Rev. Int. Contam. Ambie. 38 (Ambiente y Bioenergía), 11-21, 2022
https://doi.org/10.20937/RICA.54244

DETECCIÓN UV-VIS DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE *Vallisneria americana*

Uv-vis detection of sexual differentiation markers in hydroethanolic extracts of *Vallisneria americana*

María Concepción JIMÉNEZ-PÉREZ[1], Jesús BAUTISTA-REGIL[1], Guadalupe HERNÁNDEZ-PIEDRA[1], Marcela GAMBOA-ANGULO[2], Alberto de Jesús SÁNCHEZ[1] y Violeta RUIZ-CARRERA[1]*

[1] 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, entronque a Bosques de Saloya, 86150 Villahermosa Tabasco, México.
[2] Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 núm. 130 por 32 y 30, Chuburná de Hidalgo, 97205 Mérida, Yucatán, México.

*Autor para correspondencia: ruizvrc@gmail.com

(Recibido: enero 2021; aceptado: mayo 2021)

Palabras clave: angiosperma dioica, restauración, pigmentos sexuales, espectrofotometría UV-Vis

RESUMEN

La sexualidad de las macrófitas dioicas sumergidas adquiere importancia para fortalecer investigaciones sobre estrés ambiental y repoblación de ecosistemas acuáticos. El objetivo de este trabajo fue determinar biomarcadores que permitan la identificación sexual de *Vallisneria americana* mediante el análisis por espectrofotometría de los extractos hidroetanólicos de sus hojas o raíces. Dentro de la columna de agua de la vegetación femenina y masculina se midieron in situ los parámetros de pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, sólidos disueltos y potencial redox. Por cada morfotipo reproductivo se analizaron el número de hojas y la longitud de la hoja predominante y raíz principal en cada planta. El escaneado espectral de los extractos en el rango de 340 a 750 nm se usó tanto para comparar las longitudes de onda dominantes de los metabolitos presentes como para cuantificar clorofilas (a y b), carotenoides y antocianinas monoméricas. También se obtuvo el cociente de clorofilas. Los biomarcadores de sexualidad de esta macrófita sumergida se pueden relacionar por el contenido de los cuatro pigmentos en las hojas que fueron invariablemente altos en masculinos, mientras que las características físicas y químicas del agua y la morfología vegetativa de cada sexo fueron casi similares. Una posible influencia microalgal es descrita por la relación inversa de clorofilas en raíces y el hallazgo de ficobilinas en hojas masculinas. Los resultados ofrecen un potencial para las aplicaciones ecológicas y biotecnológicas de *V. americana* orientadas a la repoblación de humedales afectados por factores abióticos y bióticos.

Key words: dioecious angiosperm, restoration, sex pigments, UV-Vis spectrophotometry

ABSTRACT

The sexuality of submerged dioecious macrophytes acquires importance to strengthen research on environmental stress and repopulation of aquatic ecosystems. The objective of this work was to determine biomarkers that allow the sexual identification of *Vallisneria americana* by spectrophotometry analysis of the hydroethanolic extracts of its leaves or roots. Within the water column of the male and female vegetation, the parameters of pH, temperature, dissolved oxygen, conductivity, dissolved solids, and redox potential were measured *in situ*. For each reproductive morphotype, the number of leaves and the length of the predominant leaf and main root in each plant were analyzed. Spectral scanning of the extracts in the range of 340 to 750 nm was used both to compare the dominant wavelengths of the metabolites present and to quantify chlorophylls (a and b), carotenoids, and monomeric anthocyanins. The chlorophyll quotient was also obtained. The biomarkers of sexuality of this submerged macrophyte can be related to the content of the four pigments in the leaves that were invariably high in males, whereas the physics and chemistry of water and the vegetative morphology of each sex were almost similar. A possible microalgal influence is described by the inverse relationship of chlorophylls in roots and the finding of phycobilins in male leaves. The results offer the potential for ecological and biotechnological applications of *V. americana* aimed at the repopulation of wetlands affected by abiotic and biotic factors.

INTRODUCCIÓN

Vallisneria americana (Hydrocharitaceae) es una angiosperma sumergida perenne y dioica, con flores pistiladas en pedúnculo espiralado y estaminadas en pedúnculo corto, hojas acintadas de color verde o rojizas, abundante raíz fibrosa y estolones horizontales que le permiten colonizar ecosistemas acuáticos (Mcfarland 2006, Tootoonchi et al. 2019). La vegetación sumergida enraizada juega un papel ecológico importante en ecosistemas sostenibles, dado que participa en los procesos biogeoquímicos de los nutrientes y funciona como productor primario y hábitat de una gran cantidad de microflora y fauna acuática (Dhote y Dixit 2009, Rejmankova 2011, Sánchez et al. 2012, Torres-Martínez et al. 2017, Reitsema et al. 2018). Por lo tanto, en la época actual de alteraciones ambientales, como la eutrofización y el cambio climático, resulta crucial resolver la pérdida drástica de *V. americana* en las reservas naturales de agua para la biodiversidad, sociedad y economía (Reitsema et al. 2018, Zhou et al. 2019, Ruiz-Carrera et al. 2021), toda vez que la eutrofización reduce la calidad del agua, induce la floración de cianobacterias y disminuye la biodiversidad, en perjuicio de la reproducción sexual y asexual que beneficia la dispersión y colonización de la especie (Sanchini y Grosjean 2020).

En ontogenia, los procesos morfofisiológicos relacionados con el sexo de plantas dioicas difieren en respuesta a factores ambientales estresantes (Hoffmann et al. 2014, Timerman y Barrett 2019, Zhou et al. 2019). 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-López et al. 2014, Timerman y Barret 2019). En reciprocidad, las femeninas muestran mayor biomasa y perduran más tiempo durante la reproducción debido a la producción de semillas y frutos. 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-Bosch 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 (CLa, CLb) y flavonoides (FLV) durante la floración (Timerman y Barret 2019). Lo anterior destaca la importancia de realizar estas comparaciones sexuales en especies sumergidas dioicas. En congruencia con la hipótesis de dimorfismo sexual, que vincula a la variabilidad morfológica de cada género con el entorno ambiental, 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 (Efremov 2016). Además, porque dichas especies experimentan plasticidad adaptativa durante el crecimiento vegetativo y reproductivo como resultado de transiciones ambientales espacio-temporales del ecosistema (Zhou

et al. 2019). A esto se suman la condición sumergida permanente de las estructuras vegetales reproductivas y vegetativas y los mecanismos fisiológicos alternativos que permiten enfrentar el estrés. Por ejemplo, estas plantas adquieren nutrientes a través de hojas y raíces y toleran la hipoxia estricta y anoxia a largo plazo y el posterior estrés reoxidativo (Mcfarland 2006, Tootoonchi et al. 2019, Nakamura y Noguchi, 2020).

El dimorfismo sexual de las plantas dioicas sumergidas adquiere relevancia en los experimentos enfocados a repoblar y estabilizar los ecosistemas acuáticos vulnerados, ya que el suministro de germoplasma proveniente de plantas ex situ en crecimiento vegetativo, a menudo soslaya el sexo (Rezek et al., 2019). Asimismo, es difícil reconocer al individuo masculino y femenino para atender las acciones encaminadas a biotecnologías in vitro y evaluaciones de estrés abiótico de plantas sumergidas dioicas.

Para cualquier finalidad, el enfoque es integrar los rasgos cualitativos y cuantitativos del fenotipo en estado reproductivo o vegetativo con estudios bioquímicos de metabolitos secundarios (Al-Obaidi et al. 2017, Li et al. 2019, Timerman y Barret 2019). De los análisis realizados destaca el escaneado espectrofotométrico UV-Vis de extractos vegetales aplicado a clorofilas, carotenoides (CAR), FLV (flavanos, flavononas, flavonoles, flavonas y antocianidinas) y ácidos fenólicos (ACF) (Martínez et al. 2017, Tomazzoli et al. 2015, Paula et al. 2017). Los FLV son metabolitos fenólicos mono, oligo y poliméricos que exhiben bioactividades involucradas en la defensa química y reproducción (Kumar y Pandey 2013) y conforman los pigmentos vacuolares de color rojo, púrpura o azul, como las antocianinas (ANT), que son glucósidos de antocianidininas acumulados en las células de órganos vegetativos (brote, raíz y hojas) y reproductivos (Lee y Gould 2002). Específicamente, los FLV y ANT participan en las funciones de reproducción y resistencia contra el estrés osmótico, por temperatura, fotooxidación y toxinas, factores involucrados en la declinación de vegetación sumergida (Chalker-Scott 1999).

En paralelo con la amenaza de la eutrofización y el cambio climático sobre plantas dioicas y la oportunidad de aportar métodos prácticos que identifiquen la sexualidad de una especie de interés local, se plantea la hipótesis de que los metabolitos pigmentarios revelan diferencias de género en hojas o raíces, siendo sobresalientes las concentraciones de las hojas femeninas. En este estudio se determinaron biomarcadores que permitan la diferenciación sexual en los extractos hidroetanólicos de hojas o raíces femeninas y masculinas de *V. americana* mediante el análisis UV-Vis, con énfasis en la cantidad de los pigmentos clorofílicos y antocianinas. Para comprender aún más la diferenciación sexual se analizan características físicas y químicas del agua entre las poblaciones y algunos rasgos morfológicos de cada género.

La definición sexual de esta macrófita sumergida ecológicamente valiosa representa, en términos analíticos, un punto de partida para suministrar el germoplasma apropiado para repoblar, biomonitorear y rehabilitar humedales en las áreas biogeográficas donde la especie se encuentre afectada por estrés antrópico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis fisicoquímico del hábitat de *Vallisneria americana*

Las poblaciones de *V. americana* se localizaron en estado de floración en la Laguna Santa Anita (18° 22’ 59.21” LN, 92° 54’ 8.03” LO) ubicada en la cuenca baja de la región hidrológica Grijalva-Usumacinta, cerca del Golfo de México. Las plantas masculinas se recolectaron en profundidades aproximadas a 1.70 m y las femeninas a 0.5 m, cercanas al borde de la laguna. A menor profundidad se observó contaminación orgánica debida a la intensa actividad pesquera en la laguna que causa la resuspensión de los sedimentos y afecta tanto a las plantas como a epífitas.

Entre la vegetación femenina y masculina se midieron a media columna del agua cinco repeticiones de pH, temperatura (T, ^{o}C), oxígeno disuelto (OD, %), conductividad eléctrica (CE, µS/cm), sólidos totales disueltos (STD, ppt) y potencial redox (ORP, mV) con un equipo multiparamétrico (Hanna HI9828).

Las plantas separadas por género se trasladaron en recipientes con agua de la laguna a temperatura ambiente y finalmente se lavaron en el laboratorio con abundante agua. Las mediciones morfométricas sobre las plantas frescas fueron el número de hojas, la longitud de la hoja más larga y la longitud de la raíz principal (n = 5 plantas x 3 repeticiones). Los especímenes femeninos y masculinos se depositaron en el Herbario José N. Rovirosa (Folio 36532).

Preparación de extractos hidroetanólicos

Primero, las plantas se cortaron con una tijera en la base caulinar para separar hojas y raíces. El agua superficial de las muestras se retiró con papel adsorbente. Las muestras se congelaron a –80 °C (ultracongelador modelo UF V 500), se liofilizaron a –40 °C, 133 KPa (Labconco 6 L) y permanecieron resguardadas en un desecador.

La fragmentación de las muestras liofilizadas se realizó en un mortero de porcelana (10 mL) maceradas con etanol al 80%, a una relación 5 mg/mL y temperatura ambiente (Sun et al. 2015, Tomazzoli et al. 2015, Paula et al. 2017). Brevemente, las muestras se extrajeron con la mitad del volumen de disolvente durante 1 min, enseguida el contenido del mortero se pasó al tubo de vidrio y se agregaron al mortero dos porciones del disolvente para transferir exhaustivamente el residuo restante. Los extractos hidroetanólicos de hojas femeninas (EHF), masculinas (EHM) y de raíces femeninas (ERF) y masculinas (ERM) obtenidos se colocaron en un sonicador por 5 min y enseguida se centrifugaron en tubo Eppendorf (2 mL) a 3000 rpm por 15 min a 4 ºC (Hermle Labotchnik, Z326K). El líquido sobrenadante se refrigeró a –5 ºC durante 24 h previamente a los análisis. Los procedimientos durante la preparación del extracto se realizaron en oscuridad. De cada tipo de muestra se realizaron cinco repeticiones del procedimiento extractivo.

Análisis UV-Vis

El espectro UV-Vis de los extractos se analizó en un espectrofotómetro multipropósito (Shimadzu UV 1280) con ancho de banda de 5 nm y un rango fotométrico de –0.3 a +3. 0 absorbancias (A). El análisis espectral se realizó en celdas de poliestireno (1 cm) y la línea base se corrigió usando como solvente el medio de extracción. Los datos del perfil espectral Amax, λd y λmax se registraron desde 340 a 750 nm (n = 5), mientras que la concentración de los pigmentos fotosintéticos CLa A665, CLb A649 y CAR A470 (mg/g) se obtuvo usando los algoritmos de Chen et al. (2018) y sus contenidos se expresaron en peso seco. También en hojas y raíces se obtuvo la relación CLa/CLb. Además, en las hojas se calculó la composición relativa de las bandas espectrales desde 620 nm hasta 340 nm, donde la λd de 436 nm se utilizó de referencia.

Para analizar el contenido de ANT monoméricas se modificó el pH de los EHF y EHM con base en el método pH diferencial espectrofotométrico (Lee et al. 2005). Brevemente, alícuotas (1 mL) del extracto hidroetanólico se mezclaron con amortiguadores de KCl/HCl 0.025 M (pH 1.0, 4 mL) y CH_3COONa 0.4 M (pH 4.5, 4 mL), por separado. El contenido de ANT (mg/g) se expresó como equivalentes de cianidina-3-glucósido (Eq CI-3-GLU) en peso seco.

Análisis estadístico

La moda o el promedio se obtuvieron para expresar la frecuencia de λd de λmax. La prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de Cochran verificaron desvíos de la normalidad y homogeneidad de los datos. Con la prueba de Kruskal-Wallis se analizaron los contenidos de clorofilas, CAR y relación Cla/CLb de los extractos. La prueba Mann-Whitney se aplicó para analizar en las hojas la composición relativa de λd con frecuencias medias a altas y el contenido de ANT monoméricas. Por último, se analizaron los datos físicos y químicos y morfométricos con la prueba t de Student. Las diferencias se establecieron a $p < 0.5$ o $p < 0.1$. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica v. 8 (Stat Soft).

RESULTADOS

La laguna es limnética (CE = 408 ± 0.28 µS/cm) tropical (T = 32 ± 0.09 ºC). Las condiciones físicas y químicas promedio del agua en los sitios de la vegetación femenina y masculina fueron casi similares ($p < 0.05$) en los valores de pH (7.7 ± 0.001), OD (6.46 ± 0.18 mg/L), STD (2039 ± 4.2 mg/L) y ORP (13.65 ± 2.05 mV). Se registró una diferencia marginal de ORP de 0.5 mV entre la vegetación masculina y femenina ($p < 0.1$).

En cambio, la longitud de las raíces del género masculino fue significativamente mayor comparada con el femenino ($p < 0.05$) (**Fig. 1**). El perfil espectral y las λd registradas en los extractos masculinos y femeninos se diferenciaron entre hojas y raíces (**Fig. 2**). Las hojas presentaron una ventana espectral de cuatro bandas de λd de frecuencia media-alta y la raíz sólo presentó una banda (**Cuadro I**), estas bandas se relacionaron con la presencia de CLa, ficobilinas (FB), CAR, CLb o ANT. En el rango espectral analizado, las resoluciones registradas para FLV o ACF en los extractos foliares y CLb en raíces mostraron frecuencias bajas. Invariablemente, en las hojas se identificó a la CLa a 665 nm en la región roja y CLb a 436 nm en la región azul; respectivamente, en la raíz se detectó la CLa a 663 y 665 nm. Respecto a la composición relativa entre λd, el porcentaje de FB se triplicó ($p < 0.05$) en la hoja masculina en comparación con la femenina (**Fig. 3**) y por el porcentaje de ANT fueron similares los géneros (**Fig. 3**).

En correspondencia con la composición espectral, la cantidad de pigmentos fotosintéticos resultó mayor en masculinos y se midieron más pigmentos fotosintéticos en las hojas que en las raíces (**Fig. 4**). Considerando las diferencias sexuales de estos tres pigmentos en los extractos y la relación de CLa/CLb, el orden de descenso mostrado fue

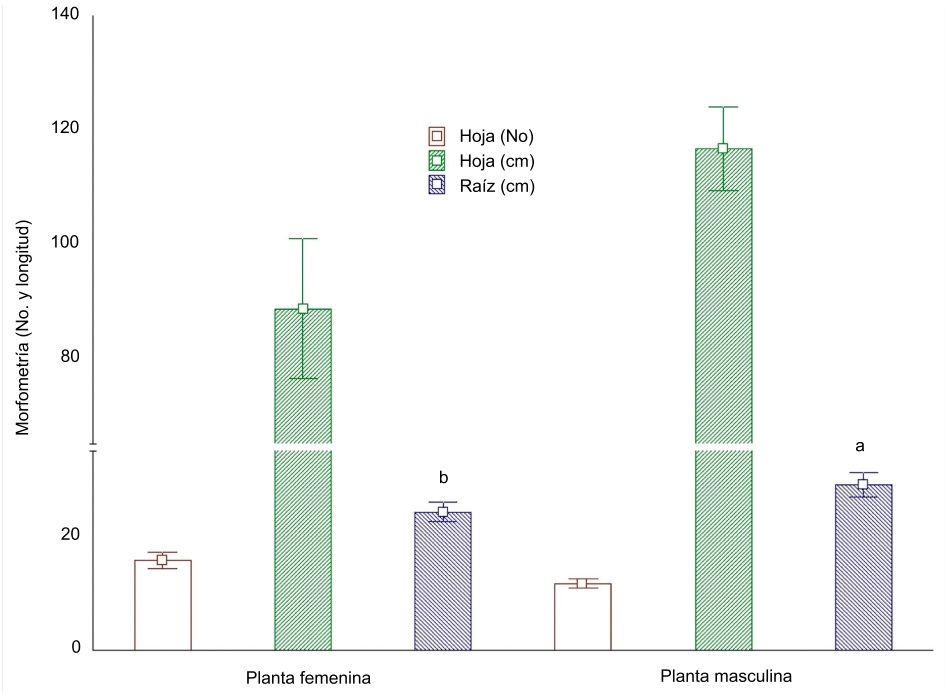

Fig. 1. Morfometría de hojas y raíces de las plantas femeninas y masculinas de *Vallisneria americana*. Valores promedio ± e. e. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.1$).

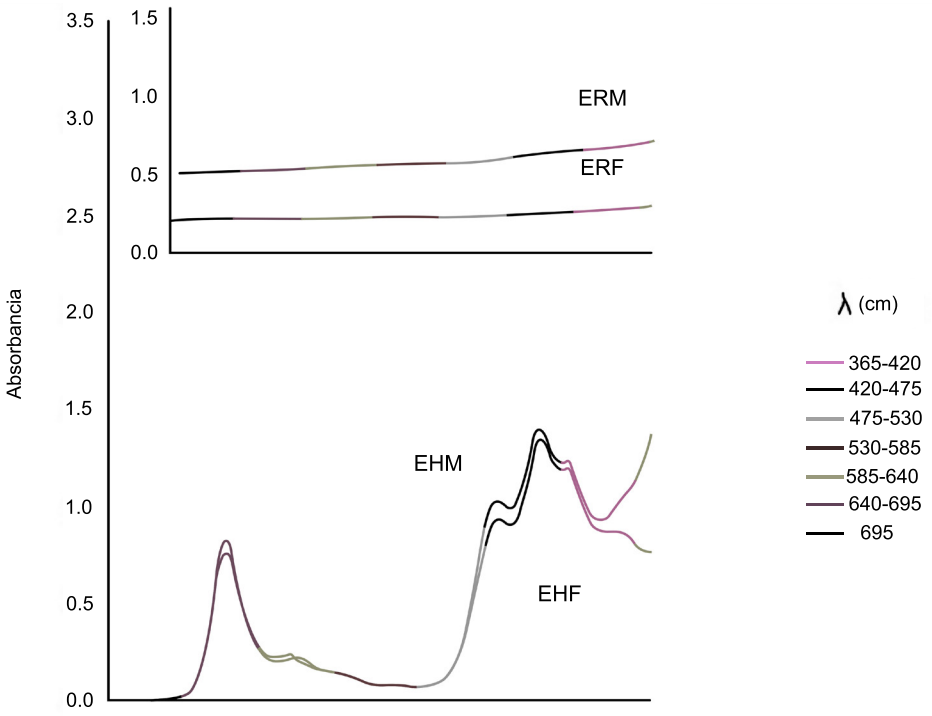

Fig. 2. Perfil espectral de extractos hidroetanólicos de *Vallisneria americana*. EHF y EHM, extracto de hojas femeninas y masculinas; ERF y ERM, extracto de raíces femeninas y masculinas. Los perfiles de los extractos que se muestran en la figura fueron seleccionados al azar.

CUADRO I. FRECUENCIA DE LONGITUDES DE ONDA DOMINANTES DE LOS EXTRACTOS HIDROETANÓLICOS DE HOJAS Y RAÍCES DE GÉNEROS FEMENINO Y MASCULINO.

Extracto	Género femenino		Género masculino		Identidad*
	λmax (nm)	Frecuencia (%)	λmax (nm)	Frecuencia (%)	
H	665	100	665	100	CLa
H	620	87	620	100	FB
H	540	73	541	85	ANT (Banda I)**
H	466	100	466	100	CAR
H	436	100	436	100	CLb
H	376	33	376	38	FLV o ACF
R	665	73	663	64	CLa
R	640	36	641	27	CLb

H, hojas; R, raíces; *Identidad obtenida por comparación de longitudes de onda reportadas en la literatura (Glazer 1994, Ritchie 2008, Kumar y Pandey 2013, Sun et al. 2015, Tomazzoli et al. 2015, Alencar y Nunes 2016, Paula et al. 2017); ** banda I del anillo B de la estructura básica (ion flavilio).

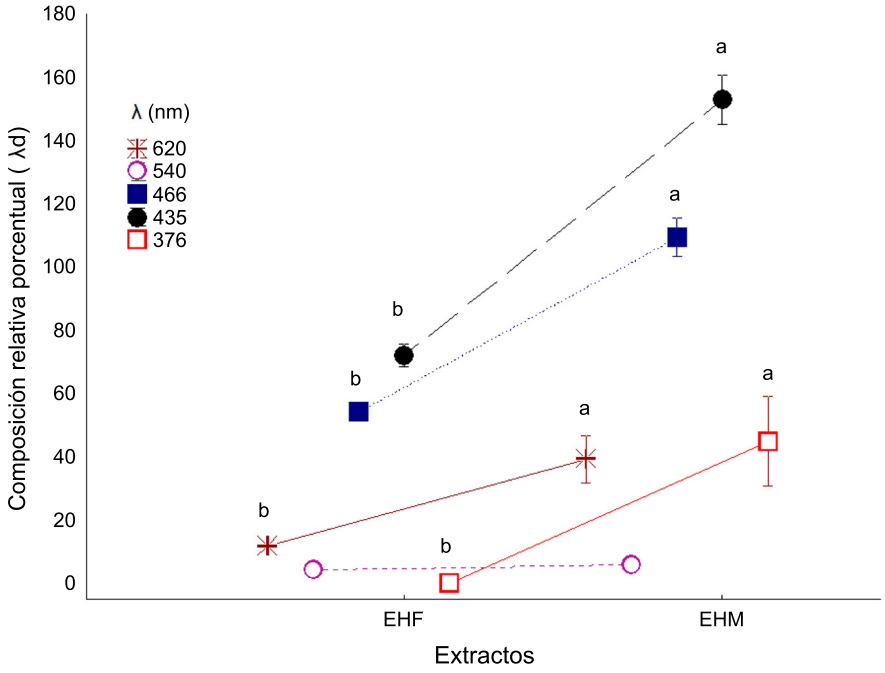

Fig. 3. Composición porcentual relativa entre absorbancias máximas de las longitudes de onda dominantes de los extractos hidroetanólicos foliares. EHF y EHM, extracto de hojas femeninas y masculinas. Valores promedio ± e. e. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.5$).

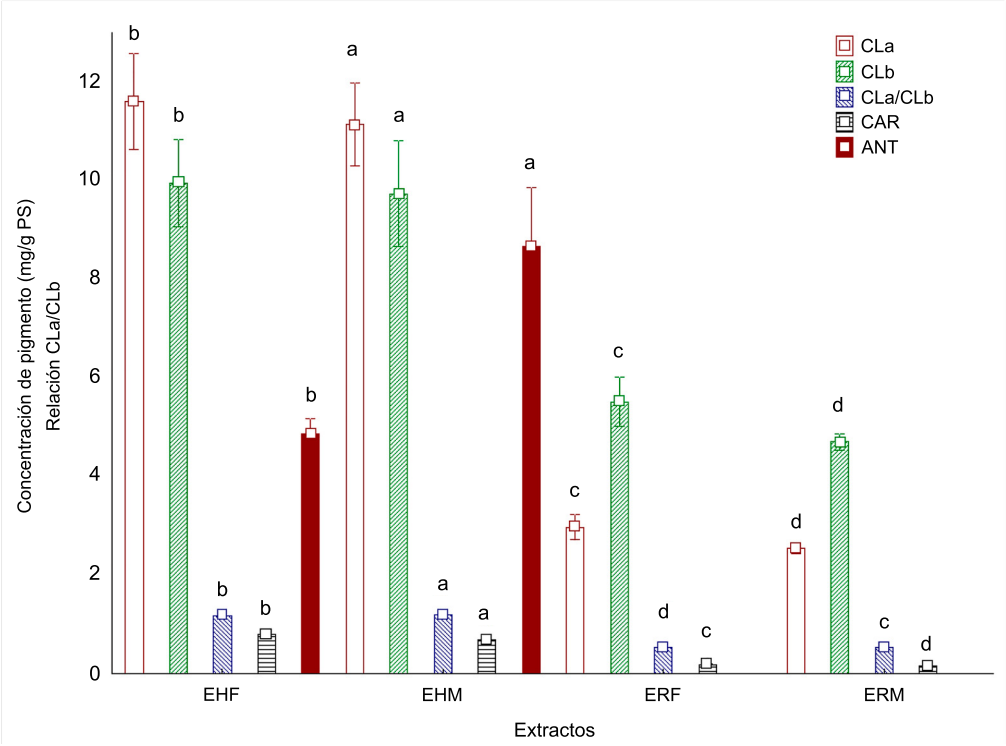

Fig. 4. Contenidos de clorofilas, carotenoides, antocianinas y relación de clorofilas en los extractos de hojas o raíces por género. Valores promedio ± e. e. Literales distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.5$).

EHM > EHF > ERF > ERM ($p < 0.05$). De manera particular se distinguieron las hojas masculinas con el doble de la concentración de ANT monoméricas en comparación con las femeninas.

DISCUSIÓN

Se esperaba que la detección de biomarcadores sexuales de la especie dioica sumergida *Vallisneria americana* evidenciara un contenido sobresaliente de metabolitos pigmentarios en las hojas femeninas. En contraste, fueron sobresalientes los contenidos de ANT, CLa, CLb, CAR de hojas masculinas. La hipótesis de partida se sustentó en la complejidad de la reproducción femenina que incluye elevada demanda de energía y tiempo para sostener la floración y producción de semillas (Kumar y Pandey 2013, Timerman y Barret 2019) y en que las hojas son el principal sitio de síntesis de muchos metabolitos secundarios que funcionan en los procesos de adaptación frente a los factores ambientales (Subhashini et al. 2013).

Adicionalmente, las hojas presentaron otras señales espectrales de λd atribuidas a la presencia de FB y ANT (Lichtenthaler y Buschmann 2001, Croft y Chen 2018). El mayor porcentaje de FB se suma a los datos cuantitativos que otorgan superioridad pigmentaria al género masculino, conforme a la **figura 3**, en tanto que la composición porcentual de las ANT a 540 nm fue similar entre géneros probablemente por el efecto de inestabilidad del ión flavilio en el sistema agua-etanol en ausencia de condiciones acidificadas (Kumar y Pandey 2013, Hurtado y Pérez 2014, Ma et al. 2018). Igualmente, es probable que las propiedades espectrales de ANT puedan cambiar por la composición de pigmentos en varios compartimentos intracelulares. Acertadamente, esta diferencia sexual se resolvió mediante la cuantificación de ANT monoméricas. Las FB son moléculas clorofílicas de importancia ecológica que se encuentran en las cianobacterias y algas de los géneros Rhodophyta y Cryptophyta (Lichtenthaler y Buschmann 2001). Usualmente, la ficocianina es la FB ligada covalentemente a proteínas cromóforas que reportan máximos de absorción en la región de 610-625 nm y una banda de Soret en el UV debido su unión con proteínas (Glazer 1994). Además de FB, las cianobacterias contienen también CLa y

diferentes pigmentos accesorios como CAR (Croft y Chen 2018), por lo tanto, un sesgo o superposición entre ambas bandas de absorción pudo ocurrir entre epífitas y *Vallisneria* (Adams et al. 2013, Lauceri et al. 2017). En este estudio, el hallazgo de FB adquiere importancia para reconocer a las comunidades de algas y bacterias ligadas a la sexualidad de *V. americana*, además de informar sobre sus efectos en la productividad acuática, estado redox, red alimentaria y condiciones de luz y temperatura de lagunas eutrofizadas (Sanchini y Grosjean 2020).

Colateralmente, la presencia de clorofilas en las raíces sugiere otra posible simbiosis, aunque las raíces adventicias de las plantas que crecen en pantanos son capaces de formar cloroplastos y fotosintetizar (Rich et al. 2011). Pero, por el número y cantidad de pigmentos fotosintéticos de las hojas y la relación inversa de clorofilas ente sexos se fortalece razonablemente la explicación de su asociación con epífitas y dicho vinculo perfila su uso como biomarcadores sexuales. Comparativamente, los contenidos de CLa, CAR y de la relación de CLa/CLb de *V. americana* a nivel foliar son más altos que los reportados para *V. natans* (Yin et al. 2019). De igual forma, es factible atribuir los incrementos de concentración de clorofilas de los individuos masculinos a las estrategias de defensa, es decir, una mayor inversión en capacidad de fotosíntesis para mitigar las consecuencias negativas de la herbivoría (Menzies et al. 2016).

Cabe destacar que por las diferencias cuantitativas pigmentarias de hojas femeninas y masculinas fueron sobresalientes en magnitud las ANT monoméricas. Sin duda, este fue el biomarcador representativo de diferenciación sexual para *V. americana*. Sin embargo, no se descarta la producción de ANT con influencia simbiótica, ya que durante la etapa de crecimiento y desarrollo vegetativo y reproductivo las microalgas, como cianobacterias, participan en muchos mecanismos de estrés abiótico (Rai et al. 2019). Recientemente, las ANT se relacionaron con el enrojecimiento en campo de vegetación acuática sumergida de biorregiones marinas atlánticas y tropicales del Indo-Pacífico. Este fenómeno provocó cambios significativos en el microbioma de las hojas enrojecidas con expresión extrema adjudicados a los procesos fisiológicos impulsados por el ambiente en alta irradiancia (Hurtado-McCormick et al. 2020), si bien para comprender mejor la relación de ANT con el dioicismo se requieren investigaciones profundas que determinen las causas y funciones de protección ambiental.

En contraposición con la marcada diferenciación pigmentaria foliar de las plantas femeninas y masculinas, sólo se encontró en los parámetros físicos y químicos de ambas poblaciones una diferencia mínima de potencial redox, que es insuficiente para ligar la producción de agentes oxidantes en el agua con la identidad sexual (Kocsy et al. 2013, Zinta et al. 2016). En cambio, por la morfología vegetativa fue significativamente mayor el ejemplar masculino en longitud de la raíz; sin embargo, la naturaleza entorchada de ésta agrega incertidumbre al resultado (Ruiz-Carrera y Sánchez 2008, Bautista-Regil et al. 2016).

Cabe señalar que la profundidad del agua ha ayudado a explicar la separación de las poblaciones femeninas y masculinas en correspondencia con la hipótesis de plasticidad del dimorfismo sexual (Hu et al. 2010). La hipótesis se corroboró en *V. natans* y *V. spinulosa* por los rasgos femeninos en agua menos profunda y masculinos a mayor profundidad (Zhou et al. 2019, Li et al. 2020, Ding et al. 2021) y en este caso, para *V. americana*. En otro estudio, se reportó que las poblaciones de *V. americana* de zonas templadas exhibieron una proporción sexual sesgada que ubica a las masculinas en aguas poco profundas, mientras que sesgo junto con la densidad de plantas es más pronunciado en femeninas a mayores profundidades (Lokker et al. 1994). Aún más, la mayor plasticidad morfológica para fotosintetizar en luz baja se adjudica a las plantas femeninas (Ding et al. 2021). Así que, la relación del dioicismo de plantas sumergidas con el efecto directo de la profundidad del agua o indirecto de la luz, la desviación sexual y el ambiente estresante son aspectos que requieren mayor atención por sus implicaciones ecológicas.

En síntesis, la definición de biomarcadores fotosintéticos y de antocianinas, complementado con el hallazgo espectral de FB, resultó una estrategia de selección de individuos diferenciados sexualmente con miras a restablecer a las poblaciones de *V. americana* en los humedales limnéticos impactados antrópicamente y para corroborar sus perfiles de estrés adaptativo con inclusión del sexo.

CONCLUSIONES

Los extractos hidroetanólicos de las hojas de *Vallisneria americana* mostraron más biomarcadores de diferenciación sexual que las raíces. Las disimilitudes atribuibles al género se resolvieron a nivel foliar con base en la concentración sobresaliente de antocianinas monoméricas en masculinos y marcaron también diferencias en carotenoides y clorofilas a y b, así como en la relación de clorofilas y proporción relativa de ficobilinas. A nivel de raíces destacaron las femeninas en clorofilas y su relación inversa. La concentración de

pigmentos en hojas masculinas y clorofilas en raíces femeninas indicaron posibles asociaciones con epífitas algales o bacterianas relacionadas con el sexo de las plantas, aunque estos aspectos de interacción biológica se encuentran en debate. Estos biomarcadores ofrecen un enorme potencial de aplicaciones ecológicas para *V. americana*, principalmente para repoblar los morfotipos afectados por estrés en humedales tropicales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el financiamiento del Proyecto de Investigación Clave UJAT-2014-IA-09, a través del Programa de Fomento a la Investigación (PFI).

REFERENCIAS

Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Duggan P.S., Rai A.N. y Schüßler A. (2013). Cyanobacterial-plant symbioses. En: The prokaryotes (E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson, Eds). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 359-400. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0-17

Alencar F.H. y Nunes S.H.R. (2016). Gallic Acid: Review of the methods of determination and quantification. Crit. Rev. Anal. Chem. 46(3), 257-265

Al-Obaidi J.R., Rahmad N., Hanafi N.M., Halabi M.F. y Al-Soqeer A.A. (2017). Comparative proteomic analysis of male and female plants in jojoba (*Simmondsia chinensis*) leaves revealed changes in proteins involved in photosynthesis, metabolism, energy, and biotic and abiotic stresses. Acta Physiol. Plant 39(8), 179. https://doi.org/10.1007/s11738-017-2485-7

Bautista-Regil J., Ruiz-Carrera V., Sánchez A.J., Salcedo-Meza M.Á. 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

Chalker-Scott L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochem. Photobiol. 70(1), 1-9. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x

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. Int. J. Mol. Sci. 19(10), 3042. https://doi.org/10.3390/ijms19103042

Croft H. y Chen J.M. (2018). Leaf pigment content. En: Comprehensive remote sensing (S. Lian, Ed.). Elsevier: Oxford, UK. pp. 117-142. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10547-0

Dhote S. y Dixit S. (2009). Water quality improvement through macrophytes — a review. Environ. Monit. Assess. 152(1-4), 149-153. https://doi.org/10.1007/s10661-008-0303-9

Ding M., Zhou R., Chen T., He L., Jeppesen E. y Li L. (2021). Physiological adaptations of the submerged macrophyte *Vallisneria spinulosa* in response to water level fluctuations. Aquat. Ecol. 55(1), 33-45. https://doi.org/10.1007/s10452-020-09808-3

Efremov A.N. (2016). Anatomy and morphology of reproductive organs of *Stratiotes aloides* L. (Hydrocharitaceae). Inland Water Biol. 9(1), 27-38. https://doi.org/10.1134/S1995082916010041

Glazer A.N. (1994). Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. J. Appl. Psychol. 6(2), 105-112. https://doi.org/10.1007/BF02186064

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

Hu Y., Xie Y., Zhu F., Wang C. y Lei C. (2010). Variation in sexual size dimorphism among populations: testing the differential-plasticity hypothesis. Entomol. Exp. Appl. 137(2), 204-209. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01054.x

Hurtado N.H. y Pérez M. (2014). Identificación, estabilidad y actividad antioxidante de las antocianinas aisladas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus serótina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). Inf. Tecnol. 25(4), 131-140. https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000400015

Hurtado-McCormick V., Kahlke T., Krix D., Larkum A., Ralph P.J. y Seymour J.R. (2020) Seagrass leaf reddening alters the microbiome of Zostera *muelleri*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 646:29-44. https://doi.org/10.3354/meps13409

Juvany M. y Munné-Bosch S. (2015). Sex-related differences in stress tolerance in dioecious plants: a critical appraisal in a physiological context. J. Exp. Bot. 66(20), 6083-6092. https://doi.org/10.1093/jxb/erv343

Kocsy G., Tari I., Vanková R., Zechmann B., Gulyás Z., Poór P. y Galiba G. (2013). Redox control of plant growth and development. Plant Sci. 211, 77-91. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.07.004

Kumar S. y Pandey A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Sci. World J. 162750, 1-16. https://doi.org/10.1155/2013/162750

Lauceri R., Bresciani M., Lami A. y Morabito G. (2017). Chlorophyll a interference in phycocyanin and allophycocyanin spectrophotometric quantification. J. Limnol. 77(1), 169-177. https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1691

Lee D.W. y Gould K.S. (2002). Why leaves turn red: pigments called anthocyanins probably protect leaves from light damage by direct shielding and by scavenging free radicals. Am. Sci. 90(6), 524-531. https://www.jstor.org/stable/27857752

Lee J., Durst R.W. y Wrolstad R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J. AOAC int. 88(5), 1269-1278. https://doi.org/10.1093/JAOAC/88.5.1269

Li L., Ding M., La Z., Zha Y. y Chen J. (2019). Light availability and patterns of allocation to reproductive and vegetative biomass in the sexes of the dioecious macrophyte *Vallisneria spinulosa*. Front. Plant Sci. 10 (572), 1-10. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00572

Li L., Ding M. y Jeppesen E. (2020). Variation in growth, reproduction, and resource allocation in an aquatic plant, *Vallisneria spinulosa*: the influence of amplitude and frequency of water level fluctuations. Aquat. Sci. 82(4), 1-13. https://doi.org/10.1007/s00027-020-00754-8

Lichtenthaler H.K. y Buschmann C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. CPFA 1(1), 1-8. https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01

Lokker C., Susko D., Lovett-Doust L., y Lovett-Doust J. (1994). Population genetic structure of *Vallisneria americana,* a dioecious clonal macrophyte. Am. J. Bot. 81(8), 1004-1012. https://doi.org/10.2307/2445294

Ma Y., Hou C-J., Li D. y Huo D.Q. (2018). The effect and evidence of ethanol content on the stability of anthocyanins from purple-fleshed sweet potato. J. Food Process. Preserv. 42(2), 1-8. https://doi.org/10.1111/jfpp.13484

Maldonado-López Y., Cuevas-Reyes P., Sánchez-Montoya G., Oyama K. y Quesada M. (2014). Growth, plant quality and leaf damage patterns in a dioecious tree species: is gender important?. Arthropod-Plant Int. 8, 241-251. https://doi.org/10.1007/s11829-014-9314-3

Martínez R.I., Rendón L.M.B., Ayala R.G.L., López G., López P.G., Acevedo M. M. A., Medina C.G. y Soto M.M.G. (2017). Comparación de métodos: fluorometría-espectrofotometría para la estimación de clorofila-a en el humedal de Patzcuaro, Michoacán. Memorias de la Academia Nacional de Ciencias Ambientales 2017. Congreso XVI internacional, XXII Nacional. Rev. Int. Contam. Ambient. Vol. 34. Chetumal, Quintana Roo. 7, 8 y 9 de junio de 2017.

Mcfarland D.G. (2006). Reproductive ecology of *Vallisneria americana* Michaux; US Army Engineer Researach and Development Center: Vicksburg, MS, USA. [en línea] https://hdl.handle.net/11681/3657 16/01/2021

Menzies L.W., Youard J.M., Lord K.L., Carpenter J. M., van Klink N.B., Perry H., Schaefer M. y Gould K.S. (2016). Leaf colour polymorphisms: a balance between plant defence and photosynthesis. J. Ecol. 104(1), 104-113. https://doi.org/10.1111/1365-2745.12494

Nakamura, M. y Noguchi, K. (2020). Tolerant mechanisms to O_2 deficiency under submergence conditions in plants. J Plant Res 133, 343-371 https://doi.org/10.1007/s10265-020-01176-1

Paula V.B., Estevinho L.M. y Dias L.G. (2017). Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. J. Apic. Res. 56(5), 569-580. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1370904

Rai A.N., Singh A.K. y Syiem M.B. (2019). Plant growth-promoting abilities in cyanobacteria. En: Cyanobacteria from basic science to applications (A.K. Mishra, D.N. Tiwari, A.N. Rai, Eds). Academic Press, Cambridge, MA, USA, pp. 459-476. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00023-4

Reitsema R.E., Meire P. y Schoelynck J. (2018). The future of freshwater macrophytes in a changing world: Dissolved organic carbon quantity and quality and its interactions with macrophytes. Front. Plant Sci. 9(629), 1-15. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00629

Rejmankova E. (2011). The role of macrophytes in wetland ecosystems. J. Ecol. Nat. Environ. 34(4), 333-345. https://doi.org/10.5141/JEFB.2011.044

Rezek R.J., Furman B.T., Jung R.P., Hall M.O. y Bell S.S. (2019). Long-term performance of seagrass restoration projects in Florida, USA. Sci. Rep. 9(15514), 1-11. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51856-9

Rich S.M., Ludwi M., Pederse O. y Colmer T.D. (2011). Aquatic adventitious roots of the wetland plant Meionectes brownii can photosynthesize: implications for root function during flooding. New Phytol. 190(2), 311-319. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03524.x

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.org/10.1007/s11099-008-0019-7

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.

Ruiz-Carrera V., Sánchez A.J., Contreras-Sánchez W.M. y Salcedo-Meza M.A. (2021). Predicción *in vitro* del estrés de *Vallisneria americana* Michx. por enriquecimiento de iones amonio y nitrato. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 8(I). https://doi.org/10.19136/era.a8nI.2673

Sánchez A.J., Florido R., Salcedo M.A., Ruiz-Carrera V., Montalvo-Urgel H. y Raz-Guzmán A. (2012). Macrofaunistic diversity in *Vallisneria americana* Michx. in a tropical wetland, Southern Gulf of Mexico. En: Diversity of ecosystems (A. Mahamane Ed.). InTech. Rijeka, Croatia, pp 1-26. https://doi.org/10.5772/35331

Sanchini A. y Grosjean M. (2020). Quantification of chlorophyll a, chlorophyll b and pheopigments a in lake sediments through deconvolution of bulk UV-VIS absorption spectra. J. Paleolimnol. 64, 243-256. https://doi.org/10.1007/s10933-020-00135-z

Subhashini P., Dilipan E., Thangaradjou T. y Papenbrock J. (2013). Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. Nat. Prod. Bioprospect. 3(4), 129-136. https://doi.org/10.1007/s13659-013-0043-6

Sun C., Wu Z., Wang Z. y Zhang H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 8, 595393. 1-9. https://doi.org/10.1155/2015/595393

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

Tomazzoli M.M., Neto R.D.P., Moresco R., Westphal L., Zeggio A.R., Specht L. y Maraschin M. (2015). UV-Visible scanning spectrophotometry and chemometric analysis as tools to build descriptive and classification models for propolis from southern Brazil. En: 9th International Conference on Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics (Overbeek R., Rocha M., Fernández-Riverola F., de Paz J., Eds.). Advances in Intelligent Systems and Computing, vol. 375. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19776-0_3

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 9/2019 (5), 1-5. https://doi.org/10.32473/edis-ag437-2019

Torres-Martínez A., Sánchez A.J., Alvárez-Pliego N., Hernández-Franyutti A.A., López-Hernández J.C. y Bautista-Regil, J. (2017). Gonadal histopathology of fish from La Polvora urban lagoon in the Grijalva Basin, Mexico. Rev. Int. Contam. Ambient. 33(4), 713-717. https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.04.14

Yin J., Fan P., Zhong G. y Wu Z. (2019). Responses of *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to the combined effects of Mn and pH. Ecotoxicology 28(10), 1177-1189. https://doi.org/10.1007/s10646-019-02126-x

Zhou Y., Li L. y Song Z. (2019). Plasticity in sexual dimorphism enhances adaptation of dioecious *Vallisneria natans* plants to water depth change. Sci. 10(826), 1-11. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00826

Zinta G., Khan A., AbdElgawad H., Verma V. y Srivastava A.K. (2016). Unveiling the redox control of plant reproductive development during abiotic stress. Front. Plant Sci. 7(700), 1-6. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00700