

## Estrés a microescala de *Vallisneria americana* por enriquecimiento de nutrientes con estequiométría N:P

## Stress to microscale of *Vallisneria americana* by enrichment of nutrients with stoichiometry N:P

Jesús Bautista-Regil, Violeta Ruiz-Carrera, Alberto J Sánchez, Miguel Ángel Salcedo-Meza y Rosa Florido

Centro de Investigación para la Conservación y Aprovechamiento de Recursos Tropicales. División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas, 86039. Villahermosa, Tabasco, México  
e-mail: violeta@ujat.mx

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

### RESUMEN

El estrés de *Vallisneria americana* provocado por incrementos de la relación molar N:P ( $\text{N-NO}_3$  y  $\text{P-H}_2\text{PO}_4$ ) o por el aumento de la concentración de nutrientes (CN) fue diferenciado mediante el análisis del régimen nutricional (RN), el cual fue examinado con dos experimentos factoriales al azar sobre plantas cultivadas *in vitro* en medio MS modificado. El primero (RN1) cruzó relaciones N:P de 16, 20 y 24 y CN (%) de 25, 50 y 100; mientras que, el segundo (RN2) evaluó las relaciones N:P de 48, 60, 72 y porcentajes de CN de 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50. El mecanismo de estrés por factor fue analizado con la declinación en regeneración y viabilidad de hojas y raíces, porcentual o unitaria, durante 45 o 75 días, ya que las plantas *in vitro* no produjeron rametos. En los experimentos RN1, todas las plantas murieron en 100% CN, las hojas reportaron mayor resistencia con 24N:P y 25% CN ( $p<0.05$ ). Las algas crecieron en el 52% de los cultivos, sin efecto de covarianza ( $p>0.05$ ). En los RN2, hojas y raíces resistieron en 72N:P dentro del rango porcentual de 6.25 a 25 de CN ( $p<0.05$ ). Otra información útil fue la correlación significativa ( $p<0.01$ ) entre hojas y raíces regeneradas ( $r=0.9$ ) y entre regeneración y viabilidad de hojas ( $r=0.5$ ). El mecanismo de estrés por la relación N:P fue descifrado mediante estequiometría metabólica (proteína:ARN). En contraste, el mecanismo por la CN fue osmótico y rápido. A microescala *in vitro*, la resistencia al estrés de *V. americana*, en N:P elevada y con el suministro de N oxidado, fue vinculado a cargas bajas de nutrientes.

**Palabras clave:** Carga de nutrientes, cultivo *in vitro*, estequiometría N:P, resistencia al estrés, *Vallisneria americana*.

### ABSTRACT

To distinguish between the stress of *Vallisneria americana* caused by increases either in the molar N:P relation ( $\text{N-NO}_3$  and  $\text{P-H}_2\text{PO}_4$ ) or in the concentration of nutrients (CN), the nutritional regimen (NR) was examined by means of two randomized factorial experiments on plants cultured *in vitro* in modified MS medium. The first (RN1) crossed N:P relation of 16, 20, and 24 and CN (%) of 25, 50, and 100; while the second (RN2) evaluated N:P relations of 48, 60, 72, and CN percentages of 3.125, 6.25, 12.5, 25, and 50. The mechanism of resistance to the stress by factor was examined with the decrease in the regeneration and viability of leaves and roots; both measured by unit or percentage for 45 to 75 days, since the plants *in vitro* did not produce ramets. In NR1 experiments, all plants died in 100% CN and leaves registered greater resistance with 24N:P, and 25% CN ( $p<0.05$ ). The algae grew in 52% of the cultures, without covariance effect ( $p>0.05$ ). In RN2 experiments, leaves and roots resisted at 72N:P, within the percent ranging from 6.25 to 25 CN ( $p<0.05$ ). Additional useful information was the significant relationship ( $p<0.01$ ) found between regenerated leaves and roots ( $r=0.9$ ), and between regeneration and viability of leaves ( $r=0.5$ ). The mechanism of stress by the N: P was deciphered by metabolic stoichiometry (protein: RNA). In contrast, the mechanism for the CN was osmotic and fast. At *in vitro* microscale, resistance to the stress of *V. americana*, in high N:P and with the supply of N-oxidized, was linked to low nutrient loads.

**Key words:** *In vitro* culture, loading nutrients, resistance to stress, stoichiometry N:P, *Vallisneria americana*.

## INTRODUCCIÓN

El enriquecimiento de nutrientes, nitrógeno (N) y fósforo (P), en ecosistemas acuáticos costeros representa una crisis ambiental en crecimiento. En muchos casos la intensidad de la carga de nutrientes en el ecosistema ha culminado en la eutrofización o hiper-eutrofización, pero tiende a diferenciarse entre regiones subdesarrolladas y desarrolladas (Selman & Greenhalgh, 2009; Marion & Orth, 2010; Dokulil & Teubner, 2011). Los ecosistemas limnéticos someros han sido más vulnerados debido a que pequeñas modificaciones en el aporte de nutrientes ha ocasionado cambios relativos en la composición de la comunidad y su funcionamiento (Kennish & Paerl, 2010).

En el dilema de la eutrofización en las lagunas costeras adquiere relevancia la vegetación de angiospermas sumergidas y enraizadas por sus funciones ecológicas, así como los servicios ambientales asociados (Wang *et al.*, 2008a; Sánchez *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). En esencia, eleva la concentración del oxígeno que purifica el agua, participa en los ciclos biogeoquímicos de carbono (C), N y P, recicla los nutrientes en diferentes escalas tróficas y alberga altas densidades de biodiversidad planctónica y benthica. En contraste, el incremento de los nutrientes modifica la concentración natural de N y P, la disponibilidad de luz, el oxígeno disuelto y el crecimiento de fitoplancton, a lo que se ha atribuido la declinación masiva o pérdida drástica de angiospermas sumergidas en diferentes áreas biogeográficas (Burkholder *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2012; Ruiz-Carrera & Sánchez, 2012; Zhu *et al.*, 2014).

En las poblaciones del género *Vallisneria* la declinación por enriquecimiento de nutrientes se ha explicado más por el efecto negativo del N reducido que por el N oxidado (Cao *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2014). Varias respuestas fisiológicas y anatómicas en *V. natans* (João de Loureiro) han presentado correlaciones negativas con el incremento de nutrientes, en relaciones 20:1 de N: P en concentración total e iónica 1:2 de N-NH<sub>4</sub>:N-NO<sub>3</sub> (Wang *et al.*, 2012). En la misma especie se han ensayado relaciones 1:1 y 1:7 de N-NH<sub>4</sub>:N-NO<sub>3</sub> (Wang *et al.*, 2012; Dou *et al.*, 2013). Sin embargo la relación N:P ha sido registrada en aguas eutrofizadas en magnitud más elevada (Quan & Falkowski, 2009).

En el ámbito de los ecosistemas acuáticos eutroficados la estrategia ha sido integrar en las evaluaciones la relación N:P y C:P (Leoni *et al.*, 2008; Dodds & Whiles, 2010), y en las predicciones reduccionistas de estrés es factible usar el cultivo *in vitro* (Pérez-Clemente & Gómez-Cadenas, 2012). El modelo de cultivo *in vitro* de plantas que fue desarrollado para *V. americana* (André Michaux) ofrece una herramienta básica de acercamiento al estrés abiótico en tiempo real (Ruiz-Carrera & Sánchez, 2008).

El enfoque experimental con el balance estequiométrico de elementos que ciclan, en particular del C, N y P, en las propiedades biológicas y ecológicas de la biota ha formado parte de varias estrategias que han explicado el flujo de energía y materiales en diferentes niveles de organización, desde genes hasta ecosistemas (Elser *et al.*, 2010; Sistla & Schimel, 2012; Wang *et al.*, 2012; Minden & Kleyer, 2014). La estequiometría N:P ha sido utilizada en el análisis de correlaciones simples y múltiples de causas y efectos del estrés, sus evaluaciones en diferentes escalas espacio-temporales y como indicador de la calidad del agua para orientar la estrategia dual de manejo de N y P en los ecosistemas costeros (de la Lanza-Espino, 2011; Chen *et al.*, 2013).

La modificación en la relación de N:P y C:P por incrementos de la concentración de nutrientes han impactado procesos metabólicos de especies sumergidas como la eficiencia en captura de luz y la asimilación de nutrientes (Burkholder *et al.*, 2007; Leoni *et al.*, 2008; Dodds & Whiles, 2010; Wang *et al.*, 2012). Diversos estudios en lagos someros señalaron que la carga de N ha sido determinante en la pérdida de plantas sumergidas, aún en concentración de P suficientemente alta (Li *et al.*, 2008). Las respuestas registradas en angiospermas acuáticas sumergidas por el enriquecimiento de N han sido de estimulación o inhibición directa en sus procesos fisiológicos e indirecta como la atenuación de luz, anoxia o hipoxia en el ambiente acuático debido al sobrecimiento de algas (Leoni *et al.*, 2008), y estas respuestas han variado de acuerdo al genotipo, el protocolo implementado, la fuente de nutrientes (columna de agua o sedimento) y por las interacciones con factores tales como la temperatura, el forrajeo y la luz.

En el contexto de la vulnerabilidad de angiospermas sumergidas por el enriquecimiento de nutrientes en la columna de agua con N oxidado, la hipótesis plantea que el mecanismo de estrés en hojas y raíces está diferenciado a partir del incremento de la relación N:P y la carga de nutrientes.

El presente estudio analizó en condición de cultivo *in vitro* la resistencia al estrés de *Vallisneria americana* a las modificaciones en la estequiometría N:P (N-NO<sub>3</sub> y P-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y el nivel de enriquecimiento de nutrientes. La disminución en viabilidad y regenerantes de hojas y raíces fueron marcadores útiles para distinguir el mecanismo de estrés de esta angiosperma sumergida y para mejorar futuras aplicaciones de restauración en las lagunas costeras eutrofizadas del Continente Americano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ecosistema y recolección de frutos.** En el humedal Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla, localizado en la cuenca baja de los ríos Grijalva-Usumacinta, se ubica la laguna de Santa Anita (051° 39' 43" N - 20° 29' 756" O). En esta laguna tropical limnética (26.0 – 32.0 °C y 372 – 513 µS cm<sup>-1</sup>) fueron recolectados los frutos maduros de *V. americana*, en la temporada de transición al flujo alto de 2012. La laguna registró en esta temporada profundidad promedio de 2.4 ± 0.2 m con una transparencia de 0.3- 0.5 m, pH de 6.6 – 8.2 y oxígeno disuelto de 6.6 – 8.2 mg L<sup>-1</sup>. Según el Índice de Estado Trófico (Carlson, 1977), con valores de 0.62 ± 0.6 mg L<sup>-1</sup> y 37.4 ± 16.9 µg L<sup>-1</sup> para NT y Cl<sub>a</sub>, la laguna presentó condiciones hipereutróficas.

Los frutos se transportaron al laboratorio en agua de la misma calidad. Las semillas fueron extraídas manualmente del fruto. El almacén de semillas permaneció en agua purificada dentro del refrigerador (5 °C) antes de iniciar los experimentos.

**Cultivo *in vitro* de plantas.** En la preparación de las semillas y unidades de cultivo para la regeneración de las plantas y los experimentos se usó la técnica de cultivo *in vitro* bifásico de Ruiz-Carrera & Sánchez (2008). La relación de altura entre fase gelificada (soporte de 4% agar-agar) y fase acuosa (columna de agua) fue 1:5 cm. Cada fase se preparó en recipientes de vidrio (6.5 cm altura x 5.5 cm ancho) con tapas de policarbonato (Magenta ®). Las fases se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 17 min. Las fases fueron preparadas de agua dura a pH 7.5, compuesta de carbonatos, sulfatos y cloruros (Eaton *et al.*, 2000).

Las semillas fueron desinfectadas con solución de NaClO (10% de Cloralex®) por 10 min en agitación constante (125 rpm) y enjuagadas tres veces con agua estéril. Antes de cultivar las semillas la fase acuosa fue agregada suavemente al soporte en la campana de flujo laminar. Las plántulas se desarrollaron en cuartos de cultivo en temperatura de  $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , luz difusa y fotoperíodo de 16:8 h luz-obscuridad.

En los experimentos se sustituyó la fase acuosa de agua dura con medio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado en la composición de sales de N con la exclusión de  $\text{N-NH}_4$ . El nivel de luz de 20  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Photosynthetic Photon Flux-BQM) se estableció bajo para evitar el estrés por fotoinhibición (Murata *et al.*, 2007). La renovación de la fase acuosa se realizó cuando las plantas fueron autótrofas, es decir presentaron coleóptilo seco, 2 o 3 hojas y 2 o 3 raíces.

**Preparación de medio nutritivo.** Los nutrientes del medio MS fueron preparados de: 1) soluciones de macronutrientes ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), micronutrientes ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , KI,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), complejo Fe-EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y orgánicos (glicina, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, tiamina-HCl y mio-inositol) y 2) diferentes pesos de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NaHCO}_3$ , que fueron sumados en la concentración total de nutrientes. Las soluciones se concentraron 10 o 100 veces respecto a la concentración de nutrientes del MS modificado y permanecieron refrigeradas a  $5^{\circ}\text{C}$  en frascos de vidrio con tapa de policarbonato. El complejo Fe-EDTA fue protegido de la luz en frasco ámbar. Las diferentes fuentes de nutrientes se mezclaron y el pH fue ajustado a 7.5 antes de aforar. La mezcla de nutrientes fue renovada cada 15 días. A partir de las concentraciones de  $\text{N-NO}_3$ ,  $\text{P-H}_2\text{PO}_4$  y  $\text{C-HCO}_3$  de la fase acuosa fueron calculadas las relaciones molares de N:P y C:P.

**Diseños experimentales.** Los experimentos se desarrollaron en régimen nutricional (RN) a través de dos experimentos factoriales aleatorizados usando las plantas *in vitro* de 20 días de edad. El primer experimento (RN1) cruzó relaciones N:P de 24, 20 y 16 (régimen N:P bajo) y concentración de nutrientes de 100%, 50% y 25% (régimen de nutrientes alto, moderado y bajo). El segundo experimento (RN2) cruzó relaciones N:P de 48, 60 y 72 de N:P (régimen N:P alto) y las concentraciones de 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.125% (régimen de nutrientes moderado, bajo y el resto muy bajos). Ambos experimentos incluyeron cinco réplicas por tratamiento más una repetición al centro en el segundo. El volumen de medio fresco se incrementó en 10 ml para evitar que las hojas rebasaran la interfase agua/aire. La relación de C:P aumentó en proporción con la concentración de nutrientes de 1.22 a 4.9 en RN1 y de 0.15 a 2.45 en RN2. El RN completo incluyó estequiométrías N:P que aplican a ecuaciones de crecimiento del fitopláncton ( $\text{N}_{16}:\text{P}$ ) y de macrófitas marinas enraizadas ( $\text{N}_{20}:\text{P}$ ) (Romero *et al.*, 2006), así como a otras citadas en áreas naturales (Romero *et al.*, 2006; Benson *et al.*, 2008; Sardans *et al.*, 2012).

La resistencia al estrés fue registrada con la declinación de la regeneración y la viabilidad foliar y radicular (10-15 plantas/unidad de cultivo), expresados en unidad o porcentaje. Por la edad juvenil de las plantas la predicción en el crecimiento de rameles fue opcional. En la unidad experimental se registró el número de plantas y el número de hojas iniciales. La presencia de algas asociadas fue indicada en categorías de ausencia y presencia.

Los predictores del experimento fueron los marcadores de regeneración y viabilidad. La regeneración fue medida con el número de

hojas y raíces nuevas en un individuo seleccionado al azar. La viabilidad foliar fue analizada por el color (verde -2, parcialmente verdes-1 y cloróticas-0). La categoría cero también se aplicó a la desintegración foliar. La viabilidad de raíces fue indicada combinando la turbidez y los crecimientos longitudinales (no turbientes-0, turbientes sin cambio-1, turbientes -2 cortas y turbientes largas-3). La turbidez se ligó a la superficie brillante translúcida. La raíz larga rebasó la base del recipiente y presentó entorchamiento o circumnutación. En el segundo experimento las categorías 2 y 3 de la raíz se unieron en la categoría turbientes con crecimiento-2. Ambos marcadores fueron analizados cada 15 días en un período máximo de 10 semanas (Wang *et al.*, 2012).

**Análisis estadístico.** El análisis de los datos fue desarrollado con el programa Statistica (release 8.0). En la determinación del supuesto de homogeneidad de varianza se usó la prueba de Cochran y de la normalidad fue Shapiro-Wilk (Zar, 1999). El MANCOVA fue usado en las variables de concentración de nutrientes, relación N:P y tiempos de cultivo. Las covariables fueron las algas (experimento 1) y el número de plantas iniciales (experimento 2). En el primer experimento se excluyó el tiempo de cultivo de 45 días y la concentración de 100%, porque las plantas se desintegran en todas las unidades de cultivo. En las comparaciones múltiples se usó la prueba de Tukey a  $p<0.05$ . La correlación entre la regeneración unitaria de hojas y raíces, y la primera con la viabilidad foliar, así como entre las de regeneración y viabilidad porcentual de hojas y raíces viables ( $n= 459$ ) fue establecida con el coeficiente de Pearson.

## RESULTADOS

Las plantas de *Vallisneria americana* no presentaron crecimiento de rameles en ningún régimen nutricional. En el primero (RN1), el crecimiento de algas en el 52% de los cultivos impidió observar la regeneración foliar y radical. Sin embargo, las algas oportunistas no presentaron covarianza ( $p>0.05$ ). En relaciones N:P de 16 a 24 y concentración de nutrientes de 100% las plantas murieron. La concentración de nutrientes mostró variación significativa en la viabilidad de hojas ( $F_{n=2} = 12.95$ ,  $p<0.0001$ ), significativa en raíces ( $F_{n=2} = 8.08$ ,  $p<0.001$ ) y en las hojas la interacción presentó significancia menor ( $F_{n=4} = 3.51$ ,  $p<0.01$ ). El tiempo de cultivo no causó variación alguna ( $p>0.05$ ). La viabilidad foliar disminuyó con el incremento de la concentración de nutrientes y en la raíz fueron iguales las de 50% y 25% ( $p<0.05$ ). La viabilidad foliar fue máximo en la interacción 24 N:P y 25% de concentración de nutrientes (Fig. 1).

En el RN2, la covarianza afectó la regeneración de raíces y la viabilidad unitaria de hojas ( $F_{n=1} = 19.92$ ,  $p<0.0001$ ). En la regeneración de hojas y raíces fue significativo el efecto de la relación de N:P ( $F_{n=2} = 8.19$ ,  $p<0.0005$  y  $F_{n=2} = 9.5$ ,  $p<0.0001$ ), la concentración de nutrientes ( $F_{n=3} = 316.74$  y  $277.93$ ,  $p<0.0001$ ) y el tiempo de cultivo ( $F_{n=4} = 59.48$  y  $63.04$ ,  $p<0.0001$ ). La relación de N:P interactuó con la concentración de nutrientes y reportó diferencias de mayor significancia en la regeneración de hojas ( $F_{n=8} = 4.89$ ,  $p<0.0001$ ) que en la viabilidad unitaria de hojas ( $F_{n=8} = 2.68$ ,  $p<0.007$ ) y la regeneración de raíces ( $F_{n=8} = 2.126$ ,  $p<0.03$ ).

La declinación en regeneración de hojas y raíces y en la viabilidad de hojas fue gradual con el incremento de la relación de N:P (Fig. 2). Solo en hojas regeneradas fueron iguales las de 72 y 60 ( $p<0.05$ ). En las relaciones N:P de 48, 60 y 72 de los tres marcadores no incremen-

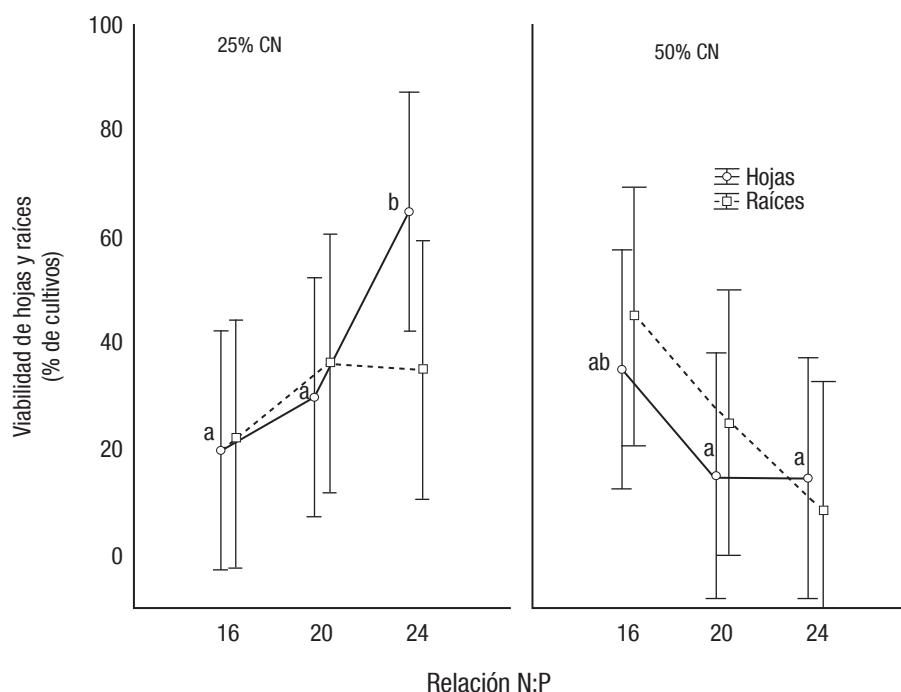


Figura 1. Viabilidad de hojas y raíces en las plantas de *Vallisneria americana* cultivadas en relación de N:P de 16 a 24 y enriquecimiento de nutrientes de 25 y 50%. Líneas verticales = intervalo de confianza. Literales diferentes = diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).  $n = 10 - 15$

taron en el tiempo ( $F_{n=8} = 0.6089$  y  $1.0833$ ,  $p > 0.05$ ). En cambio, la concentración de nutrientes interactuó con el tiempo de manera significativa ( $F_{n=8} = 40.76$  y  $27.72$ ;  $p < 0.0001$ ). La declinación en regeneración de hojas fue constante en la concentración de nutrientes de 50%, y después de 45 días de cultivo murieron (Fig. 3). La regeneración foliar permaneció estática en 25% después de 45 días y en 12.5% a los 60

días. La viabilidad fue más notoria en las hojas (Fig. 4). La correlación fue significativa ( $r = 0.9$ ,  $r^2 = 0.75$ ,  $p < 0.01$ ) entre la regeneración de hojas y raíces y entre la de regeneración de hojas y la viabilidad de hojas ( $r = 0.53$ ,  $r^2 = 0.28$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 5). El perfil cinético fue similar entre la viabilidad unitaria de hojas y regeneración de raíces, en correspondencia con las correlaciones registradas (Fig. 5).

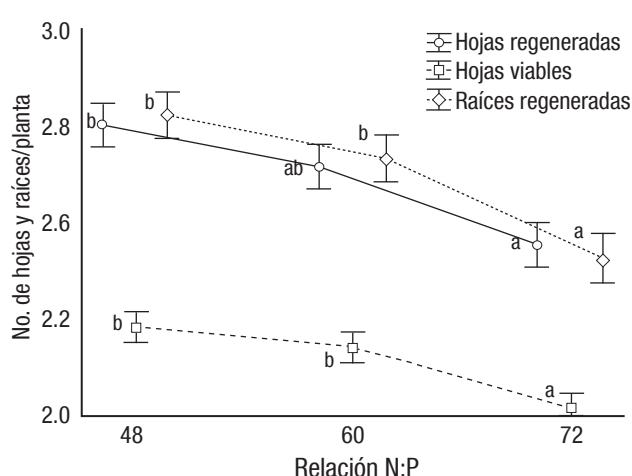


Figura 2. Declinación en la regeneración de hojas y raíces y viabilidad de hojas en plantas de *Vallisneria americana* con incremento en la relación N:P (48 a 72). Efecto covariado en el número de plantas. Líneas verticales = intervalo de confianza. Literales diferentes = diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).  $n = 10 - 15$

## DISCUSIÓN

Los estudios que han analizado el efecto del enriquecimiento de nutrientes, en particular de N, sobre las angiospermas sumergidas no han sugerido un patrón general de estrés a escala geográfica (Leoni et al., 2008). Para discernir el estrés de *V. americana* por el incremento de la relación N:P (N-NO<sub>3</sub> y P-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) del enriquecimiento de nutrientes se evaluaron, en experimentos no destructivos a microescala, sus efectos directos e interactivos en la regeneración y la senescencia foliar y radical de plantas juveniles. En contraste a muchos experimentos realizados en el género *Vallisneria* se descartaron efectos puntuales de N-NH<sub>4</sub> y el dual con N-NO<sub>3</sub> (Wang et al., 2008b; Dou et al., 2013; Wang et al., 2012). También se excluyó el efecto de la variación N:P con limitación de N. Lo anterior con base en los registros de limitación de P en el hábitat limnético (Sterner, 2008; Raven, 2012) y a estudios que han indicado que la mineralización de N es más rápida que la mineralización de P en zonas tropicales (Sardans & Peñuelas, 2012). La influencia de epífitas quedó descartada incluso en condiciones que presentaron relaciones de N:P cercanas a la de Redfield (N<sub>16</sub>P). *Vallisneria americana* fue muy sensible a los cambios en la relación de N:P en ciertos umbrales críticos de concentración de nutrientes en la columna de agua,

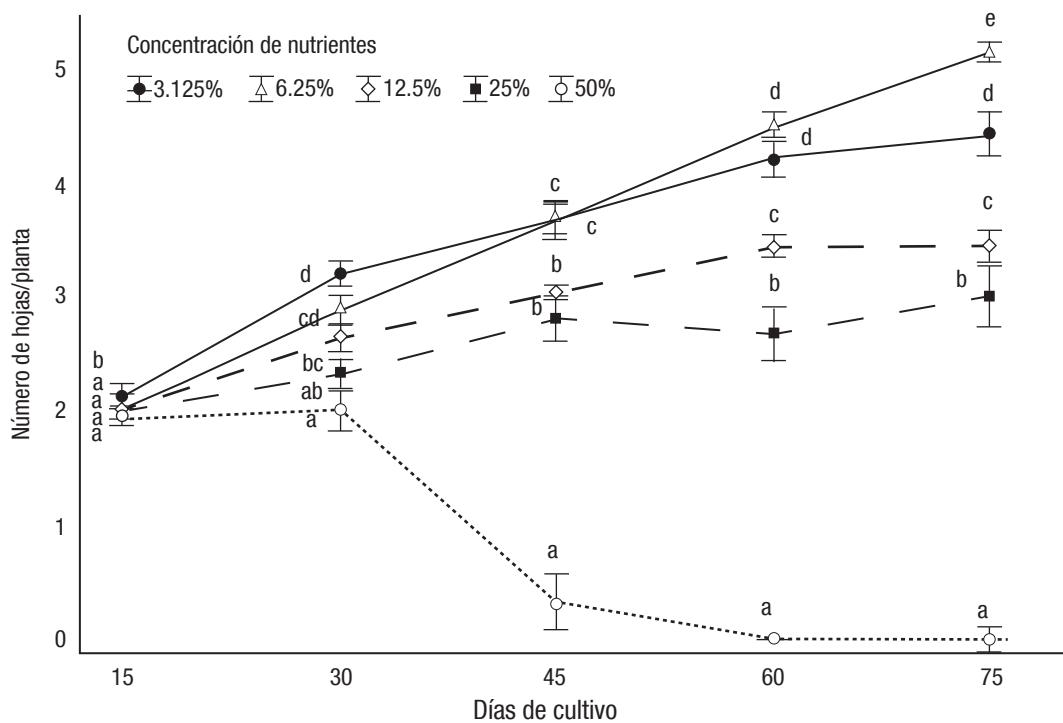


Figura 3. Cambios en la regeneración de hojas de *Vallisneria americana* en orden creciente de concentración de nutrientes durante 75 días en cultivo bifásico. Promedios acumulados en la relación N:P de 48 a 72. Líneas verticales = intervalo de confianza. Literales diferentes = diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).  $n = 5 - 10$ .

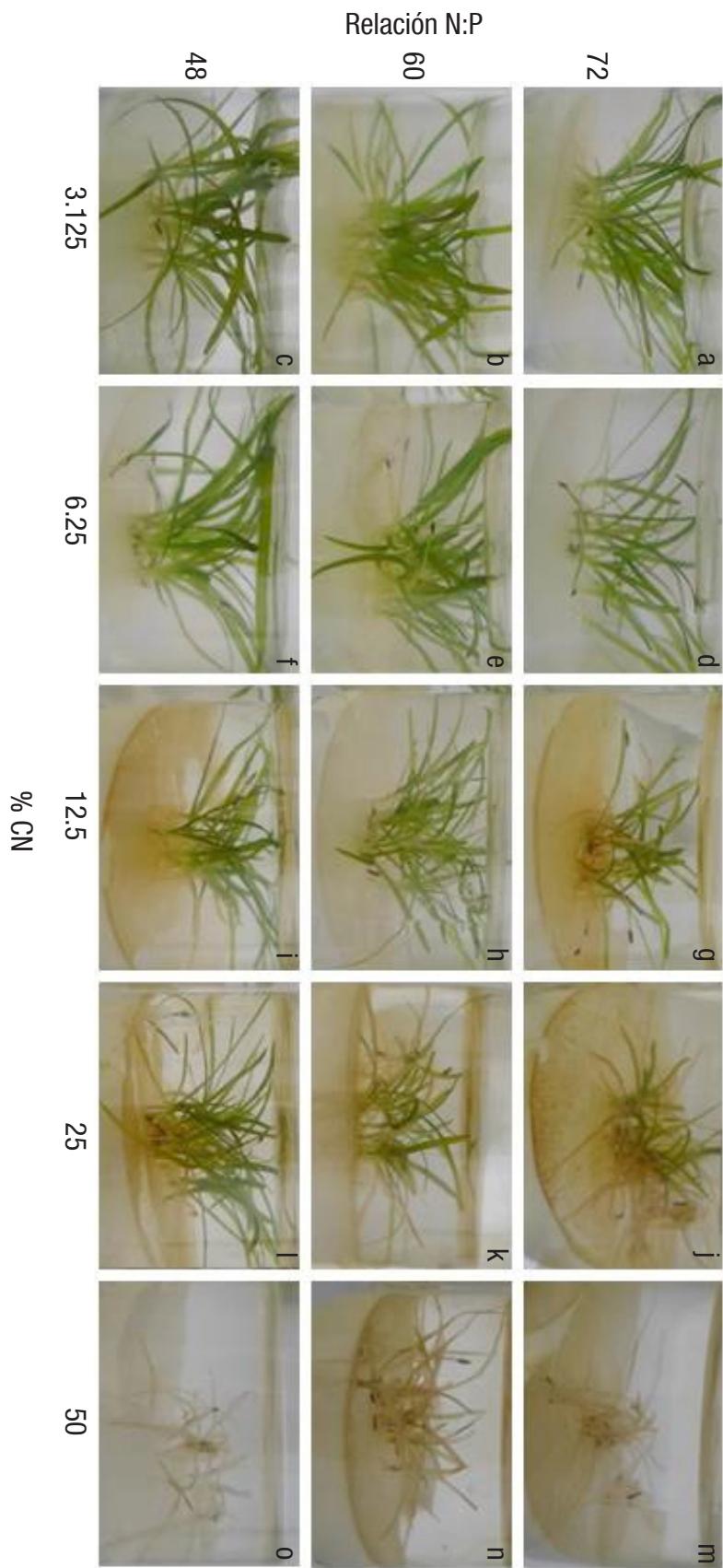
mantenida la relación C:P equilibrada con la de N:P. Además, presentó mecanismos de estrés diferenciados entre el incremento de la relación N:P y la concentración total de nutrientes, por lo que la hipótesis sometida a contrastación fue válida a microescala *in vitro* en las condiciones del presente estudio. La resistencia al estrés fue explícita en el segundo régimen nutricional con el incremento de la relación de N:P; en específico, el coeficiente de 72 mostró efecto negativo y potencializado.

Esta resistencia puede ser interpretada con base en la estequiometría del metabolismo C:N:P. En las etapas de crecimiento y desarrollo, las plantas son muy dependientes de la interacción C:N. La fotosíntesis proporciona la energía y los esqueletos de C para la síntesis de aminoácidos (Jiang *et al.*, 2013); sin embargo el suministro de N en exceso afecta la capacidad de fijar carbono, y en consecuencia disminuye la provisión de fuerza reductora y ATP para culminar el proceso de asimilación de N. Adicionalmente, el P en condición de nutriente limitante restringe la síntesis del ARN ribosomal y de las proteínas (Raven, 2013). Es decir, en la síntesis de ARN ribosomal hay mayor demanda de moléculas de P que de N. De acuerdo a Raven (2012) y Veneklaas *et al.* (2012), una demanda metabólica de ARN ribosomal de tal magnitud es inadmisible, excepto en los productores primarios que cuentan con suficiente número de ribosomas para mantener una velocidad de síntesis de proteínas y más de la mitad de P libre para sintetizar ARN (hipótesis de la velocidad de crecimiento). También se ha señalado que la posibilidad de disminuir la asignación de ARN sin disminuir la tasa de crecimiento, es un proceso metabólico muy exigente (Raven, 2012), a menos que los organismos que crecen con limitación de P manifiesten sobreregulación de ARN, o que en la etapa de crecimiento el

reparto espacial y temporal de P sea muy eficiente para satisfacer los requerimientos de ARN y mantener constante la velocidad síntesis de proteínas (Raven, 2012).

Comparativamente, los resultados mostraron que la declinación en capacidad regenerativa y viabilidad de las plantas de *V. americana* fue menos drástica en función de la relación N:P que por la concentración de nutrientes. Resultó excluida la concentración de 3 % (0.33 a 0.26 g L<sup>-1</sup>) que mostró un ritmo en regeneración y viabilidad de hojas y raíces en constante aumento durante el periodo experimental. Con base en el marcador unitario de regeneración de hojas y sus correlaciones con regeneración de raíces y viabilidad foliar, se determinó que *V. americana* presentó más resistencia al estrés salino en concentración de nutrientes de 0.66 a 0.51 g L<sup>-1</sup>, que fue la segunda en el gradiente (6.25%). En contraste, la resistencia fue mínima en concentración de nutrientes moderada y baja (2.65 a 1.03 g L<sup>-1</sup>). En las concentraciones elevadas la planta completa presentó en breve tiempo (30 días) estrés letal. Estos resultados con la relación N:P del segundo régimen nutricional concuerdan con la vulnerabilidad del ecosistema limnético con pequeños cambios en la carga de nutrientes (Kennish & Paerl, 2010) y con estudios que han indicado la limitada tolerancia de *V. americana* al estrés salino (Benson *et al.*, 2008). También explica la causa por la cual muchas macrófitas de aguas limnéticas no se ajustan a esquemas convencionales de cultivo *in vitro* (García-Jiménez *et al.*, 2006; Ruiz-Carrera & Sánchez, 2008; Ruiz-Carrera & Sánchez, 2012).

En conclusión, el mecanismo de estrés por la relación N:P con N-NO<sub>3</sub> fue interpretado por el desbalance metabólico de proteínas:



Figuras 4a-o. Viabilidad de hojas y raíz de *Vallisneria americana* a los 60 días de cultivo con incremento en la relación N:P en función de la concentración de nutrientes (CN).

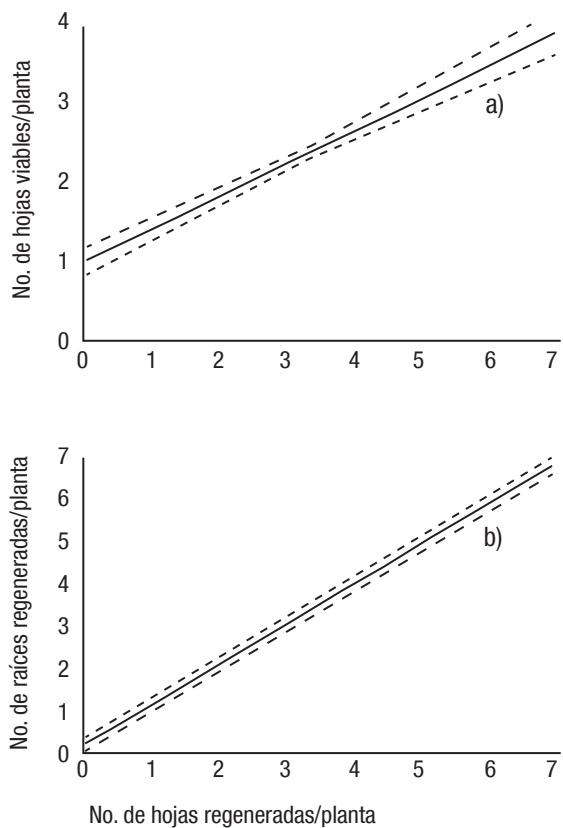


Figura 5. Correlación entre hojas viables y hojas regeneradas (a) y entre raíces y hojas regeneradas (b) de *Vallisneria americana*. n= 10 - 15.

ARN, sin haber presentado variación en tiempo. Por el contrario, el mecanismo de estrés con exceso de nutrientes fue osmótico y rápido. El mecanismo osmótico presentó similitud en la senescencia foliar y la elongación de las raíces provocada por la salinidad en diferentes plantas terrestres (Munns & Tester, 2008). Sin embargo, la identificación de circunnutación de raíces y las correlaciones efectivas entre regeneración de hojas y raíces y entre regeneración y viabilidad de hojas, mostraron valor agregado para mejorar la comprensión del estrés abiótico por eutrofización, tanto *in vitro* como de campo en el ecotipo focal. La circunnutación de raíces en las angiospermas sumergidas no ha sido destacada en otros estudios (Kosuge *et al.*, 2013).

Una perspectiva experimental de mayor nivel para la interpretación fina de ambos mecanismos de estrés, requiere técnicas modernas de proteómica, metabolómica y fenómica en asociación con las técnicas *in vitro*. El enriquecimiento de N analizado con estequiometría N:P a microescala *in vitro*, indicó que en la angiosperma sumergida, *V. americana* la resistencia al estrés estuvo vinculada a cargas bajas de nutrientes, con la fuente N oxidada en la columna de agua. La comprensión de estos conocimientos en *V. americana* requieren ser acoplados a las estrategias de rehabilitación de los ecosistemas que tienden a la eutrofización para mantener los beneficios de soporte, provisión y regulación de las lagunas limnéticas, como es el agua para beber, la cosecha de peces, varios bienes de mercado y los servicios recreacionales asociados.

## REFERENCIAS

- BENSON, E. R., J. M. O'NEIL & W. C. DENNISON. 2008. Using the aquatic macrophyte *Vallisneria americana* (wild celery) as a nutrient bioindicator. *Hydrobiologia* 596: 187-196.
- BURKHOLDER, J. M., D. A. TOMASKO & B. M. TOUCHETTE. 2007. Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* 350 (1-2): 46-72.
- CAI, X. L., G. GAO, X. M. TANG, J. Y. DAI & D. CHEN. 2012. Photosynthetic response of *Vallisneria natans* (Lour.) Hara (Hydrocharitaceae) to increasing nutrient loadings. *Photosynthetica* 50 (3): 437-446.
- CAO, T., P. XIE, L. NI, A. WU, M. ZHANG, S. WU & A. J. P. SMOLDERS. 2007. The role of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in the decline of the submersed macrophyte *Vallisneria natans* in lakes of the Yangtze River basin, China. *Marine and Freshwater Research* 58 (6): 581-587.
- CAO, T., P. XIE, Z. LI, L. NI, M. ZHANG & J. XU. 2009. Physiological stress of high NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration in water column on the submersed macrophyte *Vallisneria natans* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82 (3): 296-299.
- CAO, T., NI, L., XIE, P., XU, J., & M. ZHANG. 2011. Effects of moderate ammonium enrichment on three submersed macrophytes under contrasting light availability. *Freshwater Biology* 56 (8): 1620-1629.
- CHEN N., B. PENG, H. HONG, N. TURYAHEEBWA, S. CUI & X. MO. 2013. Nutrient enrichment and N:P relation decline in a coastal bay-river system in southeast China: The need for a dual nutrient (N and P) management strategy. *Ocean and Coastal Management* 81: 7-13.
- CARLSON, R. E. 1977. A trophic state index for lakes. *Limnology and Oceanography*. 22 (2): 361-369.
- DE LA LANZA-ESPINO, G., F. J. FLORES-VERDUGO, S. HERNÁNDEZ-PULIDO & I. PENÉ-RODRÍGUEZ. 2011. Concentration of nutrients and C:N:P ratios in surface sediments of a tropical coastal lagoon complex affected by agricultural runoff. *Universidad y Ciencia* 27 (2): 145-155.
- DODDS, W. K. & M. R. WHILES. 2010. *Freshwater ecology: concepts and environmental applications*. Academic Press, London. 821 p.
- DOKULIL, M. T. & K. TEUBNER. 2011. Eutrophication and climate change: present situation and future scenarios. In: Ansari, A.A., S. Singh Gill, G.R. Lanza, W. Rast. (Eds.). *Eutrophication: causes, consequences and control*. Springer, Dordrecht. pp. 1-16.
- DOU, Y., B. WANG, L. CHEN & D. YIN. 2013. Alleviating versus stimulating effects of bicarbonate on the growth of *Vallisneria natans* under ammonia stress. *Environmental Science and Pollution Research* 20 (8): 5281-5288.
- EATON, A. D., L. S. CLESCERI & A. E. GREENBERG. 2000. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th Ed. American Public Health Association (APHA). Maryland. Joint Editorial Board, Washington DC 139 p.
- ELSER, J. J., W. F. FAGAN, A. J. KERKHOFF, N. G. SWENSON & B. J. ENQUIST. 2010. Biological stoichiometry of plant production: metabolism, scaling and ecological response to global change. *New Phytologist* 186 (3): 593-608.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, P., E. P. NAVARRO, C. H. SANTANA, A. LUQUE & R. R. ROBAINA. 2006. Anatomical and nutritional requirements for induction and

- sustained growth *in vitro* of *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Aquatic Botany* 84 (1): 79-84.
- JIANG, Z., X. HUANG & J. ZHANG. 2013. Effect of nitrate enrichment and salinity reduction on the seagrass *Thalassia hemprichii* previously grown in low light. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 443: 114-22.
- KENNISH, M. J., & H. W. PAERL. 2010. Coastal Lagoons: Critical habitats of environmental change. In: Kennish, M.J., & H. W. Paerl (Eds.). *Coastal lagoons: critical habitats of environmental change*. CRC Press. New York. pp 1–6.
- KOSUGE, K., S. IIDA, K. KATOU & T. MIMURA. 2013. Circumnutation on the water surface:female flowers of *Vallisneria*. *Scientific Reports* 3: 1133.
- LEONI V., A. VELA, V. PASQUALINI, C. PERGENT-MARTINI & G. PERGENT. 2008. Effects of experimental reduction of light and nutrient enrichments (N and P) on seagrasses: a review. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 202- 220.
- LI, W., Z. ZHANG & E. JEPPESEN. 2008. The response of *Vallisneria spinulosa* (hydrocharitaceae) to different loadings of ammonia and nitrate at moderate phosphorus concentration: A mesocosm approach. *Freshwater Biology* 53 (11): 2321-2330.
- MARION, S.R. & R.J. ORTH. 2010. Innovative techniques for large-scale seagrass restoration using *Zostera marina* (eelgrass) seeds. *Restoration Ecology* 18 (4): 514-526.
- MINDEN, V. & M. KLEYER. 2014. Internal and external regulation of plant organ stoichiometry. *Plant Biology*. 16 :897–907.
- MUNNS, R. & M. TESTER. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 651-681.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473-497.
- MURATA, N., S. TAKAHASHI, Y. NISHIYAMA & S.I. ALLAKHVERDIEV. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1767(6): 414-421.
- PÉREZ-CLEMENTE, R.M. & A. GÓMEZ-CADENAS. 2012. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. In: Recents advances implant *in vitro* culture. In: *Recent Advances in plant in vitro culture*. Leva, A., M. Laura & R. Rinaldi (Eds.). Intech Open Access Publisher. pp. 91-108
- QUAN, T. M. & P. G. FALKOWSKI. 2009. Redox control of N: P ratios in aquatic ecosystems. *Geobiology* 7 (2): 124-139.
- RAVEN, J. A. 2012. Protein turnover and plant RNA and phosphorus requirements in relation to nitrogen fixation. *Plant Science* 188: 25-35.
- RAVEN, J. A. 2013. RNA function and phosphorus use by photosynthetic organisms. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–13.
- ROMERO, J., K. S. LEE, M. PÉREZ, M. A. MATEO & T. ALCOVERRO. 2006. Nutrient dynamics in seagrass ecosystems. In: Larkum, W.D., R.J. Orth & C.M. Duarte (Eds.). *Seagrasses: Biology, ecology and conservation*. Springer, Dordrecht. pp. 227-254.
- RUIZ-CARRERA, V. & A. J. SÁNCHEZ. 2008. Desarrollo de un modelo de cultivo *in vitro* para *Vallisneria americana* Michx. *Universidad y Ciencia* 24 (3): 205-218.
- RUIZ-CARRERA, V. & A. J. SÁNCHEZ. 2012. Estrategias experimentales y repoblación de angiospermas sumergidas en un humedal fluvial en la zona costera del sureste de México. In: *Recursos Acuáticos Costeros del Sureste: Tendencias actuales en investigación y estado del arte II*. Consejo de Ciencia, Innovación y Tecnología del Estado de Yucatán.
- SÁNCHEZ, A. J., R. FLORIDO, M. A. SALCEDO, V. RUIZ-CARRERA, H. MONTALVO-URGEL, A. RAZ-GUZMAN. 2012. Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. in a tropical wetland, southern Gulf of Mexico. In: Mhamane, A. (Ed.). *Diversity of Ecosystems*. InTech. Zagreb, Croatia. pp. 1-26.
- SARDANS, J., A. RIVAS-UBACH & J. PEÑUELAS. 2012. The elemental stoichiometry of aquatic and terrestrial ecosystems and its relationships with organismic lifestyle and ecosystem structure and function: a review and perspectives. *Biogeochemistry* 111 (1-3): 1-39.
- SARDANS, J. & J. PEÑUELAS. 2012. The role of plants in the effects of global change on nutrient availability and stoichiometry in the plant-soil system. *Plant physiology* 160 (4): 1741-1761.
- SELMAN, M. & S. GREENHALGH. 2009 Eutrophication: Policies, Actions, and Strategies to Address Nutrient Pollution. WRI Policy Note Water Quality: Eutrophication and Hypoxia 3. 16 p. Available online at: [www.wri.org/publications](http://www.wri.org/publications).
- SISTLA, S. A. & J. P. SCHIMEL. 2012. Stoichiometric flexibility as a regulator of carbon and nutrient cycling in terrestrial ecosystems under change. *New Phytologist* 196 (1): 68-78.
- VENEKLAAS, E. J., H. LAMBERS, J. BRAGG, P. M. FINNEGAR, C.E. LOVELOCK, W. C. PLAXTON & J. A. RAVEN. 2012. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist* 195 (2): 306-320.
- WANG, P. F., C. WANG, X. R. WANG, J. HOU & O. H. ZHANG. 2008a. The effect of hydrodynamics on nitrogen accumulation and physiological characteristics of *Vallisneria spiralis* L. in eutrophicated water. *African Journal of Biotechnology* 7 (14): 2424-2433.
- WANG, C., S. H. ZHANG, P. F. WANG, J. HOU, W. LI & W. J. ZHANG. 2008b. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria natans* (Lour.) Hara. *Aquatic Toxicology* 87 (2): 88-98.
- WANG, Y., G. GAO, B. QIN & X. WANG. 2012 . Ecophysiological and anatomical responses of *Vallisneria natans* to nitrogen and phosphorus enrichment. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* (405): 05.
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*, 4th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 662 pp.
- ZHU, Z., H. YUAN, Y. WEI, P. LI, P. ZHANG & D. XIE. 2014. Effects of ammonia nitrogen and sediment nutrient on growth of the submerged plant *Vallisneria natans*. *CLEAN-Soil, Air, Water*. 42 (9999): 1–7.

**Recibido:** 07 de julio de 2014.

**Aceptado:** 06 de noviembre de 2015.