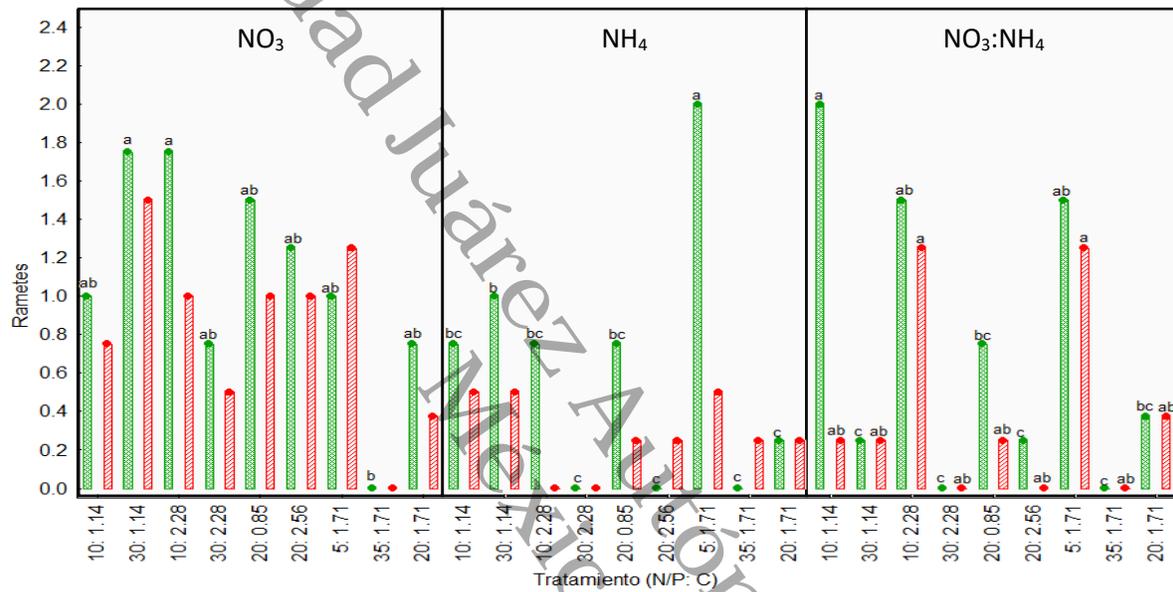


Figura 9. Sobrevivencia  y Ganancia de unidades de crecimiento por tratamiento  N/P: C en las fuentes N (NO_3 , NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$).

DISCUSIÓN

Pocos estudios han evaluado la interacción entre nivel de N y el C inorgánico disuelto (CID) en el crecimiento clonal de especies de VS, o discutido los efectos combinados de diferentes suministros y proporciones de N_{ox} y N_{red} . Aquí, se discriminó en aproximación experimental el crecimiento clonal de *Vallisneria americana* en concentración de nutrientes equivalente a la del agua intersticial, sometiendo la hipótesis que su capacidad clonal declina en concentración elevada de N_{ox} y/o N_{red} (NO_3 , NH_4 y $NO_3:NH_4$) y por el efecto aditivo del incremento de CID mejora el balance C/N/P ambiental. Nuestra hipótesis se encuentra sustentada en las conexiones de la homeostasis estequiométrica C/N/P y el crecimiento clonal de las plantas.

En la primera semana el crecimiento de rametes en cultivo *in vitro* líquido continuo o inició en las plantas madre de *V. americana* por el suministro de N inorgánico disuelto (NID), sin embargo en muchos ambientes se interrumpió en umbrales de concentración de nutrientes equivalentes al agua intersticial. En la VS marina se ha señalado que el agua intersticial de los sedimentos potencialmente puede suministrar la mayoría de N, debido a que contiene concentraciones de N más altas que la columna de agua, pero absorben más rápidamente el NID desde la columna de agua (Koch *et al.*, 2013). En *V. natans*, se indicó que el sedimento es un factor de crecimiento significativo, mientras que los impactos directos de la columna de agua son mínimos (Xie *et al.*, 2005). En cambio, el enriquecimiento de NH_4 en 1.54 mg L^{-1} incrementó la biomasa, la supervivencia y produjo más tubérculo y rametes indicando que el enriquecimiento de N_{red} no fue estresante para la planta (He *et al.*, 2015). Esta concentración es sensiblemente menor a las usadas en este estudio.

En las plantas clonadas de *V. americana*, hubo menor resistencia en la sobrevivencia por el estado reducido del N, lo que incluyó al suministro de $NO_3:NH_4$. En consecuencia, la pérdida de sobrevivencia afectó a la clonación durante el intervalo del estrés a muy corto plazo, ya que el número de unidades de crecimiento fue menor comparado con las fuentes de NO_3 . Es decir las plantas

madre y sus rametes presentaron el síndrome fisiológico de toxicidad de NH_4 atribuido a un proceso de largo plazo en las macrófitas acuáticas. No obstante, los cultivos *in vitro* de *V. americana* sobrevivieron con el suministro de NH_4 en 5:1.71 y $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ de 10:2.28 y 5:1.7, en niveles de HCO_3 intermedios y altos. Comparativamente, *Vallisneria natans* redujo la biomasa foliar con suministros mayores a 0.33 mM de NH_4 en la columna de agua (Zhu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2008). En especies flotantes como *Azolla pinnata* a niveles superiores a 5 mM, el NH_4 causó toxicidad (Jampeetong *et al.*, 2016).

Con la fuente de Nred, la toxicidad de N puede ser explicada con la nueva hipótesis que adjudica al superplus de poder reductor (20% de NADPH generado de la fotosíntesis) un desbalance redox intracelular que afecta la sobrevivencia de las plantas (Podgórska *et al.*, 2017). De acuerdo a los autores, esta barrera redox es innecesaria durante la asimilación del NH_4 . A largo plazo, estos cambios en la homeostasis redox pueden resultar en una elevación crónica de ROS en la mitocondria de las células vegetales. Esto es debido a la plasticidad de la fotofosforilación, que posee tanto una cadena de transporte de electrones ligada al flujo de energía que permite la síntesis de ATP y también las ramas no energéticas llamadas vías alternativas.

Sin embargo, la hipótesis redox requiere fortalecerse cuando la concentración de carbono inorgánico disuelto cambia y cuando la fuente suministrada incluye los iones de NO_3 y Nred. *Arabidopsis* compensó los cambios en el metabolismo redox asociados a la alternancia en los tratamientos de NO_3 y NH_4 (mM) en relación 3.33 de N:P), mostrando que entre los cambios rápidos de estos iones hay estados transitorios en la producción de ROS, antioxidantes de bajo peso molecular, enzimas cosechadoras de ROS y de las vías de transporte de electrones mitocondrial y alternativa, de tal forma que los procesos temporales del metabolismo de ROS del cloroplasto, mitocondria y el citosólico protegieron a las hojas (Podgórska *et al.*, 2017). Así mismo, argumentaron que la elevada producción extracelular de ROS en respuesta al suministro de NH_4 puede estar implicado en los mecanismos de comunicación celular. Por otro mecanismo

metabólico el suministro de N inadecuado disminuye la capacidad de fijar C, y en consecuencia disminuye la provisión de fuerza reductora y ATP para culminar el proceso de asimilación de N (Lawlor, 2002)

La integración clonal modular de las plantas sumergidas enraizadas se ha mencionado como el rasgo evolutivo más importante en adaptación al estrés (Santamaría, 2002; Dong, 2011; Liu *et al.*, 2016), pero en las fuentes de NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ fue evidente la poca resistencia de plantas al crecimiento clonal activo. Nuestro resultado se suma a las evidencias de efectos fisiológicos negativos de la fuente reducida de N en las plantas acuáticas como *Hydrilla verticillata*, *Azolla pinnata* y *Vallisneria natans* (Wang *et al.*, 2011; He *et al.*, 2015; Jampeetong *et al.*, 2016). Además de encontrar coincidencias con la literatura sobre los efectos letales e inhibitorios en la sobrevivencia de *Vallisneria* sp. por la carga de N en exceso y de su relación N/P, que han sido más demostrados en escenarios de NH_4 que de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ y menos en NO_3 (Bautista-Regil, 2014, Bautista-Regil *et al.*, 2016); también se logró discernir el equilibrio de la relación C/N ambiental sobre el proceso clonal a corto plazo y mediano plazo por su menor resistencia a los efectos agudos del incremento de las dos fuentes de bioelementos (Bautista-Regil, 2014).

Aunque las diferencia de la sobrevivencia entre plantas madre clonadas y no clonadas de *V. americana* usadas en el juego experimental fueron descartadas, su respuesta al crecimiento clonal fue deducido en el análisis de cada tratamiento experimental, al iniciar o mantener su clonación en ciertas condiciones de estrés. Lo anterior se explica por el origen sexual de las plantas madre, ya que cada individuo expresó su carga genética para clonar en el tiempo. Sin embargo, las que crecieron en presencia de NH_4 manifestaron menor resistencia para sostener la clonación, predicho matemáticamente por el efecto lineal de la concentración de N en relación N/P. Los resultados de clonación forman parte de la continuidad de la valoración del estrés a microescala en *V. americana* (Bautista-Regil *et al.*, 2016) con base en el barrido ascendente de concentraciones de NO_3 que llevó a la

clonación de la especie en las condiciones descritas en la sección de método (Bautista-Regil, 2014).

En la evaluación *in vitro*, las condiciones de inducción clonal reflejaron un estado estático del fenómeno evaluado, ya que en el proceso clonal la heterogeneidad del entorno de cultivo juega un papel importante en los mecanismos de adaptación ambiental. No obstante, con la representación equilibrada de plantas madres clonadas y no clonadas se revelaron en los diferentes escenarios de C/N/P individuos más tolerantes al enriquecimiento de N. Esto ocurrió en NH₄ (5NP-1.713C), NO₃ (10NP-2.284) y NO₃:NH₄ (10NP-1.142) y entre los casos extremos figuraron los de 30NP -1.142C con NO₃. Estos fueron determinados de acuerdo a los registros de los fenotipos y su actividad clonal asociada al estrés extremo.

Estos individuos tolerantes representan líneas clonales ideales para la propagación masiva *in vitro* y para los propósitos inmediatos de recuperación de las poblaciones de *V. americana* que son afectadas por la eutrofización en el Golfo de México.

La resistencia máxima a la sobrevivencia y al crecimiento clonal, fue más prolongada y menos severa en condiciones de C intermedias. Respecto a los estudios de estrés en juveniles de *V. americana*, en condición reduccionista las coincidencias se dieron en la mayor sensibilidad frente a relaciones altas de N/P de NH₄ (Bautista-Regil *et al.*, 2016), y que la concentración de nutrientes fue menos drástica con NO₃:NH₄ al favorecer su clonación. De la misma manera Ruiz-Carrera (2009) coincidió con Huss y Wehr (2004) quienes reportaron preferencia de NO₃ sobre NH₄ para *V. americana*, en el crecimiento de hojas y raíces. *Vallisneria natans*, aun cuando mostró tendencia similar en la sobrevivencia y el crecimiento clonal registró preferencia por NO₃ en comparación con NH₄, con disminución de la tasa de crecimiento con el aumento de la concentración de N (Gu *et al.*, 2016).

El enriquecimiento de NO₃ y HCO₃ mostraron efectos aditivos en la sobrevivencia y en el crecimiento sostenido de rametes en el intervalo de estrés. Excepto por la disminución de la sobrevivencia en relación de N/P 20 a 30 y las concentraciones

de HCO_3^- que representaron incrementos intermedios y altos del nivel fijado en el proceso de inducción clonal previo (1.14 mM). Estas dos concentraciones de HCO_3^- , incluso superaron el pronóstico de 25% de incremento en los océanos para finales del siglo (0.97 mM de HCO_3^-). Entonces, los resultados con NO_3^- evidenciaron los niveles críticos de estrés de *V. americana* si el incremento de CO_2 atmosférico continúa, lo cual se estimó como el efecto de un ambiente sin intervención de otras variables ambientales aleatorias, como la acidificación, hipoxia o por cambios amplios en el potencial redox. Por lo tanto el estrés de máxima resistencia (28 días) en presencia de NO_3^- y HCO_3^- se manifestó probablemente porque la sobresaturación de los centros metabólicos haya causado la desregulación de las enzimas clave de la asimilación de estos dos nutrientes por sus altas concentraciones o por la formación de especies reactivas. No obstante, la respuesta del C elevado puede limitar la disponibilidad de N, ya que los metabolismos de N y C están fuertemente acoplados.

El mecanismo de resistencia por acumulación de NO_3^- ha sido revelado en las plántulas de *V. americana* con bajo suministro de NO_3^- (Ruiz-Carrera, 2009) y es una generalización en muchas especies vegetales que presentan deficiencia nutricional por esta forma de N. Además, este mecanismo puede funcionar en la recuperación de biomasa en ambientes de NH_4^+ y NH_4NO_3 . El mecanismo contempla los principios de entrada y regulación de N.

En los pastos marinos de *Halodule uninervis* y *Thalassia hemprichii*, la fertilización de NO_3^- de la columna de agua en presencia de niveles de NH_4^+ menores, no afectó las velocidades de entrada del NO_3^- , pero no mejoró las tasas de productividad o crecimiento de las hojas. Además, la relación C:N tampoco reveló alguna evidencia de la demanda de N (2 mM) por el enriquecimiento de CO_2 en la sinergia metabólica C/N (Ow *et al.*, 2016)

Aquí también evidenciamos el posible estrés osmótico de las fuentes N ligado a valores altos de sólidos totales en la mayoría de las condiciones C/N/P evaluadas. En particular, las condiciones osmóticas se elevaron sensiblemente con las tres

fuentes de N tomando como referencia la del crecimiento clonal inducido con NO_3 , previo a la prueba de estrés, excepto en la condición de deficiencia.

En general, las plantas de *V. americana* en ambientes de C/N/P respondieron a los cambios fisicoquímicos que registró el medio acuoso en su máximo punto de estrés de sobrevivencia. Varios síntomas de estrés fisiológicos que han sido reportados en la literatura, tanto de enriquecimiento de NID como de CID fueron identificados aquí.

La acidificación ha sido una condición química adjudicada al incremento de CO_2 y el NH_4 . En promedio, la desviación del valor de pH experimental fijado fue mínima con la combinación de estos dos factores, ya que se redujo y aumentó el pH en 0.1 unidades con NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, respectivamente. No obstante, la acidez ligera ha sido registrada en ambientes naturales (Sánchez *et al.*, 2012). En los océanos la disminución de 0.2 unidades de pH se ha determinado en un fenómeno de acidificación.

Los menores porcentaje de oxígeno (> 40%) presentes en la fuente de NH_4 , reflejaron los niveles de hipoxia que causan estrés biológico (>2 < 5 mg/L DO, de acuerdo a Scavia y Bricker, 2006). El potencial redox fue el parámetro cuyo comportamiento fue contrastante y mostraron amplias variaciones entre las condiciones de fertilización de N y C simulados en *V. americana*, mismas que fueron de mayor sobrevivencia en NO_3 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, incluso con crecimiento clonales sostenidos. Mientras que, con NH_4 la variación fue más estable. La información del Eh resulta relevante en la interpretación de estrés de la especie focal, porque la cuantificación de este parámetro ambiental ha faltado en muchas publicaciones.

En este trabajo no descartamos el efecto osmótico sobre la clonación de las plantas debido al alto contenido sólidos totales disueltos en la mayoría de las condiciones C/N/P evaluadas. En particular, los sólidos totales disueltos podrían haber propiciado condiciones osmóticas elevadas dominadas por la concentración en las tres fuentes de N, salvo las condiciones de N bajas (10 N/P) a muy bajas (5

N/P). Sin embargo estas excepciones, presentaron contenidos cercanos a la condición de crecimiento clonal inducido con NO_3 , previo a la prueba de estrés.

CONCLUSIONES

El análisis de estrés *in vitro* en *Vallisneria americana*, determinó los efectos negativos del enriquecimiento de N sobre el crecimiento de rametes, por lo tanto aporta evidencia de la vulnerabilidad en su estado adulto, puesto que la mayoría de indicadores de estrés están basados en mediciones de germinación/sobrevivencia, morfología, calidad fenotípica y crecimiento de hojas y/o raíces en talla, biomasa y número.

En orden decreciente, los agentes inductores de estrés en la sobrevivencia y clonación de *V. americana* fueron NH_4 , $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, NO_3 y HCO_3 ; siendo los ambientes de Nred los que provocaron impactos de corto plazo. Posiblemente, las plantas que se mantuvieron en clonación activa fueron los genetes tolerantes al estrés fisiológico.

Dado que, el proceso clonal fue afectado en mayor grado por el suministro de NH_4 y en cercanía por $\text{NO}_3:\text{NH}_4$, estas condiciones de estrés severo pueden estar colocando a las poblaciones de *V. americana* en máxima vulnerabilidad ecológica.

La predicción del estrés usando el modelo matemático evidenció en la mortalidad de plantas la función cuadrática del enriquecimiento de carbono cuando crecieron en NO_3 . Mientras que NH_4 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ mostraron efectos cuadráticos por el N/P. Sin embargo, en el proceso de crecimiento de rametes estos efectos cuadráticos resultaron excluidos. Posiblemente por la coordinación del metabolismo carbono y nitrógeno.

Se concluye que el crecimiento de rametes fue un indicador sensible al estrés abiótico de *V. americana*, provocado con el incremento de N reducido y N oxidado y menos por sinergia del incremento de HCO_3 , pero la respuesta de crecimiento clonal entre plantas fue más favorecida en las plantas que iniciaron su crecimiento sin rametes en el intervalo de estrés.

El mecanismo de toxicidad por NH_4 en esta investigación puede explicarse por estrés osmótico, desbalance C:N con influencia mínima de la acidificación en el medio de crecimiento. Sin embargo, la hipótesis de toxicidad por NH_4 se debilita cuando el enriquecimiento proviene del co-suministro de N reducido y oxidado.

Se asume, que por la amplia variación del potencial redox en las fuentes de NO_3 y $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ en niveles más reductivo, la resistencia al estrés fisiológico indicada en la sobrevivencia y el crecimiento clonal, fue el resultado del proceso de respiración. Las de NH_4 , por su tendencia a elevar el nivel de oxidación del medio respondieron a obstáculos metabólicos que crearon un desbalance C/N/P.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

REFERENCIAS

Aguilar I. A. (2005). Estimación y monitoreo de los peces como indicadores del uso sostenible del agua en cuencas hidrológicas. *Revista Digital Universitaria UNAM*, 6(8): 14.

Alaa, E.E., Zaki, M.M. (2010). The impact of global climatic changes on the aquatic environment. *Environmental Sciences* 4: 251–259. Doi: 10.1016/j.proenv.2011.03.030

Alexandre, A., Silva, J., Buapet, P., Björk, M., Santos, R. (2012). Effects of CO₂ enrichment on photosynthesis, growth, and nitrogen metabolism of the seagrass *Zostera noltii*. *Ecology and Evolution*, 2(10): 2625-2635. Doi:10.1002/ece3.333

Allen, A.P., Gilloly, J.F. (2009). Towards an integration of ecological stoichiometry and the metabolic theory of ecology to better understand nutrient cycling. *Ecology Letters*. 12:369-384. Doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01302.x

Andrew, M., Raven, J.A., Lea, P.J. (2013). Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants. *Annals of Applied Biology* 163:174–199. Doi: 10.1111/aab.12045

Bautista-Regil, J. (2014). Bioensayos nutricionales para inducir *in vitro* el crecimiento estolonífero de la angiosperma acuática *Vallisneria americana*. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco.

Bautista-Regil, J., Ruiz-Carrera, V., Sanchez, A.J, Salcedo-Meza, M.A. Florido, A. (2016). Estrés a microescala de *Vallisneria americana* por enriquecimiento de nutrientes con estequiometría N:P. *Hidrobiológica*. 26 (1): 53-60.

Brezonik, P.L. (1984). Trophic State Indices: Rationale for Multivariate Approaches. *Lake and Reservoir Management*, 1 (1), pp. 441-445.

Brogan, W.R., Relyea, R.A. (2017). Multiple mitigation mechanisms: Effects of submerged plants on the toxicity of nine insecticides to aquatic animals.

Environmental Pollution. 220:688-695. Doi:
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.030>

Cao, T., 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(8): 1620-1629. Doi: 10.1111/j.1365-2427.2011.02601.x

Cao, T., Xie, P., Li, Z., Ni, L., Zhang, M., Xu, J. (2009). Physiological stress of high NH_4^+ concentration in water column on the submersed macrophyte *Vallisneria natans* L. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 82(3): 296-299. Doi: 10.1007/s00128-008-9531-5.

Cao, T., Xie, P., Ni, L., Wu, A., Zhang, M., Wu, S. Smolders, A. J. P. (2007). The role of NH_4^+ toxicity in the decline of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* in lakes of the Yangtze River basin, China. *Marine and Freshwater Research* 58(6): 581-587.

Carlson, R.E. (1977). A trophic state index for lakes. *Limnology and oceanography*. 22(3):361-369. DOI: 10.4319/lo.1977.22.2.0361

Catling, P. M., Spice K W, Biernacki M, Lovett D J (1994). The biology of Canadian weeds. 103. *Vallisneria americana* Michx. *Canadian Journal Plant Science*. 74:883–897. Doi: <https://doi.org/10.4141/cjps94-160>

Cease, A. J., Elser, J. J. (2013). Biological Stoichiometry. *Nature Education Knowledge* 4(5):1-3

Chen, N., B. Peng, H., Hong, N., Turyaheebwa, S., Cui, X. Mo. (2013). Nutrient enrichment and N: P relation decline in a coastal bay-river system in southeast China: The need for a dual nutrient (N and P) management strategy. *Ocean and Coastal Management* 81, 7-13. Doi: 10.1016/j.ocecoaman.2012.07.013

Copertino, M.S., Creed, J.C., Lanari, M.O., Magalhães, K., Barros, K., Lana, P.C., Sordo, L., Horta, P.A. (2016). Seagrass and Submerged Aquatic Vegetation (VAS) Habitats off the Coast of Brazil: state of knowledge, conservation and main threats. *Brazilian Journal of Oceanography*. 64 (2): 53-80

- Dokulil, M., Teubner, K. (2010). Eutrophication and climate change: present situation and future scenarios. In Eutrophication: causes, consequences and control Springer. 1-16.
- Dong, B.C., Liu, R.H., Zhang, Q., Li, H.L., Zhang, M.X., Lei, G.C., Yu, F.H. (2011). Burial Depth and Stolon Internode Length Independently Affect Survival of Small Clonal Fragments. Plos One. 6(9): e23942. Doi: 10.1371/journal.pone.0023942.
- Dong, M., Yu, F-H., Alpert, P. (2014). Ecological consequences of plant clonality. Annals Botany. 114(2)367. Doi:10.1093/aob/mcu137.
- Dou, Y., Wang, B., Chen, L., Yin, D. (2013). Alleviating versus stimulating effects of bicarbonate on the growth of *Vallisneria natans* under ammonia stress. Environmental Science and Pollution Research 20(8): 5281-5288.
- Duan, H. Y., Zhang, L. Y., Ye, T. L., Fan, R. X., Xu, H. G., Shen, R. Q. (2007). Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. Annals Botany 99(6): 1153-1160. Doi: 10.1093/aob/mcm051
- Duckworth, O.W., Franzluebbers, A.J., Gardner T.G. (2016). Biogeochemical Processes underpin ecosystem service. Book Chapter. Doi:10.2136/2015.soilecosystemservices.2015.0024.
- Eaton, A. D., I. S. CleS Ceri y A. e. greenBerg. (2000). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Ed. American Public Health Association (APHA). Maryland. Joint Editorial Board, Washington DC 139 p
- Elser, J. J., Fagan W. F., Kerkhoff A. J., Swenson N. G., Enquist B. J. (2010). Biological stoichiometry of plant production: metabolism, scaling and ecological response to global change. New Phytologist 186(3): 593-608. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03214.x
- Elser, J.J., Andersen, T., Baron, J.S., Bergström, A.K., Jansson, M., Kyle, M., Nydick, K.R., Steger, L., Hessen, D.O. (2013). Shifts in lake N:P stoichiometry and nutrient limitation driven by atmospheric nitrogen deposition. Science. 326(5654):835-837. Doi: 10.1126/science.1176199

Foyer, C.H., Mery, S.F., Noctor, G. (2001). Interactions Between Carbon and Nitrogen Metabolism. Chapter 4. In Plant Nitrogen. 237-254pp. Doi: 10.1007/978-3-662-04064-5_9

Gao, H., Qian, X., Wu, H., Li, H., Pan, H., Hah, C. (2016). Combined effects of submerged macrophytes and aquatic animals on the restoration of a eutrophic water body - A case study Gonghu Bay, Lake Taihu. Ecological Engineering. 102:15-23. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.013>

Ghaly A, Ramakrishnan V, (2015). Nitrogen sources and cycling in the ecosystem and its role in air, water and soil pollution: a critical review. Journal of Pollution Effects & control. 3:1–26. Doi:10.4172/2375-4397.1000136.

Glibert, P.M. (2012). Ecological stoichiometry and its implications for aquatic ecosystem sustainability. Current opinion in Environmental Sustainability. 4:272-27. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2012.06.009>

Glover, R., Drenovsky, R.E., Futrell, C.J., Grewell, B.J. (2015). Clonal integration in *Ludwigia hexa petala* under different light regimes. Aquatic Botany. 122:40-46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2015.01.004>

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(12): 563. Doi:10.3390/w8120563.

Harley, C. D. G . (2011). Climate change, keystone predation, and biodiversity loss. Science 334, 1124–1127.

Hasler, C.T., Butman, D., Jeffrey J.D., Suski, C.D. (2016). Freshwater biota and rising pCO₂? . Ecology Letters. 19: 98-108.

He, L., Cao, T., Hu, X., Zhang, X., Ni, L., Xie, P. (2015). Effects of NH₄⁺ and K⁺ enrichments on carbon and nitrogen metabolism, life history and asexual reproduction of *Vallisneria natans* L. in aquarium experiments. Journal of Freshwater Ecology. 30(3): 391-406. Doi: <http://dx.doi.org/10.1080/02705060.2014.957740>

Hessen, D.O. (2013). Inorganic Nitrogen Deposition and Its Impacts on N:P-Ratios and Lake Productivity. *Water* 5(2):327-341; Doi: 10.3390/w5020327

Houghton J., Meira, F. I., Callander, B., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (1996). *Climate change: The science of climate change*. Cambridge: Cambridge University Press.

Huss, A. A., Wehr, J.D. (2004). Strong indirect effects of a submersed aquatic macrophyte, *Vallisneria americana*, on bacterioplankton densities in a mesotrophic lake. *Microbial Ecology*. 47: 305–315. DOI: 10.1007/s00248-003-1034-7.

IPPC. (2014). *Cambio climático. Impactos, adaptación y vulnerabilidad*. OMM, PNUMA.

Jampeetong, A., Stripakdee, T., Khamphaya, T., Chairuang Sri. (2016). The effects of nitrogen as NO_3^- and NH_4^+ on the growth and symbiont (*Anabaena azollae*) of *Azolla pinnata* R. Brown. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*. 15:11-20. Doi: 10.12982/cmujns.2016.0002.

Jeppesen, E., Trolle, D., Davidson, T.A., Bjerring, R., Søndergaard, M., Johansson, S., Lauridsen, L., Nielsen, A., Larsen S.E., Meerhoff, M. (2016). Major changes in CO_2 efflux when shallow lakes shift from a turbid to a clear water state. *Hydrobiologia*. 778:33-44. Doi: 10.1007/s10750-015-2469-9.

Keeley, J. E. (1998). CAM photosynthesis in submerged aquatic plants. *The Botanical Review*, 64(2), 121-175.

Koch, M., Bowes, G., Ross, C., Zhang, X.H. (2013). Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology*. 19: 103-132. Doi: 10.1111/j.1365-2486.2012.02791.x.

Köln, H.B., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (2007). *Biology of the Nitrogen Cycle*. Elsevier. Amsterdam. DO. Doi: <http://dx.Doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50001-1>

Lambert, S.J. y Davy, A.J. (2011). *Water quality as a threat to aquatic plants: discriminating between the effects of nitrate, phosphate, boron and heavy metals*

on charophytes. *New Phytologist* 189: 1051–1059. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03543.x

Lauer, N., Yeager, M., Kahn, A.E., Dobberfuhl, D.R., Ross C. (2011). The effects of short term salinity exposure on the sublethal stress response of *Vallisneria americana* Michx. (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany* 95(3): 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2011.06.002>

Lawlor, D.D (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanism are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*. 53(370):773-787. Doi: <https://doi.org/10.1093/jxb/53.370.773>.

Li, W., Wang, J. (2011). Influence of light and nitrate assimilation on the growth strategy in clonal weed *Eichhornia crassipes*. *Aquatic Ecology*. 45:1–9. Doi: 10.1007/s10452-010-9318-8

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(11): 2321-2330.

Lindig, C. R., Zambrano, L. (2007). Aplicaciones prácticas para la conservación y restauración de humedales y otros ecosistemas acuáticos. En Ó. Sánchez, M., Herzig, E. P., Marquéz, R., y Zambrano, L. *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México* (págs. 167-188). México D.F: INE-SEMARNAT

Liu, F., Liu, J., Dong, M. (2016). Ecological consequences of clonal integration in plants. *Frontiers in Plant Science*. 7:770. Doi:10.3389/fpls.2016.00770.

Lowden, R.M. (1982). An approach to the taxonomy of *Vallisneria* L. (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*. (13): 269-298.

Luo, W., Xie, Y., Chen, X., Li, F., Qin, X. (2010). competition and facilitation in three marsh plants in response to a water-level gradient. *Wetlands*. 30:525-530. .DOI: 10.1007/s13157-010-0064-4

Madsen, J.D. (2014). Chapter 1. impact of invasive aquatic plants on aquatic biology, in: Biology and control of aquatic plants. Gettys, L.A., Haller, W.T., Pettr, D.G. Eds. AERF. Biology and Control of Aquatic Plants: A Best Management Practices Handbook. 1-8p.

Malyshev, A.V., Arfin Khan, M.A., Beierkuhnlein, C., Steinbauer, M.J., Henry, H.A., Jentsch, A., Dengler, J., Wilner, E., Kreyling, J. (2016). Plant responses to climatic extremes: within-species variation equals among-species variation. *Global Change Biology*. 22(1):449-464. Doi: 10.1111/gcb.13114.

Matveev, V., Robson, B. (2014). Aquatic Food Web Structure and the Flow of Carbon. *Freshwater Reviews* 7(1):1-24. Doi: <http://dx.Doi.org/10.1608/FRJ-7.1.720>

MEA (2005). Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis. Millennium Ecosystem Assessment. World Resources Institute, Washington, DC. EUA.

Morris, K., Bailey, C. P., Boon, P.L., Hughes, L. (2003). Alternative stable states in the aquatic vegetation of shallow urban lakes II. Catastrophic loss of aquatic plants consequent ta nutrient enrichment. *Marine and Freshwater Research*, 54 (3):201-215. Doi: 10.1071/MF02003

Nishihara, G. N., Ackerman, J. D. (2007). The interaction of CO₂ concentration and spacial location on O₂ flux and mass transport in the freshwater macrophytes *Vallisneria spiralis* and *V. americana*. *Journal of Experimental Biology*. 210, 522-532. Di: 10.1242/jeb.02679.

Novelo, R. A. (2006). Plantas acuáticas de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla. Universidad Autónoma de México (UNAM) México D.F. 260p

Ow, Y.X., Vogel, N., Collier, C.J., Holtum, J.A.M., Flores, S.F. (2016). Nitrate fertilisation does not enhance CO₂ response in two tropical seagrasss species. *Scientific Reports*. 6:23093. Doi: 10.1038/srep23093.

Pennings, S.C., Callaway, R.M. (2000). The advantages of clonal integration under different ecological conditions: a community-wide test. *Ecology*. 81:709-716. Doi: 10.1890/0012-9658(2000)081[0709:TAOCIU]2.0.CO;2

Podgórska, A., Burian, M., Rychter, A.m. Rasmusson, A.G., Szal, B. (2017). Short-term ammonium supply induces cellular defence to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* leaves. *Physiologia Plantarum*. 160: 65-83. Doi: 10.1111/ppl.12538.

Rabalais, N.N. (2000). Nitrogen in aquatic ecosystems. *Ambio*. 31(2):102-112.

Raven, J. A., Giordano, M., Beardall, J., Maberly, S. C. (2011). Algal and aquatic plant carbon concentrating mechanisms in relation to environmental change. *Photosynthesis Research*, 109(1-3), 281-296. Doi: 10.1007/s11120-011-9632-6

Roiloa, S.R., Antelo B, Retuerto R. (2014). Physiological integration modifies $\delta^{15}\text{N}$ in the clonal plant *Fragaria vesca*, suggesting preferential transport of nitrogen to water-stressed offspring. *Annals of Botany* 114: 399–411. Doi:10.1093/aob/mcu064

Romero, J., Lee, K. S., Pérez, M., Mateo, M. A., Alcoverro, T. (2006). Nutrient dynamic in seagrass ecosystems. En: Larkum WDA, Orth JR, Duarte MC (eds) *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer. 159-192 p.

Ruiz Carrera, V. (2009). Efecto del enriquecimiento nitrogenado en el crecimiento y tolerancia in vitro de *Vallisneria americana* Mitchx. Enfoque al biomonitorio y a la restauración ecológica en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla. Tesis de Doctorado. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco 150 pp.

Ruiz-Carrera, V., & Sánchez, A. J. (2014). Development of a model for *in vitro* culture of *Vallisneria americana* Michx. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 24(3).

Ruiz-Carrera, V., Sánchez, A. J. (2012a). Estrategias experimentales y repoblación de angiospermas sumergidas en un humedal fluvial en la zona costera del sureste de México in Sánchez A.J.; Chiappa-Carrara X. (eds). *Recursos acuáticos*

costeros del sureste: tendencias actuales en investigación y del arte. CONCYTEY. RECORECOS, UNACAR, UJAT. ISBN 978-607-9060-06-0 (obra completa).

Ruiz-Carrera, V., Sánchez, A. J. (2012b). Estrategias de propagación en *Vallisneria americana*: experimentos in vitro en *V. americana* editorial académica española. ISBN-13:978-3659059711.

Salman, A.G. 1985. Habitat selection in a clonal plant. *Science*. 228 (4699):603-604. DOI: 10.1126/science.3983647

Sánchez, A. J., Florido, R., Salcedo, M. A., Ruiz-Carrera, V., Montalvo-Urgel, H., Raz-Guzman, A. (2012). Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. in a tropical wetland, southern Gulf of Mexico: 1- 26. In: Mahamane A (ed) Diversity of Ecosystems. InTech. Zagreb, Croatia. 484 pp.

Santamaría, L. (2002). Why are most aquatic plants widely distributed? Dispersal, clonal growth and small-scale heterogeneity in a stressful environment. *Acta Oecologica*. 23(3):137-154. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(02\)01146-3](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(02)01146-3)

Sarasketa, A., Gonzalez-Moro, M.B., Gonzalez-Murua, C., Marino, D. (2016). Nitrogen source and external medium pH interaction differentially affects root and shoot metabolism in *arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 7:29. Doi: 10.3389/fpls.2016.00029

Sardans, J., Rivas-Ulbach, A., Peñuelas, J. (2012). The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. *Evolution and Systematics* 14:33-47. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.08.002>

Scavia, D., Bricker, S. B. (2006). Coastal eutrophication assessment in the United States. *Biogeochemistry*, 79(1-2), 187-208.

Short, F.T., Ksoten, S., Morgan, P.A., Malone, s., Moore, G.E. (2016). Impacts of climate change on submerged and emergent wetland. *Aquatic Botany*. 135:3-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.06.006>

Steffens, B., Steffen-Heins, A., Sauter, M. (2013). Reactive oxygen species mediate growth and death in submerged plants. *Frontiers in Plant Science*. 4: 179. Doi: 10.3389/fpls.2013.00179

Sterner, R. W., Elser, J. J. (2002). *Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere*. Princeton University Press. 464.

Suddick, E.C., Whytney, P., Townsend, A.R., Davidson, E.A. (2013). The role of nitrogen in climate change and the impacts of nitrogen–climate interactions in the United States: foreword to thematic issue. *Biogeochemistry*. 114:1-10. Doi: 10.1007/s10533-012-9795-z

Tanner, J.W., Cross, W., Benstead, J.P., Gislason, G.M., Hood, J.M., Huryn, A.D., Johnson, P.W. (2016). Warwing alters coupled carbon and nutrient cycles in experimental streams. *Global Change Biology*. 22:2152-2164. Doi: 10.1111/gcb.13205

Touchette, W. B., Burkholder, M. J. (2007). Carbon and nitrogen metabolism in the seagrass, *Zostera marina* L.: Environmental control of enzymes involved in carbon allocation and nitrogen assimilation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 350: 216-233. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.05.034>.

Touchette, W. B., Steudler, S. E. (2009). Climate change, drought, and wetland vegetation. In: Uzochukwu, GA, Schimmel K, Chang S-Y, Kabadi V, Luster-Teasley S, Reddy G, Nzewi E (eds.) *Proceedings of the National Conference on Environmental Science and Technology*. Springer Science, New York, NY. 239-244 pp.

Van de Waal, D. (2010). *Out balance- Implications of climate for the ecological stoichiometry of harmful cyanobacteria*. Gildeprint Drukkerijen. ISBN 978-94-61080-45-5.

, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Li, W., Zhang, W. J. (2008). Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *Aquatic Toxicology*, 87(2), 88-98.

Wang, C., Zhang, S.H., Li, W., Wang, P.F., Li, L. (2011). Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 67-73. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.005>.

Wang, Y., Gao, G., Qin, B., Wang, X. (2012). Ecophysiological and anatomical responses of *Vallisneria natans* to nitrogen and phosphorus enrichment. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (5):405.

Wolfer, S.R., Straile, D. (2012). To share or not to share: clonal integration in a submerged macrophyte in response to light stress. *Hydrobiologia*. 684:261-269.

Woodward, G., Perskins, D.M., Brown, L.E. (2010). Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. B.365:2093–2106. Doi:10.1098/rstb.2010.0055

Xiao, K., Yu, D., Wang, L., Han, Y. (2011). Physiological integration helps a clonal macrophyte spread into competitive environments and coexist with other species. *Aquatic Botany*. 95:249-253. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2011.07.002>.

Xie, Y., An, S., Wu., B. (2005). Resource allocation in the submerged plant *Vallisneria natans* related to sediment type, rather than water-column nutrients. *Freshwater Biology*. 50(3): 391-402. Doi: 10.1111/j.1365-2427.2004.01327.x

Xing, W., Wu, H., Shi, Q. Hao, B., Liu, H. Wang, Z., Liu, G. (2015). Multielement stoichiometry of submerged macrophytes across Yunnan plateau lakes (China). *Scientific Reports*. 5.10186:1-9.DOI: 10.1038/srep10186

Yan, Z., Han, W., Peñuelas, J., Sardans, J., Du, E., Reich, P.B., Fang, J. (2016). Phosphorus accumulates faster than nitrogen globally in freshwater ecosystems under anthropogenic impacts. *Ecology letters*. Doi:19:1237-1246. Doi:10.1111/ele.12658

Zhang, M., Cao, T., Ni, L., Xie, P., Li., Z. (2010). Carbon, nitrogen and antioxidant enzyme responses of *Potamogeton crispus* to both low light and high nutrient

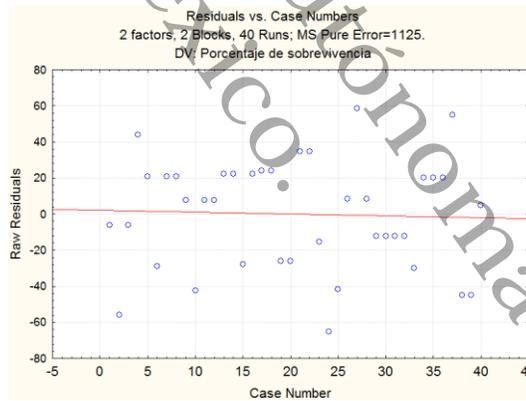
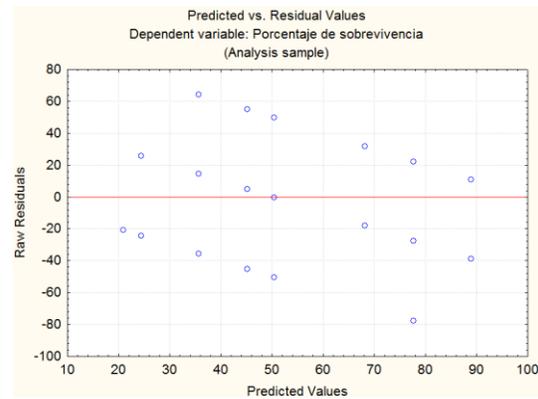
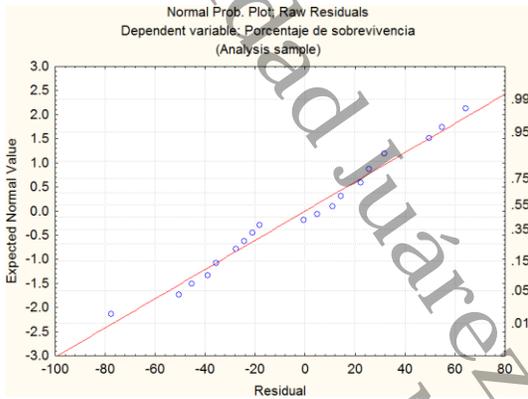
stresses. *Environmental and Experimental Botany*. 68:44-50. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.003>.

Zhu, Z., Song, S., Li, P., Jeelani, N., Wang, P., Yuan, H., Zhang, J., An, S., Leng X. (2016). Growth and physiological responses of submerged plant *Vallisneria spiralis* to water column ammonia nitrogen and sediment copper. *Peer J*. 4:e1953. Doi: 10.7717/peerj.1953.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

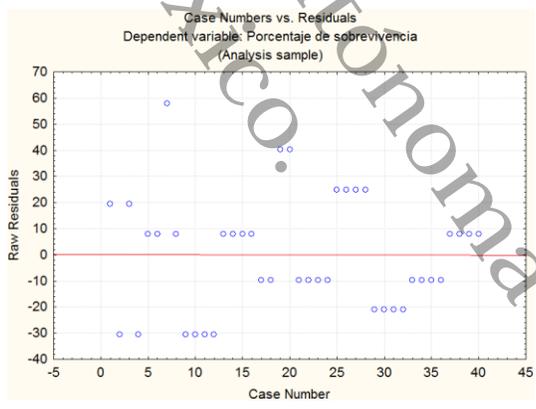
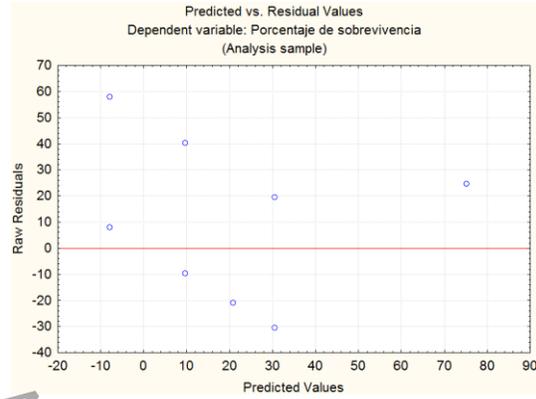
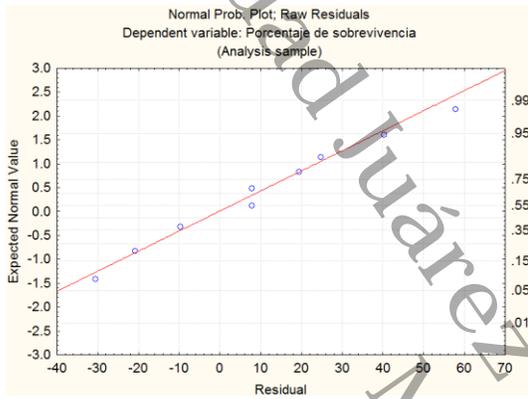
ANEXOS: Gráficas de residuos

Sobrevivencia NO₃

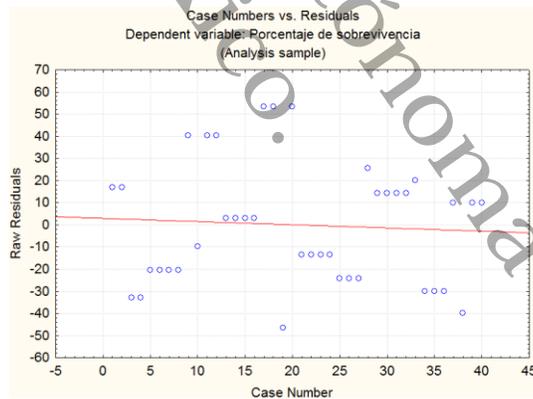
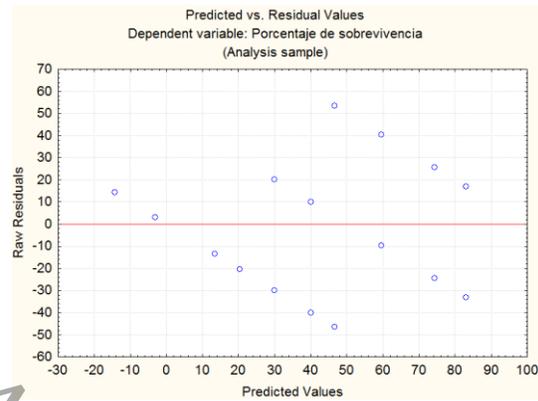
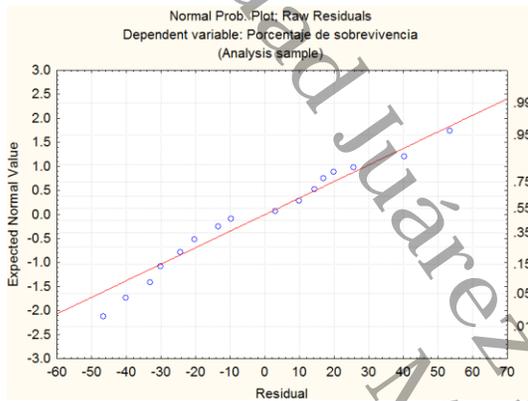


Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Sobrevivencia NH₄

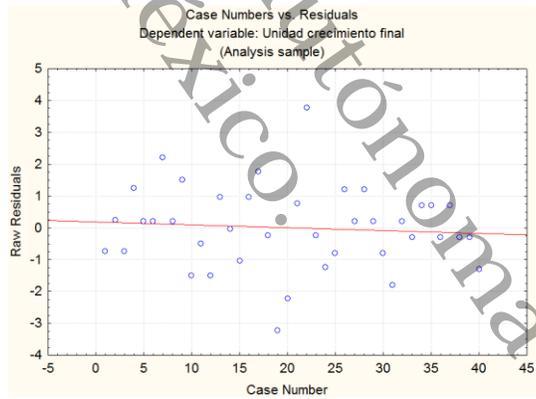
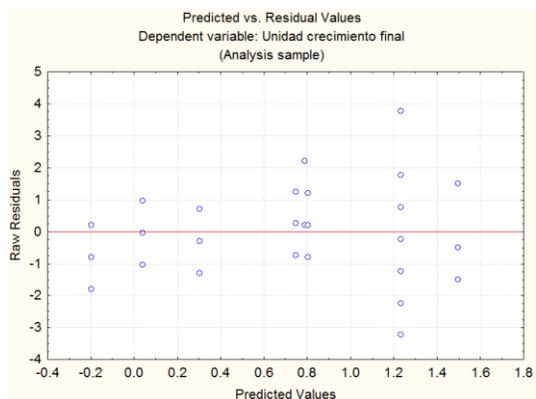
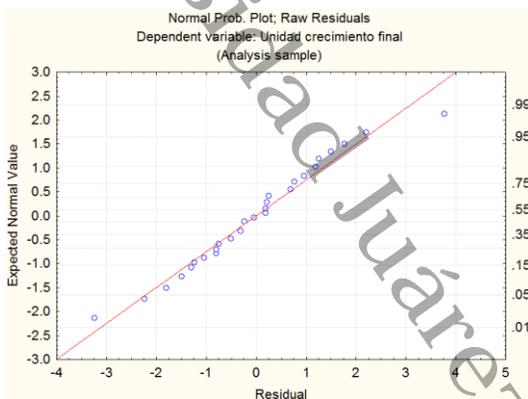


Sobrevivencia $\text{NO}_3:\text{NH}_4$

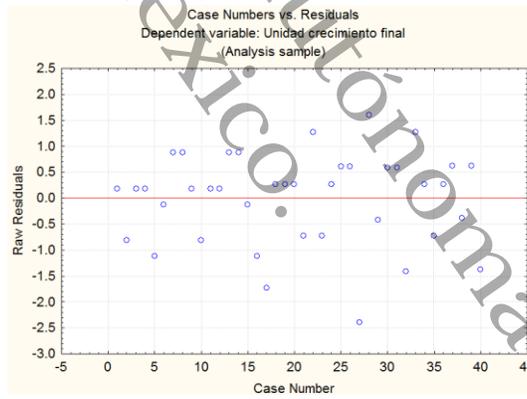
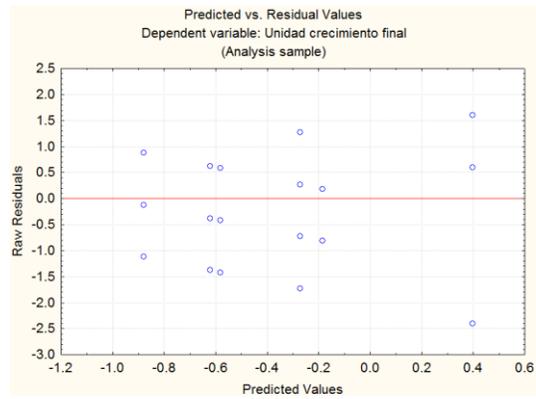
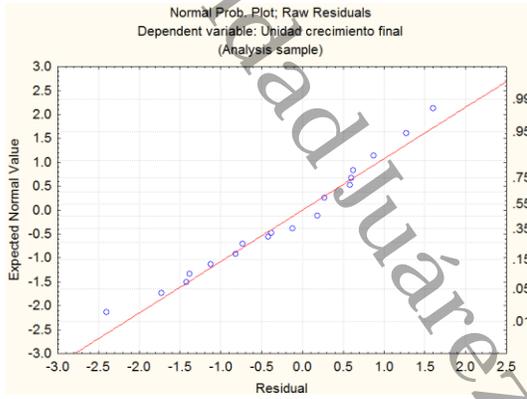


Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Unidades de Crecimiento NO₃



Unidades de Crecimiento NH₄



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Unidades de Crecimiento $\text{NO}_3:\text{NH}_4$

