UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas

"ANTOCIANINAS COMO MARCADORES DE ESTRÉS EN *VALLISNERIA AMERICANA* POR INCREMENTOS DE P EN TRES FUENTES DE N"

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis

Para obtener el título en:

Licenciatura en Biología

Presenta:

Jorge Augusto Hernández Rodríguez

Director:

Dra. Violeta Ruiz Carrera

Villahermosa, Tabasco, México **Febrero, 2019**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Antocianinas Como Marcadores De Estrés En Vallisneria Americana Por Incrementos De P En Tres Fuentes De N

Por Jorge Augusto Hernández Rodríguez

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

CANTIDAD DE PALABRAS 8267

HORA DE ENTREGA 01-JUL-2025 09:31A. M.

NÚMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO 117015832

Antocianinas Como Marcadores De Estrés En Vallisneria Americana Por Incrementos De P En Tres Fuentes De N

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ri.ujat.mx Internet	192 palabras — 3%
2	docplayer.es Internet	114 palabras — 2%
3	proyectos.inecol.edu.mx Internet	62 palabras — 1%
4	archive.org Internet	58 palabras — 1%
5	dgip.unach.mx Internet	58 palabras — 1%
6	archivos.ujat.mx Internet	46 palabras — 1%
7	cybertesis.uach.cl Internet	46 palabras — 1%
8	Marja P Kähkönen, Johanna Heinämäki, Velimatti Ollilainen, Marina Heinonen. "Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities", Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003 Crossref	36 palabras — 1%
9	idus.us.es Internet	35 palabras — 1%
10	doczz.es Internet	34 palabras — 1%
	repositorio.umsa.bo	

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

11	Internet	34 palabras — 1%
12	www.coursehero.com Internet	33 palabras — 1%
13	manualzz.com Internet	24 palabras — < 1%
14	doczz.net Internet	21 palabras — < 1%
15	es.scribd.com Internet	14 palabras — < 1%
16	repositorio.unp.edu.pe Internet	13 palabras — < 1%
17	www.scielo.org.mx Internet	13 palabras — < 1%
18	cicy.repositorioinstitucional.mx Internet	11 palabras — < 1%
19	ia801906.us.archive.org Internet	11 palabras — < 1%
20	hdl.handle.net Internet	10 palabras — < 1%
21	repositorio.uaaan.mx:8080 Internet	10 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS	ACTIVADO	EXCLUIR FUENTES	DESACTIVADO
EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA	ACTIVADO	EXCLUIR COINCIDENCIAS	< 10 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

ENERO 14 DE 2019

C. JORGE AUGUSTO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ
PAS. DE LA LIC. EN BIOLOGIA
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 denominado: **"ANTOCIANINAS COMO MARCADORES DE ESTRÉS EN *VALLISNERIA AMERICANA* POR INCREMENTOS DE P EN TRES FUENTES DE N"**, asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera sobre el cual sustentará su examen profesional, cuyo jurado está integrado por el Dr. Humberto Hernández Trejo, M. en C. Guadalupe Hernández Piedra, Dra. Violeta Ruiz Carrera, M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio y M. en C. Jesús Manuel Carrera Velueta.

A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRÓN LÓPEZ
DIRECTORA

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

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

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

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 denominado: **"ANTOCIANINAS COMO MARCADORES DE ESTRÉS EN *VALLISNERIA AMERICANA* POR INCREMENTOS DE P EN TRES FUENTES DE N",** 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 14 de Enero de 2019.

AUTORIZO

JORGE AUGUSTO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

Agradecimientos

- A mis padres, Beatriz Rodríguez Magaña y Sergio Hernández Arellano, por el apoyo brindado en todos los ámbitos a lo largo de estos años académicos.
- A mi familia en general, abuelos, primos, tíos.
- A la universidad, Juárez Autónoma de Tabasco por haberme otorgado las herramientas necesarias para hoy culminar mi carrera.
- Al proyecto de investigación “Flavonoides en *Vallisneria americana* como Biomarcadores de estrés por eutrofización” Clave UJAT-2014-IA-09. por el cual estuve becado durante la realización de esta tesis.
- A la Doctora Violeta Ruiz Carrera directora, de este proyecto. Gracias profesora que me dio la oportunidad de comprender y ver de manera distinta la química y la biotecnología y sin la cual no habría podido finalizar esta tesis.
- A mis maestros y maestras por la guía y el aprendizaje y el amor inculcado hacia la Biología.
- A todos mis amigos y compañeros. Elizabeth Pérez Netzahual, Diana Cecilia Rivera Ramos, Elsy Guadalupe Carrillo Méndez, Diana Jiménez Platero, Carlos Alberto Castellanos Castellano que me acompañaron atreves de todos estos años, los cuales me dieron su apoyo incondicional en todo momento y aquellos que fui conociendo durante el tiempo que estuve en la universidad.
- A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología, Jesús (chucho), José Juan Cano Sánchez, Geni Del Carmen Martínez Rodríguez, Daniel Iván Pérez Jiménez, Patricia Cruz Cerino.
- A mis revisores de tesis y a todas las personas por brindarme su conocimiento, gracias por todo el aprendizaje otorgado así como a cada una de las personas que conformaron mi vida universitaria.

Gracias

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Índice General

Índice de Figuras I

Índice de Tablas I

1. Introducción 1

2. Antecedentes 3

2.1. El N y P en humedales tropicales 3

2.2. Función ecológica de macrófitas vasculares sumergidas 4

2.3. Vallisneria americana 4

2.4. Antocianinas y estrés oxidativo 6

2.5. Espectrofotometría 7

3. Justificación 8

4. Hipótesis 9

5. Objetivos 9

5.1. Objetivo general 9

5.2. Objetivos particulares 9

6. Método 10

6.1. Plantas *in vitro* 11

6.2. Diseño experimental 12

6.3. Análisis de sobrevivencia 12

6.4. Preparación y extracción de antocianinas 13

6.5. Determinación de antocianinas 14

6.6. Análisis fisicoquímicos 14

6.7. Análisis de datos 14

7. Resultados 15

7.1. Sobrevivencia 15

7.2. Marcadores de crecimiento 16

7.3. Antocianinas en hojas y raíces 17

7.4. Antocianinas *vs* crecimiento 18

7.5. Antocianinas *vs* C, N y P 19

7.6. Evaluacion fisicoquímica de los medios 21

8. **Discusión** 23

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

9. **Conclusiones.**.....26

10. **Literatura**.....27

Anexo.....32

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Índice de Figuras

Figura 1 Epihidrograma en *Vallisneria americana*.....5
Figura 2 Estructura química de las antocianinas.....7
Figura 3 Diagrama metodológico.....10
Figura 4 Procedimiento de cultivo *in vitro*.....11
Figura 5 Plantas de V.americana en tres fuentes experimentales de N y controles.....15
Figura 6 Porcentaje de estolones y rametes en las plantas de *V.americana*.....16
Figura 7 Estolones y brotes V.americana en controles.....17
Figura 8 Contenido de antocianinas de hojas y raíz de NO_3.....20
Figura 9 contenido de antocianinas de hoja y raiz de NH_4NO_3.....20
Figura 10 Datos fisicoquímicos de medios de cultivo con N experimental y controles.....22

Índice de Tablas

Tabla 1. *Arreglo Taguchi, y relaciones molares y controles experimentales*.....13
Tabla 2. *Contenido promedio de antocianinas en hojas y raíz de V.americana a 7 días* ...18

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

1. Introducción

El fósforo (P) y el Nitrógeno (N) son bioelementos de numerosas moléculas clave, incluidas proteínas, ADN y ARN que son requeridas por los organismos en grandes cantidades para su crecimiento óptimo. Sin embargo, el incremento de N en los ecosistemas ha sido mucho mayor que P y esto ha supuesto que el P se convierta en el gran limitante de la fotosíntesis (Lu *et al*. 2012) Por ello, la relación N:P resulta fundamental en el metabolismo de las macrófitas sumergidas costeras. Estas macrófitas están bajo amenaza por eutrofía así como por hipereutrofía en los ecosistemas acuáticos (Sánchez *et al*. 2007).

El incremento de N y P ha afectado a la biodiversidad funcional y los procesos biogeoquímicos que benefician la producción primaria en muchas regiones acuáticas; en el continente Americano la especie vulnerada ha sido *Vallisneria americana* (Benson *et al*. 2008). La hipótesis del estrés por enriquecimiento de N en macrófitas sumergidas, que prevalece desde el siglo pasado, no explica contundentemente el mecanismo metabólico de toxicidad de este bioelemento; por lo tanto, continúan las investigaciones sobre los procesos de regulación metabólica asociadas a la asimilación de N y P en plantas sumergidas (Cordell *et al*. 2009). El incremento de P genera más oxígeno e incrementa el estrés oxidativo en vegetales, inducido por un exceso de producción y acumulación de moléculas llamadas ROS que son especies de oxígeno reactivo (Nawkar *et al*. 2013). El estrés oxidativo es un desorden metabólico actual que se ha relacionado a diferentes tipos de estrés abiótico de gran impacto en el crecimiento de una planta, de tal forma que las reducciones de crecimiento resultantes han sido mayores de 50 % en la mayoría de las especies (Rejeb *et al*. 2014). En el estrés oxidativo, la generación y desintoxicación de ROS desencadena un desequilibrio debido a la perturbación de la fisiología celular y la biosíntesis de novo de ROS, como parte constitutiva de la señalización de estrés y la respuesta inmunitaria necesaria para la defensa así como la adaptación. Estos mecanismos coexisten debido a los

factores primarios de estrés como metales de transición, luz ultravioleta y exceso de nutrientes) que estimulan la generación de ROS (Zhang *et al*. 2010; Nawkar *et al*. 2013)

Las plantas cuentan con mecanismos para metabolizar, y manejar la homeostasis celular. El estrés oxidativo impacta significativamente el estatus de los nucleótidos ATP, NADH y NADPH (Anjum *et al*. 2016) y produce metabolitos antioxidantes (Ostrofsky y Zettler 1986). Especialmente los flavonoides, como las antocianinas, las cuales son metabolitos antioxidantes involucrados en la resistencia de la planta contra el estrés ambiental abiótico, como son, luz ultravioleta, temperatura, contaminación del aire, metales pesados, heridas mecánicas y la deficiencia nutricional; estos han sido los factores de estrés más investigados (Nakabayashi y Saito 2015).

En esta investigación la finalidad fue analizar en los cultivos de *V. americana* el efecto del incremento de P en diferentes relaciones estequiométricas C/N/P con enriquecimiento de N y C, sobre su crecimiento y contenido de antocianinas. El estudio de la condición metabólica de *V. americana* frente al desafío de la eutrofización es necesario para comprender su respuesta de aclimatación, adaptación y defensa (Hering *et al.* 2006).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2. Antecedentes

2.1 El N y P en humedales tropicales

Los humedales como marismas, pantanos o ciénagas son ecosistemas que surgen cuando la saturación del terreno por agua produce sustratos hídricos (dominados por procesos anaeróbicos) que permite el establecimiento de biota, principalmente plantas enraizadas (Keddy 2010). Debido a que los humedales representan un gradiente entre ambientes acuáticos y terrestres, no hay una definición universalmente reconocida sobre estos ecosistemas, generando así confusiones e inconsistencias en la clasificación de inventario y manejo (Martínez *et al*. 2014)

La eutrofización es un problema persistente en humedales de todo el mundo. Las disminuciones en la calidad del agua asociados a la eutrofización son causadas por el aumento de niveles de N y P, debido a las actividades humanas como; la quema de combustibles fósiles, el uso de fertilizantes agrícolas y la captación de las aguas residuales (Smith *et al.* 1999). Las actividades agropecuarias ocupan las mayores extensiones de tierra en el mundo y en casi todas ellas se aplica gran cantidad de fertilizantes que luego son arrastrados y enriquecen los cuerpos de agua. La eutrofización producida por estas actividades resulta en tasas de descomposición muy elevadas (Moreno-Casasola 2008).

Las pérdidas de P por drenaje en los suelos, es decir, por lixiviación y escorrentía, resultan en su utilización ineficiente e incrementa más el riesgo de eutrofización en ríos y estuarios (Berkheiser *et al.* 1980). Por lo que la interacción del P con N es esencial para la producción primaria de ríos y lagos. Una característica única del P es su baja disponibilidad debido a la lenta difusión y alta fijación en los suelos. Su solubilidad en agua es tan baja que sólo hay un movimiento lento y constante de P en medios acuáticos (Shen *et al.* 2012). Todo esto significa que el P es un factor limitante de crecimiento en organismos vegetales. La mayor parte de dicho elemento en el suelo son compuestos orgánicos e inorgánicos no asimilables

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

(Holford 1997). Las plantas sólo pueden tomar ortofosfato ($P\text{-}H_2PO_4$), cuya concentración rara vez excede 10 µM (Holford 1997).

2.2 Función ecológica de macrófitas sumergidas costeras

Las macrófitas sumergidas influyen sobre varios factores ambientales a través de su respiración, fotosíntesis y tasa de crecimiento. Entre estos factores destacan la concentración de oxígeno disuelto y dióxido de carbono, el contenido de nutrientes, el pH, la penetración de la luz, la velocidad de la corriente y la tasa de sedimentación; y sus efectos pueden influir directa o indirectamente en la vida de otros organismos, sobre todo de la microbiota que utilizan estas macrófitas como alimento, protección y soporte (Moreno-Casasola 2008). El impacto sobre las plantas acuáticas en el ambiente y en las relaciones bióticas aumenta conforme el volumen de agua disminuye (Lugo *et al.* 1990; Mitsch y Gosselink 2000), lo cual genera estrés ambiental y desencadena la producción de metabolitos secundarios como las antocianinas como mecanismos de resistencia al estrés (Mohd *et al.* 2011).

2.3 *Vallisneria americana*

La angiosperma *Vallisneria americana Michx. (*Clase: Liliopsida; Orden: Hydrocharitales; Familia: Hydrocharitaceae). Se distribuye desde Norteamérica hasta América Central (Korschgen & Green 1988; Ellison 2004). En la zona costera del Golfo de México ha sido reportada desde Tamaulipas hasta Yucatán y el Caribe en ecosistemas lénticos y lóticos (Lot. 1999; Novelo y Ramos 2005). Su distribución en las lagunas de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla ha registrado una marcada variación temporal y espacial, con tendencia a disminuir (Sánchez *et al.* 2007). *Vallisneria americana* es un ejemplar dioico (Figura 1) con capacidad de reproducción sexual y asexual; produce rizomas cortos y verticales que presentan rosetas de hojas (McFarland 2006); habita en ecosistemas dulceacuícolas o ligeramente salobres (estuarianos); y su desarrollo completo se da en condición sumergida y enraizada al sedimento. Presenta hojas lineales

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

sumergidas o flotantes en forma de cinta y flexibles que se extienden dependiendo de la profundidad del agua.

La dimensión de las hojas es de 10-25 mm y de ancho 5-9 mm; presenta venas y márgenes dentados con una franja central oscura y estrías pigmentadas transversales visibles (Catling *et al*. 1994; Korschgen 1997). Las hojas están alternadas y se encuentran en hileras que surgen de pequeños tallos laterales. Presenta flores pequeñas en un tono blanco sobre la misma planta.

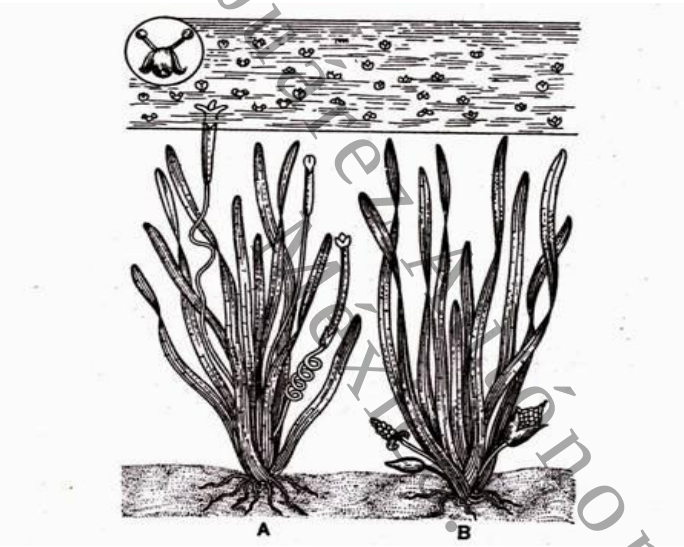


Figura 1. Epihidrograma en *Vallisneria americana* (A) planta femenina (B) planta masculina, (Kumar 2017) Rescatada de www.biologydiscussion.com

El polen es liberado en filamentos gelatinosos y ocurre cuando la flor es impulsada por las corrientes del agua o el viento. El polen se sumerge en la depresión creada por la flor y se deposita sobre el estigma (polinización hidrófila) (Sculthorpe 1967). Los granos de polen son alargados y esféricos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

La reproducción sexual es por dispersión de semilla y la asexual por estolones. La planta desarrolla rizomas horizontales o plagiotrópicos que suelen estar debajo de la superficie del sustrato y mantienen una estrecha relación con el rizoma ortotrópico. Las raíces son fibrosas y se desarrollan en la porción basal del rizoma ortotropico (Korschgen 1997).

2.4 Antocianinas y estrés oxidativo

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides que forman un grupo de pigmentos hidrosolubles de origen natural reconocidos por la coloración roja, púrpura y azul que pueden estar presentes en diferentes órganos, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. (Fennema 2000; Castañeda *et al.* 2009). De todas las antocianinas que actualmente se conocen, las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, peonidina y malvidina (Figura 2) nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas (Aguilera *et al*. 2011). La acumulación de pigmentos de antocianina en tejidos vegetales es una característica de estrés en las plantas, por ejemplo, en *Arabidopsis*, la respuesta de estrés reveló que la ROS es una importante señal para desencadenar la acumulación de las antocianinas y a su vez las antocianinas funcionan como antioxidante para amortiguar la homeostasis de ROS y ofrecer protección contra el daño celular causado por estrés oxidativo (Ríos 2003).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

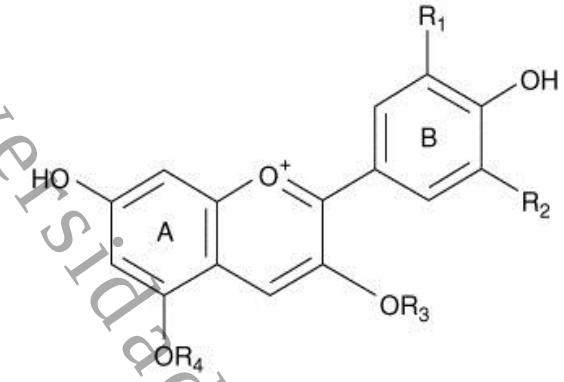


Figura 2. Estructura química de las antocianinas Cianidina: R1 = OH; R2, R3, R4 = H. Delfinidina: R1, R2 = OH; R3, R4 = H. peonidina: R1 = OCH_3; R2, R3, R4 = H. Petunidina: R1 = OCH_3; R2 = OH; R3, R4 = H. Malvidina: R1, R2 = OCH_3; R3, R4 = H. Pelargonidina: R1, R2, R3, R4 = H. (Kähkönen *et al*. 2003)

2.5 Espectrofotometría

Los métodos espectroscópicos que usan longitudes de onda UV-Visible (UV-Vis) son rápidos, baratos y cuantifican el contenido de metabolitos secundarios (Nieves *et al* .2006) que pueden utilizarse como marcadores bioquímicos.

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. El fundamento de la espectrofotometría se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones en las regiones del ultravioleta (UV cercano de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm). Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones pH, temperatura, fuerza iónica del medio (Nieves *et al.* 2006). El análisis espectrofotometría de UV-Vis requiere poca cantidad de muestra y preparación y rápidamente proporciona información valiosa y sólida sobre la presencia de determinadas clases de metabolitos, como los flavonoides, carotenoides y clorofilas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

3. Justificación

La tasa de contaminación por perturbaciones antropogénicas en ecosistemas de agua dulce y salobre incrementa los niveles de nutrientes (N y P) generando problemas de estrés en las especies locales de macrófitas enraizadas sumergidas. En los últimos años *Vallisneria americana* ha mostrado disminución en número y extensión de praderas distribuidas en la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla, y asociado al hecho, destaca el incremento de la carga orgánica y de sólidos suspendidos. Por el impacto ambiental que representa la desaparición de esta especie a largo plazo se han abordado estudios en cultivo *in vitro* para comprender el mecanismo metabólico de estrés asociado al incremento de N o en relación N/P, en concentraciones de P que se han relacionado a la hipótesis de homeostásis metabólica con el P en relación uno milimolar (Bautista et al. 2016); así como por su relación con el estrés oxidativo ligado a los contenidos de flavonoides como estrategia de defensa (Cruz 2014). Los enfoques de estrés oxidativo presentan investigaciones escasas en angiospermas acuáticas sumergidas. Los estudios se han realizado en géneros de la familia *Hydrocaritaceae* como *Enhalus,Thalassia* y *Halophila* (Attaway et al. 1970; Qi et al. 2012) a la cual pertenece *V. americana*, para reconocer la filogenia molecular de éstas macrófitas (Qi et al. 2012). La presente investigación aprovechó el suministro de plantas clonadas in vitro del laboratorio de Biotecnología para determinar en la relación C/N/P el efecto de estrés del P en tres fuentes de N analizada con la técnica de Taguchi.

La evaluación experimental con la metodología de Taguchi, aplica diseños factoriales fraccionados, para evitar una serie de ensayos progresivos. El diseño Taguchi analiza a menudo muchos factores con el fin de identificar aquellos que tienen un efecto importante para reducir el número de experimentos y obtener resultados estadísticamente significativos (Moussavi et al. 2007). Los factores de control luego se utilizan para predecir una combinación óptima. Si estos resultados son satisfactorios, los demás experimentos son innecesarios (Cobb et al. 1994).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

4. Hipótesis

De acuerdo con la teoría estequiométrica del balance C/N/P ligado al metabolismo, se propuso que el enriquecimiento de C, N y P en *Vallisneria americana* cultivada *in vitro* estimula el crecimiento estolonifero o produce antocianinas como mecanismo de defensa ante el estrés**.**

5. Objetivos

Objetivo general

- Evaluar en plantas de *Vallisneria americana* cultivadas *in vitro*, el efecto del incremento de P en la relación C/N/P y su efecto sobre el crecimiento vegetativo y la producción de antocianinas ante un posible estrés.

Objetivos particulares

- Comparar el crecimiento vegetativo en diferentes relaciones C/N/P con énfasis en el incremento de P.
- Revelar el estrés oxidativo por el contenido de antocianinas.
- Discriminar el efecto de los iones sodio y cloro de las diferentes sales de N utilizadas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

6. Método

El enfoque de este trabajo fue experimental, exploratorio y metabólico (Figura 3).

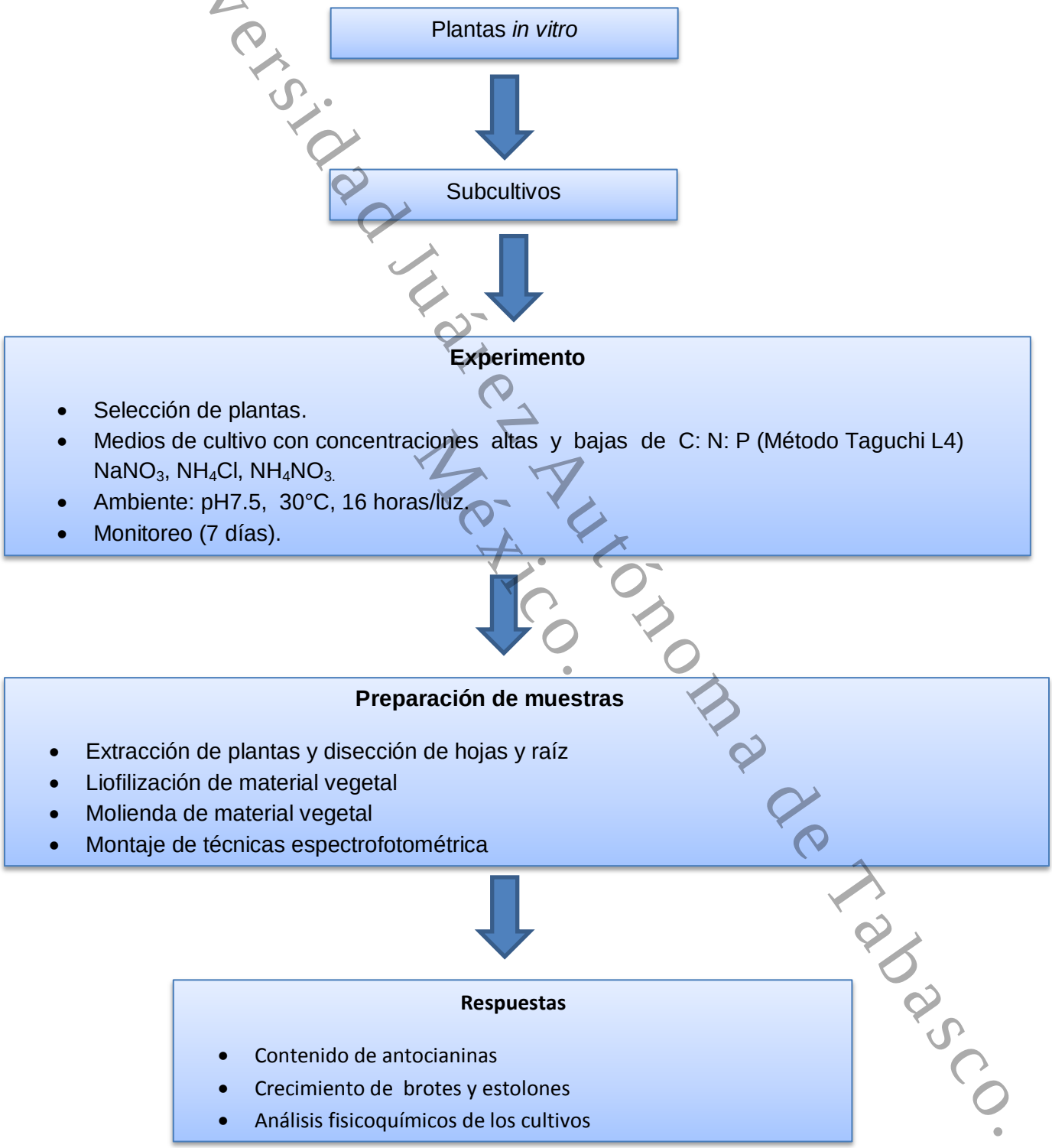


Figura 3. Diagrama metodológico.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

6.1 Plantas *in vitro*

El procedimiento para la obtención de rametes antes del experimento se estableció a partir de plantas clonadas de Vallisneria americana de acuerdo a Bautista et al. (2016). El cultivo aséptico de ortet y la propagación de rametes se realizó en medio de cultivo sin MS y MS 12.5% modificado sin NH_4, respectivamente con recambios de medio cada 15 días por dos meses. El medio de cultivo fue preparado con micro y macro nutrientes (Bautista et al. 2016).

El cultivo inicio con la regeneración de semillas asépticas 5 ± 17 en 40 ml de fase líquida en recipientes de vidrio estéril (6.5 cm de alto x 5.5 cm de ancho) a pH de 7.5 (Figura 4 a). En una cabina de flujo de aire aséptico se depositaron las semillas (Figura 4 b). En la primer fase de germinación los cultivos permanecieron las plántulas en oscuridad a 30 °C con un tiempo de germinación cercano a 15 días, luego recibieron luz en fotoperiodo de 16 horas/luz. Después el mismo procedimiento, condiciones y tiempos de cultivo se usaron en el proceso de clonación.

Figura 4. Procedimientos de cultivo *in vitro* (a) Unidades experimentales estériles de diferentes tratamiento (izquierda) y (b) Procedimiento de cultivo siembra de semillas en campana de flujo laminar (derecha).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

6.2 Diseño experimental

En el experimento se evaluaron las plantas clonadas en niveles altos y bajos de concentración de N, P y C en arreglo Taguchi ortogonal L4 (Tabla 1) en ambiente de luz de 100 µmol de fotones m-2 s-1 a 30 °C. Para estimar el estrés por N/P y C se analizaron tres fuentes de N que fueron $NaNO_3$, NH_4Cl y NH_4NO_3 se usó P-H_2PO_4 y C-HCO_3 (Tabla 1). El cociente C/N/P de 2/1/1 se analizó en relación molar de 435/20/10 y 870/40/10, por lo tanto fueron equivalentes. Además se usaron controles de KNO_3, $NaNO_3$ y NH_4Cl, para estimar los efectos osmóticos. Cada tratamiento presentó tres réplicas con una planta por cada unidad de cultivo. A los siete días del experimento se registró el número de yemas de rizoma y ramete, el porcentaje de sobrevivencia y el contenido de antocianinas fue analizado en raíz y hoja.

6.3 Análisis de sobrevivencia

El marcador de sobrevivencia fue estimado con la ausencia y presencia del color verde de las hojas por unidad de cultivo usando la escala de 0 a 100%; donde 0 fue clorosis y 100 donde la planta contaba con el color verde correspondiente de las hojas sanas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Tabla1. Arreglo Taguchi, relaciones molares y controles experimentales Fuente de Nitrógeno experimental (FN_{ex}) y controles identificados por relaciones estequiometricas C, N y P y Osmolalidad calculada.

	Trat	Rel C:N:P)	Rel N:P	Rel C/N	C	N	H_2PO_4	Osmolalidad
FN_{exp}	No	mM			mM			TT
$NaNO_3$	1.	43:1:1	20	43	870	20	1	1782
	2	11:1:1	40	11	435	40	1	952
	3	2:1:1	2	22	435	20	10	930
	4	2:1:1	4	22	870	40	10	1840
NH_4Cl	1	43:1:1	20	43	870	20	1	1782
	2	11:1:1	40	11	435	40	1	952
	3	2:1:1	2	22	435	20	10	930
	4	2:1:1	4	22	870	40	10	1840
NH_4NO_3	1	43:1:1	20	43	870	20	1	1782
	2	11:1:1	40	11	435	40	1	952
	3	2:1:1	2	22	435	20	10	930
	4	2:1:1	4	22	870	40	10	1840
Controles								
KNO_3	K	22/1/1	20	22	435	20	1	912
NH_4Cl	Cl	43/1/1	10	43	435	10	1	912
$NaNO_3$	Na	43/1/1	10	43	435	10	1	912

6.4 Preparación y extracción de antocianinas

Las plantas fueron extraídas del medio acuoso. Con ayuda de pinzas de disección y colocadas sobre papel absorbente para retirar el H_2O superficial. El peso fresco de la planta completa fue registrado en una balanza analítica profesional (Velab). La disección de hoja y raíz se realizó con ayuda de un bisturí dentro cajas petri de

Universidad Juárez Autónoma de México. Tabasco.

vidrio previamente esterilizado con 5ml de H_2O. Las muestras (0.1 g) fueron congeladas durante un mes a -20°C en ultra congelador (Modelo UF V 500).

Posteriormente se registró el peso seco en las muestras liofilizadas al alto vacío a (-40°C, 133m Pascales) (Freeze Dry Sistem Labconco) por cuatro días. Las muestras fueron molidas en un mortero de porcelana y la extracción se llevó acabo con una mezcla de 70% etanol y 30 % de ácido acético en oscuridad utilizando el método modificado de Salinas *et al*. (1999). El extracto etanólico fue sonicado durante 5 min en tubos eppendorf y centrífugado a 14,000 rpm durante 10 min. El extracto final se guardó a -5ºC.

6.5 Determinación de antocianinas

En el espectrofotómetro Shimadzu UV-1280 (Shimadzu, Kyoto, Japan) se realizó la caracterización de antocianinas. El extracto se leyó 520 nm. La curva de calibración se realizó con una dilución de 10 µg de cloruro de cianidina en concentraciones 12.5 hasta 125 µl (Salinas *et al.* 1999). El contenido total de antocianinas (µg g^{-1}) se calculó en las hojas y raíces.

6.6 Análisis fisicoquímicos

Los datos fisicoquímicos se analizaron en un Medidor Multiparametrico para Calidad del Agua (HANNA HI9828). Los parámetros de pH, Oxígeno disuelto (OD%), Sólidos totales disueltos (STDppm), salinidad (UPS) y potencial redox (ORPmv) se registraron en los medios al final del experimento.

6.7 Análisis de datos

Con pruebas de ANOVA y Kruskal-Wallis se analizaron los datos de crecimiento y contenidos de antocianinas por tratamiento y controles. Las diferencias entre medias usaron pruebas de Fisher. El diseño experimental Taguchi (L4 arreglo ortogonal) usó la razón señal/ ruido sin interacción y con la característica de

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

calidad “el más pequeño es mejor” para estimar la media y la variabilidad del contenido de antocianina con el software estadístico fue Statistica V8 Statsoft

7. Resultados

7.1 Sobrevivencia

Las plantas *in vitro* sobrevivieron en las fuentes experimentales de N que presentaron NO_3 y NH_4NO_3, mientras que en NH_4Cl la mortandad fue total (Figura 5A). Así mismo, sobrevivieron en los controles de KNO_3, NH_4Cl y $NaNO_3$ (Figura

Figura 5. Plantas de *V.americana* en tres fuentes experimentales de N: NO_3,NH_4 y NO_3NH_4 (superior) y en controles KNO_3, NH_4Cl y $NaNO_3$ (inferior).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

7.2 Marcadores de crecimiento

Con suministro de N_{exp} de la fuente $NaNO_3$, el crecimiento de rametes fue mayor en las relaciones C/N/P de 43/1/1 y 2/1/1 de los tratamientos 1 y 3 (Figura 6) mostrando promedios de 60%; en cambio el crecimiento de estolones fue superior en el tratamiento. Aunque los otros tratamientos de N_{exp} de esta fuente mostraron entre 40% de estolones y 20% de rametes su diferencia estadística fue rechazada (Figura 6). La formación de estolones en NH_4NO_3 fue de 40% en la relación C/N/P 2/1/1 y N/P 2/1 del tratamiento 3 ($p < 0.05$); mientras que en el resto de las relaciones el porcentaje fue menor o no registrado, como en el último tratamiento (Figura 7); en las tres relaciones C/N/P de los tratamientos 1 a 3 la producción de rametes osciló entre 0 y 40% sin registrar diferencias significativas ($p<0.05$). Excepcionalmente en las plantas en N_{exp} de NH_4Cl se encontró evidencia de estolones en la relación 22 de C/N y N/P 2/1 a los siete días de la prueba. Por lo cual, a causa de su elevada mortandad fue eliminada del análisis de resultados subsecuentes. Todos los controles produjeron un estolón por cultivo, y solo con KNO_3 formaron 50% de brotes.

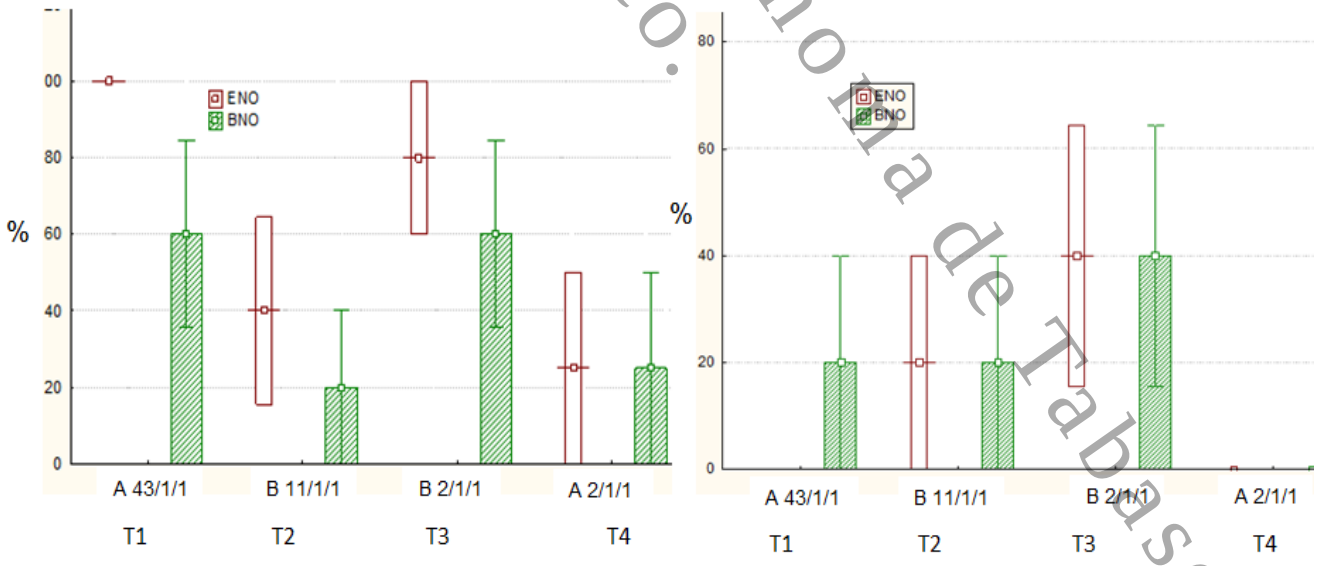


Figura 6. Porcentaje de estolones (ENO) y brote (BNO) en los tratamientos $NaNO_3$ y NH_4NO_3 de las plantas de *V.americana* cultivadas in vitro A=carbono alto y B=carbono bajo

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

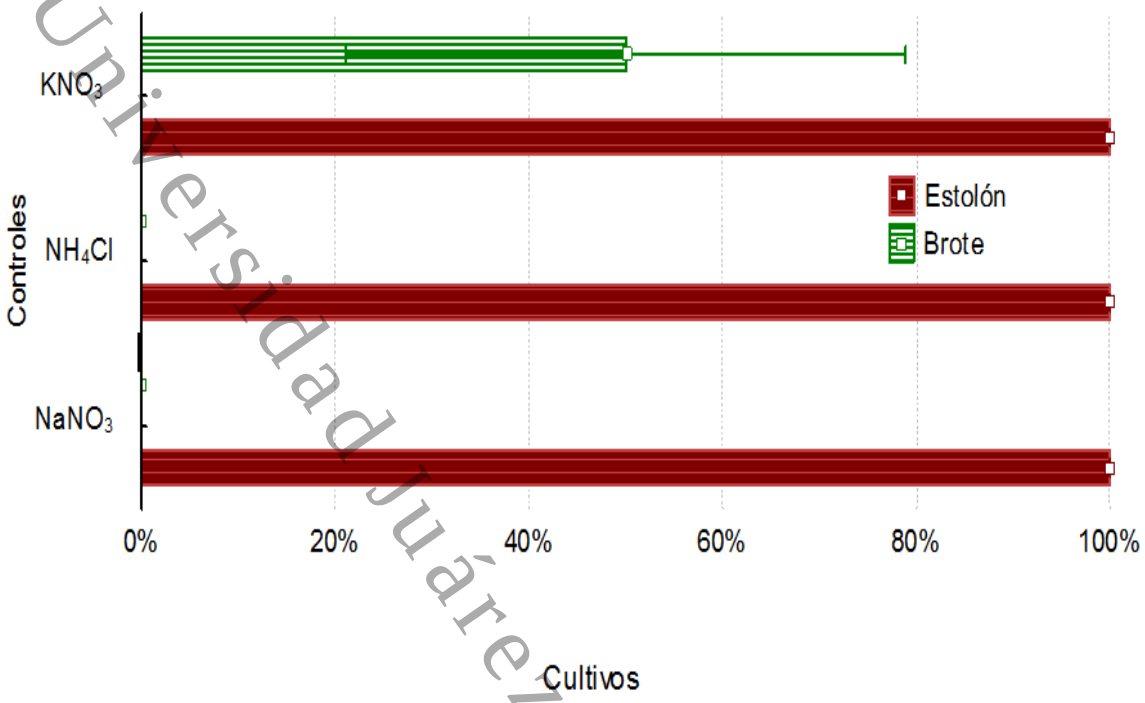


Figura 7. Estolones y brotes en las plantas de *V.americana* en controles de KNO_3 NH_4Cl y NO_3 (N=3).

7.3 Antocianinas en hojas y raíces

Los contenidos de antocianinas en las hojas de las plantas cultivadas en $NaNO_3$ y NH_4NO_3 y los tres controles presentaron rangos de 19 a 88 µg g^{-1} y en las raíces de 13 a 36 µg g^{-1} (Tabla 2). En las hojas el contenido fue mayor usando la fuente de NH_4NO_3 y el control de $NaNO_3$, sin embargo, fue superior con KNO_3. Así mismo en las raíces, el control KNO_3 presentó el contenido más elevado y el control de $NaNO_3$ el más bajo.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Experimento	Tratamiento	Hoja	Raíz
	ATC µg g^{-1}		
$NaNO_3$	T_1-T_4	22.51	28.99
NH_4Cl	T_1-T_4	ND	ND
NH_4NO_3	T_1-T_4	37.46	25.44
Controles			
KNO_3	Control K	88.21	35.61
NH_4Cl	Control Cl	19.04	27.17
$NaNO_3$	Control Na	26.81	12.63

Tabla 2. Contenido promedio de antocianinas en hojas y raíz de *V.americana* a 7 días de (cultivo N=3 tratamientos por fuente de Nexp.)

7.4 Antocianinas *vs* crecimiento

En la fuente NO_3 experimental la concentración de antocianinas en hoja disminuyó en relación con la formación de estolón (p = 0.03). De manera similar, los controles mostraron una disminución de antocianinas en hojas y raíces.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

7.5 Antocianinas *vs* C, N y P

Las fuente de N_{exp} de NO_3 y NH_4NO_3 incrementaron significativamente los contenidos de antocianinas de *Vallisneria americana*, más en hoja que en raíz (Figura 8 y 9). Los valores elevados de antocianinas en hoja se registraron en NH_4NO_3 con la relación C alto ($p=0.003095$) y P bajo ($p=0.01920$), sin el efecto significativo de N **(**$p=0.318982$). La fuente de NO_3 presentó concentraciones más bajas de antocianinas y provocó incrementos con el C bajo y N alto. La relación C/N asociada a concentraciones altas de antocianinas usando fuentes de NO_3 fue 11/1 y fue indistinto el efecto del P entre valores de 1 y 10 mmol L^{-1}; y para la fuente NH_4NO_3 fue 43/1.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

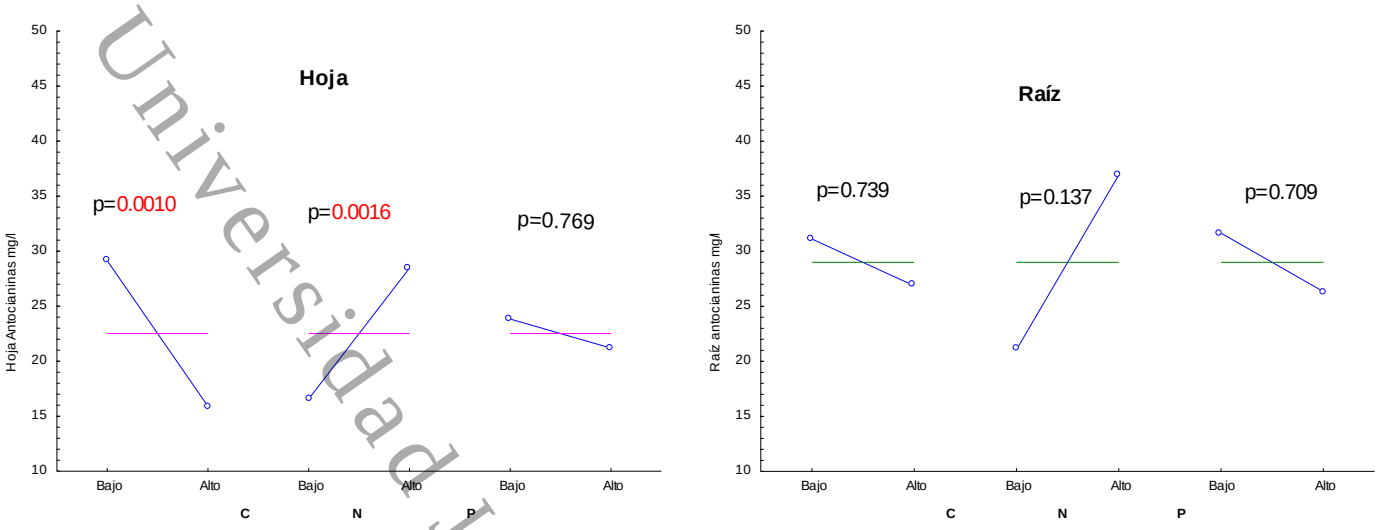


Figura 8. Contenido de antocianinas de hojas y raíz de *V. americana* en concentraciones altas y bajas de C/N/P. Fuentes de NO_3. Y=Relación señal/Ruido de antocianinas.

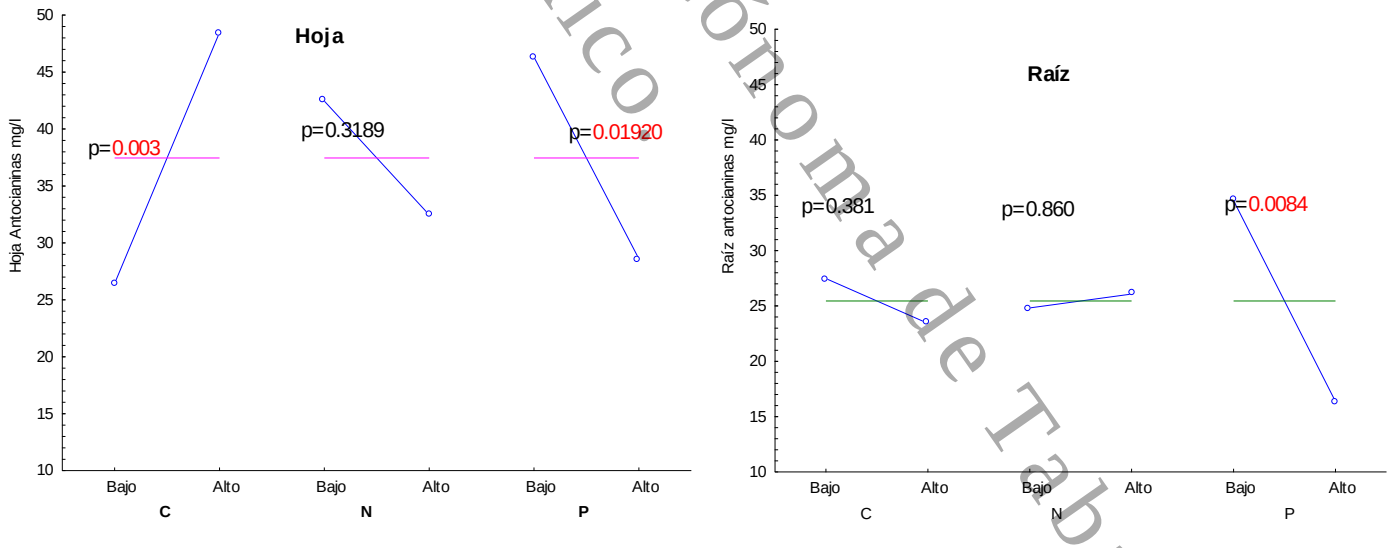


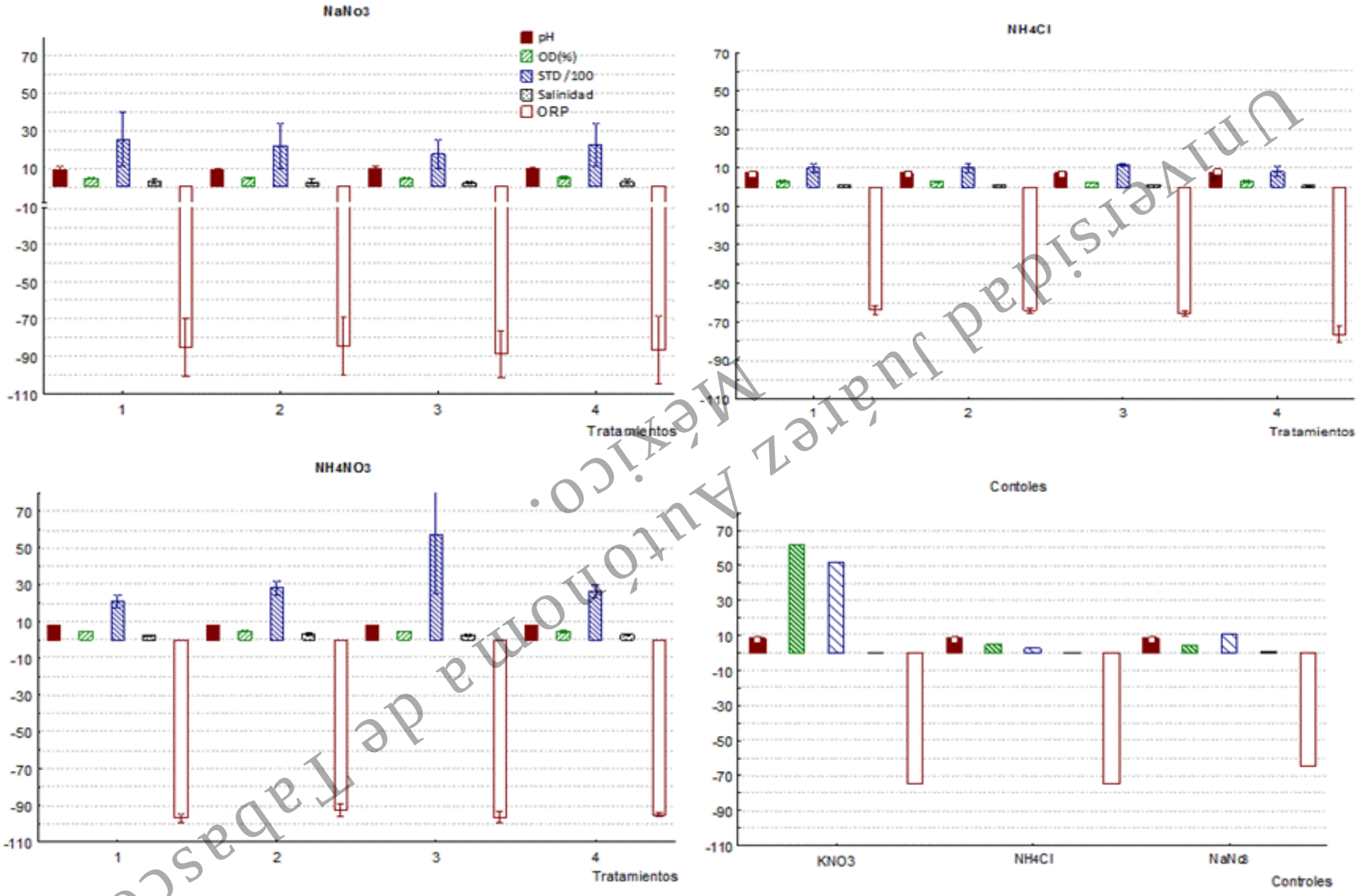
Figura 9. Contenido de antocianinas de hoja y raíz en concentraciones altas y bajas. Fuente de NH_4NO_3. Y=Relación señal/Ruido de antocianinas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

7.6 Evaluación fisicoquímica

Los parámetros fisicoquímicos del medio de cultivo final de la fuente de N_{exp} promediados se consignan en la Figura 10. El OD fluctuó entre 40 y 60 % usando NH_4. Ninguna de las tres fuentes de N experimentales ni los controles mostraron carácter ácido; en contraposición el NH4 experimental alcanzó valor cercano a la neutralidad y el medio de clonación fue alcalino. El Eh fue mayor con NO_3 y en KNO_3 (relación 435/20/1 de C/N/P). La concentración de los STD y la salinidad coincidieron en magnitud; las dos mediciones cambiaron cuando la fuente de N de NH_4 fue única presentando el valor más bajo; en NH_4NO_3 fue el más alto. En contraste, los controles de NO_3 en sal de K y NH_4Cl disminuyeron sensiblemente en estos dos parámetros. Figura 10 controles Entre los de NH_4 experimental y los control las diferencias fueron notables.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Figura 10. Datos fisicoquímicos promedios en el medio de cultivo final de las fuentes de N experimental ($NaNO_3$,NH_4:NO_3 derecha y NH_4Cl izquierda) datos fisicoquímicos promedios de los controles (Izquierda KNO_3,NH_4Cl,$NaNO_3$).

8. Discusión

Existen muy pocos estudios sobre plantas acuáticas de humedales en referencia a la *obtención* de P en suelos y sedimentos, así como del comportamiento de este bioelemento en la rizósfora de las plantas (Xing et al. 2018). En aproximación *in vitro* aplicando la teoría estequiométrica ligada al balance ambiental C/N/P al crecimiento estolonífero de *Vallisneria americana*, los contenidos de antocianinas se expresaron más como un control del desarrollo de estolones que por su respuesta química antioxidativa. La hipótesis planteó que sus poblaciones pueden superar el estrés por enriquecimiento de N de índole inorgánica (NH_4, NH_4NO_3 y NO_3, cuando el metabolismo C/N/P cambia debido al incremento de P (10 mM). Sin embargo, en condición natural la mayor parte del P no es asimilado y por esta razón se necesita mayor investigación sobre los mecanismos reguladores de la asimilación y transporte del P en las macrófitas sumergidas (Secco et al. 2017). Comparando la sobrevivencia de las plantas del control Cloro con la fuente experimental de NH_4 como fuente de N, la consecuencia fue drástica y este resultado no fue explicado por los cambios de pH, salinidad, redox, incluso por el nivel de oxigenación del medio de cultivo en siete días de exposición. En consecuencia el efecto tóxico del NH_4 en ausencia de NO_3, resultó incuestionable (Gomes et al. 2011). Sin embargo el efecto osmotizante de las principales sales del experimento en las relaciones altas de C/N/P de NH_4 fue claro; ya que con NH_4NO_3 produjo inhibición o ausencia de estolones y rametes, a pesar del incremento de P. Los crecimientos en las fuentes de NO_3 y NH_4NO_3 coinciden con la hipótesis de la tasa de crecimiento, la cual propone que el crecimiento está asociado a concentraciones de P altas.

Estudios han reportado que tanto la magnitud como la dirección de la respuesta en el crecimiento de las plantas con CO_2 elevado depende de la disponibilidad del P (Jakobsen et al. 2016). Así mismo, este estudio se revelaron posibles mecanismos regulatorios de las antocianinas en el crecimiento o como mecanismo de defensa. Sin embargo las antocianinas parecen haber funcionado más como biomarcadores en el desarrollo de rametes que por estrés. Lo anterior quedó explicado con el

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

suministro de KNO_3 ya que la concentración de antocianinas disminuyó con el desarrollo del ramete. Al igual que este resultado, estudios han demostrado patrones de crecimientos en regiones determinadas debido a mecanismos moleculares en la regulación ecológica de las antocianinas (Pervaiz et al. 2017). Aquí se reveló la importancia del K como resultado, destacando tanto el crecimiento como el mecanismo oxidativo mediado por antocianinas. Estas también contribuyen a la sobrevivencia de las plantas expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico. El K cuenta con un papel importante en la activación enzimática, proteica, fotosíntesintética, de osmorregulacion, movimientos estomáticos, transferencia de energía, balance catión-anión; así también mantiene un balance en la resistencia al estrés. Estudios han demostrado que el K interactúa junto al P y otros nutrientes vitales para el desarrollo vegetal (Amtmann et al. 2018). Por lo tanto la producción de antocianinas con incremento de P en fuente de NO_3 y NH_4NO_3 impidió el crecimiento estolonifero, mediante un mecanismo que deberá ser investigado.

La relación C/N/P idónea que mantuvo constante la clonación fue determinada en la fuente de NO_3 en condición de salinidad de 1.1 UPS; sin embargo, el efecto del catión Na demeritó estos efectos, tal como se denota con la contraparte de la relación C/N/P de los controles de Na y Cl. Por lo tanto, en futuros experimentos de efectos de la eutrofización deberá disminuir el uso de sales de Na y Cl que enmascaran el incremento de P, suponiendo un ambiente limnético. Tal como se ha demostrado en estudios de macrófitas acuáticas, como Salvinia auriculata, en la cual el contenido de P afectó negativamente en concentraciones altas de salinidad de 100 a 200 mM con iones Na y Cl (Gomes et al. 2011).

En esta investigación el contenido de antocianinas en hojas y raíces no funcionó como marcador de estrés en relaciones molares de C, N y P, con la concentración de P elevada, a pesar de haber presentado inhibición del crecimiento con las fuentes de NH_4 y NO_3. Tampoco su concentración fue incrementada en los controles de Na y Cl, mismos presentaron la mitad de la concentración de N y C y la décima parte de P respecto a las evaluaciones de N experimental; no obstante

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

la oxigenación y el pH mejoraron de forma equivalente al control de KNO_3. En el control de KNO_3 el mayor crecimiento en brotes y estolones fue ligado a la disponibilidad de oxígeno. Aquí se corrobora el doble efecto tóxico del NH_4 y Cl en máxima concentración, sin embargo con menor balance C/N/P dio evidencias de crecimiento.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

9. Conclusión

1. En plantas cultivadas con NH_4 se corroboró el efecto de toxicidad aun en elevada concentración de P.

2. El incremento de estolones y el contenido de antocianinas de *V. americana* fue favorecido en relaciones bajas de C/N con fuentes de NO_3 y de NH_4NO_3 en concentraciones altas de P.

3. El máximo crecimiento de estolones con formación de rametes y la mayor concentración de antocianinas se registró en las plantas establecidas en el control de KNO_3 del medio de clonación, en relaciones de N/P y C/N bajas; por lo tanto se infiere que el suministro de K conectó el metabolismo primario y secundario durante la activación del crecimiento modular de las plantas. En este estudio la mayor concentración de K fue ligada a la producción de antocianinas y esto a su vez con la regulación del crecimiento fisiológico

4. El incremento de P parece haber contribuido en la resistencia al enriquecimiento de N.

5. Las diferencias de salinidad indicaron consumo de nutrientes, sin embargo por el elevado porcentaje de oxígeno disuelto se infiere que en el medio de clonación la mejor actividad fotosintética se manifestó en una relación C/N/P con el P en concentración uno milimolar.

6. Este es el primer reporte de la función reguladora de los flavonoides en el desarrollo de rametes de *V. americana.*

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

10. Literatura citada

Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., Meza, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 13(2), 16-22.

Amtmann, A., Armengaud, P., Volkov, V. (2018). Potassium nutrition and salt stress. *Annual Plant Reviews*, 328-379.

Attaway, J. A., Pieringer, A. P., Buslig, B. S. (1970). The origin of citrus flavor components—IV: The terpenes of "Valencia" orange leaf, peel, and blossom oils. *Phytochemistry*, *7*(9),1695-1698.

Anjum, N. A., Khan, N. A., Sofo, A., Baier, M., & Kizek, R. (2016). redox homeostasis managers in plants under environmental stresses. *Frontiers in Environmental Science*, 4;35.

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

Benson, E. R., O'Neil, J. M., Dennison, W. C. (2008). Using the aquatic macrophyte *Vallisneria americana* (wild celery) as a nutrient bioindicator. *Hydrobiologia*, 596(1),187-196.

Berkheiser, V. E., Street, J. J., Rao, P. S. C., Yuan, T. L., Ellis, B. G. 1980. Partitioning of inorganic orthophosphate in soil-water systems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *10*(3), 179-224.

Catling, P. M., Spicer, K. W., Biernacki, M., Doust, J. L. (1994). The biology of Canadian weeds. 103. *Vallisneria americana Michx*. *Canadian Journal of Plant Science*, *74*(4), 883-897.

Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.

Cordell, D., Drangert, J. O., White, S. (2009). The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, *19*(2), 292-305.

Cobb, B. D., CIarkson, J. M. (1994). A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Research*, *22*(18), 3801-3805.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México

Cruz-Cerino, P. (2014). Biomarcadores fenólicos de estrés en el balance ambiental N/C de *Vallisneria americana Michx* (Tesis de licenciatura) Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Chmelíková, L., Hejcman, M. (2014). Effect of nitrogen, phosphorus and potassium availability on emergence, nodulation and growth of *T rifolium* medium L. in alkaline soil. *Plant Biology*, 16(4), 717-725.

Ellison, A. M. (2004). Wetlands of Central America. *Wetlands Ecology and Management*, *12*(1), 3-55.

Fennema, O. (2000). Color y estabilidad de antocianinas. Química de los alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, 807-820.

Gomes, M. A. D. C., Suzuki, M. S., Cunha, M. D., Tullii, C. F. (2011). Effect of salt stress on nutrient concentration, photosynthetic pigments, proline and foliar morphology of *Salvinia auriculata Aubl*. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 23(2), 164-176.

Hering, D., Feld, C. K., Moog, O., Ofenböck, T. (2006). Cook book for the development of a Multimetric Index for biological condition of aquatic ecosystems: STAR projects and related initiatives. In The Ecological Status of European Rivers: Evaluation and Intercalibration of Assessment Methods. 311-324.

Holford, I. C. R. (1997). Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research*, 35(2), 227-240.

Jakobsen, I., Smith, S. E., Smith, F. A., Watts-Williams, S. J., Clausen, S. S., Grønlund, M. (2016). Plant growth responses to elevated atmospheric CO_2 are increased by phosphorus sufficiency but not by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6173–6186.

Kähkönen Marja P, Heinämäki Velimatti, Johanna Ollilainen, Heinonen Marina (2003), Estructura química de las antocianinas [Figura].Berry anthocyanins:, 83, 403-1411.

Keddy, P. A. (2010). Wetland ecology: principles and conservation. Cambridge University Press. 1–497.

Korschgen, C. E., Green, W. L. (1988). American wild celery (*Vallisneria americana*): Ecological considerations for restoration. US Fish and Wildlife Service. 19, 0-24.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Korschgen, C. E. (1997). Feasibility study: Impacts of turbidity on growth and production of submerged plants. Report by the U.S. Fish and Wildlife Service, Northern Prairie Wildlife Research Center, La Crosse, Wisconsin, for the U.S. Fish and Wildlife Service, Environmental Management Technical Center, Onalaska, Wisconsin, 90-07. 11.

Kumar, S. (2017). Agents for Pollination: Anemophily, Zoophily and Hydrophily (With Diagrams) [Figura]. Recuperado de: http://www.biologydiscussion.com/pollination/agents-for-pollination-anemophily-zoophily-and-hydrophily-with-diagrams/13503

Lot, A. (1999). Catálogo de angiospermas acuáticas de México: hidrófitas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes 33. UNAM.

Lugo, A., Brown E. S., Brinson. M. M. (1990). Concepts in Wetland Ecology. Forested Wetlands. Ecosystems of the World 15. Elsevier, Amsterdam, 53-85.

Lu, X., Mo, J., Gilliam, F., Fang, H., Zhu, F. (2012). Nitrogen addition shapes soil phosphorus availability in two reforested tropical forests in southern China. *Biotropica,* 44, 302-311.

Martínez, A. A. A., Rodríguez, J. M., Cabrera Hernández, A. (2014). Los paisajes de humedales, marco conceptual y Aspectos metodológicos para su estudio y ordenamiento. *Mercator-Revista de Geografia da UFC*, 13(2), 169-191.

McFarland, D. G. (2006). Reproductive ecology of *Vallisneria americana Michx* (No. ERDC/TN-SAV-06-4).(ERDC/TNSAV-06-04).Vicksburg,MS: U.S. Army Engineer Research and Development Center.

Mitsch, W. J., Gosselink, J. G. (2000). Wetlands john wiley & sons. Inc., New York, New York.

Moreno-Casasola, P. M. (2008). Los humedales en México: tendencias y oportunidades. (28), 10-18.

Moussavi, A. H., Mesgaran, M. D., Vafa, T., Soleimani, A. (2007). Effects of Pre and Postpartum Feeding Fish Meal on Milk Yield and Metabolic Responses in Early Lactating Dairy Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (12), 1489-1494.

Mazid, M., Khan, T. A., Mohammad, F. (2011). Role of Nitric oxide in regulation of H2O2 mediating tolerance of plants to abiotic stress: A synergistic signaling approach. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, *7*(2).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

Nakabayashi, R., Saito, K. (2015). Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *24*, 10-16.

Nawkar, G.M., Maibam, P., Park, J.H., Sahi, V.P., Lee, S.Y., Kang, C.H. (2013). UV-induced cell death in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1608–1628.

Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Fiñana, I. T. (2000). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Córdoba.[En línea] España.[Fecha de acceso: 15 de mayo de 2014] Disponible en URL: http://www. uco. es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR% C3% 8DA. pdf.

Novelo, A., Ramos, L. (2005) Vegetación acuática. En: Bueno J. Álvarez F., Santiago, S. (ed) Biodiversidad del estado de Tabasco., Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. 111-144.

Ostrofsky, M. L., Zettler, E. R. (1986). Chemical defences in aquatic plants. *The Journal of Ecology*, 279-287.

Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S., & Fang, J. (2017). Naturally occurring anthocyanin structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *J. Plant Biochem. Physiol*, 5(2), 187.

Qi, L., Haurwitz, R. E., Shao, W., Doudna, J. A., Arkin, A. P. (2012). RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nature Biotechnology*, 30(10), 1002.

Rejeb, K. B., Abdelly, C., Savouré, A. (2014). How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 278-284.

Ríos, M. D. C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. Química viva, 2,(1).

Sánchez, A.J., M.A. Salcedo., R. Florido., A. Armenta., C. Rodriguez., A. Galindo., E. Moguel. (2007). Pantanos de Centla, un humedal costero tropical: En De la Lanza-Espino, G. Las aguas interiores de México Conceptos y casos. México: AGT EDITOR. 399-422.

Salinas, M. Y., Soto H., M. Martínez B., F. González H. V., Ortega P. R.(1999). Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22, 161-174.

Secco, D., Bouain, N., Rouached, A., Prom-u-Thai, C., Hanin, M., Pandey, A. K., Rouached, H. (2017). Phosphate, phytate and phytases in plants: from

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

fundamental knowledge gained in Arabidopsis to potential biotechnological applications in wheat. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 898-910.

Shen, Y., Koh, K. D., Weiss, B., Storici, F. (2012). Mispaired rNMPs in DNA are mutagenic and are targets of mismatch repair and RNases H. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(1), 98.

Sculthorpe, C.D. (1967). The Biology of aquatic vascular plants. Edward Arnold, London.

Smith, V. H., Tilman, G. D., Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution*, 100(1-3), 179-196.

Xing, X., Ding, S., Liu, L., Chen, M., Yan, W., Zhao, L., Zhang, C. (2018). Direct evidence for the enhanced acquisition of phosphorus in the rhizosphere of aquatic plants: A case study on Vallisneria natans. *Science of the Total Environment*, 616, 386-396.

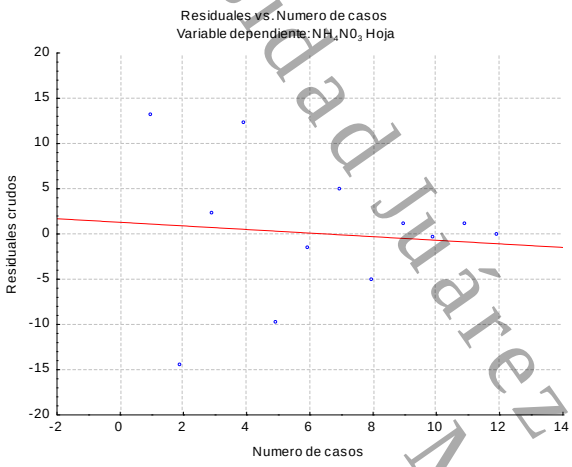
Zhang, H., Zhang, F., Xia, Y., Wang, G., Shen, Z. (2010. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase. Journal of hazardous materials, 178(1-3), 834-843.

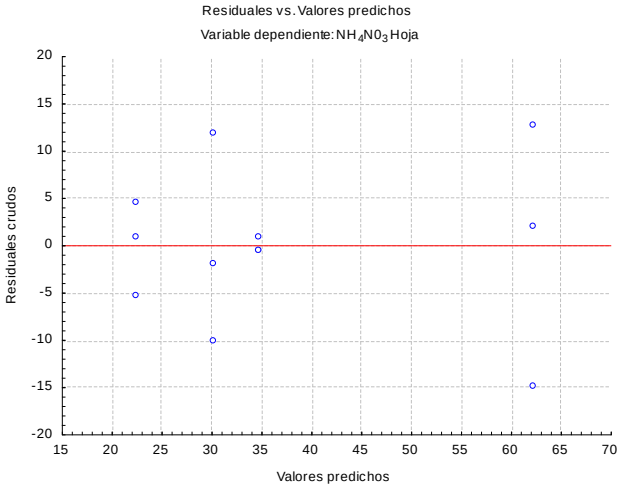
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

11. Anexo

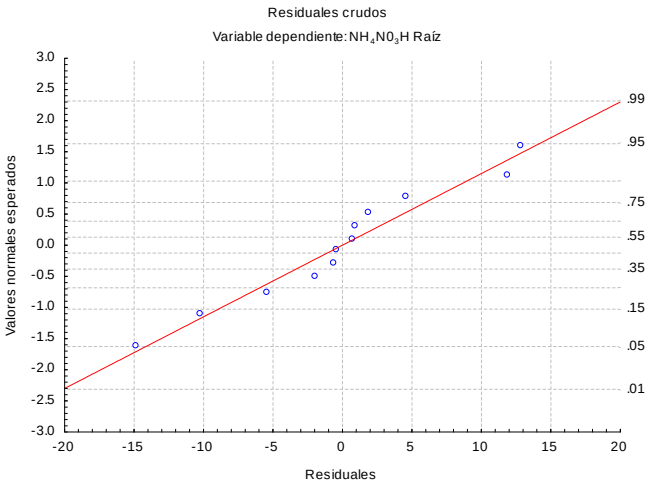
Pruebas de independencia

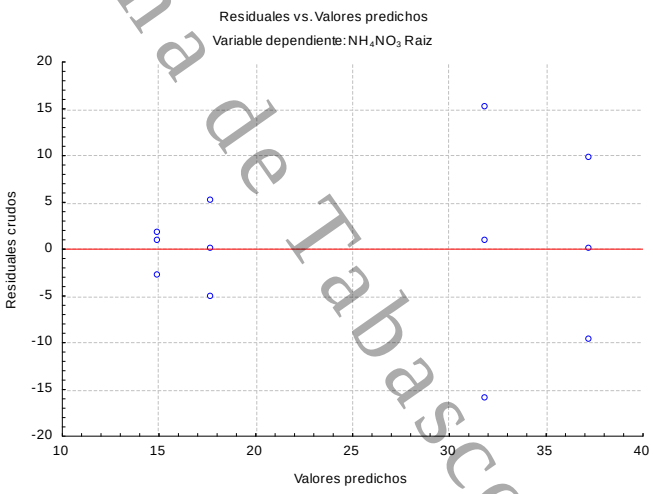
1. NH_4NO_3 Hoja





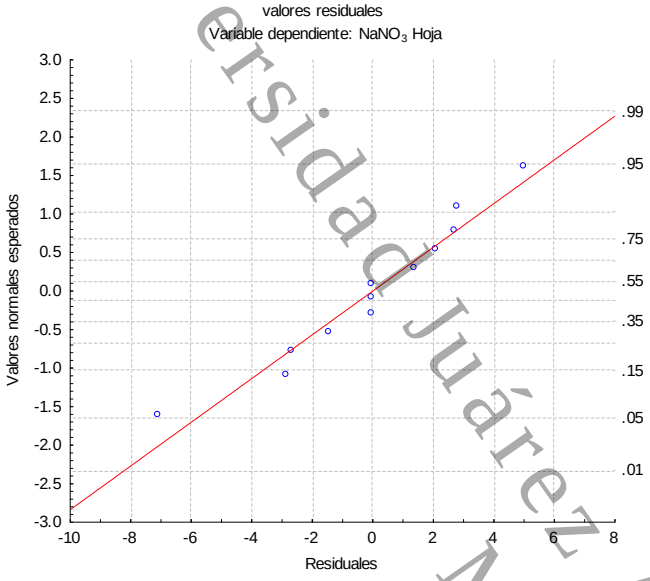
NH_4NO_3 Raíz

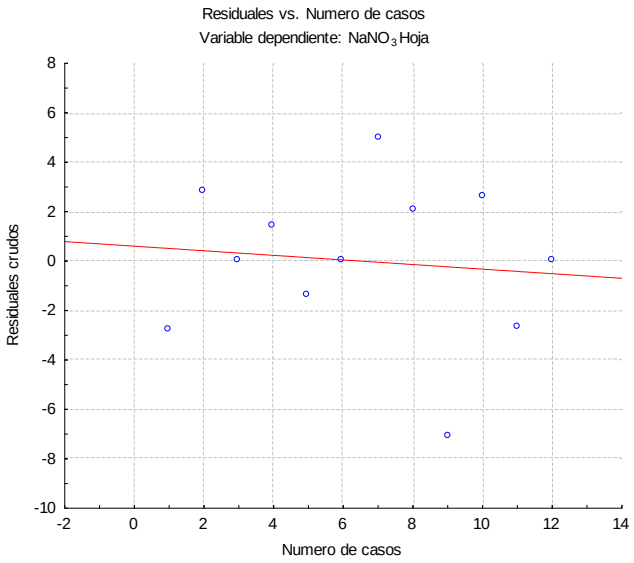




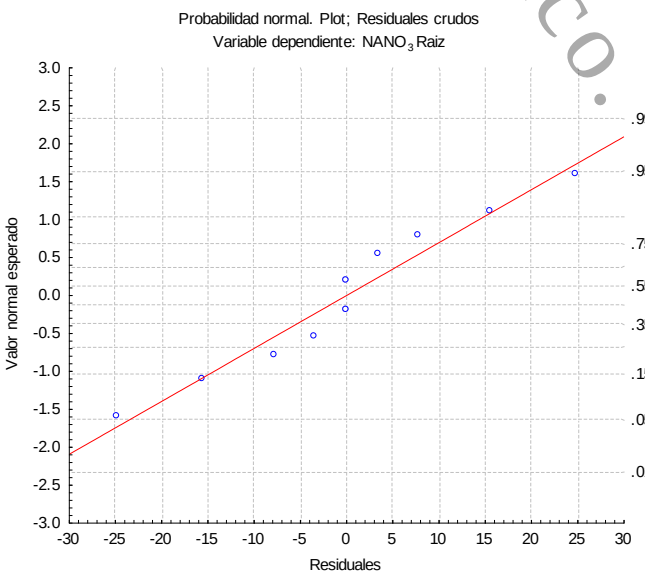
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

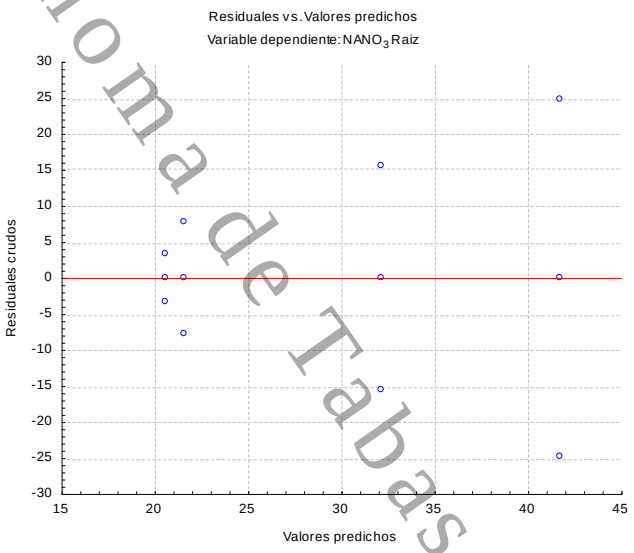
$NaNO_3$ Hoja





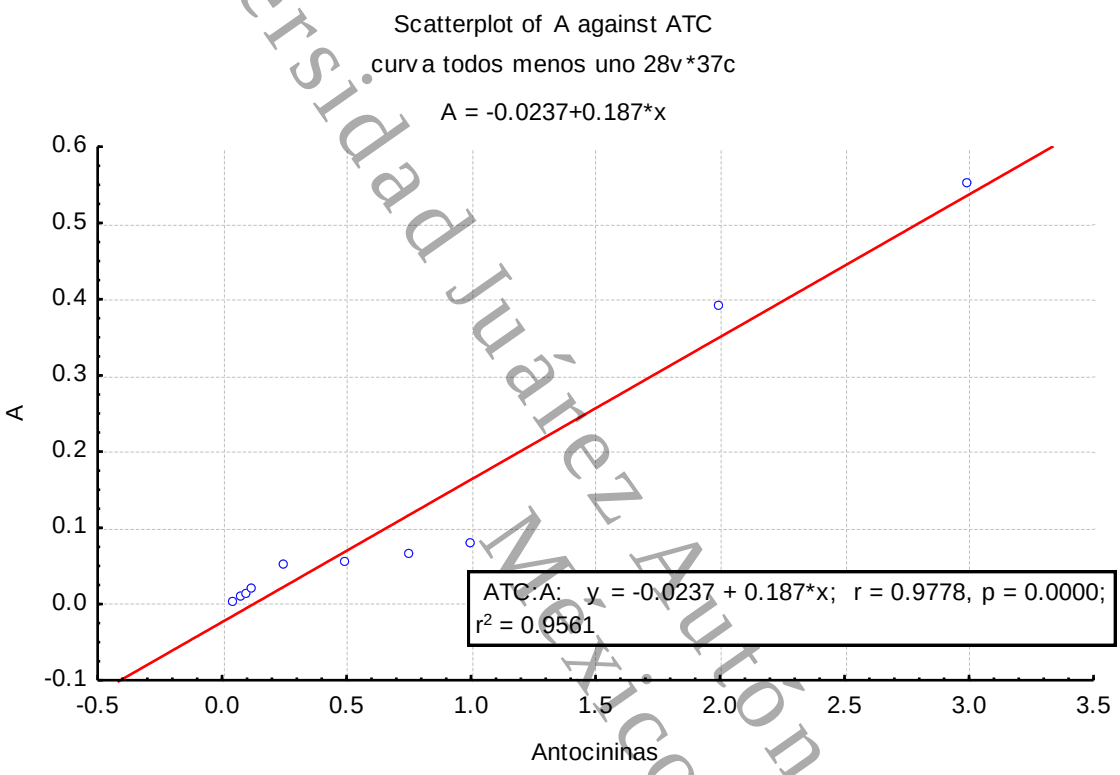
$NaNO_3$ Raíz





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.

2. Curva de antocianinas



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.