



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SEPARACIÓN SEXUAL DE PLANTAS MODULARES *IN VITRO* DE *Vallisneria americana* Michx CON Y SIN INDUCCIÓN FISIOLÓGICA**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

**MARÍA GUADALUPE TORRES MARTÍNEZ**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**DRA. VIOLETA RUIZ CARRERA**

EN CODIRECCIÓN DE:

**M.C.A. JESÚS BAUTISTA REGIL**

VILLAHERMOSA, TABASCO. AGOSTO 2024.

**"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**2024**  
**Felipe Carrillo  
PUERTO**  
GOBIERNO DEL ESTADO DE TABASCO  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
DE TABASCO  
MÉXICO

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 20 de Junio de 2024

**ASUNTO:** Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION  
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. MARÍA GUADALUPE TORRES MARTÍNEZ** egresada de la Lic. en **BIOLOGIA** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis denominado: "**SEPARACIÓN SEXUAL DE PLANTAS MODULARES IN VITRO DE *Vallisneria americana* MICHX CON Y SIN INDUCCIÓN FISIOLÓGICA**".

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

**A T E N T A M E N T E**

  
**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

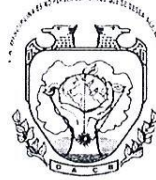


C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica  
C.c.p.- Interesado



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**2024**  
**Felipe Carrillo  
PUERTO**  
ANIVERSARIO DEL CENTENARIO  
DEL NACIMIENTO DEL  
MEXICANO

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN**

JUNIO 20 DE 2024

**C. MARÍA GUADALUPE TORRES MARTÍNEZ  
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: **"SEPARACIÓN SEXUAL DE PLANTAS MODULARES IN VITRO DE *Vallisneria americana* MICHX CON Y SIN INDUCCIÓN FISIOLÓGICA"**, asesorado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera y MCA. Jesús Bautista Regil, sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado por el Dr. Nicolás Álvarez Pliego, MCA. Guadalupe Hernández Piedra, Dra. Violeta Ruiz Carrera, M. en C. Rosa Amanda Florido Araujo y Dr. Carlos Manuel Burelo Ramos.

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

**DR. ARTURO GARRIDO MORA  
DIRECTOR**

**U.J.A.T.  
DIVISIÓN ACADÉMICA  
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DIRECCIÓN**

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



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2024  
**Felipe Carrillo  
PUERTO**  
MARTIN LUTHER KING, JR.  
RECONOCIMIENTO A SU LUCHA  
POR LA LIBERTAD Y LA JUSTICIA  
COMUNIDAD MEXICANA

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN

20 de junio de 2024

**C. María Guadalupe Torres Martínez**  
Pasante de la Lic. en Biología.  
**PRESENTE**

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se implementó la revisión del trabajo recepcional (Tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad y el Código Institucional de Ética para la Investigación.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones, el índice de similitud y el reporte de originalidad obtenido a través de la revisión en la plataforma iThenticate de su documento de tesis "Separación sexual de plantas modulares in vitro de *Vallisneria americana* Michx con y sin inducción fisiológica".

OBSERVACIONES:

Se excluyó bibliografía y se limitó el tamaño de coincidencias a 15 palabras.

<b>RESULTADO DE SIMILITUD</b>	<b>4 %</b>
	<b>12440 palabras, 12 coincidencias, 3 fuentes</b>

Finalmente, se le solicita a la **C. María Guadalupe Torres Martínez**, integrar en la versión final del trabajo recepcional (Tesis), este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

**DR. ARTURO GARRIDO MORA**  
DIRECTOR



C.c.p. Dra. Violeta Ruíz Carrera. Directora de tesis.  
C.c.p. Archivo



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA  
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y despilfarro de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx

# Separación sexual de plantas modulares in vitro de Vallisneria americana Michx con y sin inducción fisiológica

INFORME DE ORIGINALIDAD

4%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cicy.repositorioinstitucional.mx">cicy.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	164 palabras — 2%
2	<a href="http://www.congreso.mesoamericano.unach.mx">www.congreso.mesoamericano.unach.mx</a> Internet	151 palabras — 1%
3	<a href="http://nanopdf.com">nanopdf.com</a> Internet	38 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS      ACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA      ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES      DESACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS

## 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 Licenciatura denominado: **“SEPARACIÓN SEXUAL DE PLANTAS MODULARES IN VITRO DE *Vallisneria americana* MICHX CON Y SIN INDUCCIÓN FISIOLÓGICA”**, 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 20 de Junio de Dos Mil Veinticuatro.

AUTORIZO



---

MARÍA GUADALUPE TORRES MARTÍNEZ

## DEDICATORIAS

### A Dios

Dedico mi tesis principalmente a Dios, quien me ha brindado fuerza, sabiduría y resiliencia en cada paso de mi camino académico. Él es quien me ha bendecido con la capacidad de aprender, me ha brindado entendimiento y sabiduría necesaria para alcanzar este logro.

### A mis padres

Con profunda gratitud a mi madre **Amalia Martínez Gutiérrez** y a mi padre **Juan Torres Arcos**, ellos son mi más grande inspiración para luchar día a día y ser mejor persona, siempre me brindan su apoyo incondicional para poder cumplir mis metas personales y académicas. A pesar de las adversidades, ellos con su amor y cariño me motivaron a nunca rendirme. También son los que me brindaron el soporte material y económico para dedicarme en mis estudios y nunca abandonarlos. Cada éxito que alcanzo es también suyo, ninguna palabra es suficiente para expresar tanto agradecimiento que siento por ustedes.

### A mis hermanos

Quiero agradecer a mis queridos hermanos **Araceli, Sebastián y Miguel Alberto** por enseñarme que todo se puede y que a pesar de las dificultades siempre habrá una luz de esperanza. Siempre recordaré el apoyo incondicional que me brindaron en esta etapa de mi vida. Gracias por ser mis pilares en los momentos más desafiantes y por celebrar conmigo cada triunfo. Los amo tanto.

### A mi hija

A mi niña **Aida Mónica Torres Martínez**, por quien me inspiré a terminar mi carrera. Agradezco inmensamente a dios que hayas formado parte importante de la historia de mi vida, gracias por motivarme a seguir adelante a cumplir nuestros propósitos planteados. Gracias por enseñarme lo bello que es la vida, tu brillo, tu alegría han llenado mis días de luz y como te lo prometí cada meta "LO LOGRAMOS JUNTAS".

## AGRADECIMIENTOS

### A mis asesores

Toda mi gratitud a mi directora de tesis, la Dra. **Violeta Ruiz Carrera** quien me guió siempre en este camino, sus enseñanzas han sido fundamentales en este crecimiento académico y profesional. Gracias por inspirarme a seguir adelante, por su paciencia, su apoyo incondicional, sus consejos como docente y amiga. Con sus palabras y correcciones precisas logre llevar a buen término mi trabajo de tesis. Gracias por todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

Quiero expresar mi agradecimiento al **Mtro. Jesús Bautista Regíl**, por su apoyo incondicional, sus consejos y conocimientos me motivaron a perseverar y a nunca darme por vencida en este proceso. Gracias por ser un guía excepcional y por hacerme crecer profesionalmente.

### Comité sinodal

Agradezco a los miembros del comité sinodal, **Dr. Nicolás Álvarez Pliego, M.C.A. Guadalupe Hernández Piedra, Dra. Violeta Ruiz Carrera, M. en C. Rosa Amanda Florido Araujo** y el **Dr. Carlos Manuel Burelo Ramos**, quienes siempre amablemente estuvieron dispuestos a ayudarme y dar seguimiento a mi trabajo para culminar satisfactoriamente.

### A mis amigos

Expreso mi gratitud para aquellas amistades que iniciaron conmigo esta travesía académica. Gracias por estar presentes, por la convivencia y los ánimos cuando me sentía sola y lejos de familia. A **Ulises** quien con su compañía y personalidad tan maravillosa me animo a seguir adelante e hizo mis días de escuela los mejores. ¡Ustedes forman parte de mi vida, Gracias por todo!



ÍNDICE	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
PALABRAS CLAVES.....	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	5
2.1 Dioicismo.....	5
2.2 Modelo de estudio: <i>Vallisneria americana</i> .....	5
2.3 Especies dioicas sumergidas.....	7
2.4 Estrategias de diferenciación sexual.....	9
2.5 Biomarcadores sexuales.....	10
2.6 Inducción floral en plantas <i>in vitro</i> .....	10
3 JUSTIFICACIÓN.....	12
4 OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos específicos.....	13
5 METODOLOGÍA.....	14
5.1 Recolección de material vegetal.....	15
5.2 Aclimatación de las plantas.....	15
5.3 Cultivo <i>in vitro</i> de semillas y explantes vegetativos.....	15
5.4 Diseño experimental de inducción floral.....	16
5.5 Cultivo de plantas unisexuales.....	17
5.6 Indicadores de asepsia, viabilidad y crecimiento en los cultivos.....	17
5.7 Análisis de pigmentos foliares.....	18

5.8 Análisis de datos estadísticos .....	19
6 RESULTADOS.....	19
6.1 Referencias de longitud y biomasa de segmentos vegetales para los cultivos en microcosmos.....	19
6.2. Proceso de aclimatación .....	20
6.3 Germinación, regeneración y modularidad de las plantas <i>in vitro</i> .....	21
6.4 Asepsia y viabilidad <i>in vitro</i> de plantas modulares .....	22
6.5. Inducción floral y morfologías indeterminadas en plantas modulares <i>in vitro</i> .....	27
6.6 Características de regeneración y crecimiento modular de plantas germinadas y unisexuales.....	31
6.6.1 Plantas en preinducción floral .....	31
6.6.2 Plantas madre <i>in vitro</i> sin definición sexual en proceso floral inductivo con fitorreguladores .....	32
6.6.3 Plantas modulares unisexuales - bases de hojas .....	33
6.7 Morfología foliar y de los rizomas de plantas madre unisexuales .....	35
6.8 Perfil y contenido de clorofilas, carotenoides y feofitinas de plantas silvestres e inducidas a floración con ANA y GA <sub>3</sub> .....	35
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIÓN.....	46
REFERENCIAS .....	47
ANEXO.....	55

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 1. Algoritmos para cuantificar clorofilas, carotenoides y feofitinas	19
Tabla 2. Parámetros estadísticos de los datos pigmentarios en extractos etanólicos	39

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Esquema representativo de <i>Vallisneria americana</i> Michx	6
Figura 2. Filogenia general de las angiospermas acuáticas	8
Figura 3. Esquema metodológico	14
Figura 4. Preparación y cultivo <i>in vitro</i> de semillas	16
Figura 5. Diseño experimental y condiciones de cultivo <i>in vitro</i> con ANA y GA <sub>3</sub> .	17
Figura 6. Longitud de segmentos vegetales y biomasa total de las unidades de cultivo por sexo iniciada en microcosmos	20
Figura 7. Plantas femeninas y masculinas de <i>Vallisneria americana</i> .	21
Figura 8. Etapas de crecimiento de plantas modulares en cultivo <i>in vitro</i> iniciadas de semillas	22
Figura 9. Clorosis en plantas modulares <i>in vitro</i> sin definición sexual	23
Figura 10. Asepsia y viabilidad de bases de hojas de plantas madre femeninas y masculinas durante el tiempo de cultivo.	24
Figura 11. Indicador de viabilidad en bases de hojas femenina y masculina de <i>Vallisneria americana</i>	25
Figura 12. Distribución porcentual de la contaminación bacteriana/microalgal vs asepsia de bases de rizoma	26

Figura 13. Asepsia y contaminación en los cultivos de bases de rizomas de plantas madre unisexuales	26
Figura 14. Plantas modulares de <i>Vallisneria americana</i> sin floración completa en ANA y GA <sub>3</sub> durante un mes	27
Figura 15. Estructuras indeterminadas en la base caulinar de las plantas madre modular con tratamientos de ANA 0.5 mg/L	28
Figura 16. Morfologías de rizomas inusuales sin definición sexual con tratamientos de GA <sub>3</sub> 0.5 mg/L comparada con el control	29
Figura 17. Morfología comparativa de yemas de rizomas en las dos concentraciones de ANA y GA <sub>3</sub> ensayadas	30
Figura 18. Regeneración de hojas, raíces y rizomas en tres subcultivos de la planta madre, previo al experimento de inducción floral	31
Figura 19. Crecimiento de rametes y yemas del rizoma durante el periodo completo de cultivo con ANA 0.1 mg/L y ANA 0.5 mg/L	32
Figura 20. Crecimiento total de rametes y yemas del rizoma durante el periodo de cultivo con GA <sub>3</sub> 0.1mg/L y GA <sub>3</sub> 0.5 mg/L	33
Figura 21. Crecimiento de nuevas estructuras vegetativas en las bases de hoja masculinas y femeninas	34
Figura 22. Características morfológicas de las hojas y rizomas de las plantas unisexuales en cultivo <i>in vitro</i> a 30 días	36
Figura 23. Comparación de los contenidos de clorofilas Cl a, Cl b, Cl c, total Cl, carotenoides y feofitinas a y b en extractos foliares etanólicos de las plantas de campo en microcosmos y las plantas <i>in vitro</i> inducidas a dimorfismo sexual con ANA y GA <sub>3</sub> en concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/L	37
Figura 24: Perfil espectral de extractos etanólicos de hojas femeninas y masculinas de <i>vallisneria americana</i>	38

## RESUMEN

La planta sumergida dioica *Vallisneria americana* está experimentando disminución poblacional debido a la eutrofización. El presente estudio se propuso separar la sexualidad de plantas *in vitro*, inducidas a floración fisiológica con fitorreguladores y regeneradas unisexualmente a partir de bases foliares y rizomas sin estímulos florales. La floración y los marcadores clorofílicos sexuales se evaluaron en dos concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/L de ANA y GA<sub>3</sub> en MS modificado. Con una asepsia y viabilidad de cultivos satisfactoria, las plantas presentaron crecimiento armónico modular durante la etapa preinductiva y una diferenciación morfológica indeterminada o inusual con inhibición de crecimiento modular durante la etapa postinductiva sin fitorreguladores. Estos hallazgos sugirieron una floración rudimentaria típica de *V. americana*. En plantas inducidas con 0.5 mg/L ANA, los extractos hidroetanólicos presentaron contenidos de Cla, Clb, Clc, Cl total y uno de feofitina b parecidos a la planta femenina unisexual, y solo carotenoides a la contraparte masculina. En el experimento siguiente, se promovió la regeneración en MSM de las bases de hojas, y no bases rizomas, de plantas unisexuales, resultando el 50% de los cultivos asépticos y viables con flotabilidad y mostrando modularidad satisfactorio. Adicionalmente se vislumbró la separación morfológica sexual de ápice y nervadura. La incertidumbre de la floración *in vitro* conduce a reformular hipótesis sobre el mecanismo floral de especies dioicas acuáticas en futuras investigaciones de campo y reduccionistas. En cambio, se estableció la primera biotecnología de propagación y separación sexual *in vitro* mediante el método organogénico unisexual.

## ABSTRACT

The dioecious submersed plant *Vallisneria americana* is experiencing population decline due to eutrophication. The present study aimed to separate the sexuality of plants *in vitro*, induced to physiological flowering with phytohormones and unisexually regenerated from leaf bases and rhizomes without floral stimuli. Flowering and chlorophyll sexual markers were evaluated at two concentrations of 0.1 and 0.5 mg/L ANA and GA<sub>3</sub> in MS modified. With satisfactory culture asepsis and viability, plants exhibited modular harmonic growth during the preinductive stage and indeterminate or unusual morphological differentiation with modular growth inhibition during the postinductive stage without phytohormones. These findings suggested a rudimentary flowering typical of *V. americana*. In plants induced with 0.5 mg/L ANA, hydroethanolic extracts showed Cla, Clb, Clc, total Cl and one pheophytin b contents similar to the unisexual female plant, and only carotenoids to the male counterpart. In the following experiment, regeneration was promoted in MSM from leaf bases, and not rhizome bases, of unisexual plants, resulting in 50% of the cultures being aseptic and viable with buoyancy and showing satisfactory modularity. In addition, the sexual morphological separation of apex and rib was glimpsed. The uncertainty of *in vitro* flowering leads to reformulate hypotheses on the floral mechanism of aquatic dioecious species in future field and reductionist investigations. Instead, the first biotechnology of *in vitro* propagation and sexual separation using the unisexual organogenic method was established.

**PALABRAS CLAVES:** macrófitas, sexualidad, floración *in vitro*, pigmentos, morfología unisexual.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de herbáceas acuáticas sumergidas dioicas se encuentran afectadas por la eutrofización que repercute en la reproducción sexual y asexual. La eutrofización es una amenaza importante para los ecosistemas acuáticos al propiciar la proliferación de microalgas, cuyo sobrecrecimiento reduce la disponibilidad de luz para los productores fotosintéticos herbáceos (O'Hare *et al.*, 2018). Con frecuencia, este fenómeno se asocia a otros factores de estrés abióticos, como la temperatura, la salinidad, el tipo de sedimento y el estrés por herbivoría (Moore *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2016). Por lo tanto, es imperativo investigar el sistema reproductivo dioico de *Vallisneria americana* Michx., la especie sumergida representativa en los ecosistemas acuáticos del Norte y centro de América, en particular en los humedales tropicales donde las poblaciones unisexuales femeninas y masculinas aún prosperan.

El esfuerzo por repoblar a *V. americana* ha sido difícil e infructuoso (Moore y Jarvis, 2008). Sin embargo, mínimamente se enfoca la atención en el carácter dioico. Incluso se asume que las poblaciones femeninas y masculinas comparten funciones ecológicas en los ecosistemas, como proporcionar hábitat para la misma biodiversidad acuática, resistir por igual el estrés abiótico, entre varios mecanismos ecológicos compartidos (Hoffmann *et al.*, 2014). Sin embargo, los mecanismos de resistencia al estrés eutrófico pueden diferir entre los sexos, tanto en el patrón de desarrollo vegetativo como el floral (Feng *et al.*, 2020).

En las especies dioicas la expresión sexual está regulada por diferentes genes que sintetizan las hormonas vegetales específicas del sexo femenino y masculino y determinan la floración bajo el estímulo de la luz y temperatura (Grant *et al.*, 1994). Específicamente, resulta un desafío aplicar las estrategias de cultivo de la biotecnología para resolver el dilema de repoblar a las herbáceas sumergidas con diferenciación sexual dioica (Zhou *et al.*, 2016).

La biotecnología de cultivo *in vitro* es una herramienta que permite guiar la morfogénesis floral. El proceso de cultivo inicia con el cultivo de semillas o microestructuras vegetativas, lo que implica el diseño de microambientes biofísicos y bioquímicos que

sostienen o inducen el proceso sexual (Sharma *et al.*, 2014). La aplicación de estas técnicas de cultivo permite manipular fisiológicamente la floración a través de la interacción de fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, etc. (Murthy *et al.*, 2012). La utilidad de alterar la estructura reproductiva con fitohormonas se ha demostrado en pocas plantas acuáticas y la literatura se encuentra limitada en los tipos dioicos sumergidos (Khryanin, 2002).

Adicionalmente la sexualidad de las plantas dioicas puede registrarse con la detección de biomarcadores pigmentarios y fenólicos. En plantas de *V. americana* reproductivas en campo los biomarcadores contudentes de diferenciación sexual fueron el perfil espectral y la cantidad de pigmentos clorofilícos y de antocianinas foliares (Jiménez- Pérez *et al.*, 2022). Alternativamente, las diferencias asociadas a la sexualidad de los morfotipos sexuales se revelan con el marcador de feofitinas (Tormena *et al.*, 2020). Por lo tanto, estos biomarcadores pueden servir para explorar el perfil sexual de plantas femeninas y masculinas micropropagadas.

En consecuencia, el cultivo *in vitro* no solo es esencial como herramienta tecnológica dirigida a la propagación de plantas femeninas y masculinas de *V. americana*, sino que también adquiere relevancia para esclarecer su biología reproductiva (Jeffrey *et al.*, 2013).

Como alternativa para repoblar los humedales locales que registran pérdida de vegetación dioica, se puede esperar que la optimización continua de un sistema de propagación *in vitro* exploratorio de la especie con identidad sexual apoye de manera científica el desconocimiento del dioicismo en plantas sumergidas (Vannozzi *et al.*, 2022) y mejore las diversas estrategias de repoblación que reportan a la fecha complicaciones técnicas y ecológicas (Wang *et al.*, 2020).

En esta investigación, el objetivo fue inducir con fitorreguladores la floración o separar plantas modulares femeninas y masculinas de *Vallisneria americana* usando una metodología de cultivo *in vitro* adaptada para esta especie, siendo importante confirmar la identidad sexual con biomarcadores fotosintéticos.



## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Dioicismo

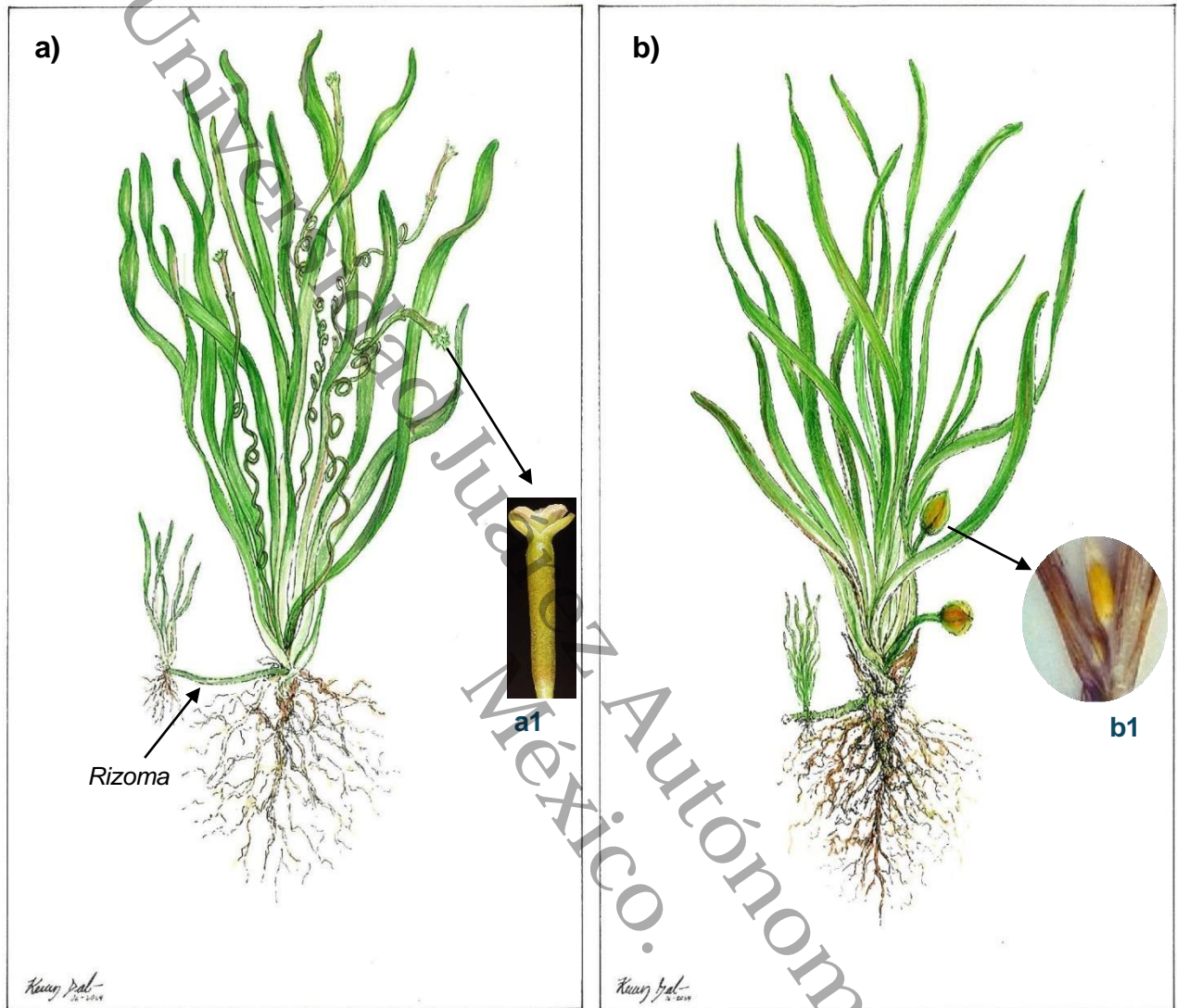
En las plantas dioicas, el pistilo y estambre se desarrollan en individuos separados y de estas existen unas 15000 especies en 1300 géneros y 60 familias de angiospermas (Vannozi *et al.*, 2022), es decir, representan el 6% de las angiospermas (Barret, 2013). La separación sexual de especies dioicas evolucionó en respuesta a la selección natural especializada para evitar la depresión por endogamia o por el beneficio que representó a cualquiera de los sexos (Peng y Wu, 2022).

Las investigaciones han demostrado que femeninas y masculinas suelen tener dimorfismo en morfología, fisiología, defensa y patrones de asignación a la historia de la vida. Es así como un tema científico de interés es distinguir cuáles son las diferencias de los procesos vegetativos del género femenino y masculino asociados a sus funciones ecológicas (Hou *et al.*, 2004).

La determinación del sexo es una disposición hereditaria para formar órganos, flores o plantas femeninas o masculinas, esta determinación es seguida por la expresión sexual, que implica la formación de primordios específicos de órganos regenerativos que producen flores masculinas o femeninas. La transición de un sexo a otro (inversión sexual), puede producirse por factores naturales o por efectos patológicos y experimentales (Khryanin, 2002). La separación del sexo masculino y femenino es un mecanismo generalizado que garantiza la recombinación y diversidad genética, siendo la identificación temprana del sexo de gran importancia (Martin y Mort, 2022) pero difícil de diagnosticar durante la morfogénesis vegetativa.

### 2.2 Modelo de estudio: *Vallisneria americana*

*Vallisneria americana* Michx. (Hydrocharitaceae) es una angiosperma perenne dioica con flores unisexuales en plantas separadas (Fig. 1), ampliamente distribuidas en el Este de América del Norte, Canadá, Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras, Cuba, Haití, República Dominicana y Jamaica.



**Figura 1.** Esquema representativo de *Vallisneria americana* Michx. a) planta femenina, b) planta masculina, a1) representa la flor femenina, b1) representa la flor masculina. Nota. Autor de dibujo Kevin Dalí, 2024.

Es una herbácea sumergida que proporciona muchos beneficios al ecosistema, tales como filtrar el agua mediante la captura de carbono y de nutrientes en lagunas y estuarios (Sánchez *et al.*, 2012) y es fuente de alimento y microhábitat de muchas especies de invertebrados y peces. Diferentes ecotipos se encuentran en ecosistemas de agua dulce.

y salobres sujetos a una temperatura casi constante con amplias variaciones en la tolerancia a la salinidad (5 a 15 ups) y exceso de nutrientes (Tootoonchi *et al.*, 2020).

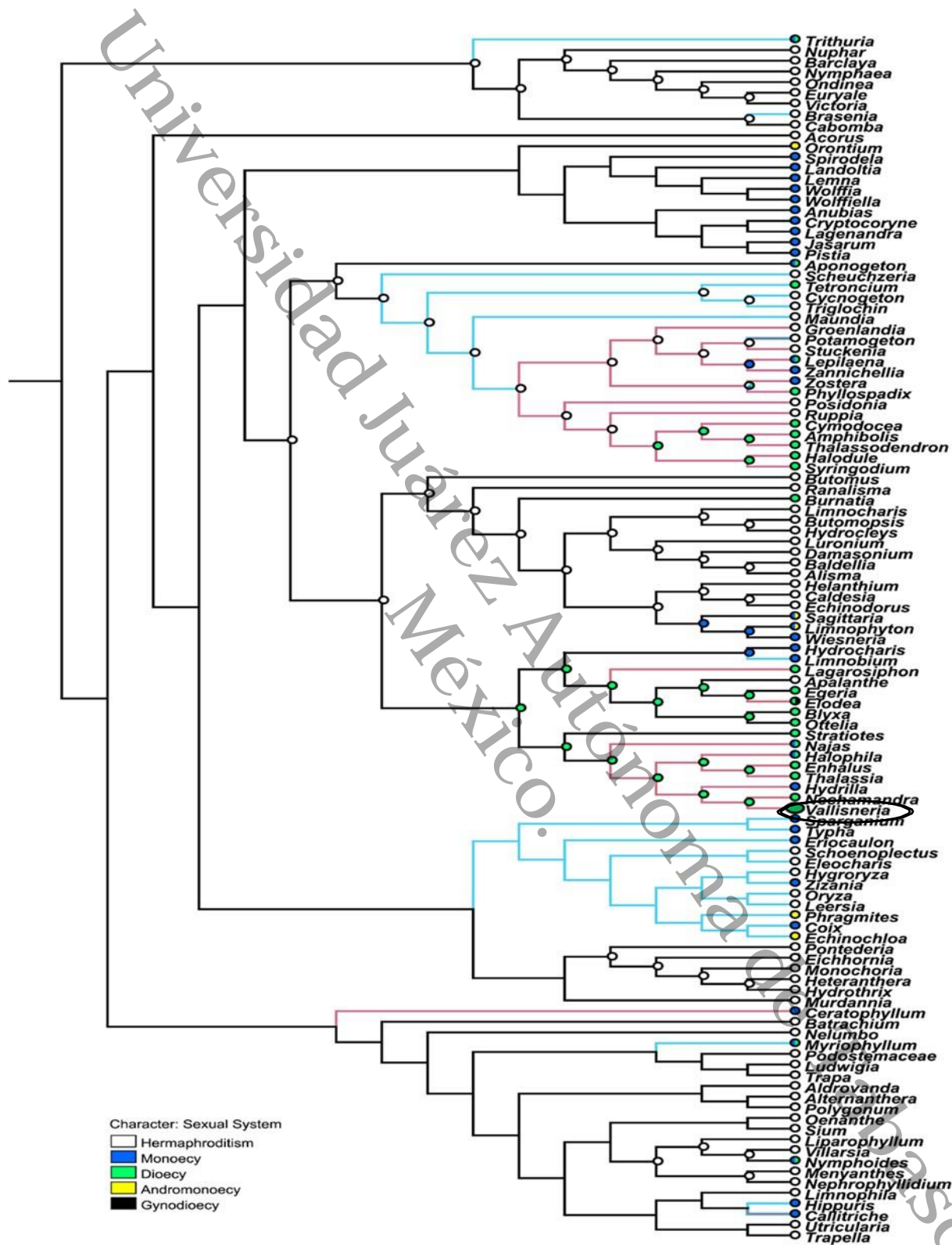
La especie focal se reproduce sexualmente por semillas y asexualmente mediante crecimiento de rizomas formando densas colonias (Tootoonchi *et al.*, 2019). La polinización ocurre en la superficie del agua y después de la polinización, los pedúnculos de las flores femeninas se enrollan fuertemente y retraen las flores polinizadas bajo el agua, donde se desarrollan los frutos carnosos (Zhou *et al.*, 2019).

El cuerpo vegetativo presenta raíces fibrosas y hojas acintadas en roseta sobre un rizoma corto vertical y las hojas sumergidas se extienden hasta dos metros más conforme a la profundidad del agua (Lowden, 1982).

### 2.3 Especies dioicas sumergidas

Los sistemas de determinación del sexo tienen un impacto importante en la biología evolutiva, así como importancia para la producción de semillas y frutos. En las plantas acuáticas (hidrófitas) los mecanismos sexuales evolucionaron muchas veces y se dicotomizaron a partir de ancestros hermafroditas que han surgido varias veces en la evolución de las plantas con flores (Juvany y Munné, 2015). Actualmente el sistema sexual exhibe una gran diversidad (Du y Wang, 2014).

Las hidrófitas estrictas se dividen en tres linajes, y los cuatro órdenes acuáticos se encuentran en el nodo basal de cada linaje. La familia Cymodoceaceae y los géneros *Phyllospadix* (Zosteraceae), *Elodea* y *Thalassia* (Hydrocharitaceae) son dioicos. Los tres géneros restantes *Lepilaena* (Potamogetonaceae), *Najas* y *Halophila* (Hydrocharitaceae) tienen especies monoicas y dioicas. La reconstrucción del sistema sexual indica que la dioecia fue el estado ancestral en Hydrocharitaceae, y la monoecia y el hermafroditismo se derivaron de la dioecia, también indica un estado ancestral de múltiples orígenes de plantas acuáticas (Fig. 2) (Du y Wang, 2014).



**Figura 2.** Filogenia general de las angiospermas acuáticas. Figura referenciada en (Du y Wang, 2014).

## 2.4 Estrategias de diferenciación sexual

El dimorfismo entre hembras y machos no solo está referido a sus características sexuales (órganos reproductores), sino también a una amplia gama de características vegetativas reconocidas como dimorfismo sexual secundario (Cuevas *et al.*, 2017), por ejemplo, la diferencia en la arquitectura de la inflorescencia entre machos y hembras (en poblaciones dioicas) o machos y hermafroditas (en poblaciones androdioicas) representa un dimorfismo sexual secundario muy importante que contribuyen al mantenimiento de la separación de los sexos (Pannell y Santos, 2014). Las características reproductivas y otras características de la historia de vida de las angiospermas acuáticas están estrechamente asociadas con formas de crecimiento específicas: emergidas del agua, flotando libremente, con hojas flotantes o sumergidas (Du y Wang, 2014). En plantas dioicas las distinciones en la estructura general y en los caracteres morfológicos individuales se hacen evidentes durante la época de floración, algunos sexos se separan espacialmente a lo largo de gradientes de humedad, nutrientes, luz, temperatura y salinidad (Beltrán *et al.*, 2022).

Para el caso del género *Vallisneria* se ha documentado que las plantas hembra invierten más energía en la biomasa foliar y por la necesidad de desarrollar órganos reproductivos soportan costos reproductivos más altos que los machos, estas diferencias dimórficas se asocian principalmente a la disponibilidad de carbono y de luz, que a su vez son dependientes de la temporalidad de recursos disponibles, la profundidad y otros procesos como la eutrofización (Li *et al.*, 2019). Otros informes han reportado rasgos que distinguen los sexos en poblaciones dioicas mediante diferencias entre los sexos en la etapa de semilla o plántula. En *Rumex nivalis* (Polygonaceae) se ha reportado que las semillas masculinas son más pesadas y germinan antes que las semillas femeninas, pero los niveles generales de germinación no difieren entre los sexos. Las semillas masculinas también son más pesadas que las femeninas en *Spinacia oleracea*. De lo contrario existen numerosos informes de diferencias de los sexos durante la fase vegetativa del crecimiento de la planta (Barrett y Hough, 2012). Regularmente, la planta masculina crece rápidamente y desarrolla flores antes del periodo de crecimiento vegetativo, presenta mayor número de rametes y es común que la mitad de las poblaciones produzca

flores sin polen (Maldonado *et al.*, 2014). En reciprocidad, las femeninas muestran mayor biomasa y perduran más tiempo durante la reproducción debido a la producción de semillas y frutos (Spencer y Josh, 2013). La variabilidad morfológica de cada género con el entorno ambiental y la disponibilidad de luz en ecosistemas acuáticos debe influir de manera desigual en la producción y variabilidad de metabolitos vinculados con sus procesos de adaptación y defensa (Kurtz *et al.*, 2003). Si bien la predisposición al estrés abiótico de las plantas dioicas parece ser específica de cada especie, en algunas es más tolerante el género femenino y en otras el masculino (Juvany y Munné, 2015). Igualmente, el estrés por luz influye en la fotosíntesis y altera la composición de los tipos de metabolitos sintetizados, por ejemplo, provoca variabilidad sexual en la concentración de clorofilas y flavonoides durante la floración (Timerman y Barret, 2019).

## 2.5 Biomarcadores sexuales

Las plantas femeninas y masculinas difieren en toda una serie de indicadores biofísicos, fisiológicos y bioquímicos que los caracteriza de un sexo u otro. En la yerba mate, el dimorfismo sexual tuvo una influencia significativa en las huellas dactilares espectrales UV-Vis, lo que confirmó que la feofitina es un posible biomarcador para las hembras (Pauli *et al.*, 2019).

## 2.6 Inducción floral en plantas *in vitro*

Aunque es conocido que la determinación sexual es fuertemente influenciada por efecto de las fitohormonas, principalmente giberelina y citoquinina, la acción del tipo y dosis de fitorreguladores en tales distinciones no es universal, ya que, es totalmente dependiente de la especie (Mukherjee *et al.*, 2022). Adicionalmente, las investigaciones sobre la determinación sexual *in vitro* de plantas dioicas son escasas. En la especie *Vallisneria americana* la separación sexual se analizó en plantas clonadas *in vitro* con el estímulo del incremento de C y la relación N/P y ambiente de luz sin obtener diferenciación sexual, en contraste, la clonación fue disparada en condiciones contrastantes de incremento de nutrientes, (Bautista-Regil *et al.*, 2016). Por su parte Pérez (2017) mostró vestigios de masculinización en dosis baja de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), en cambio en Martínez (2017) la feminización se vislumbró con ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP)

como inductores de floración, sin la definición de órganos floral. Las plantas *in vitro* de Uma y Mohan Ram (1972), registraron la feminización y masculinización con el cambio de las plantas *in vitro* a la radiación alta de la condición de campo (Rogers *et al.*, 1995).

En cambio, en las especies dioicas y no dioicas terrestres se tienen más resultados exitosos de inducción floral. Galoch (1978) investigó la expresión sexual del cultivar de cáñamo con GA<sub>3</sub>, ácido indolacético (AIA), etefon, ácido abscísico y cinetina. Los reguladores de crecimiento se aplicaron por separado y en combinaciones sobre ápices de tallo de plantas determinadas sexualmente que tenían los primeros primordios florales. El GA<sub>3</sub> promovió la masculinización, mientras que el IAA, el etileno y la cinetina tuvieron un efecto de feminización sobre el sexo del cáñamo. El ácido abscísico no ejerció ningún efecto directo sobre la determinación del sexo, sin embargo, actuó antagónicamente en relación con el efecto ejercido por GA<sub>3</sub> y IAA, los resultados indican que los reguladores de crecimiento pueden hacer que los sexos respondan de diferentes maneras, lo que provoca variaciones en el grado de dimorfismo sexual (Galoch, 1978).

El desarrollo floral *in vitro* de *Lolium temulentum* en plantas derivadas de ápices extirpados ocurrió después de la exposición de las plantas a un día largo (LD), mientras que las extirpadas de las plantas en días cortos (CD) permanecieron vegetativas. La diferenciación floral *in vitro* fue razonablemente normal y respondió cuantitativamente a la inducción de LD anterior cuando se cumplieron tres condiciones. En primer lugar, la escisión no debe preceder a la llegada al ápice del estímulo LD de las hojas. Esto parece comenzar unas 22 horas después del comienzo de la LD y se completa después de otras 14 horas, momento en el que todos los ápices aislados se determinan floralmente. En segundo lugar, para los ápices extirpados el día posterior a la LD (Día II) o temprano en el Día III, se requiere la presencia de GA<sub>3</sub> en el medio para que se produzca la diferenciación floral en la mayoría de los explantes. Por el contrario, ni la cinetina fue beneficiosa, mientras que el ácido abscísico inhibió la supervivencia y la diferenciación floral en los ápices extirpados. El tercer requisito es el suministro adecuado de azúcares, particularmente después de que inicia la diferenciación floral (McDaniel *et al.*, 1991).

Amiri y Mohammadi (2021), desarrollaron un protocolo para la multiplicación rápida de brotes y floración *in vitro* de *Zumaque* (*Rhus coriaria* L.) a partir de yema axilar. El medio

MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 0.2 mg/L ANA fue ideal para promover la tasa máxima de proliferación y floración en 2500 lux durante 4-6 semanas. En la angiosperma acuática, *Polypleurum stylosum* planta de la familia Podostomaceae que crece adherida a las rocas en corrientes rápidas ocurrió a los cuatro meses de edad en crecimiento continuo, cuando se transfirieron de medio líquido a medio semisólido gelificado. Esto sugirió el papel clave del agua en el control floral (Sehgal *et al.*, 1993).

### 3 JUSTIFICACIÓN

La propagación de ejemplares femeninos y masculinos de *Vallisneria americana* es necesaria para generar el germoplasma diferenciado sexualmente que culmine en la repoblación de esta especie vulnerada por eutrofización en los humedales críticos, como el humedal Pantanos de Centla. Experimentos previos evidenciaron las etapas reproductivas primordiales de la floración *in vitro* femenina y masculina mediante la inducción con y sin fitorreguladores de plantas clonadas *in vitro*. Sin embargo, es necesario contar con el protocolo de floración completo para impulsar la micropropagación clonal masiva de cada sexo, ya sea vía regeneración sexual o vegetativa para suministrar explantes cultivables en estado adulto. Como la floración *in vitro per se* es difícil se proponen dos estrategias de cultivo para este fin. La primera es inducir la sexualidad fisiológica *in vitro* con los fitorreguladores que dieron indicios de floración sexual temprana de *Vallisneria americana* a los autores previamente citados antes y describir el desarrollo morfológico floral en etapas avanzadas. La segunda es iniciar la clonación con bases de hojas y bases de rizoma procedentes de las plantas de campo diferenciadas por sexo e incrementar el número potencial de unidades de cultivo en estado vegetativo adulto. A su vez, la diferenciación sexual se puede analizar a través biomarcadores, que incluye el perfil espectral y los contenidos de clorofilas, carotenoides y feofitinas. Conforme a lo anterior, se someten tres hipótesis: a) la diferenciación sexual fisiológica se logra con los fitorreguladores ANA y GA<sub>3</sub> en plantas modulares provenientes del germinados *in vitro*, b) la sexualidad de las plantas modulares *in vitro* se determina por el tipo sexual de los explantes vegetativos y c) la separación sexual se confirma con biomarcadores de la química dimórfica sexual.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Separar la sexualidad de *Vallisneria americana* en plantas modulares *in vitro* inducidas a floración con fitorreguladores y en plantas unisexuales femeninas y masculinas, complementada con la identidad de marcadores morfológicos florales y biomarcadores sexuales fotosintéticos.

### 4.2 Objetivos específicos

Desarrollar plantas modulares *in vitro* a través de la vía sexual para inducir la sexualidad femenina y masculina en plantas con dos niveles de concentración de ANA y GA<sub>3</sub>.

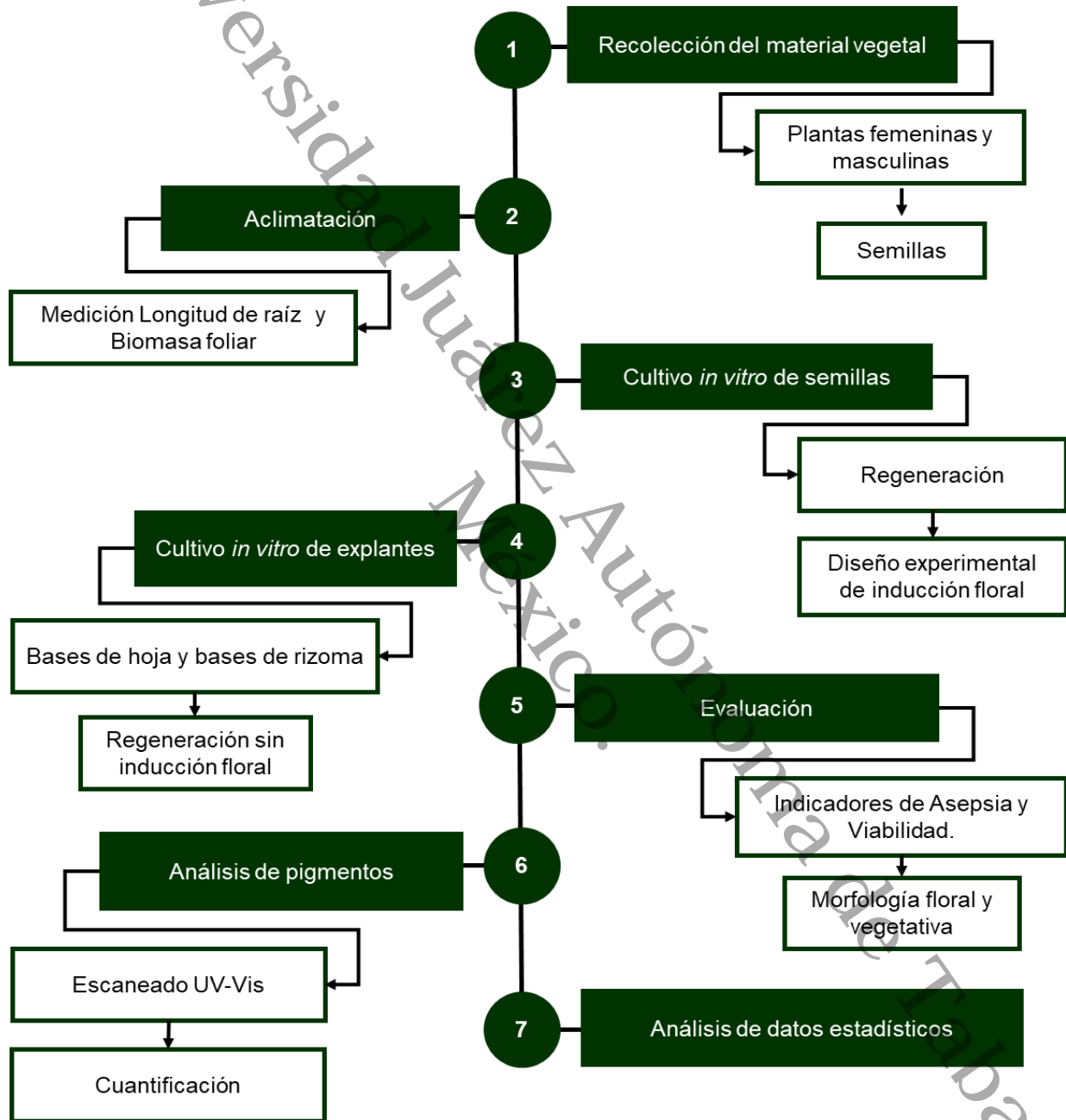
Establecer cultivos *ex vitro* donadores de explantes vegetativos para propagar las plantas modulares unisexuales *in vitro* sin inducción con fitorreguladores.

Determinar marcadores de crecimiento regenerativo y clonal y la morfología floral o foliar de plantas modulares.

Contrastar el perfil y contenido de pigmentos fotosintéticos como biomarcadores de sexualidad en plantas unisexuales precultivadas e inducidas *in vitro*.

## 5 METODOLOGÍA

El desarrollo metodológico de las etapas de investigación se presenta en la (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema metodológico. 1) recolección del material vegetal, 2) aclimatación, 3) cultivo *in vitro* de semillas, 4) cultivo *in vitro* de explantes, 5) evaluación de plantas y explantes, 6) análisis de pigmentos y 7) análisis estadístico.

## 5.1 Recolección de material vegetal

En las poblaciones de *Vallisneria americana* Michx. (Hydrocharitaceae) de la Laguna Santa Anita, Centla, Tabasco (coordenadas 18° 21' 59'' N. 92° 52' 15'' W. 18.3666, -92.87096), las plantas femeninas y masculinas se localizaron tanto en etapa de floración como fructificación. Los frutos y plantas completas se trasladaron sumergidos en agua de la laguna a temperatura ambiente. Las semillas se lavaron al chorro del agua para eliminar el exceso de detritus y permanecieron en refrigeración en recipientes de plásticos con agua de llave aireada y renovada diariamente durante una semana. Los especímenes femeninos y masculinos se cultivaron separados en microcosmos.

## 5.2 Aclimatación de las plantas

El microcosmo se diseñó para cultivar y aclimatar las plantas de campo de *V. americana*. Las plantas unisexuales femeninas y masculinas disectadas se establecieron en microcosmos de laboratorio hasta activar el crecimiento de rizomas y producir suficientes rametes ( $\pm 6$ ). La longitud de las raíces se midió con una regla a escala centimétrica ( $n=7$ ). Las hojas se disectaron a 10 cm de la zona caulinar y se determinó el peso de la biomasa para homogeneizar la unidad de cultivo ( $n=7$ ). La siembra de cada unidad disectada se realizó en recipientes de plástico acondicionados de una cama de arena lavada. Los recipientes se colocaron en microcosmos y se cubrieron con agua de la llave aireada sobrepuesta. La separación de sexos fue espacial y permanecieron así durante un mes a temperatura ambiente con aireación y luz blanca artificial de  $100 \mu\text{mol de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 5.3 Cultivo *in vitro* de semillas y explantes vegetativos

El procedimiento de preparación y siembra *in vitro* de semillas se desarrolló de acuerdo con Ruiz-Carrera *et al.*, (2008) (Fig. 4).



**Figura 4.** Preparación y cultivo *in vitro* de semillas. 1. Frutos recolectados; 2. Disección de frutos. 3. Selección de semillas maduras; 4. Cultivo de semillas en condiciones asépticas.

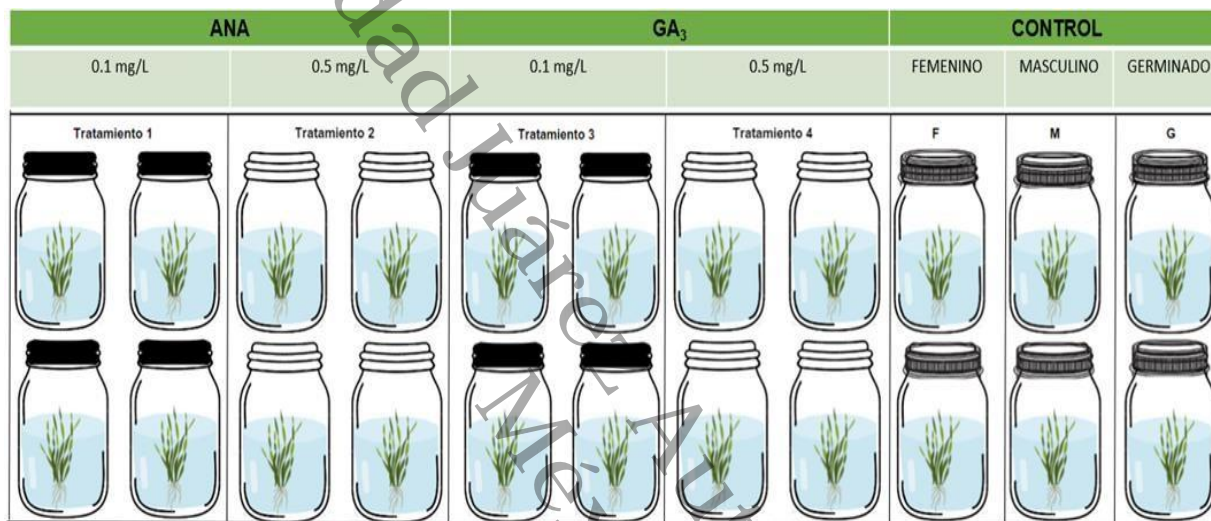
Para la asepsia, se colocaron las semillas en 50 ml de etanol al 70% en un recipiente comercial Gerber (100 ml) en agitación durante 30 s y se desinfectaron con NaClO al 10% por 10 min, finalmente se lavaron con tres a cuatro porciones de 50 ml de agua estéril para eliminar el exceso de cloro. Aproximadamente 15 semillas asépticas se colocaron en frascos comerciales Gerber esterilizados a 121°C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> en autoclave (Yamato Scientific SM300) con agua sintética (40 ml). Las semillas cultivadas germinaron, con luz tenue ( $\pm 3 \mu\text{mol}$  de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). A los 15 días las plántulas se transfirieron en una campana de flujo laminar al medio básico MS (Murashige and Skoog, 1962) modificado (MBM) formulado y conforme a Bautista-Regil *et al.* (2016) en condición estéril para guiar el proceso de crecimiento a estado adulto y modular. Similarmente, se cultivaron en condición aséptica y nutritiva y separados los explantes de bases de hoja y las bases de rizomas (1.5 a 2 cm) de las plantas unisexuales femeninas y masculinas procedentes del microcosmo.

En todos los casos las renovaciones de medio MBM se realizaron cada 15 días hasta la regeneración completa de la planta madre y el sostenimiento de la propagación modular. Las condiciones de operación del cuarto de cultivo fueron luz de 100 micromol de fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 28 °C ( $\pm 1$ ) y fotoperiodo de 16: 8 luz/oscuridad.

#### 5.4 Diseño experimental de inducción floral

La inducción floral se realizó en las plantas modulares *in vitro* regeneradas de semillas y clonadas sin definición sexual en el MBM. En un diseño unifactorial independiente de

ANA y GA<sub>3</sub> se evaluaron las concentraciones de 0, 0.1 y 0.5 mg/L en una planta modular ± 4 rametes con cuatro réplicas por tratamiento (Fig. 5). Se realizaron dos subcultivos semanales durante la inducción fisiológica y hubo dos subcultivos adicionales en ausencia de fitoreguladores. Se revisaron visualmente en cada subcultivo durante un mes las morfologías vegetativas y reproductivas usando un estereomicroscopio (Zeiss Stemi DV4).



**Figura 5.** Diseño experimental y condiciones de cultivo *in vitro* de ANA y GA<sub>3</sub> en concentraciones (0.1 y 0.5 mg/L) por tratamientos.

### 5.5 Cultivo de plantas unisexuales

Las plantas unisexuales femeninas y masculinas de bases de hojas y bases de rizoma fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo MBM y subcultivadas cada 13 días por un mes. Cada unidad de cultivo presentó dos explantes en cinco réplicas.

### 5.6 Indicadores de asepsia, viabilidad y crecimiento en los cultivos.

La asepsia de los cultivos se evaluó con la ausencia de desarrollos bacterianos y algales. Para calificar la viabilidad se utilizaron los indicadores de hojas verdes (categoría de hojas sanas), clorosis (categoría de hojas con pérdida de clorofila) y necrosis (categoría de hojas con 75% de necrosis). La flotabilidad fue evaluada por la (viabilidad de las hojas) y pérdida de flotabilidad por la (inviabilidad de las hojas) causada por necrosis. El

crecimiento modular fue analizado por el número total de hojas y raíces y las que regeneraron de la planta madre, así como por la formación de rizomas y rametes. Los registros de crecimiento también se realizaron en la etapa de inducción y postinducción de la floración.

## 5.7 Análisis de pigmentos foliares

Los extractos hidroetanólicos foliares se procesaron separados de acuerdo con Jiménez-Pérez *et al.* (2022). Las muestras frescas (20-30 mg) se molieron durante 3-5 minutos en un homogeneizador de tejidos a temperatura ambiente con 2mL de alcohol al 80% y se diluyeron con el mismo solvente para igualar las concentraciones de diferentes muestras a 10 mg/mL. Los extractos se sonicaron en tubos de ensayo durante 5 min, se refrigeraron a 5°C durante 20 horas. Los extractos se centrifugaron en tubos Eppendorf con (2 mL) a 3000 RPM por 15 min a 4°C y el sobrenadante se utilizó para analizar los pigmentos. El proceso de extracción se realizó en oscuridad.

El escaneado UV- Vis (Espectrofotómetro (Shimadzu UV 1280) entre 200 a 750 nm se realizó en los extractos etanólicos de hojas de plantas femeninas y masculinas precultivadas en crecimiento modular y las plantas *in vitro* de los cuatro tratamientos de inducción floral con ANA y GA<sub>3</sub>. Se comparó el perfil espectral de los extractos de acetona entre los extractos etanólicos de hojas unisexuales de microcosmos con aquellas de plantas *in vitro* precultivadas e inducidas con fitorreguladores. El contenido de pigmentos fotosintéticos, Cla, Clb, Clc y Cl total se cuantificó usando los algoritmos del método tricromático de Ritchie (2008). El contenido de carotenoides se cuantificó usando el algoritmo de Chen (2018).

Para analizar la feofitina de la Cla y Clb se agregaron a los extractos clorofílicos 1ml de HCl, se agitaron a 30s, se registró la absorbancia a las mismas longitudes de onda de las clorofilas a y b y se cuantificaron con las ecuaciones de Vernon (1960), (Tabla 1). Las concentraciones de todos los pigmentos fueron expresadas en mg/g muestra fresca (mf).

Tabla 1: Algoritmos para cuantificar clorofilas, carotenoides y feofitinas	
Algoritmos de Ritchie (2008)	Algoritmos de Vernon (1960)
Clorofilas	Feofitinas
$Cl\ a = -0.3002A_{630} - 1.7538A_{647} + 11.9092A_{664}$ $Cl\ b = -1.2942A_{630} + 19.8952A_{647} - 4.9401A_{664}$ $Cl\ c = 23.6723A_{630} - 7.9057A_{647} - 1.5467A_{664}$ $Cl\ total = 22.0780A_{630} + 10.2357A_{647} + 5.4224A_{664}$	$Fa = 21.67 \cdot A_{666\ nm} - 17.42 \cdot A_{536\ nm}$ $Fb = 31.90 \cdot A_{655\ nm} - 13.40 \cdot A_{666\ nm}$
Algoritmos de Chen (2018)	
Carotenoides	
$Car = ((1000 \times A_{470}) - (2.05 \times Cl\ a) - (114.8 \times Cl\ b)) \times 2 / (245 \times 1000 \times 0.2)$	

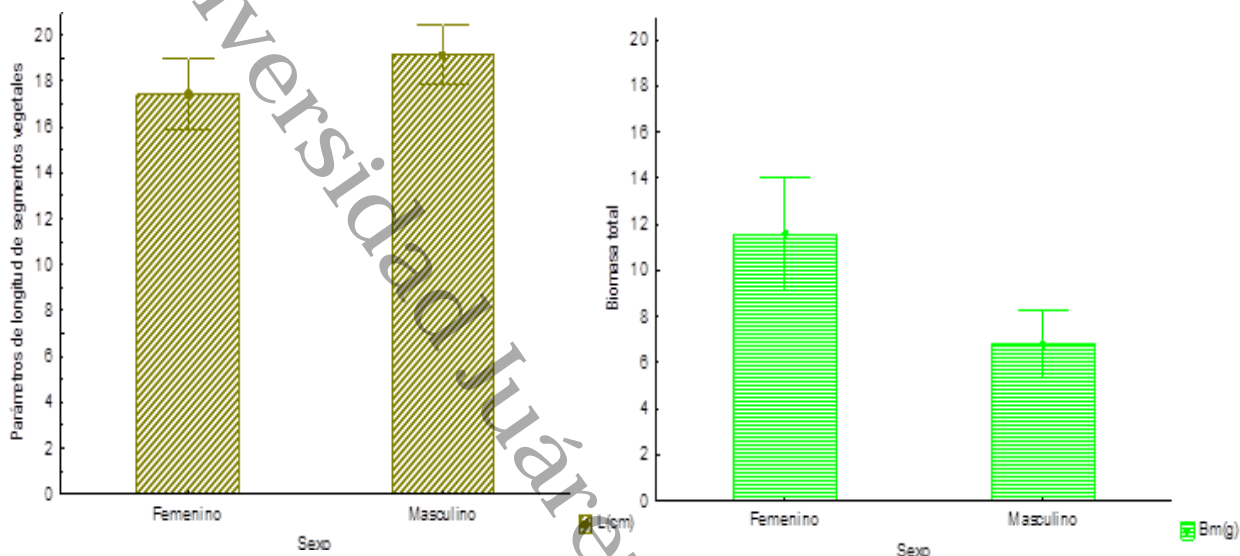
## 5.8 Análisis de datos estadísticos

La base de datos fue diseñada y ordenada en Microsoft® Excel® V.230. En todos los casos, la normalidad y homocedasticidad fueron verificadas con pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran. Las pruebas ANOVAS con análisis de medias de Fisher o Kruskal Wallis se usaron a  $p < 0.05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Referencias de longitud y biomasa de segmentos vegetales para los cultivos en microcosmos

La longitud de los segmentos vegetales y biomasa total fueron significativamente similares entre la unidad vegetativa femenina y masculina cultivada ( $p > 0.05$ ). La longitud promedio a partir de la raíz + 5 cm de base foliar fue 12 cm en femeninos y 16 cm en masculinos y la biomasa total fue de 4.8 g en femeninos y de 2.58 g en masculinos (Fig.6).



**Figura 6.** Longitud de segmentos vegetales y biomasa total de las unidades de cultivo por sexo iniciada en microcosmos. Longitud de la raíz L(cm);  $F(1,12) = 0.7152$ ,  $p = 0.4143$ . Biomasa total Bm (g);  $F(1,12) = 2.7867$ ,  $p = 0.1209$ .

## 6.2. Proceso de aclimatación

Durante el periodo de aclimatación de las plantas silvestres en microcosmos (Fig. 7a y 7b) en unidades vegetativas femeninas y masculinas precultivadas (Fig. 7c) la temperatura del medio acuoso se mantuvo entre  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ , y junto con la iluminación artificial y el fotoperiodo fijados favorecieron el desarrollo modular autótrofo de las plantas enraizadas de cada sexo. Esto incluyó la regeneración de hojas y raíces de la planta madre y los nuevos rametes (Fig. 7d y 7e).

El tamaño de la planta madre alcanzó la altura de la columna de agua del microcosmos (Fig. 7c), por lo que fueron más pequeñas en comparación con las plantas de ambiente natural que muestran longitud variable relacionada a la profundidad del agua.





**Figura 7.** Plantas femeninas y masculinas de *Vallisneria americana*. Plantas silvestres completa, a) femenina y b) masculina, c) plantas cultivadas en microcosmos separado por sexo. Desarrollo modular a cinco meses de cultivo en microcosmo d) planta femenina y e) planta masculina.

### 6.3 Germinación, regeneración y modularidad de las plantas *in vitro*

La germinación de semillas de *V. americana* se definió con la emergencia de la radícula y posteriormente el coleóptilo (Fig. 8a), a los 15 días de cultivo se observa el desarrollo de plántulas y raíces adheridas al medio de cultivo (Fig. 8b) en continuo crecimiento estable de los brotes cada individuo se transfirió en tubos de vidrio (Fig. 8c). A los 40 días de cultivo se logró un desarrollo *in vitro* saludable (Fig. 8d), el crecimiento modular con raíces bien desarrolladas y nuevos rametes fue reproducible con el protocolo establecido para esta especie (Fig. 8e).

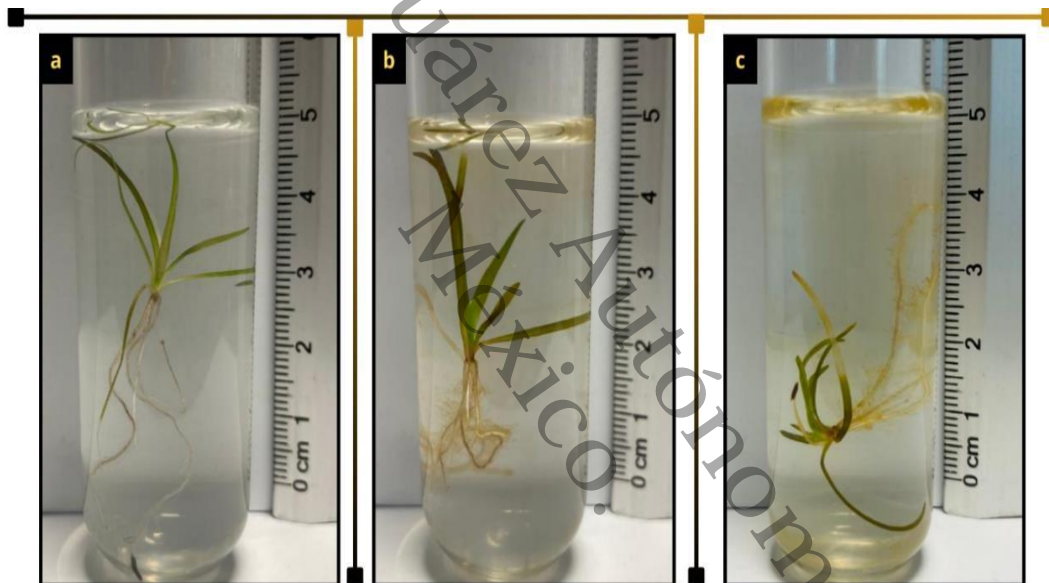


**Figura 8.** Etapas de crecimiento de plantas modulares en cultivo *in vitro* iniciadas de semillas. Plántula temprana (a y b), planta juvenil (c), crecimiento modular (d) desarrollo de rametes (e).

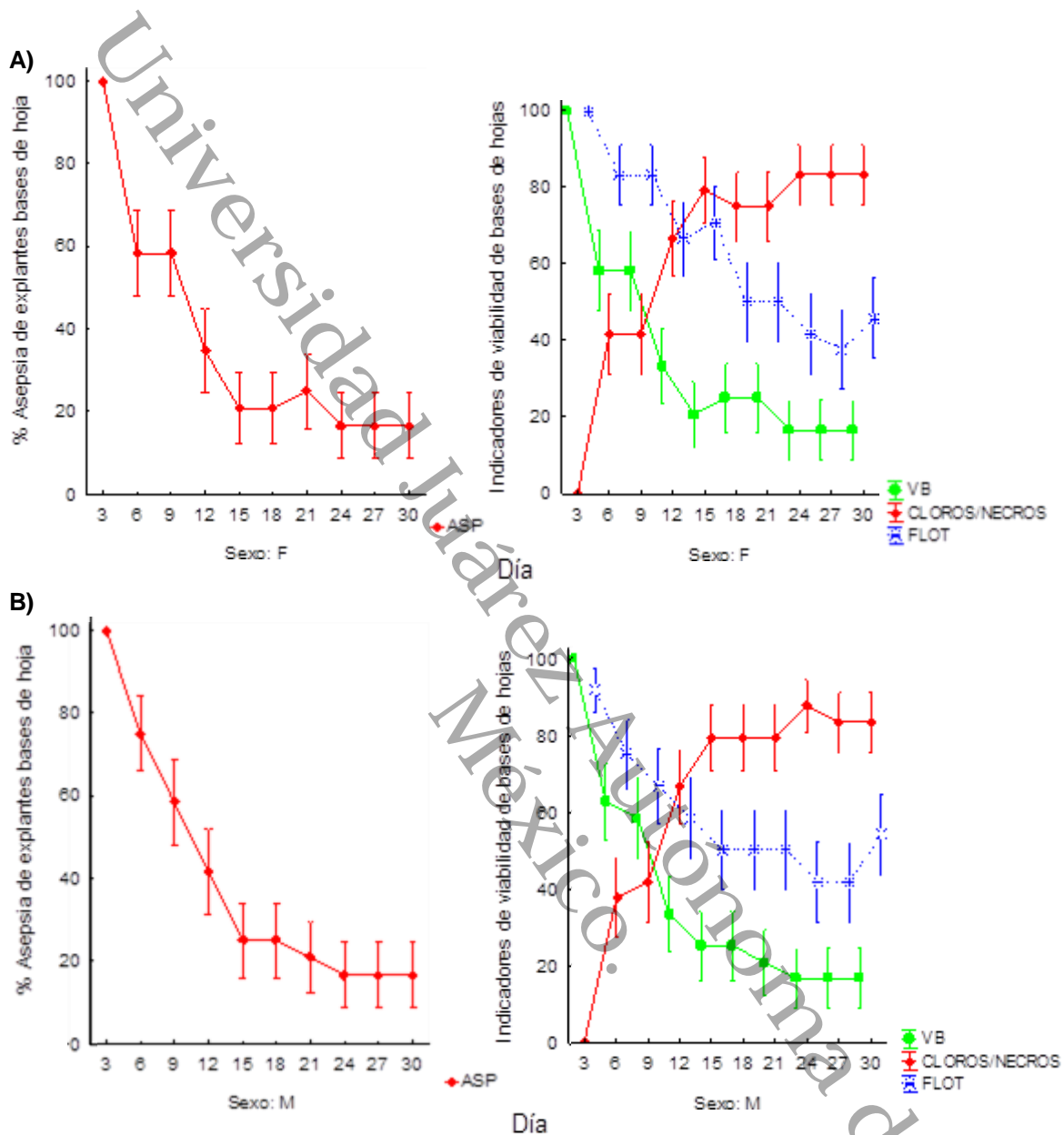
#### 6.4 Asepsia y viabilidad *in vitro* de plantas modulares

La asepsia y viabilidad de las plantas modulares ( $n= 25$ ) decayeron 2% a los 24 días de cultivo ( $p < 0.05$ ), sin mostrar diferencias significativas en el tiempo. La asepsia final fue alrededor de 92% y fueron inviables el 4% por la manifestación de clorosis. La clorosis en la lámina foliar se relaciona con la intensidad del tono amarillento del medio acuoso (Fig. 9). Mientras que declinaron gradualmente la asepsia y viabilidad en los cultivos de plantas unisexuales iniciados de bases de hojas femeninas y masculinas ( $p < 0.05$ ), (Fig. 10).

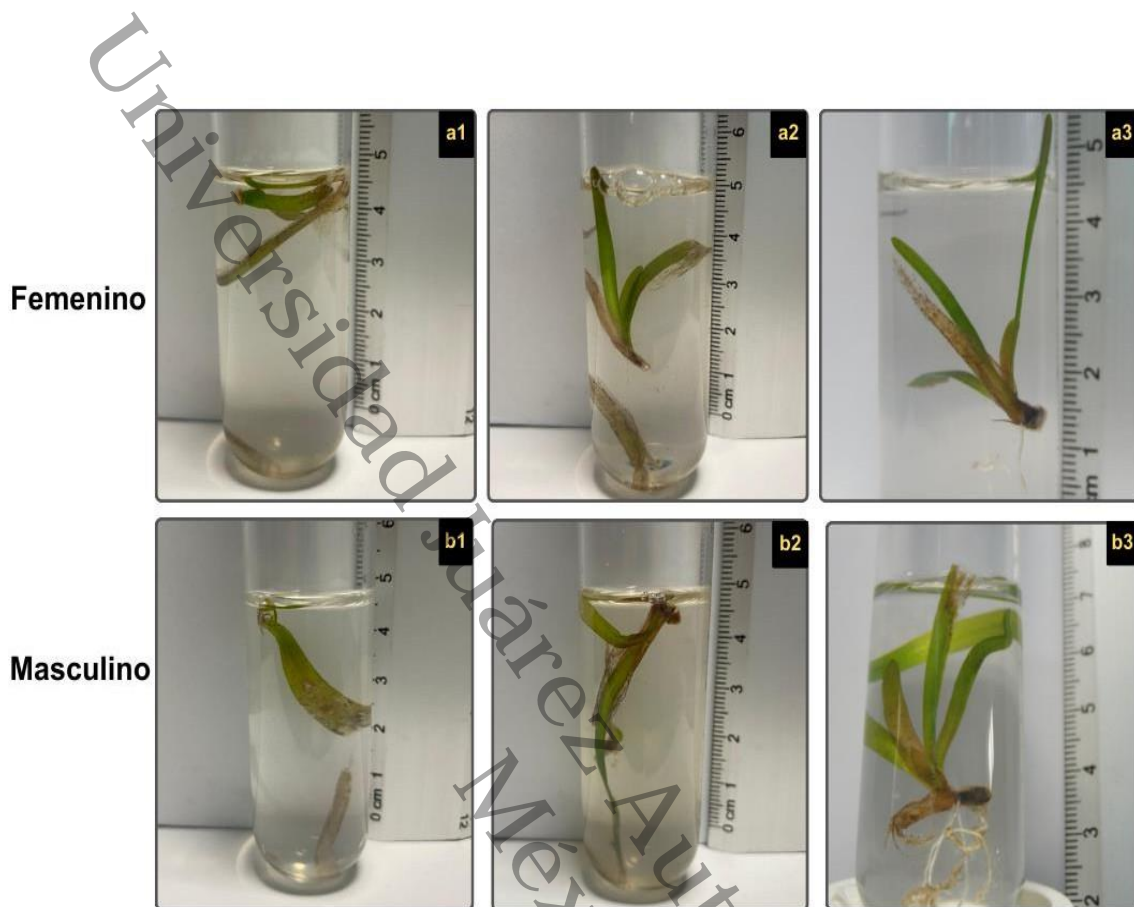
La asepsia finalizó con una pérdida de 80% y fue similar a la viabilidad. Indistinto al tipo de sexo, las bases de hojas flotaron y mantuvieron la lámina foliar verde durante los tres primeros días, después se hicieron cloróticas o necrosadas incluso ocurrió en las nuevas hojas de la planta madre (Fig. 11). La pérdida de viabilidad fue cercana al 80% ( $p < 0.05$ ) con el indicador de clorosis/necrosis, pero el indicador de flotabilidad fue más favorable para el diagnóstico de viabilidad en los cultivos femeninos y masculinos, aunque solo alcanzó promedios cercanos a 50% en magnitud similar al finalizar el periodo (Fig. 10, 11).



**Figura 9.** Clorosis en plantas modulares *in vitro* sin definición sexual. a) planta aséptica (categoría de hojas verdes) 15 días, b) indicios de clorosis (categoría de hojas con pérdida de clorofila) 24 días, c) indicios de necrosis (categoría de necrosamiento en hojas con pérdida de flotabilidad) 30 días.

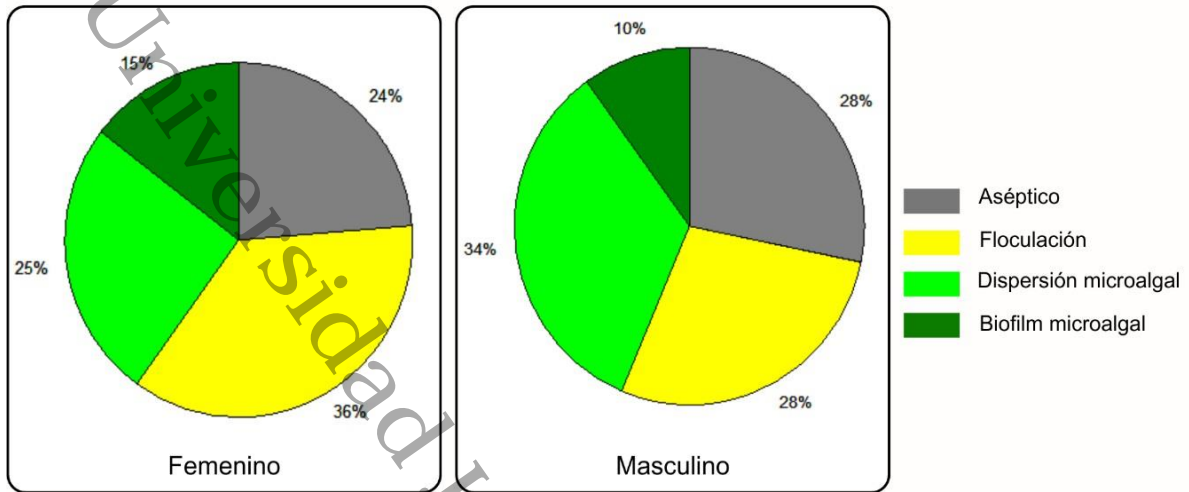


**Figura 10.** Asepsia y viabilidad de bases de hojas de plantas madre femeninas y masculinas durante el tiempo de cultivo. Viabilidad (VB), Clorosis/ Necrosado (Cloros/Necros), Flotabilidad (FLOT), Asepsia (ASP). **A) femeninas:** VB: F (9,230) = 10.2569,  $p = 0.0000$ , Trans/necros: F (9,230) = 10.2569,  $p = 0.0000$ , FLOT: F (9,230) = 5.3017,  $p = 0.00000$ , ASP: F (9,229) = 10.5515,  $p = 0.0000$ . **B) masculinas:** VB: F (9,230) = 10.608,  $p = 0.0000$ , Trans/necros: F (9,230) = 11.7847,  $p = 0.0000$ , FLOT: F (9,230) = 2.5836,  $p = 0.0075$ , ASP: F (9,230) = 11.9341,  $p = 0.0000$ .



**Figura 11.** Indicador de viabilidad de bases en hojas femenina y masculina de *Vallisneria americana*. a1, b1) clorosis y a2, b2) lámina foliar necrosada, a3, b3) flotabilidad del explante de cada morfotipo sexual (N=23 por sexo).

Comparativamente, las bases rizoma también presentaron 76% de contaminación a los 30 días (Fig. 12). Sin embargo, el porcentaje de inviabilidad de las hojas del explante femenino y masculino incrementó a medida que se presentaron crecimientos de flóculos bacterianos y material vegetal fragmentado, así como de una dispersión celular y películas de microalgas (Fig. 13). Por lo tanto, este explante no sobrevivió en el periodo de evaluación, incluso en los cultivos asépticos (Fig.12).



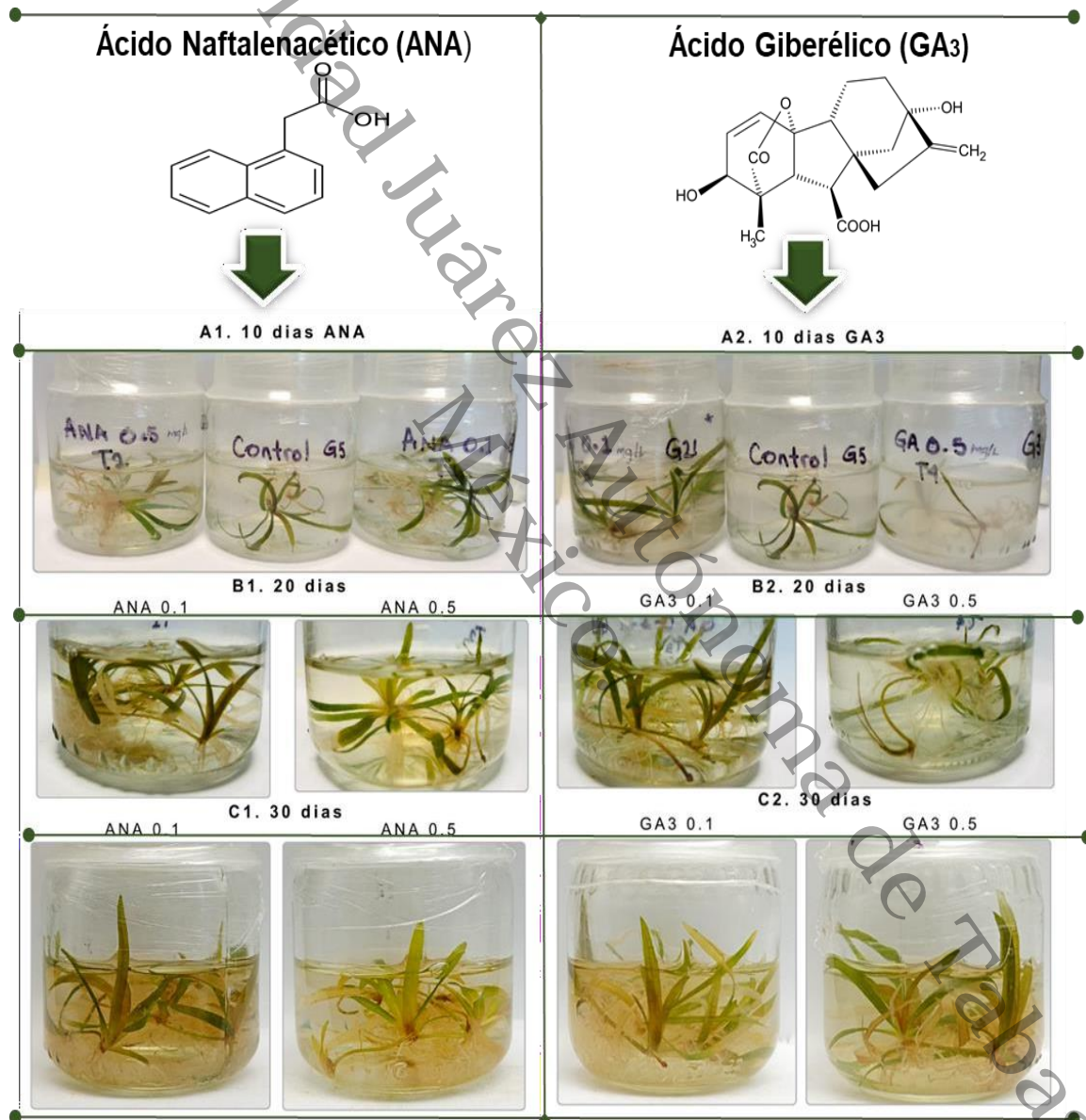
**Figura 12.** Distribución porcentual de la contaminación bacteriana/ microalgal vs asepsia de bases de rizoma.

		Contaminados			
		<i>Aséptico</i>	<i>Floculación</i>	<i>Microalgas</i>	<i>Biofilm</i>
Explantante	Femenino				
	Masculino				

**Figura 13.** Asepsia y contaminación en los cultivos de bases de rizomas de plantas madre unisexuales.

## 6.5. Inducción floral y morfologías indeterminadas en plantas modulares *in vitro*

Ninguna floración fue registrada en las plantas modulares *in vitro* (Fig. 14) en presencia de ANA (Fig. A1-C1) y GA<sub>3</sub> (A2-C2), ni en el control.



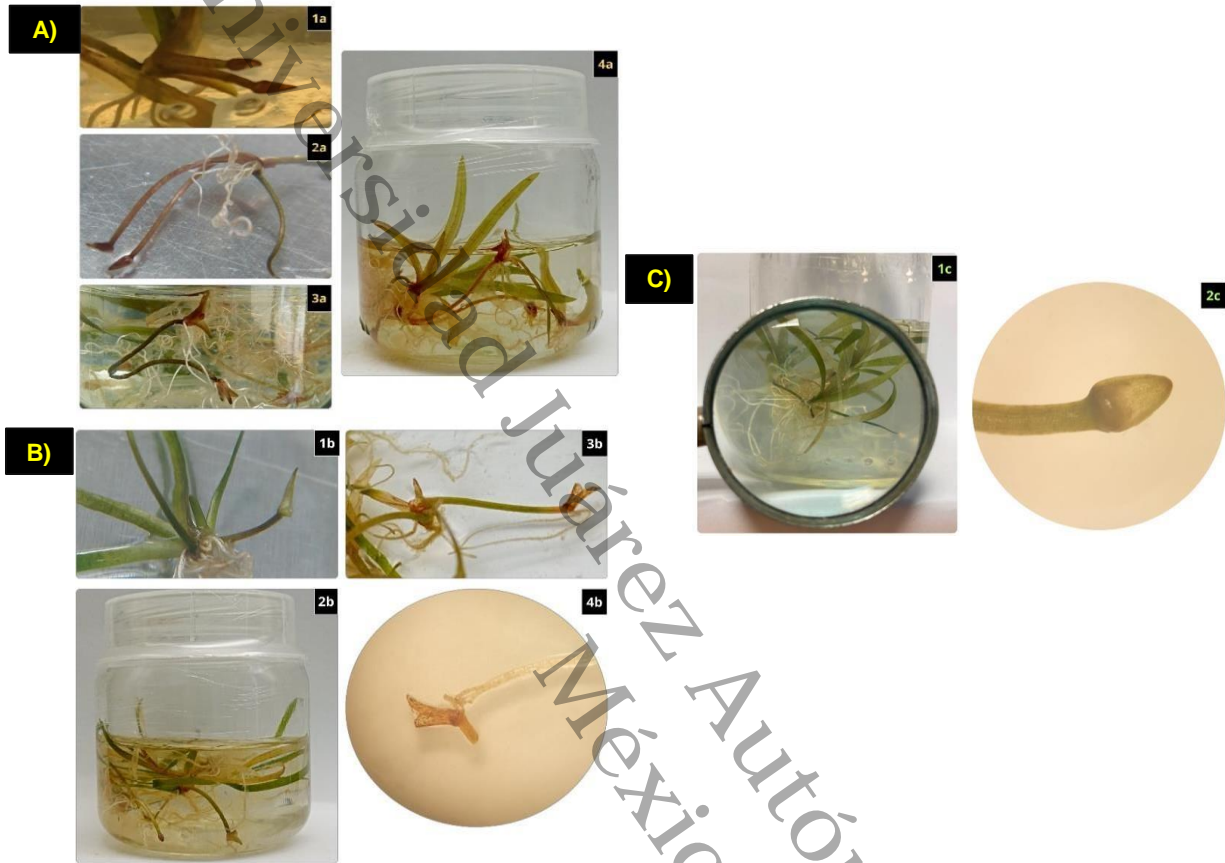
**Figura 14.** Plantas modulares de *Vallisneria americana* sin floración completa en ANA (A1, B1 y C1) y GA<sub>3</sub> (A2, B2, C2) durante un mes.

Con 0.1 y 0.5 mg/L de GA<sub>3</sub>, hojas y rizomas se observaron más alargados (Fig. 14). En la misma figura se observa la turbidez del medio de cultivo que inició con la exposición a GA<sub>3</sub> y se intensificó por el incremento de la concentración hasta desaparecer a los 15 días de cultivo. No obstante, predominaron algunas morfologías indeterminadas inducidas en concentraciones de 0.5 mg/L ANA y 0.5 mg/L GA<sub>3</sub>, las que mostraron mejor desarrollo hasta la tercera transferencia a medio de cultivo fresco (Fig. 15 y 16), comparado con el control. Con ANA se formaron estructuras indeterminadas en el 60% de los cultivos sobre la base caular en el noveno día que incrementaron el tamaño a los 30 días de cultivo (Fig. 15 c, d). En GA<sub>3</sub> se desarrollaron morfologías de rizomas inusuales parte del rizoma en el 80% de los cultivos (Fig. 16 a, b y c).



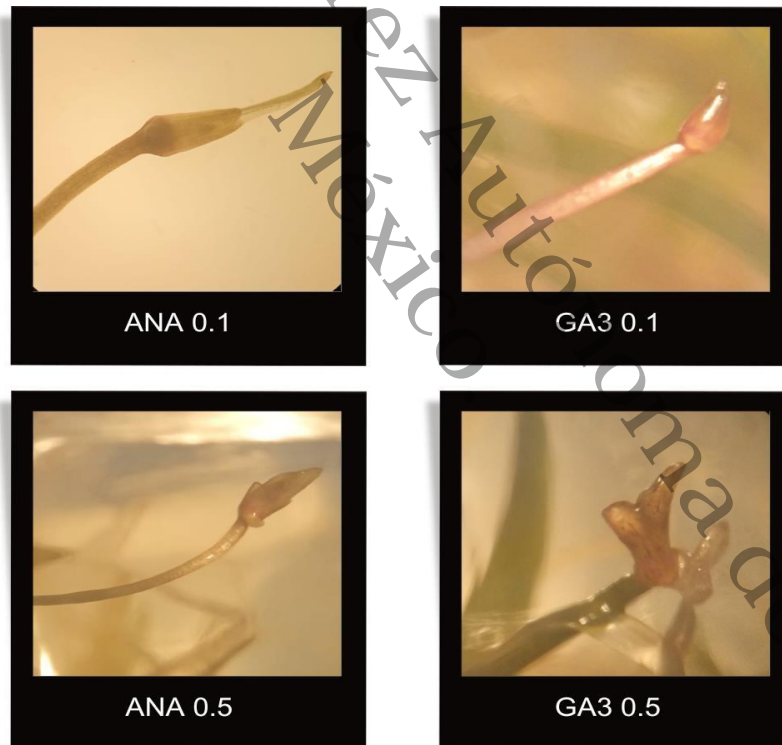
**Figura 15.** Estructuras indeterminadas en la base caular de las plantas madre modulares con tratamientos de ANA 0.5 mg/L. Planta con desarrollo de estructura indeterminada (a), estructura indeterminada en la base caular de la planta madre (b). Observaciones en estereomicroscopio: estructura indeterminada redonda (c), estructura indeterminada curvada (d). Morfología microscópica a 20x de la estructura indeterminada redonda en corte transversal con presencia de cromoplastos.





**Figura 16.** Morfologías de rizomas inusuales sin definición sexual (izq) comparada con el control (der). **A)** Tratamiento de GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L después de tres subcultivos. 1a) duplicación inicial de yemas del rizoma en la planta madre a los 9 días, 2a) alargamiento del rizoma a los 16 días, 3a) desarrollo inusual del ápice de los rizomas a 23 días, no presentó crecimiento de ramete, pero si la formación de nuevas yemas apicales, 4a) planta con algunas hojas y rizomas alargados de color marrón a 30 días. **B)** Tratamiento duplicado en GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L 1b) desarrollo inicial del ápice de rizoma en forma de capullo verdoso, 2b) alargamiento del rizoma a 15 días, 3b) estructura translúcida púrpura con nuevas raíces vista con una lupa a 18 días, 4b) degeneración del crecimiento del rizoma a los 20 días observada en un estereomicroscopio. **C)** Desarrollo morfológico del rizoma en tratamientos de control de la Planta madre unisexual. 1c) plantas en medio de cultivo (Ms) sin fitorregulador con formación del ápice rizoma normal a los 15 días, 2c) yema apical normal del rizoma.

El desarrollo de las nuevas hojas, raíces y rizomas del control resultó comparativamente diferente a los tratamientos con fitoreguladores que mostraron yemas de rizomas de formas variadas (Fig.17). El desarrollo de los rizomas en ANA 0.1 mg/L se caracterizó por la estructura de la yema en forma de capullo, en ANA 0.5 mg/L la yema apical se desarrolló en forma escamosa. En GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L el rizoma presentó un tipo de desarrollo peculiar en coloración púrpura con la yema desnuda, por el contrario, a GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L el rizoma presentó una coloración verde y yema púrpura en forma de roseta. Otra característica diferencial fue el lento desarrollo modular en los cultivos del control con hojas y raíces que permanecieron viables. Estas comparaciones se presentan en otra subsección (Fig. 16).

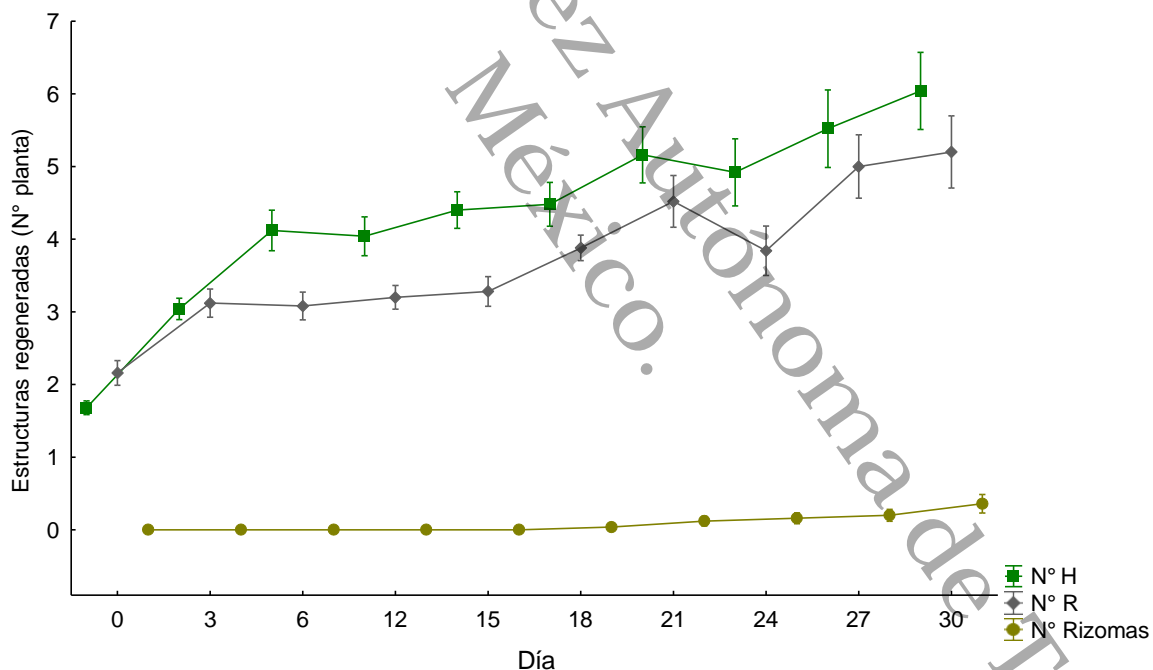


**Figura 17.** Morfología comparativa de yemas de rizomas en las dos concentraciones de ANA y GA<sub>3</sub> ensayadas.

## 6.6 Características de regeneración y crecimiento modular de plantas germinadas y unisexuales.

### 6.6.1 Plantas en preinducción floral

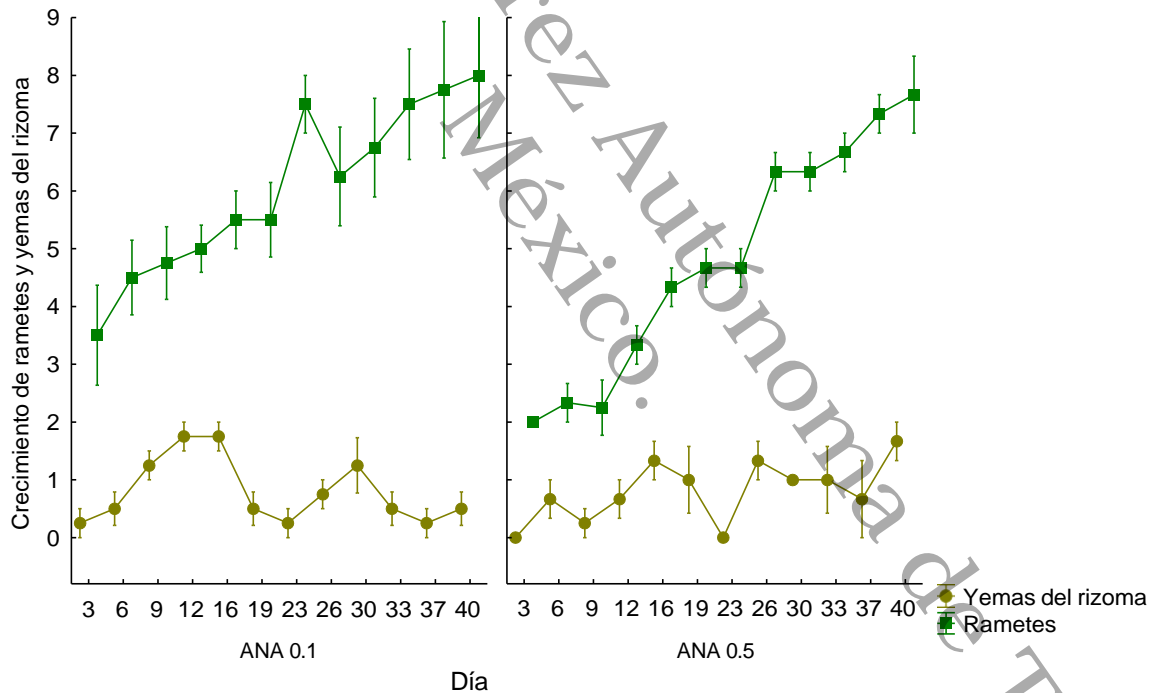
Las plantas madre provenientes de germinados ( $n= 288/300= 95\%$ ) asépticas/viables mostraron crecimiento foliar y radical en ascenso antes de la etapa de preinducción con fitorreguladores (Fig. 18). La regeneración de hojas, raíces y rizomas por planta sucedió en parsimonia. Las nuevas hojas se formaron en los primeros 3 días y mostraron transición regenerativa a los 27 días. En contraste, con las tres regeneraciones de raíces en los días 21 y 27. La clonación de los rizomas inició a los 21 días e incrementaron la acumulación y esta se mantuvo hasta aumentar a los 30 días.



**Figura 18.** Regeneración de hojas, raíces y rizomas en tres subcultivos de la planta madre (PM), previo al experimento de inducción floral. Número de hojas (N°H):  $F(9,240) = 12.5277$ ,  $p = 0.00$ , Numero de raíces (N° R):  $F(9,240) = 10.3006$ ,  $p = 0.00$ , Número de rizomas (N° Rizoma):  $F(9,240) = 4.3037$ ,  $p = 0.00$ .

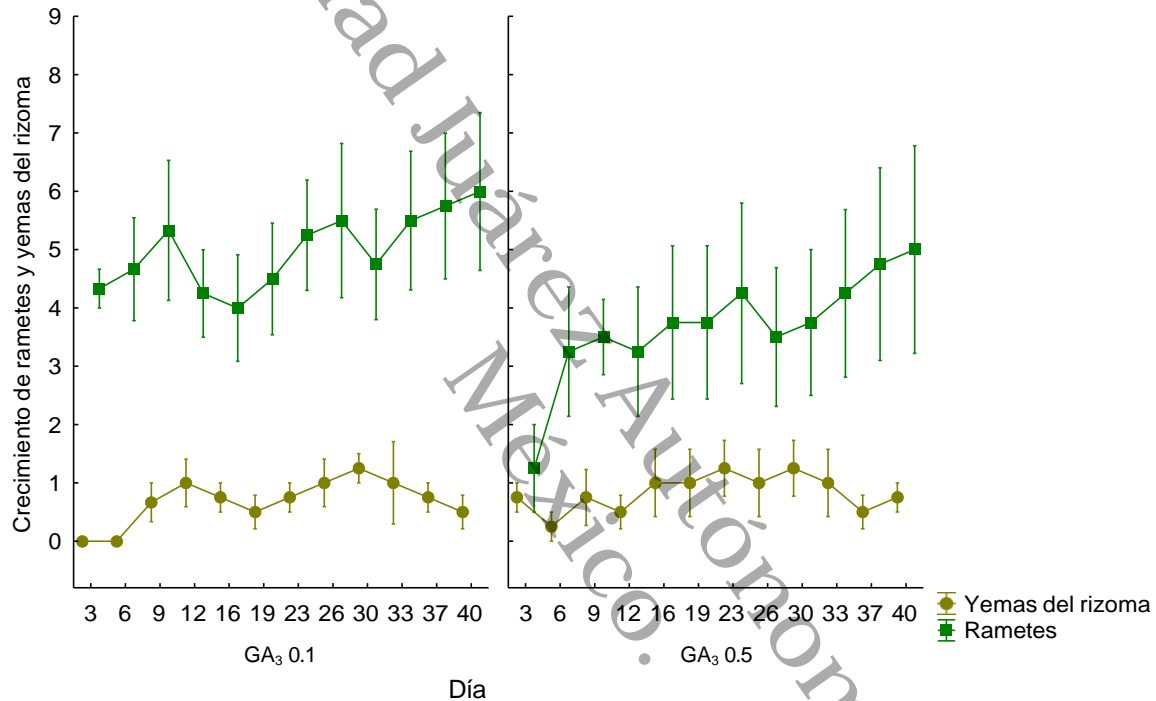
### 6.6.2 Plantas madre *in vitro* sin definición sexual en proceso floral inductivo con fitorreguladores

La propagación del ramete madre inició a partir de los primeros 6 días inducidos con ANA 0.1 mg/L, el desarrollo de las yemas del rizoma inició a los 6 días aumentando su desarrollo a los 12-16 días y se mantuvo constante. En ANA 0.5 mg/L el proceso de ramificación y el crecimiento de yemas de rizoma fue similar, sin embargo registraron inhibición respecto a ANA 0.1 mg/L. Los cultivos con fitorreguladores en concentración de 0.5 mg/L, a los 30 días los rizomas comenzaron a degenerar y mostraron fragilidad en proporción a la concentración de ANA 0.1 mg/L (Fig. 19).



**Figura 19.** Crecimiento de rametes y yemas del rizoma durante el periodo completo de cultivo con **ANA 0.1**: Yemas del rizoma:  $F(11,36) = 3.7955$ ,  $p = 0.0012$ , Rametes:  $F(11,36) = 3.4136$ ,  $p = 0.0026$ . **ANA 0.5**: Yemas del rizoma:  $F(11,25) = 2.0127$ ,  $p = 0.0716$ , Rametes:  $F(11,25) = 28.5456$ ,  $p = 0.0000$ .

El crecimiento de rametes en GA<sub>3</sub> 0.1mg/L inició en los primeros seis días aumentando su desarrollo a los 40 días, en cambio en GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L a los 9 días inició el desarrollo de rametes aumentando a los 40 días. El desarrollo de las yemas de rizoma en tratamientos con GA<sub>3</sub> 0.1 inició a partir de los 6 a 16 días, aunque declinó a los 19 días manteniendo su desarrollo. En GA<sub>3</sub> 0.5 inició su desarrollo a los 9 días las yemas de rizoma alcanzaron su máximo desarrollo a los 40 días (Fig. 20).



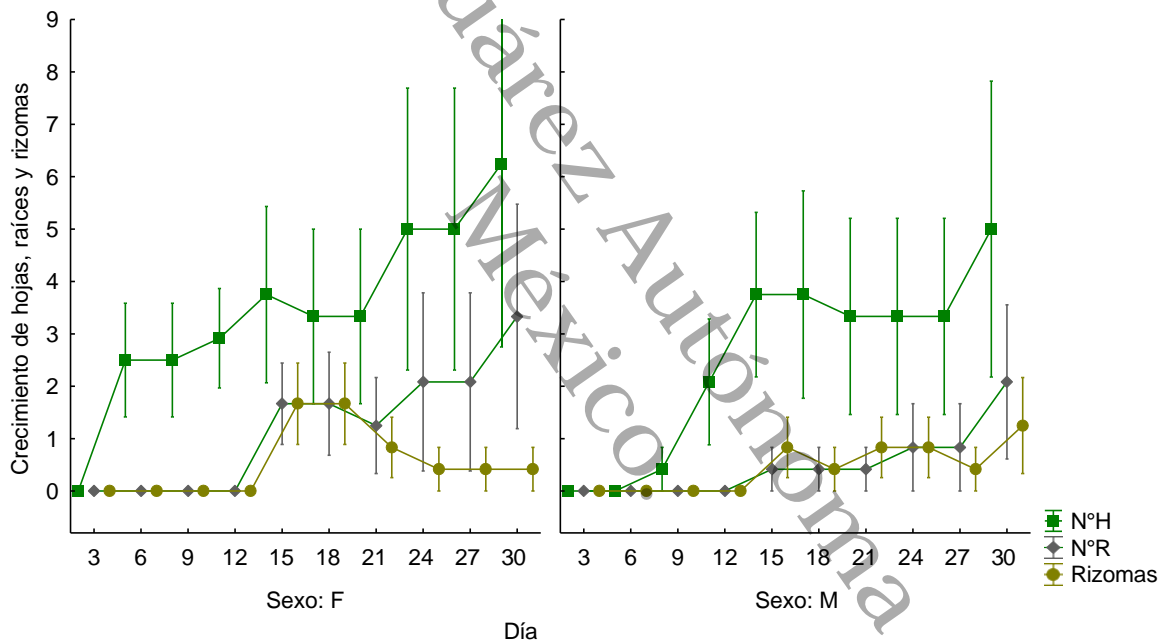
**Figura 20.** Crecimiento de rametes y yemas del rizoma durante el periodo de cultivo con **GA<sub>3</sub> 0.1 mg/L:** Yemas del rizoma:  $F(11,33) = 1.0681$ ,  $p = 0.4147$ , Rametes:  $F(11,33) = 0.3803$ ,  $p = 0.9547$ . **GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L:** Yemas del rizoma:  $F(11,36) = 0.4785$ ,  $p = 0.9044$ , Rametes:  $F(11,36) = 0.5334$ ,  $p = 0.8674$ .

### 6.6.3 Plantas modulares unisexuales - bases de hojas

El crecimiento en número de hojas, raíces y rizoma fue más rápido en las plantas femeninas comparadas con masculinas. Las femeninas incrementaron el número de hojas a los 6 días y simultáneamente raíces y rizoma a los 15 días. Cada tipo sexual

regeneró hasta 5 hojas y entre 2 y 3 raíces con tiempos pico menos definidos respecto a las plantas madre unisexuales. Al finalizar el tiempo de cultivo el máximo porcentaje de regeneración foliar fue cercano entre ambos sexos (45%/sexo), no así en regeneración de raíces que fue 1.5 veces mayor en femeninas (Fig. 21).

El máximo incremento de rizomas femeninos por planta fue de 1.5 a los 15 días y se mantuvo en 0.5 el crecimiento desde los 21 días. La superioridad de rametes femeninos fue 3.3 veces mayor respecto a masculinos a partir de los 21 días, en los días posteriores fueron equiparables. Comparativamente, el follaje, raíces y los rametes regenerados fueron parecidos a las plantas madre unisexuales del control (Fig. 9).



**Figura 21.** Crecimiento de nuevas estructuras vegetativas en las bases de hoja masculinas y femeninas. **Sexo femenino:** Número de hojas (N°H):  $F(9,230) = 0.7745$ ,  $p = 0.6402$ , Numero de raíz (N°R):  $F(9,230) = 1.0702$ ,  $p = 0.3857$ , Rizomas:  $F(9,230) = 2.0688$ ,  $p = 0.0332$ . **Sexo masculino:** Numero de hojas (N°H):  $F(9,230) = 1.1947$ ,  $p = 0.2992$ , Numero de raíz (N°R):  $F(9,230) = 1.0222$ ,  $p = 0.4229$ , Rizomas:  $F(9,230) = 0.9639$ ,  $p = 0.4708$ .

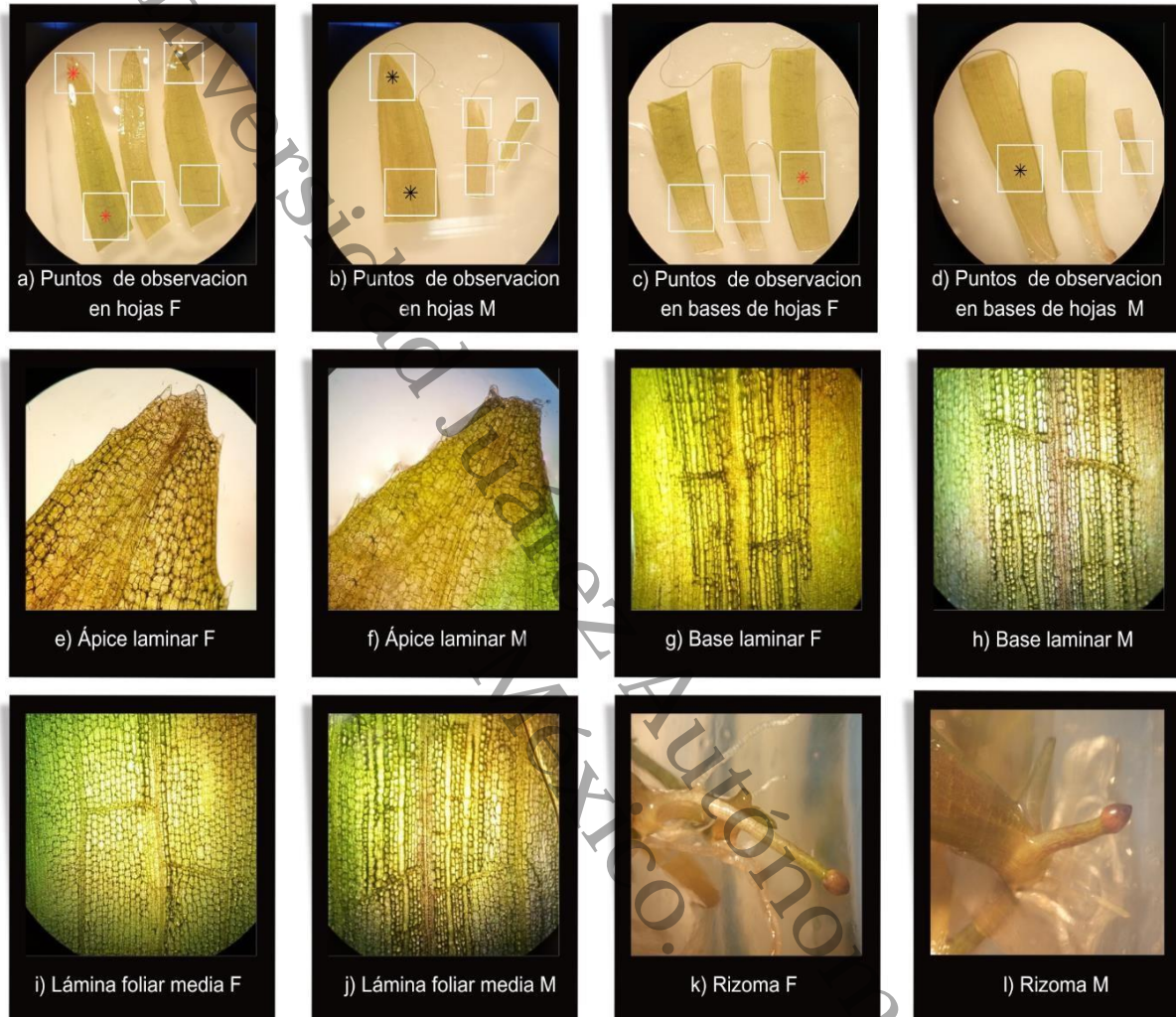
## 6.7 Morfología foliar y de los rizomas de plantas madre unisexuales

En la Figura 22 se muestran los cortes laminares de las plantas unisexuales cultivadas de bases de hoja. Los asteriscos indican los puntos de observación del ápice y parte media de la lámina foliar femenino (a), masculino (b) en las bases de hoja femenina (c), y bases de hoja masculina (d). La arquitectura estructural de las hojas presentó ápice agudo (a, b), el margen de la base foliar es entero (c, d) dentado y fue similar en planta femenino (e) y masculino (f). Ambos sexos presentan venación tipo paralelógrama que originó en posición basal, 3 a 4 venas primarias con recorrido derecho (g, h), y otras veces curvadas (i) hasta el ápice donde convergen (f), estrías transversales visibles en la base laminar femenina (g) y poco visibles en la lámina foliar femenina (i). Por el contrario, en la base laminar (h) y lámina foliar masculina (j) la distribución de las estrías transversales se observó más divididas y marcadamente visibles respecto a la femenina. En la misma (fig. 22), se observa el rizoma femenino (k) más alargado comparado con el rizoma masculino (l). Las características morfológicas de la estructura indeterminada mostraron un patrón celular típico del rizoma.

## 6.8 Perfil y contenido de clorofilas, carotenoides y feofitinas de plantas silvestres e inducidas a floración con ANA y GA<sub>3</sub>.

Las hojas de las plantas silvestres femeninas y masculinas mostraron perfiles pigmentarios parecidos en extractos etanólicos (Fig.23) y acetónicos (Anexo 1). Por lo tanto, el análisis comparativo sexual del contenido de pigmentos de plantas precultivadas versus inducidas fue analizado en extractos etanólicos. Las plantas silvestres femeninas y masculinas mostraron contenidos estadísticamente similares de clorofilas a, b, c y total, así como carotenoides y clorofilas a y b feofitinizadas (Fig. 24). En acetona el contenido de clorofilas fue más bajo (Anexo 2). La Tabla 2 representan los parámetros estadísticos de los datos pigmentarios de extractos etanólicos y de extractos acetónicos (Anexo 3).

Características microscópicas de plantas unisexuales

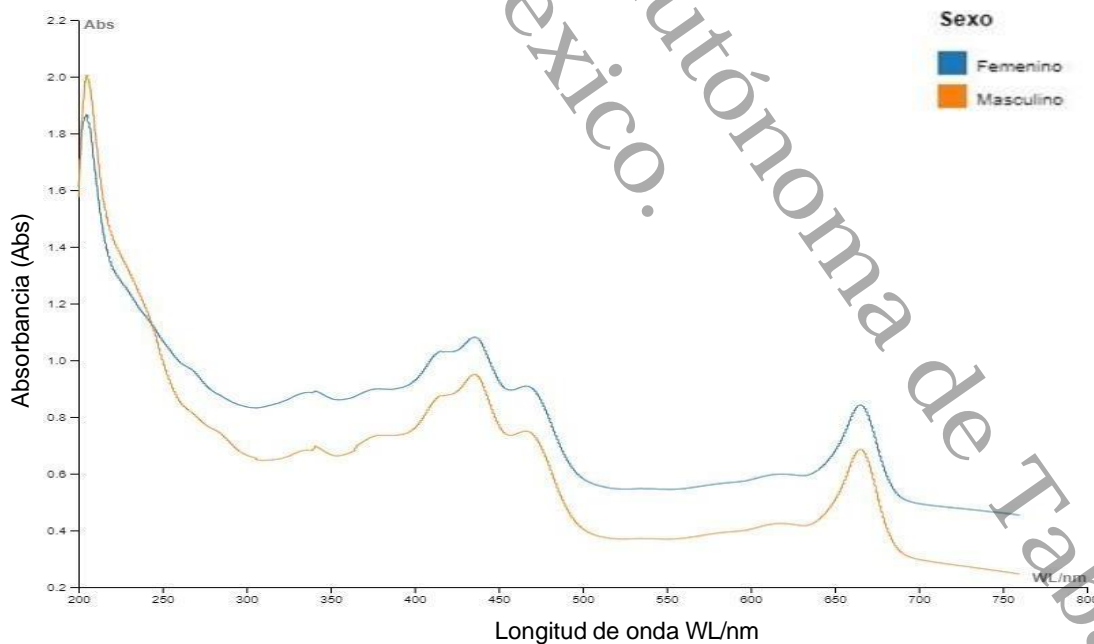


**Figura 22.** Características morfológicas de las hojas y rizomas de las plantas unisexuales en cultivo *in vitro* a 30 días de cultivo. Observaciones esteomicroscópicas: réplicas con secciones marcadas para observación en puntos del ápice y parte intermedia de la hoja femenina F (a) y masculina M (b), margen dentado del ápice de la hoja F (e), margen dentado del ápice de la hoja M (f) morfología de la lámina foliar intermedia F (i) y morfología de la lámina foliar intermedia M (j). Réplicas con secciones marcadas de las bases de hojas F (c) y M (d), nervaduras de la base foliar F (g), nervaduras de la base foliar M (h), morfología del rizoma F (k) y M (l). Las evidencias corresponden a repeticiones de tres hojas de diferentes cultivos principalmente las más desarrolladas.

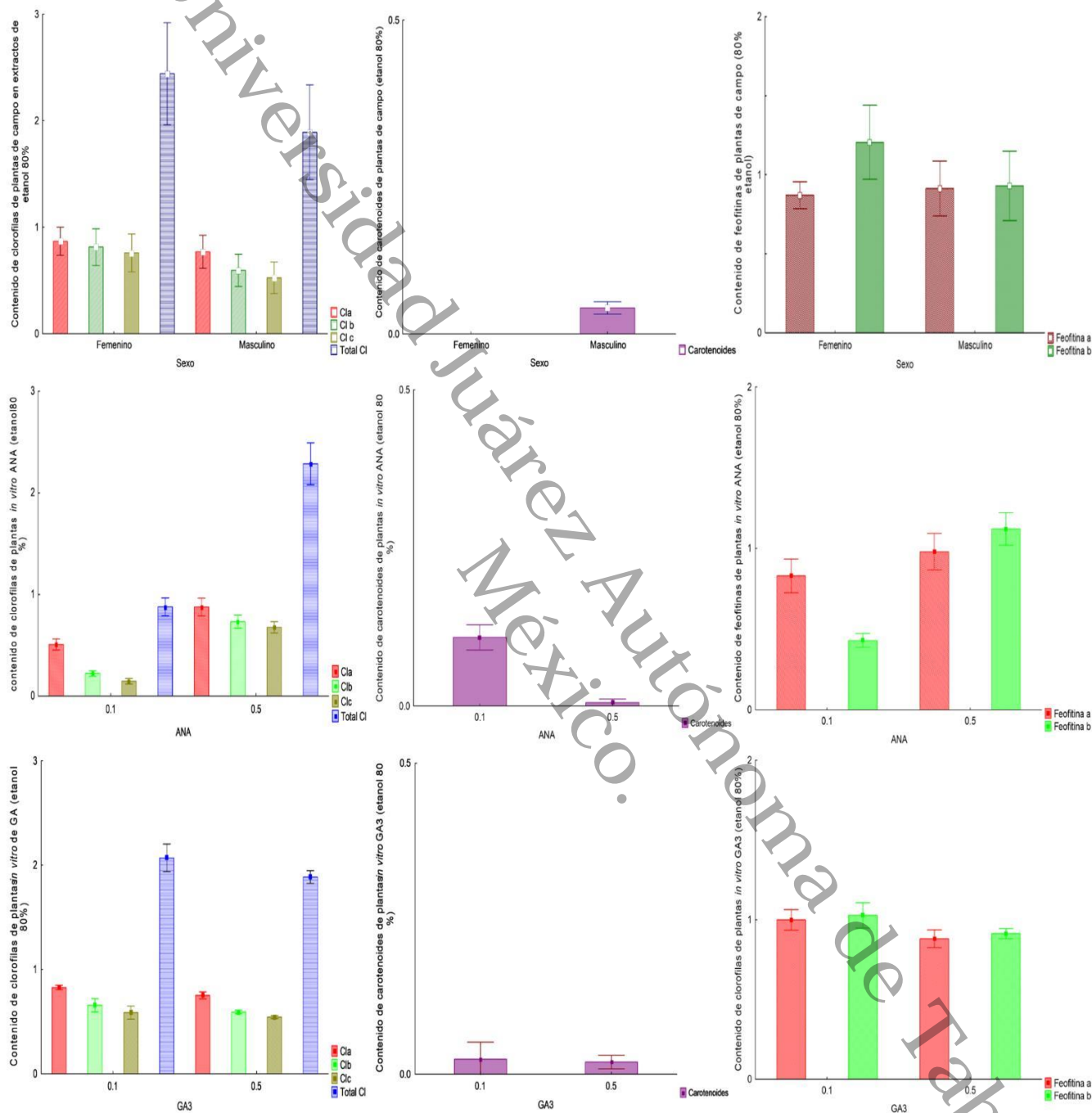


También las plantas *in vitro* inducidas a la diferenciación sexual fueron parecidas a las hojas de campo en la significancia de todos los contenidos pigmentarios. Por magnitud de concentración se revelaron diferencias en las hojas femeninas silvestre ligeramente superiores en clorofilas b, c y total y la feofitina b, mientras que los carotenos solo se presentaron en el sexo masculino en bajas concentraciones (~ 0.1 mg/g peso fresco).

Las plantas *in vitro* inducidas a la diferenciación sexual presentaron menores concentraciones de pigmentos fotosintéticos respecto a las plantas precultivadas. En 0.5 mg/L de ANA mayores contenidos de clorofilas respecto a la concentración baja y fue inverso en carotenoides (0.1 mg/L) y la feofitina b se duplicó. En las dos concentraciones de GA<sub>3</sub>, las clorofilas de hojas mostraron magnitudes parecidas a las hojas silvestres de ambos sexos, así como vestigios de carotenos y feofitinas similares. Por lo que los marcadores pigmentarios *in vitro* no coincidieron con la definición sexual de las plantas silvestres, excepto por la mayor presencia de carotenoides.



**Figura 23:** Perfil espectral de extractos etanólicos de hojas femeninas y masculinas de *vallisneria americana*.



**Figura 24.** Comparación de los contenidos de clorofilas Cla, Clb, Clc, total CI, carotenoides y feofitinas a y b en extractos foliares etanólicos de las plantas de campo en microcosmos y las plantas *in vitro* inducidas a dimorfismo sexual con ANA y GA<sub>3</sub> en concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/L.

Tabla 2. Parámetros estadísticos de los datos pigmentarios de extractos etánicos

Plantas precultivadas	
Clorofilas	Cla: $F(1,7) = 0.2331, p = 0.6439$ Clb: $F(1,7) = 0.8528, p = 0.3865$ Clc: $F(1,7) = 0.9492, p = 0.3624$ Total Cl: $F(1,7) = 0.6733, p = 0.4389$
Carotenoides	Carotenoides: $F(1,7) = 2.4409, p = 0.1622$
Feofitinas	Feofitina a: $F(1,7) = 0.0529, p = 0.8246$ Feofitina b: $F(1,7) = 0.6967, p = 0.4315$
Plantas <i>in vitro</i> FR (ANA)	
Clorofilas	Cla: $F(1,6) = 12.789, p = 0.0117$ Clb: $F(1,6) = 53.7141, p = 0.0003$ Clc: $F(1,6) = 72.649, p = 0.0001$ Total Cl: $F(1,6) = 39.2482, p = 0.0008$
Carotenoides	Carotenoides: $F(1,6) = 24.5605, p = 0.0026$
Feofitinas	Feofitina a: $F(1,6) = 0.9463, p = 0.3682$ Feofitina b: $F(1,6) = 39.9756, p = 0.0007$
Plantas <i>in vitro</i> FR (GA <sub>3</sub> )	
Clorofilas	Cla: $F(1,6) = 3.6018, p = 0.1065$ Clb: $F(1,6) = 0.9596, p = 0.3651$ Clc: $F(1,6) = 0.4522, p = 0.5263$ Total Cl: $F(1,6) = 1.5615, p = 0.2580$
Carotenoides	Carotenoides: $F(1,6) = 0.0252, p = 0.8791$
Feofitinas	Feofitina a: $F(1,6) = 1.9211, p = 0.2151$ Feofitina b: $F(1,6) = 1.8292, p = 0.2250$

## 7. DISCUSIÓN

La aplicación de la tecnología de floración *in vitro* para inducir cambios fisiológicos en plantas madre de sexo indeterminado de *Valisneria americana*, mediante el uso de fitorreguladores resultó insatisfactoria, ya que los órganos florales masculino y femenino completos no se definieron en ninguna concentración de giberelina y ácido naftalenacético. Por el contrario, la propagación de morfotipos unisexuales a partir de plantas regeneradas de explantes vegetativos unisexuales de bases foliares fue la alternativa más adecuada e inmejorable respecto a las bases de rizomas debido al resultado de menor mortalidad del material de cultivo.

La morfología de las plantas modulares fue reproducible conforme a los trabajos pioneros (Bautista-Regil *et al.*, 2016). Sin embargo, los criterios foliares utilizados de hoja verde y hoja necrosada para el diagnóstico de la viabilidad de bases de hoja maduras pronosticaron la pérdida masiva de explantes. En oposición, el indicador de flotabilidad facilitó un mejor reconocimiento de la supervivencia, dando lugar a la modularidad en la mitad de los cultivos. El diagnóstico de la flotabilidad de las bases de rizoma fue difícil debido a la grave contaminación algal y microbiana.

En el aspecto reproductivo, la floración femenina y masculina de las plantas unisexuales *in vitro* fue imperceptible durante el tiempo de inducción y post-inducción fisiológica con ANA (0.1, 0.5 mg/L) y GA<sub>3</sub> (0.1, 0.5 mg/L), incluso en los controles. Es decir, no se pudieron describir como estructuras florales visuales, como sépalos, pétalos, estambres y pistilos, debido a que los fitorreguladores provocaron morfologías indefinidas, aun cuando se fijaron criterios de la literatura, por ejemplo, el fotoperiodo de día largo. Es probable que los rasgos microscópicos asociados a la morfología floral rudimentaria de esta especie sean desapercibidos, lo que resulta en una floración con características incompletas o subdesarrolladas (Lowden, 1982). Para mejorar la interpretación de la formación de estructuras morfológicas atípicas que sugieren la manifestación de la reducción floral primitiva, es conveniente el antecedente del proceso de floración compleja de *Vallisneria* (Lowden, 1982).

Según estudios previos de floración *in vitro* de *V. americana* en ausencia y presencia de ANA con ácido ascórbico (Martínez, 2018), se esperaba optimizar el desarrollo del

primordio floral hasta el desarrollo del sector del rizoma alargado, gravitrópico, enjuto y verde, que identificaron como el rizoma vegetativo con pérdida de flotabilidad. Este rizoma coincidió con la morfología del rizoma blanco truncado, que presentó cromoplastos, aunque en este caso su crecimiento se detuvo.

Con GA<sub>3</sub>, la posible microfloración fue más evidente, pero en este caso presentaron rizomas duplicados en GA<sub>3</sub> 0.5 mg/L, similar al primordio floral reportado en Martínez (2018), los que elongaron más y simultáneamente. Aunque fueron similares en la turbidez inicial del medio de cultivo con Pérez (2017). En especies dioicas y en el espárrago las concentraciones de ANA para inducir floración se han rebasado y en plantas acuáticas solo ha sido posible con GA<sub>3</sub>, pero no en una monocotiledónea dioica como *Vallisneria*, de la cual solo se mencionan las floraciones esporádicas en condiciones de vivero.

Algunas otras posibles coincidencias con los trabajos de microfloración previos fueron los cambios de forma en la punta de yemas, incluso se lograron hacer descripciones más precisas basados en Les *et al.* (2008). Tal es el caso de las formas de yemas de capullo con GA<sub>3</sub> y ovoide con ANA, indistinto de la concentración milimolar.

Una rareza en los cultivos fue la formación sucesiva de desarrollos translúcidos en presencia de GA<sub>3</sub> muy parecidos a una floración precoz, pero mostrando raíces rudimentarias. El crecimiento fue irregular, no solo por las formas de la yema descrita también en Martínez (2018), sino también por la distancia extensiva entre nudos de rizomas. Estas descripciones morfológicas irregulares en presencia de ANA y GA<sub>3</sub> generaron confusión, por lo que se nombran estructuras indeterminadas o inusuales en lo sucesivo.

Cabe destacar que la diferenciación sexual basada en la respuesta hormonal se ha considerado como un continuo de diferentes sistemas genéticos de determinación del sexo (Golenberg y West, 2013). En particular, las especies dioicas se agrupan en dos clases en función del mecanismo de desarrollo que da lugar a una flor unisexual (Mitchell y Diggle, 2005). El mecanismo floral tipo I es más definido, comienza desarrollando una flor perfecta y se convierte en unisexual al terminar el desarrollo del androceo fase del aborto de órganos que se produce durante el desarrollo es específico de cada especie. •

El mecanismo unisexual tipo II está destinado a convertirse en pistilada o estaminada durante la transición a la floración o poco después. El primordio floral de una especie de Tipo II sólo inicia un tipo de órgano sexual y, por lo tanto, no requiere un aborto controlado de órganos; sin embargo, a veces se confunden con especies de Tipo I que abortan muy pronto. En las especies dioicas, el desarrollo floral hermafrodita se convierte en unisexual, haciendo que los estambres de las flores masculinas dejen de crecer y degeneren, y que los ovarios de las flores femeninas dejen de crecer sin degeneración asociada (Komai *et al.*, 2016). Esta diferenciación sexual se produce mediante el aborto selectivo del órgano floral opuesto. Dicho antecedente se ha citado en *V. americana*, sin embargo, el mecanismo floración en especies dioicas acuáticas ha recibido poca atención.

En cuanto al desarrollo de las plantas modulares sin definición sexual, durante la inducción floral con fitorreguladores coincidieron parcialmente en el tiempo de regeneración de hojas, raíces y rizomas, incluso fue parecido al control. En contraposición, la regeneración en la fase post inductiva en general fue lenta y presentaron mayores incrementos de clorosis y necrosis. Este comportamiento cinético durante la inducción floral y postinducción mostró características similares a las dos etapas descritas en Martínez (2018). Independientemente del fitorregulador aplicado, el desarrollo del rizoma fue normal a una concentración 0.1 mg/L y en el control se ralentizó, así como en concentraciones de 0.5 mg/L. Aunque fue en esta concentración donde se presentaron las morfologías inusuales mostradas en la (Fig. 15).

En el cultivo *in vitro* de *Spathiphyllum* (Araceae) usando una concentración mucho más alta de GA<sub>3</sub> (10 mg/L) se desarrolló una morfología floral anormal, hubo tendencia a aumentar la longitud de los brotes y disminuyeron el número de hojas, el peso fresco y seco con el tratamiento GA<sub>3</sub> (Dewir *et al.*, 2007). Parecido a las plantas asexuales y unisexuales perdieron función foliar siendo una condición común en el cultivo *in vitro* de plantas acuáticas sumergidas. Las plantas de *Thalassia hemprichii* cultivadas en invernadero presentaron incidencia hojas translucidas/necrosadas en proporción aproximada de 30:70 (Zheng *et al.*, 2018). El daño visual de las hojas se atribuye a condiciones de estrés asociadas a deficiencias de algunos minerales y enfermedades, sin embargo, en los pastos acuáticos se adjudica a un mecanismo natural de

translocación de nutrientes del ramete madre a la progenie para garantizar la extensión vegetativa. Menos favorecido fue el crecimiento modular en ausencia de fitorreguladores (control), aunque hubo sobreestimulación a mayor concentración de ANA ya que regeneraron suficientes raíces y follaje y varios presentaron actividad estolonífera. Esto se puede atribuir a los diferentes orígenes espaciales del material de cultivo y al estrés in situ diagnosticado en Bautista-Regil *et al.* (2016).

No se descarta que el fenómeno morfológico floral indeterminado haya sido provocado por un efecto de estrés tóxico del fitorregulador o por sobrecalentamiento ambiental. Un aspecto importante por tomar en consideración es la imprevista temperatura alta alcanzada debido a una falla generalizada en el suministro de aire artificial de la infraestructura que afectó las condiciones controladas del cuarto de cultivo. En analogía, experimentos controlados que evaluaron si el calentamiento global puede desencadenar la floración de *Posidonia oceánica*, simularon una ola de calor de seis semanas en condiciones de mesocosmos de laboratorio. Los resultados mostraron que el calentamiento afectaba negativamente a las tasas de crecimiento de las hojas. Sin embargo, al final del experimento, la mayoría de las plantas calentadas florecieron, mientras que las plantas de control no lo hicieron, aun siendo genéticamente similares. Se comprobó que la intensidad de la floración estaba significativamente correlacionada con la riqueza alélica y la heterocigosidad. Este hecho sin precedentes demuestra que la respuesta de las praderas marinas al calentamiento será más plástica, compleja y potencialmente resistente de lo que se pensaba (Ruiz *et al.*, 2017).

Favorablemente con el cultivo *in vitro* de *Vallisneria* usando el explante de base de hoja, se logró propagar el tipo unisexual femenino y masculino y se describieron los parámetros morfológicos de crecimiento y la predominancia de marcadores pigmentarios de la sexualidad. Similar a Jiménez-Pérez *et al.* (2022), el género masculino de la especie *V. americana* subtropical analizada en este estudio registró mayor longitud de la raíz principal, aunque la magnitud de la superioridad masculina fue estadísticamente descartada entre los géneros sexuales. En este estudio dicha magnitud de la raíz fue reproducible y junto con la cantidad de biomasa resultaron útiles para registrar la variabilidad de cada unidad de cultivo en los microacuarios y para estandarizar el tamaño del material vegetal en experimentos sucesivos.

En relación con los pigmentos foliares de las plantas unisexuales *in vitro* no se marcaron diferencias de sexualidad por el contenido ni en el perfil UV-Vis, sin embargo, en el sexo masculino se detectaron vestigios de carotenoides y la feofitina b parece destacar. La clorofila c fue importante para informar sobre la asociación de algas como marcadores sexuales. Hipótesis de microalgas asociadas por temporada quizá hizo la diferencia. Numerosos estudios han tratado de determinar si existe una interacción entre el dimorfismo sexual y el contenido de pigmentos, por ejemplo, en hojas de cáñamo se demostró que el contenido de carotenoides tiende a ser mayor en hembras que en los machos Galoch (1978), lo cual coincidió parcialmente en la estimulación sexual con ANA 0.1 mg/L.

Respecto a las descripciones morfológicas de la hoja no marcaron diferencias sexuales. Se distinguió una banda llamativa formada de pares de células de colores más claros que rodean la vena media de la hoja llamada banda lacunal encontrada *V. americana* de Minnesota, (Martin y Mort, 2022). Las características morfológicas y anatómicas inicialmente descritas en plantas vivas de *Vallisneria* (*Hydrocharitaceae*), se reconocieron como caracteres taxonómicos indecisos, lo que incluyó el largo y ancho de las hojas y la presencia/ausencia de estrías en los márgenes, de acuerdo con Lowden (1982).

Adicionalmente, las mediciones u observaciones comparativas fueron inconsistentes con los estados morfológicos de *Vallisneria* sp definidos por Les *et al.*, (2008) de 27 fuentes diferentes. Incluso Martin y Mort (2022) establecieron nuevos estados para reducir los caracteres polimórficos en la matriz filogenética con el fin de anular las plantas del jardín común usadas para diseñar el conjunto de datos morfológicos vegetativos y reproductivos de la información recopilada. Antes, McConchie y Kadereit (1987), sugirieron profundizar sobre la morfología floral pérdida o compactada de *Vallisneria*, por la presencia de pelos androeciales que representaban una condición evolutivamente derivada. Los estudios de estos autores no incluyeron a los homólogos masculinos y femeninos para cada taxón, por lo que resultó difícil unir nuestros datos para distinguir los caracteres sexuales de las plantas *in vitro*.



De acuerdo con Martin y Mort (2023), algunas características de hábito han sido distintivas y consistentes entre especies de *Vallisneria*, particularmente aquellas relacionadas con la morfología floral de las inflorescencias umbeladas en poblaciones de *Vallisneria americana* de Florida Central. Las estructuras umbeladas inusuales fueron descritas por Lowden (1982). Una hipótesis que se ha formulado sobre la inflorescencia umbelada es que pueden ser relictos de estirpes ancestrales que sobrevivieron mediante reproducción asexual, rasgos hereditarios dignos de reconocimiento taxonómico o especímenes teratológicos resultantes de lesiones durante la formación de flores. En campo algunas flores umbeladas presentan tamaño floral miniaturizado y un número reducido de partes, y las flores más pequeñas muestran un cambio en la tendencia sexual a partir de estigmas y rudimentos de pétalos reducidos. En un caso, una inflorescencia umbelada tenía flores pistiladas, así como las partes de una flor masculina, lo que ha sugerido una reversión monóica. Por estas rarezas se puede inferir la probabilidad de que esta floración se haya potencializado en los cultivos *in vitro* de *Vallisneria* en este estudio, lo cual es una posible hipótesis preliminar.

En analogía con los posibles vestigios florales o morfologías inusuales, el cultivo *in vitro* de plantas suele producir rarezas como la embriogénesis somática primaria y secundaria, la organogénesis indefinida de raíces, y raíces peludas y embriones somáticos agrotransformados que se han convertido en procesos biotecnológicos innovadores.

## 8. CONCLUSIÓN

Por la incertidumbre de la floración *in vitro* basada en el desarrollo de flores perfectas se descartó como método para reproducir plantas modulares unisexuales regeneradas a partir de semillas. A cambio se ofrece el método organogénico estable genéticamente para propagar las plantas viables unisexuales femeninas y masculinas. La determinación del sexo por inducción fisiológica con aplicaciones de ANA y GA<sub>3</sub> en concentración limitada o exceso, tampoco dio evidencias de una floración rudimentaria definida. En cambio, la investigación fue parcialmente reproducible respecto a estudios previos de vestigios de microfloración con los fitorreguladores ANA y GA<sub>3</sub>, con la revelación de posibles marcadores morfológicos conspicuos, que son indicios para reformular hipótesis sobre el mecanismo de floración desconocido en el cultivo *in vitro* de especies dioicas acuáticas.

Estos son los primeros marcadores morfológicos en su tipo en un cultivo *in vitro* de plantas acuáticas basada en ciertas señales reveladas en la fase inductiva y postinductiva como fueron las irregularidades morfológicas de las yemas y el crecimiento atípico del rizoma, incluso el lento crecimiento en fase postinductiva de ambos fitorreguladores. La sexualidad femenina y masculina con los marcadores pigmentarios revelados no fue cuantitativamente en los extractos foliares etanólicos de plantas *in vitro*, aunque por la magnitud de concentración se inclinaron al sexo femenino las Cla, Clb, Clc, Cl total y feofitina b, respecto al sexo masculino los B carotenos fueron más sobresalientes presentaron similitud en plantas *in vitro*. Los hallazgos de este estudio son importantes para monitorear la diferenciación sexual en futuras investigaciones de campo y reduccionistas.

## REFERENCIAS

- Amiri, S., y Mohammadi, R. (2021). Establishment of an efficient *in vitro* propagation protocol for Sumac (*Rhus coriaria* L.) and confirmation of the genetic homogeneity. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80550-4>.
- Bautista- Regil, J., Ruiz-Carrera, V., Sánchez, A. J., Salcedo-Meza, M. y Florido, R. (2016). Estrés a microescala de *Vallisneria americana* por enriquecimiento de nutrientes con estequiometría N: P. *Hidrobiológica*, 26(1), 53–60. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2016v26n1/Ruiz>.
- Barret, S. CH. (2013). The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible?. *The royal society B: Biological sciences*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0913>.
- Barrett, S. CH., y Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of experimental Botany*, 64(1), 67–82. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers308>.
- Beltrán, R. L., Romero, M. A., Amparo, B. M., Valdez, H. J., Luna, C. M., y Blancas, B. J. (2022). Adaptive advantages of wood anatomical–hydraulic features linked to sex in a tropical dioecious species. *Trees* 36, 39–52. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02258-w>.
- Cuevas, E., Perez, M. y Sevillano, L. (2017). Population size, sex-ratio and sexual dimorphism in *Fuchsia parviflora* (Onagraceae) an endemic dioecious shrub. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Morelia, Michoacán, México.
- Chen, C., Wang, C., Liu, Z., Liu, X., Zou, L., Shi, J., y Tan, M. (2018). Variations in Physiology and Multiple Bioactive Constituents under Salt Stress Provide Insight into the Quality Evaluation of *Apocyni Veneti Folium*. *International Journal of Molecular Sciences*.

Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Singh, N., Hahn, E.-J., y Paek, K.-Y. (2007). Influence of GA<sub>3</sub>, sucrose and solid medium/bioreactor culture on *in vitro* flowering of *Spathiphyllum* and association of glutathione metabolism.

Du, Z. Y., y Wang, Q. F. (2014). Correlations of Life Form, Pollination Mode and Sexual System in Aquatic Angiosperms. *PLoS ONE*, 9(12). [https://doi: 10.1371/journal.pone.0115653](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115653).

Feng, G., Sanderson, B. J., Keefover R. K., Liu, J., Ma, T., Yin, T., Smart, L., y Olson, M. (2020). Pathways to sex determination in plants: how many roads lead to Rome? *Current Opinion in Plant Biology*. Department of Biological Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409, USA, 54, 61–68. [https://doi: 10.1016/j.pbi.2020.01.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.01.004).

Galoch E. (1978). The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). The influence of plant growth regulators on sex expression in male and female plants. Nicolaus Copernicus University. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*; Vol. 47, números 1 y 2. [https://doi:10.5586/asbp.1978.013](https://doi.org/10.5586/asbp.1978.013).

Golenberg, E. M., y West, N. W. (2013). Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American Journal of Botany*, 100(6), 1022–1037. [https://doi:10.3732/ajb.1200544](https://doi.org/10.3732/ajb.1200544).

Grant, S., Houben, A., Vyskot, B., Siroky, J., Pan, W. H., Macas, J., y Saedler, H. (1994). Genetics of sex determination in flowering plants. *Developmental Genetics*. *Developmental Genetics*, 15(3), 214-230.

Hoffmann, M., Raeder, U. y Melzer, A. (2014). Influence of the gender on growth and phenology of the dioecious macrophyte *Najas marina* ssp. *intermedia* *Hidrobiología*. 727(1), 167–176. [https://doi:10.1007/s10750-013-1795-z](https://doi.org/10.1007/s10750-013-1795-z).

Hou, Y., Li, F. y Gao, S. (2004). Sex determination and sexual organ differentiation in flowering plants. *Forestry Studies in China*, 6 (4), 50-57. <https://doi.org/10.1007/s11632-004-0031-3>.

Jeffrey, G. D., Jane B., Fletche, r P. W., Matcham, W. H., Read, J. D., Russell, J. A., y Pressel S. (2013). *In vitro* cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. *Journal of Bryology*, 26.

Jiménez-Pérez, M. C., Bautista-Regil, J., Hernández-Piedra, G., Gamboa-Angulo, M., Sánchez, A. de J., & Ruiz Carrera, V. (2022). Detección UV-VIS de marcadores de diferenciación sexual en extractos hidroetanólicos de *Vallisneria americana*. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 38, 11–21. <https://doi.org/10.20937/RICA.54244>.

Juvany, M., y Munné, B. S. (2015). Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context. *Journal of Experimental Botany*, 66. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv343>.

Komai, F., Watanabe, Y., Kanno, A. y Masuda, K. (2016). Precocious In-Vitro Flowering of Perennial Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Regenerants with a Chemical Inducer. *American Journal of Plant Sciences*. Vol. 7, 1834-1845. <https://doi:10.4236/ajps.2016.714170>.

Kurtz, J. C., Yates, D. F., Macauley, J. M., Quarles, R. L., Genthner, F. J., Chancy, C. A., y Devereux, R. (2003). Effects of light reduction on growth of the submerged macrophyte *Vallisneria americana* and the community of root-associated heterotrophic bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 291(2), 199–218. [https://doi:10.1016/s0022-0981\(03\)00120-5](https://doi:10.1016/s0022-0981(03)00120-5).

Khryanin, V. N. (2002). Role of Phytohormones in Sex Differentiation in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 545–551. <https://doi.org/10.1023/A:1016328513153>.

Les, D. H., Jacobs, S. W. L., Tippery, N. P., Chen, L., Moody, M. L., y Wilstermann-Hildebrand, M. (2008). Systematics of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae). *Systematic Botany*, 33(1), 49–65. <https://doi:10.1600/036364408783887483>.

Li, L., Barrett, S. CH., Song, Z., y Chen, J. (2019). Sex-specific plasticity of reproductive allocation in response to water depth in a clonal, dioecious macrophyte. *American journal of Botany*, 106. 42-50. <https://doi:10.1002/ajb2.1218>.

Lowden, R.M. (1982). An approach to the taxonomy of *Vallisneria* L. (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 13, 269-298. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(82\)90064-X](https://doi.org/10.1016/0304-3770(82)90064-X).

Maldonado L. Y., Cuevas-R.P., Sánchez M. G., Oyama K. y Quesada M. (2014). Growth, plant quality and leaf damage patterns in a dioecious tree species: is gender important? *Artrópodo-Planta Int.*, 8 ,241-251. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9314-3>.

Martínez Rodríguez. G. (2018). Inducción floral *in vitro* de *Vallisneria americana* Michx (Hydrocharitaceae) con fitorreguladores. UJAT.

Martínez Ri, Rendón LMB, Ayala RGL, López G., López P, G., Acevedo MMA., Medina C, G., y Soto M, MG. (2017). Comparación de metodos: fluorometría- espectrofotometría para la estimación de clorofila a en el humedal de Pátzcuaro, Michoacán. *Congreso XVI internacional, XXII Nacional*. Int. rev. Contacto Ambiente. Chetumal, Quintana Roo.

Martin, A y Mort, M. (2023). *Vallisneria* (Hydrocharitaceae): novel species, taxonomic revisions, and hybridization. *Ecology and Evolutionary Biology*, University of Kansas, Lawrence, KS 66045, Estados Unidos.

Martin, A. y Mort, M. (2022). New Insights for the Systematics and Taxonomy of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae). *Ecology and Evolutionary Biology*, University of Kansas, Lawrence, KS 66045. SSRN.

Mitchell, C. H., y Diggle, P. K. (2005). The evolution of unisexual flowers: morphological and functional convergence results from diverse developmental transitions. *American Journal of Botany*, 92(7), 1068–1076. <https://doi:10.3732/ajb.92.7.1068>.

Moore, K. A., Shields, E. C., y Jarvis, J. C. (2008). The Role of Habitat and Herbivory on the Restoration of Tidal Freshwater Submerged Aquatic Vegetation Populations. *The journal of the society for Ecological Restoration*, 18, 596–604. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00699.x>.

Moore, K., y Jarvis, J. (2008). Using Seeds to Propagate and Restore *Vallisneria americana* Michaux (Wild Celery) in the Chesapeake Bay.

Mukherjee, Arpan., Kumar Gaurav, Anand., Singh, Saurabh., Yadav, Shweta., Bhowmick, Shiuly., Abeysinghe, Sama y Prakash, Jay. (2022). The bioactive potential of phytohormones: A review. Institute of Environment and Sustainable Development, Banaras Hindu University, Varanasi 221005, Uttar Pradesh, India.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.X>.

Murthy, KSR, Kondamudi, R., Chalapathi Rao, PV y Pullaiah, T. (2012). *In vitro* flowering review. *J Agric Technol*, 8(5), 1517-1536.

McDaniel, C. N., King, R. W., y Evans, L. T. (1991). Floral determination and *in-vitro* floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum* L. *Planta*, 185(1). <https://doi:10.1007/bf00194508>.

McConchie, C. A., y Kadereit, J. W. (1987). Floral structure of *Vallisneria caulescens* Bailey & F. Mueller. *Aquatic Botany*, 29(2), 101–110. [https://doi:10.1016/0304-3770\(87\)90089-1](https://doi:10.1016/0304-3770(87)90089-1).

O'Hare, M. T., Baattrup-Pedersen, A., Baumgarte, I., Freeman, A., Gunn, I. D. M., Lázár, A. N., y Bowes, M. J. (2018). Responses of Aquatic Plants to Eutrophication in Rivers: A Revised Conceptual Model. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi:10.3389/fpls.2018.00451>.

Pauli, E. D., Scheel, G. L., Delaroza, F., Rakocevic, M., Bruns, R. E., y Scarminio, I. S. (2019). Photodiode array chromatographic-spectrophotometric metabolite quantification for yerba-mate plant sexual dimorphism differentiation. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104218>.

Pannell, J. y Santos del Blanco, L. (2014). Evolución de la agregación y separación de sexos: ¿Qué hemos aprendido de las poblaciones ibéricas de *Mercurialis annua*? *Ecosystems* 23(3): 13-22. <https://doi:10.7818/ECOS.2014.23-3.03>.

Peng D., y Wu Z. (2022). Progress on sex determination of dioecious plants. *Biodiversity science*, 30. <https://doi:10.17520/biods.2021416>.

Pérez Jiménez D. (2017). Diferenciación sexual con variables biofísicas en clones de *vallisneria americana*. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Tabasco.

Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46(1), 115–126. <https://doi:10.1007/s11099-008-0019-7>.

Ruiz, J. M., Marín-Guirao, L., García-Muñoz, R., Ramos-Segura, A., Bernardeau-Esteller, J., Pérez, M., y Procaccini, G. (2017). Experimental evidence of warming-induced flowering in the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi:10.1016/j.marpolbul.2017.10.037>.

Ruiz-Carrera V. y Sánchez A, J. (2008). Desarrollo de un modelo de cultivo *in vitro* para *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y Ciencia* 24(3), 205-218.

Rogers, S. J., McFarland D, J., y Barko J.W. (1995). Evaluation of the Growth of *Vallisneria americana* Michx. In Relation to Sediment Nutrient Availability. *Lake and Reservoir Management*, 11, 57-66. <https://doi.org/10.1080/07438149509354198>.

Sánchez AJ, Florido R., Salcedo MA, Ruiz-Carrera V., Montalvo- Urgel H. y Raz-Guzmán A. (2012). Macrofaunistic Diversity in *Vallisneria americana* Michx. In a Tropical Wetland, Southern Gulf of México. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco. *Diversity of Ecosystems*. <https://doi.org/10.5772/35331>.

Sharma, V., Kamal, B., Srivastava, N., Dobriyal, A. K., y Jadon, V. S. (2014). *In vitro* Flower Induction from Shoots Regenerated from Cultured Axillary Buds of Endangered Medicinal Herb *Swertia chirayita* H. Karst. *Biotechnology Research International*. <https://doi:10.1155/2014/264690>.

Spencer, CH. B., y Josh, H. (2013). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of experimental botany*, 64(1), 67-82.

Sehgal, A., Mohan Ram, HY y Bhatt, JR. (1993). *In vitro* germination, growth, morphogenesis, and flowering of an aquatic angiosperm, *Polypleurum stylosum*



(Podostemaceae). *Aquatic Botany*, 45(4), 269–283. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(93\)90028-u](https://doi.org/10.1016/0304-3770(93)90028-u).

Timerman D. y Barrett S.C. (2019). The spatial ecology of sex ratios in a dioecious plant: Relations between ramet and genet sex ratios. *J. Ecol.* 107(4), 1804-1816. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13128>.

Tootoonchi, M., Gettys L. A., y Bhadha J. H. (2019). Tapegrass, Eelgrass, or Wild Celery (*Vallisneria americana* Michaux): A Native Aquatic and Wetland Plant: SS-AGR-437/AG437. University of Florida, (5), 1-5. <https://doi.org/10.32473/edis-ag437-2019>.

Tootoonchi M, Gettys LA, Thayer KL, Markovich IJ, Sigmon JW, Sadeghibaniani S. (2020). Ecotypes of aquatic plant *Vallisneria americana* tolerate different salinity concentrations. *Diversity* 12: 65. <https://doi.org/10.3390/d12020065>.

Tormena, C. D., Pauli, E. D., Marcheafave, G. G., Scheel, G. L., Rakocevic, M., Bruns, R. E., y Scarminio, I. S. (2020). FT-IR biomarkers of sexual dimorphism in yerba-mate plants: Seasonal and light accessibility effects. *Microchemical Journal*, 158, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105329>.

Uma MC, Mohan-Ram HY. (1972). *In vitro* culture of *Vallisneria spiralis*. *Phytomorphology* 22: 121-124.

Vannozzi, A., Palumbo, F., Lucchin, M. y Barcaccia, G. (2022). Dioecy in Flowering Plants: From the First Observations of Prospero Alpini in the XVI Century to the Most Recent Advances in the Genomics Era. Department of Agronomy, Food, Natural Resources, Animals and Environment (DAFNAE), Campus of Agripolis, University of Padova, V. 16, 35020 Legnaro, Italy, 12(3), 364. <https://doi.org/10.3390/agricultura12030364>.

Vernon, L. P. (1960). Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts., 32(9), 1144–1150. <https://doi.org/10.1021/ac60165a029>.

Wang, N., Li, Q., Jiang, M., Zhang, W., Zhang, H., Song, Q., y Zheng, Z. (2020). Effects of Distinct Revegetation Methods on Growth and Microbial Properties of *Vallisneria*

*natans*. Water. Department of Environmental Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China.

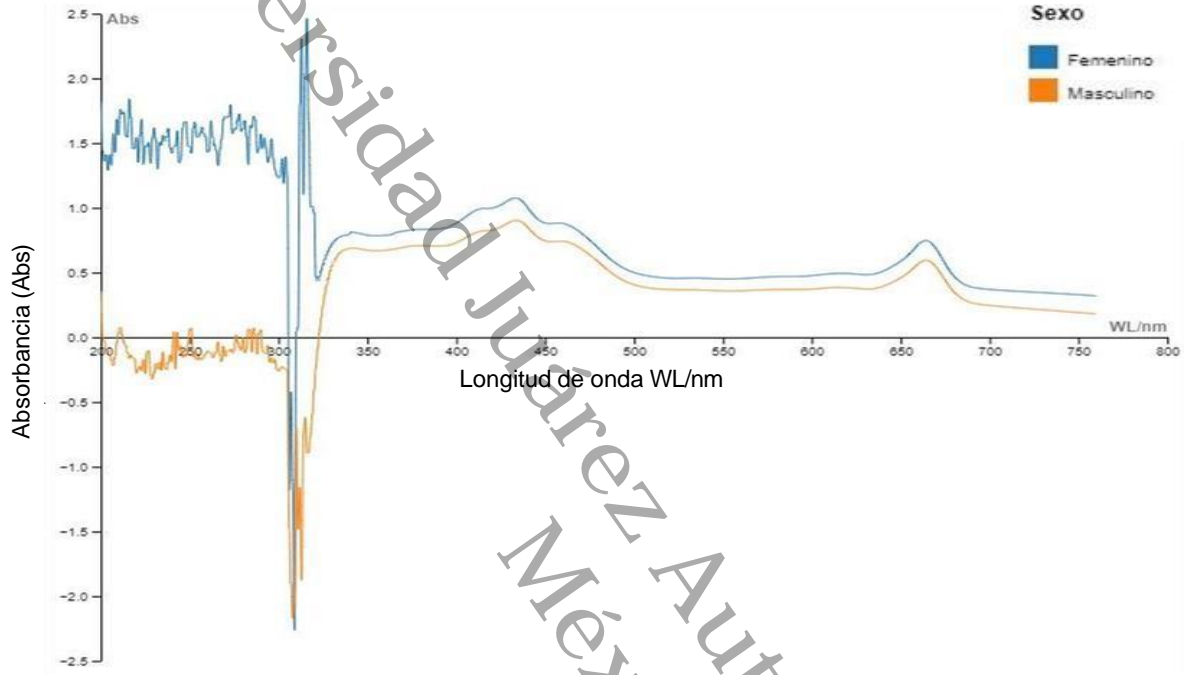
Zhang, Y., Liu, X., Qin, B., Shi, K., Deng, J., y Zhou, Y. (2016). Aquatic vegetation in response to increased eutrophication and degraded light climate in Eastern Lake Taihu: Implications for lake ecological restoration. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi:10.1038/srep23867>.

Zheng, J., Gu, X. Q., Zhang, T. J., Liu, H. H., Ou, Q. J., y Peng, C. L. (2018). Phytotoxic effects of Cu, Cd and Zn on the seagrass *Thalassia hemprichii* and metal accumulation in plants growing in Xincun Bay, Hainan, China. *Ecotoxicology*, 27, 517-526.

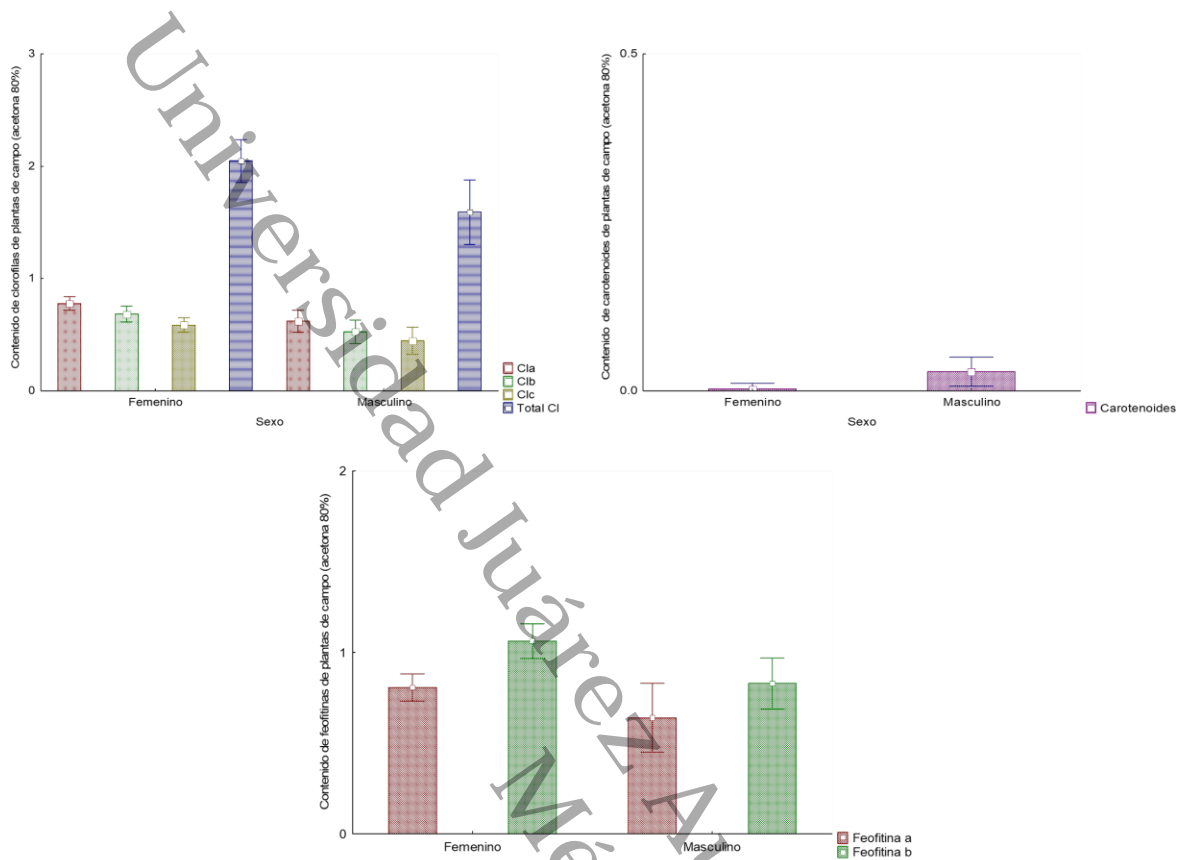
Zhou, Y., Li, L., y Song, Z. (2019). Plasticity in Sexual Dimorphism Enhances Adaptation of Dioecious *Vallisneria natans*. Plants to Water Depth Change. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00826>.

Zhou, Y., Li, X., Zhao, Y., Zhou, W., Li, L., Wang, B., y Song, Z. (2016). Divergences in reproductive strategy explain the distribution ranges of *Vallisneria* species in China. *Aquatic Botany*, 132, 41–48. <https://doi:10.1016/j.aquabot.2016.04.005>.

ANEXO



**Anexo 1:** Perfil espectral de extractos acetónicos de hojas femeninas y masculinas de *vallisneria americana*.



**Anexo 2.** Contenidos de clorofilas Cl a, Cl b, Cl c, total Cl, carotenoides y feofitinas a y b en extractos foliares de acetona de las plantas de campo en microcosmos.

Tabla 3. Parámetros estadísticos de los datos en extractos de acetona	
Plantas silvestres	
Clorofilas	Cl a: $F(1,7) = 2.0864, p = 0.1918$ Cl b: $F(1,7) = 1.6955, p = 0.2341$ Cl c: $F(1,7) = 1.1388, p = 0.3213$ Total Cl: $F(1,7) = 1.8964, p = 0.2109$
Carotenoides	Carotenoides: $F(1,7) = 1.5007, p = 0.2602$
Feofitinas	Feofitina a: $F(1,7) = 0.7975, p = 0.4015$ Feofitina b: $F(1,7) = 2.0167, p = 0.1985$

**Anexo 3:** Tabla de parámetros estadísticos de extractos acetónicos.

<b>Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional</b>	
<b>Título de Tesis:</b>	Separación sexual de plantas modulares <i>in vitro</i> de <i>vallisneria americana</i> Michx con y sin inducción fisiológica
<b>Autor(a) de la Tesis:</b>	María Guadalupe Torres Martínez
<b>ORCID:</b>	<a href="https://orcid.org/0009-0003-0872-1902">https://orcid.org/0009-0003-0872-1902</a>
<b>Resumen de la Tesis:</b>	<p>La planta sumergida dioica <i>Vallisneria americana</i> está experimentando disminución poblacional debido a la eutrofización. El presente estudio se propuso separar la sexualidad de plantas <i>in vitro</i>, inducidas a floración fisiológica con fitorreguladores y regeneradas unisexualmente a partir de bases foliares y rizomas sin estímulos florales. La floración y los marcadores clorofílicos sexuales se evaluaron en dos concentraciones de 0.1 y 0.5 mg/L de ANA y GA<sub>3</sub> en MS modificado. Con una asepsia y viabilidad de cultivos satisfactoria, las plantas presentaron crecimiento armónico modular durante la etapa preinductiva siguiendo los protocolos de (Bautista-Regil <i>et al.</i>, 2016) y una diferenciación morfológica indeterminada o inusual con inhibición de crecimiento modular durante la etapa postinductiva sin fitorreguladores. Estos hallazgos sugirieron una floración rudimentaria típica de <i>V. americana</i>. En plantas inducidas con 0.5 mg/L ANA, los extractos hidroetanólicos presentaron contenidos de Cla, Clb, Clc, Cl total y uno de feofitina b parecidos a la planta femenina unisexual, y solo carotenoides a la contraparte masculina. En el experimento siguiente, se promovió la regeneración en MSM de las bases de hojas, y no bases rizomas, de plantas unisexuales, resultando el 50% de los cultivos asépticos y viables con flotabilidad y mostrando modularidad satisfactorio. Adicionalmente se vislumbró la separación morfológica sexual de ápice y nervadura. La incertidumbre de la floración <i>in vitro</i> conduce a reformular hipótesis sobre el mecanismo floral de especies dioicas acuáticas en futuras investigaciones de campo y reduccionistas. En cambio, se estableció la primera biotecnología de propagación y separación sexual <i>in vitro</i> mediante el método organogénico unisexual.</p>
<b>Palabras claves:</b>	Macrófitas, sexualidad, floración <i>in vitro</i> , pigmentos, morfología unisexual.
<b>Referencias citadas:</b>	Bautista- Regil, J., Ruiz-Carrera, V., Sánchez, A. J., Salcedo-Meza, M. y Florido, R. (2016). Estrés a microescala de <i>Vallisneria americana</i> por enriquecimiento de nutrientes con estequiometría N: P. <i>Hidrobiológica</i> , 26(1), 53–60. <a href="https://doi.org/10.24275/uam/izt/dCBS/hidro/2016v26n1/Ruiz">https://doi.org/10.24275/uam/izt/dCBS/hidro/2016v26n1/Ruiz</a> .