



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS
ECOLOGÍA

**EFFECTOS FISIOLÓGICOS SOBRE *Laelia speciosa* (ORCHIDACEAE) RESULTADO DE
LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA POR NITRÓGENO (N) EN EL ESTADO DE
MICHOACÁN MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EDISON ARMANDO DÍAZ ÁLVAREZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ERICK DE LA BARRERA MONTPELLIER
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO ANTONIO LINDIG CISNEROS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

COMITÉ TUTOR: DRA. CASANDRA REYES GARCÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE YUCATAN

MORELIA MICHOACÁN. OCTUBRE, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presenta

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de agosto del 2013, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestro en Ciencias Biológicas del alumno **Edison Armando Díaz Álvarez** con número de cuenta **512451228** con la tesis titulada: **"Efectos fisiológicos sobre *Laelia speciosa* (Orchidaceae) resultado de la contaminación atmosférica por nitrógeno (N) en el estado de Michoacán, México"** bajo la dirección del Dr. Erick de la Barrera Montpellier.

Presidente:	Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Vocal:	Dr. Javier Villegas Moreno
Secretario:	Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros
Suplente:	Dr. Fernando Pineda García
Suplente:	Dr. John Larsen

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 24 de septiembre del 2013.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la gran oportunidad que me concedió al permitirme ser uno de sus estudiantes en su programa de maestría; además por la formación académica y científica recibida durante la realización de mis estudios. Así mismo quiero agradecer el apoyo PAEP 2012 concedido en pro de realizar mi estancia de investigación en la Universidad de Wyoming

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención número 412787/262604 ya que sin esta no habría podido adelantar mis estudios de maestría, adicionalmente quiero agradecer al CONACyT por la beca mixta que me fue otorgada para la realización de una estancia de investigación en Estados Unidos de América donde pude complementar mis estudios de posgrado.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al comité tutor ya que gracias a ellos mi trabajo fue enriquecido día a día con acertadas recomendaciones y consejos sobre la metodología, análisis y discusión de los hallazgos hechos durante mi maestría. Muchas gracias al Dr. Erick de la Barrera por la orientación, amistad, confianza y muchas cosas más depositadas durante los últimos dos años, así mismo a la Dra. Casandra Reyes García por sus atinados comentarios acerca del manuscrito y críticas constructivas al proyecto, al Dr. Roberto Lindig Cisneros por sus aportaciones y consideraciones claves para el desarrollo de esta tesis.

Agradecimientos a título personal

A mi madre por tener tantos años de paciencia de sacrificios y de optimismo, gracias por las grandes lecciones de la vida.

A mi padre por el esfuerzo y dedicación por el apoyo, por aquellos buenos consejos sobre el trabajo duro y sacrificio en pro de una gran meta.

A mi esposa por estar conmigo en los grandes momentos de sacrificio y entrega, por aguantar tantas y tantas cosas derivadas del trabajo duro, gracias por estar por segunda vez en una tesis y que espero no sea la última.

A mi padrino por su apoyo incondicional, paciencia y continuos consejos en pro de hacerme crecer como científico, que me han llevado a feliz término de esta etapa de mi vida.

Al Doctor David Williams y su esposa Rene por su cortesía, atenciones y consejos brindados durante el transcurso de mi estancia en Estados Unidos.

A la Universidad de Wyoming por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos.

A la Dra. María Clara Arteaga por sus invaluable consejos.

Quiero agradecer a **孫悟空** por enseñarme que siempre se puede ir más allá, a mantener el ánimo sin importar lo que suceda, a escuchar los sueños y a sentir emoción cuando los retos por delante son tan difíciles que parecen imposibles de alcanzar.

Dedicatoria

Para Ángela fuente de tantas y tantas alegrías quien me ayudo a conllevar los embates de la vida en los tiempos más penosos y quien con su sonrisa me inspira y motiva en cada instante a seguir adelante con más fuerza y determinación. Tu siempre presente dándome todo tu amor y cariño.

Dedico esta tesis a mis padres Gladys Álvarez Y Armando Díaz de quienes he recibido las mayores lecciones de la vida, y que me han llevado a ser quien soy en la actualidad, también quiero hacer parte de esta dedicatoria a mis hermanos Sergio y César.

Índice general

Agradecimientos	I
Agradecimientos a título personal	II
Dedicatoria	III
Índice general	IV
Índice de cuadros	VIII
Índice de figuras	IX
Resumen	XII
Abstract	XIV

Capítulo 1. Introducción general 1

1.1. Antecedentes	2
1.1.1. Detección de contaminación por nitrógeno atmosférico usando organismos indicadores	2
1.1.2. Los valores isotópicos del nitrógeno en la atmósfera	3
1.1.3. Ecofisiología de plantas epífitas	3
1.1.4. <i>Laelia speciosa</i> (Kunth) Schltr	4
1.1.5. Contaminación por nitrógeno en Morelia y su estudio	5
1.2. Planteamiento del problema	6
1.3. Hipótesis	8
1.4. Objetivos	9
1.4.1. Objetivo general	9
1.4.2. Objetivos específicos	9
1.5. Referencias	10

Capítulo 2. Fuentes de nitrógeno y metabolismo fotosintético de la orquídea epífita <i>Laelia speciosa</i> en dos sitios con diferentes usos de suelo en Michoacán México	17
2.1. Introducción	18
2.2. Materiales y métodos	21
2.2.1. Área de estudio	21
2.2.2. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad	21
2.2.3. Material vegetal	22
2.2.4. Análisis químicos	23
2.2.5. Análisis estadístico	23
2.3. Resultados	24
2.3.1. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad	24
2.3.2. Contenido de carbono y nitrógeno	25
2.3.3. Metabolismo fotosintético	26
2.3.4. $\delta^{15}\text{N}$ de <i>Laelia speciosa</i>	27
2.3.5. Proporción de carbono nitrógeno (C/N)	27
2.3.6. Historia del depósito de nitrógeno de <i>Laelia speciosa</i>	29
2.3.7. La proporción de C/N en el cambio de hábitat de <i>Laelia speciosa</i>	30
2.4. Discusión	31
2.4.1. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad	31
2.4.2. Contenido de carbono y nitrógeno	32
2.4.2. Metabolismo fotosintético	33
2.4.3. $\delta^{15}\text{N}$ de <i>Laelia speciosa</i>	34
2.4.4. Proporción de carbono nitrógeno (C/N)	35
2.4.5. Historia del depósito de nitrógeno de <i>Laelia speciosa</i>	36
2.4.6. La proporción de C/N en el cambio de hábitat de <i>Laelia speciosa</i>	37
2.5. Conclusiones	38
2.6. Referencias	39

Capítulo 3. Efectos fisiológicos del depósito de nitrógeno simulado sobre

<i>Laelia speciosa</i>	48
3.1. Introducción	49
3.2. Materiales y métodos	51
3.2.1. Material biológico	51
3.2.2. Soluciones nutritivas	51
3.2.3. Fenología	52
3.2.4. Conductancia estomática	52
3.2.5. Fluorescencia de la clorofila	53
3.2.6. Contenido de clorofila	53
3.2.7. Análisis químicos: Contenido de carbono, nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$	53
3.2.8. Análisis estadísticos	54
3.3. Resultados	55
3.3.1. Fenología	55
3.3.2. Conductancia estomática	56
3.3.3. Fluorescencia de la clorofila	57
3.3.4. Contenido de carbono y nitrógeno	58
3.3.5. Contenido de clorofila	59
3.3.6. $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y la discriminación isotópica de <i>Laelia speciosa</i> ..	60
3.4. Discusión	63
3.4.1. Fenología	63
3.4.2. Conductancia estomática	63
3.4.3. Fluorescencia de la clorofila	64
3.4.4. Contenido de carbono y nitrógeno	65
3.4.5. Contenido de clorofila	66
3.4.6. Contenido de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y la discriminación isotópica de <i>Laelia speciosa</i>	67
3.5. Conclusiones	69
3.6. Referencias	70

Capítulo 4. Discusión general	83
4.1. Discusión general	84
4.2. Referencias	88

Índice de cuadros

Capítulo 2.

Cuadro 2.1. Porcentaje de peso seco de carbono y nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C/N en tejidos de *Braunia* sp. y materia orgánica del suelo del dosel en dos sitios y dos posiciones en el dosel, así como musgos provenientes de rocas del campo. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por posición) 25

Cuadro 2.2. $\delta^{13}\text{C}$ en hojas, raíces y pseudobulbos de *Laelia speciosa*. en dos sitios y dos posiciones en el dosel y musgos provenientes de rocas del Cerro El Olvido. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por posición) 27

Capítulo 3

Cuadro 3.1. $\delta^{13}\text{C}$ en hojas de *Laelia speciosa* sometida a un control y seis dosis de N durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 5 plantas) 61

Índice de figuras

Capítulo 2.

Figura 2.1. Contenido: de (A) carbono y (B) nitrógeno en plantas de *Laelia speciosa*. en dos sitios de Michoacán México. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por posición). Las letras indican diferencias significativas entre lugares, posiciones y plantas 26

Figura 2.2. Proporción de C/N y $\delta^{15}\text{N}$ en órganos de *Laelia speciosa*. Provenientes de dos sitios del estado de Michoacán. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por posición). 28

Figura 2.3. $\delta^{15}\text{N}$ en series de 10 pseudobulbos de *Laelia speciosa*, donde el número 1 representa el más antiguo y el número 10 el más reciente. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por lugar y posición) 29

Figura 2.4. Proporción C/N en series de 10 pseudobulbos de *Laelia speciosa* donde el numero 1 representa el más antiguo y el número 10 el más reciente; en dos posiciones del dosel y de plantas de rescate creciendo en la ciudad. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por lugar y posición) . . 30

Capítulo 3.

Figura 3.1. Producción de hojas (en blanco), pseudobulbos (líneas diagonales a la derecha) y flores (diagonales a la izquierda) en plantas de *Laelia speciosa*. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 20 plantas por dosis). Las letras: minúsculas (hojas), mayúsculas (pseudobulbos) indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$ 55

Figura 3.2. Conductancia estomática $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 12 horas en plantas regadas con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$) 56

Figura 3.3. Conductancia estomática máxima $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al medio día de plantas sometidas a riego con diferentes dosis de nitrógeno. El recuadro (parte superior derecha) muestra la conductancia estomática $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 12 horas en plantas regadas con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$) 57

Figura 3.4. Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) en plantas adaptadas a la oscuridad por 20 minutos y expuestas a riego con un control y 5 dosis de nitrógeno durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$) 58

Figura 3.5. Contenido de carbono (A) y nitrógeno (B) como porcentaje de peso seco en hojas de plantas de *Laelia speciosa*. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$) 59

Figura 3.6. Contenido de clorofila a (cuadro), clorofila b (círculo) y clorofila total (triángulo) de plantas de *Laelia speciosa* al finalizar tratamiento, con un control y 5 dosis de nitrógeno durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$ 60

Figura 3.7. Composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de *L. speciosa*, la línea punteada indica el $\delta^{15}\text{N}$ de la solución en plantas sometidas a riego con diferentes dosis de

N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$ 61

Figura 3.8. La discriminación isotópica que acompaña la absorción y asimilación de NH_4NO_3 al finalizar 26 semanas de riego con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$ 62

Resumen general

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida y a menudo es limitante para las plantas. Sin embargo, debido a la creciente producción de alimentos y energía, su disponibilidad ha aumentado, sobre todo en formas químicamente reactivas que se depositan en los ecosistemas y pueden ser tóxicas para las plantas, lo que ha llevado a un cambio en la composición de especies y a la pérdida de diversidad. En este contexto el objetivo general de este estudio fue: determinar la fuente de nitrógeno y el metabolismo fotosintético de *Laelia speciosa* en dos sitios con diferente uso de suelo, así como el efecto del depósito de nitrógeno simulado en la fisiología de esta orquídea epífita. Para ello este estudio fue dividido en dos partes, la primera (capítulo 2) fue llevada a cabo en dos sitios del estado de Michoacán, donde se colectaron muestras de hojas, pseudobulbos y raíces de plantas de dos posiciones en el dosel de un lugar en el campo a 30 km de la ciudad; además se tomaron muestras de plantas de rescate que durante varios años fueron expuestas al ambiente de la ciudad de Morelia. Como organismo indicador del depósito de nitrógeno en cada sitio se usó el musgo (*Braunia* sp.). Se colectaron muestras de series de 10 pseudobulbos en cada sitio y posición. A todas las muestras se les determinó el contenido de carbono, nitrógeno, los $\delta^{13}\text{C}$, los $\delta^{15}\text{N}$ y la proporción C/N. *Laelia speciosa* presentó valores de $\delta^{13}\text{C}$ que son típicos de plantas CAM, por ejemplo en hojas fueron en promedio de -17.42‰ , en pseudobulbos -17.3‰ y -17.06‰ en raíces, la posición en el dosel o el lugar donde habitan no tuvieron efecto en los $\delta^{13}\text{C}$ de las orquídeas ($p > 0.05$). En *Braunia* sp. los $\delta^{13}\text{C}$ fueron de -26.13‰ distintivos de plantas C_3 y no cambiaron ni en el campo ni en la ciudad. Los resultados indican que los $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas del campo son típicos de lugares con baja contaminación siendo estos de -3.28‰ en hojas, -2.8‰ en pseudobulbos y -3.09‰ en raíces, mientras que para el organismo indicador fueron de -3.15‰ , la posición en el dosel no tuvo efecto en la fuente de nitrógeno que usa esta orquídea epífita, siendo esta primordialmente atmosférica. Las plantas de la ciudad mostraron valores de $\delta^{15}\text{N}$ típicos de lugares

donde la actividad industrial humana está presente, siendo de 5.63‰ para hojas, 3.38‰ en pseudobulbos y 5.52‰ en raíces ($p > 0.05$) entre órganos. Los $\delta^{15}\text{N}$ de *Braunia* sp. fueron de 3.33‰. A su vez las series de pseudobulbos mostraron que los $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas trasladadas del campo a la ciudad cambian de ser negativos en aquellos que crecieron en el campo a ser positivos en los que se formaron en la ciudad.

La segunda parte del estudio (capítulo 3) fue llevada a cabo en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas UNAM Morelia, donde durante 26 semanas se aplicaron varias dosis de nitrógeno en solución que simulaban diferentes escenarios de depósito de nitrógeno (un testigo sin nitrógeno y 5 dosis de: 2.5, 10, 20, 40 y 80 kg de N ha⁻¹ año⁻¹). Al terminar el experimento se determinó el número de hojas, pseudobulbos y flores, además se midieron parámetros fisiológicos: conductancia estomática, fluorescencia de la clorofila y contenido total de clorofila. Finalmente el contenido de carbono, nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y la discriminación isotópica entre dosis fueron determinados. Los resultados sugieren que las dosis más bajas de nitrógeno entre 2.5 y 20 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ estimularon la producción de órganos (hojas y pseudobulbos), las dosis mayores a estas se observó una disminución del 48.15%. Este mismo patrón fue observado en la conductancia estomática máxima donde a 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ fue de 41.82 ± 0.88 mmol m⁻² s⁻¹, por el contrario se registró una reducción del 51.7% cuando se aplicó una dosis de 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹. La fluorescencia de la clorofila presentó una disminución significativa en plantas regadas con 40 y 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ alcanzando valores de 0.62 ± 0.02 de Fv/Fm. el contenido de clorofila total aumentó con el incremento en la dosis de nitrógeno alcanzando el máximo en plantas que recibieron una dosis de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹. El contenido de carbono mostró pequeñas variaciones en respuesta a la dosis de nitrógeno alcanzado su máximo en 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ con un $46.2 \pm 0.25\%$ del peso seco, el contenido de nitrógeno se vio afectado por el incremento de la dosis alcanzando el máximo a 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ 1.76% del peso seco ($p > 0.05$) con plantas que recibieron dosis

diferente a ésta. Los $\delta^{13}\text{C}$ no fueron afectados por la dosis de nitrógeno siendo estos de $-14.67 \pm 0.17\text{‰}$.

Las plantas sometidas a riego con diferentes dosis de nitrógeno mostraron la absorción preferencial de iones NH_4^+ , ya que los $\delta^{15}\text{N}$ disminuyeron al aumentar la dosis, de $1.09 \pm 0.1\text{‰}$ en plantas regadas con $2.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ a $-3.14 \pm 0.2\text{‰}$ en plantas regadas con $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mostrando una fuerte discriminación isotópica. Las dosis de 40 y $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ mostraron tener efectos tóxicos debido a la acumulación de N en las células que afectó los diferentes procesos fisiológicos de *Laelia speciosa*. Mientras que dosis menores incrementaron el desempeño fisiológico.

Palabras clave: *Braunia* sp; contenido de carbono y nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$; $\delta^{15}\text{N}$; depósito atmosférico de nitrógeno; *Laelia speciosa*; Metabolismo fotosintético; Pérdida de la diversidad; Toxicidad por nitrógeno.

Abstract

Nitrogen is an essential element for life and is often limiting to plants. However, due to increasing food production and energy its availability has increased, especially chemically reactive forms are deposited on ecosystems and can be toxic to plants, which has led to a change in the composition and loss of species diversity. In this context, the main objective of this study was: to determine the source of nitrogen and photosynthetic metabolism of *Laelia speciosa* in two sites with contrasting land use, and the effect of simulated nitrogen deposition in the physiology of this epiphytic orchid. This study was divided into two parts, the first one (Chapter 2) was carried out at two sites in the state of Michoacán, Mexico, where samples of leaves, pseudobulbs and roots, as well as series of 10 pseudobulbos of plants where collected in two positions in the canopy, located at countryside 30 km from Morelia, in addition to rescue plants that for several years were exposed to the environment of this city, as the indicator organism nitrogen tank at each site was used moss (*Braunia* sp.), in order to determine the content of carbon, nitrogen, the $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and the C/N ratio. $\delta^{13}\text{C}$ values of *Laelia speciosa* were typical of CAM plants, for instance in leaves were -17.42‰ , in pseudobulbs were -17.3‰ and -17.06‰ in roots, the position in the canopy or where they live, had no effect on the $\delta^{13}\text{C}$ of the orchids ($p > 0.05$). $\delta^{13}\text{C}$ values on *Braunia* sp. Were consistent with C_3 plants and site had no effect on it. The results indicate that $\delta^{15}\text{N}$ of plants in the field are typical of places with low pollution, thereby in leaves were -3.28‰ , in pseudobulbs were -2.8‰ and -3.09‰ in roots, while in the indicator organism were -3.15‰ , the position in the canopy had no effect on the nitrogen source using by this epiphytic orchid being this primarily atmospheric. In contrast the city plants showed typical $\delta^{15}\text{N}$ values of plants located close to human industrial activities, values range from 5.63‰ in leaves to 3.38‰ in roots ($p > 0.05$) between organs and *Braunia* sp. In turn pseudobulbs series showed a significant change in $\delta^{15}\text{N}$ between those plants moved to urban

from country, since in country $\delta^{15}\text{N}$ values were negative, while in urban were positive.

The second part of the study (Chapter 3) was carried out at the Centro de Investigaciones en Ecosistemas UNAM Morelia, during 26 weeks were applied various doses of nitrogen in solution in order to simulate different scenarios of nitrogen deposition (a control without nitrogen, and 5 doses of 2.5, 10, 20, 40 and 80 kg of N ha⁻¹ year⁻¹). The number of leaves, flowers and pseudobulbos were determinate, as well as some physiological parameters such as stomatal conductance, chlorophyll fluorescence and total chlorophyll content. Finally the content of carbon, nitrogen, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and isotope discrimination between doses were evaluated. The results suggest that lower doses of nitrogen between 2.5 and 20 kg of N ha⁻¹ year⁻¹ served as a fertilizer since the production of organs (leaves and pseudobulbs) was enhanced, whereas at higher doses the decrease was significant 48.15%, the same pattern was observed in maximum stomatal conductance where at 20 kg of N ha⁻¹ year⁻¹ was of $41.82 \pm 0.88 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ however, there was a 51.7% reduction when apply a dose of 80 kg of N ha⁻¹ year⁻¹. The fluorescence chlorophyll presented in plants irrigated with 40 and 80 kg of N ha⁻¹ year⁻¹ reaching values of 0.62 ± 0.02 of Fv/Fm. Total chlorophyll content increased with increasing nitrogen dose peaking in plants that received a dose of 20 kg of N ha⁻¹ year⁻¹. The carbon content showed small variations in response to nitrogen rate peaked at 20 kg of N ha⁻¹ year⁻¹ with $46.2 \pm 0.25\%$ of dry weight, nitrogen content was affected by the increase of the dose reaching maximum at 80 kg of N ha⁻¹ year⁻¹ 1.56% dry weight ($p < 0.05$) with plants receiving other doses. The $\delta^{13}\text{C}$ were not affected by the dose of nitrogen being these of -14.67 ± 0.17 ‰. On the other hand $\delta^{15}\text{N}$ were significantly altered with increasing dose, since the $\delta^{15}\text{N}$ of the solution was 1.09 ± 0.1 ‰, however the plants showed a reduction in this up to -3.14 ± 0.2 ‰ at 80 kg N ha⁻¹ year⁻¹, which was presented isotopic discrimination. Doses of 40 and 80 kg N ha⁻¹ year⁻¹ were shown to have toxic effects due to the accumulation of N in cells that affect various physiological

processes of *Laelia speciosa*. While lower doses proved to be fertilizer increasing physiological performance.

Keywords: *Braunia* sp, carbon content, nitrogen content, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, atmospheric nitrogen deposition, *Laelia speciosa*; photosynthetic metabolism; Loss of diversity; nitrogen toxicity

Capítulo 1

Introducción general

*“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”*

JULIUS ROBERT 1904-1967



1.1. Antecedentes

1.1.1. Detección de contaminación por nitrógeno atmosférico usando organismos indicadores.

El uso de organismos como indicadores de la contaminación se remonta a finales de la década de 1960, aunque es a partir de 1970 cuando se generaliza su uso (Núñez-Olivera et al. 2004). Actualmente los estudios en organismos indicadores de contaminación se han popularizado, en particular mediante la detección de $\delta^{15}\text{N}$ en musgos ya que estos organismos reciben el influjo directo del N proveniente de la atmósfera a sus células, lo que hace del fraccionamiento isotópico un proceso muy bajo o ausente, así, el $\delta^{15}\text{N}$ del musgo refleja el $\delta^{15}\text{N}$ de la atmósfera, haciendo de este un método eficaz para identificar isotópicamente las diferentes fuentes de N atmosférico (Bragazza et al. 2005). De este modo los musgos que crecen cerca a fuentes de contaminación industrial presentan valores de $\delta^{15}\text{N}$ positivos, mientras que los musgos de zonas rurales menos contaminadas presentan valores negativos, demostrando una relación directa entre la fuente de contaminación y la planta, dicho modelo de estudio ha sido usado en Europa, Estados Unidos y China (Pearson et al. 2000; Bragazza et al. 2005; Solga et al. 2006; Xue-Yan et al. 2008; Power y Collins 2010).

En el caso particular de especies de plantas vasculares como indicadores de la contaminación por N, se ha demostrado que también son sensibles a cambios en la fuente de nitrógeno. Por ejemplo, en São Paulo Brasil el estudio de la abundancia natural de ^{15}N en varias familias de plantas terrestres (Cecropiaceae, Moraceae, Melastomataceae, Piperaceae, Ulmaceae) y algunas epífitas (Bromeliaceae, Cactaceae, Araceae, Cyatheaceae, así como algunos helechos), reveló que tanto las plantas terrestres como las epífitas absorben y retienen la señal isotópica propia de los productos de desecho de las industrias cercanas, en este caso en particular de una planta de producción de fertilizantes (Stewart et al. 2002). Dicho estudio mostró que las plantas epífitas son biomonitores sensibles de la contaminación atmosférica por N como resultado de su estrecha relación con la

atmósfera. Otro ejemplo es el estudio con la bromelia epífita *Tillandsia recurvata* en el Valle de Mezquital México, que mostró que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de aquellas plantas que habitan cerca a industrias son positivos en comparación con los valores negativos encontrados en plantas de áreas rurales (Zambrano et al. 2009).

1.1.2. Los valores isotópicos del nitrógeno en la atmósfera

La contribución de nitrógeno proveniente de fuentes atmosféricas en plantas puede ser evaluada gracias a la habilidad de estas para absorber el nitrógeno directamente de fuentes atmosféricas, esto fue descubierto mediante el uso de los $\delta^{15}\text{N}$ proveniente de varios sustratos líquidos o gaseosos como indicadores de la fuente (Boyce et al. 1996; Wilson y Tiley 1998). Sin embargo, ha sido difícil cuantificar la proporción de N atmosférico tomado por las plantas versus otras fuentes en el campo, ya que la atmósfera tiene un amplio rango de valores de $\delta^{15}\text{N}$. Por ejemplo los valores de $\delta^{15}\text{N}$ del NO_x proveniente de la quema de carbón en plantas generadoras de energía presenta rangos de valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre +6‰ y +13‰ (Heaton 1990; Kiga et al. 2000), mientras que los $\delta^{15}\text{N}$ de NO_x resultante del escape de los vehículos están en el rango de +3.7‰ a +5.7‰ (Moore 1977; Ammann et al. 1999; Pearson et al. 2000), y los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de los compuestos nitrogenados derivados de la actividad eléctrica de los rayos están en un rango de entre -0.5‰ y +1.4‰ (Hoering 1957).

1.1.3. Ecofisiología de plantas epífitas

Las plantas epífitas son organismos no parásitos que pasan toda su vida ancladas a otras plantas denominadas forofitos (Benzing 1989). El hábitat de las epífitas es generalmente seco en bosques tropicales y a pesar de que el suministro de luz es mayor que en otros ambientes, estas plantas cuyas raíces no tienen contacto con el suelo están expuestas a limitación de agua y nutrientes (Benzing 1990). Para sobrevivir a este suministro limitado y a menudo irregular de agua, las epífitas han desarrollado adaptaciones especiales: morfológicas como

filotelmata y succulencia, además de absorción de agua (velamen radical) y adaptaciones fisiológicas como fotosíntesis CAM (Benzing 1990). CAM representa una adaptación metabólica al estrés por sequía que ayuda a las plantas a conservar agua por medio de la absorción nocturna de CO₂, el cual es almacenado en las vacuolas como ácidos orgánicos y es asimilado en forma de carbohidratos durante el periodo de luz subsecuente (Smith et al. 1986; Andrade et al. 2007). Durante la noche el gradiente de presión de vapor entre el aire y la planta es mucho más bajo que durante el día, cuando los estomas están cerrados. Las plantas CAM exhiben un uso eficiente de agua varias veces mayor que las C₃ (Nobel 1991). La fotosíntesis CAM es común a varias familias de epífitas vasculares del trópico y subtropical como: Araceae, Asclepiadaceae, Cactaceae, Piperaceae, y en particular Bromeliaceae y Orchidaceae son los grupos más sobresalientes de las cuales el 90% de las especies son consideradas plantas CAM (Medina et al. 1977, 1989; Winter y Smith 1996; Fontoura y Reinert 2009, Mardegan et al. 2011).

La abundancia natural de isótopos estables de nitrógeno y la concentración de nutrientes de las epífitas son afectados por la posición en el dosel. Las epífitas que crecen en ramas más gruesas y que tienen acceso al llamado “suelo del dosel” (materia orgánica en descomposición presente principalmente en las ramas más gruesas y centrales de los árboles) reciben un aporte menor de nitrógeno directamente de la lluvia que aquellas que crece en ramas pequeñas, (Hofstede y Wolf 1993; Nadkarni et al. 2000; Hietz et al. 2002).

1.1.4. *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr.

Laelia speciosa es una orquídea epífita endémica de la parte central de México, típica de bosques de encino de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y la parte sureste del Altiplano Mexicano. Se establece en climas templados a sub-húmedos entre los 1250 y los 2500 m.s.n.m. Ocasionalmente se le localiza en bosques con otras especies arbóreas mezcladas, principalmente con encinos (p. ej. *Quercus laeta*, *Q. rugosa* y *Q. deserticola*), enebros y pinos

(Halbinger y Soto 1997). En el estado de Michoacán su nombre de uso general es flor de mayo donde también se conoce como chichiltictepetzacuxóchitl, itzámahua o itzámacua, flor grande entre otros (Halbinger y Soto 1997).

Laelia speciosa florece de abril a junio y produce una inflorescencia con 1 a 2 flores pálidas u oscuras, rosado a purpura; lo que la ha llevado a que enormes cantidades de plantas y segmentos con flores, sean vendidas en las calles y mercados de las ciudades Mexicanas durante mayo y junio para celebraciones religiosas, así como para extraer mucilago de los pseudobulbos para hacer una pasta con medula de maíz la cual es usada para crear figuras religiosas (Miranda 1997; Hágaster et al. 2005; Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007).

Es una de las orquídeas de mayor importancia cultural en México, ya que las flores se utilizan para confeccionar arreglos para el Día de las Madres (Soto-Arenas 1994). Está listada como sujeta a protección especial por la norma oficial mexicana, NOM-059-SEMARNAT-2010, ya que “podría llegar a encontrarse amenazada por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas” (SEMARNAT 2010).

1.1.5. Contaminación por nitrógeno en Morelia y su estudio

El principal contaminante atmosférico liberado en Morelia es el monóxido de carbono que es el 81% de la emisión total, hidrocarburos con el 14% y los óxidos de nitrógeno representan el 4% que es equivalente a 21000 toneladas al año, en su mayoría provienen de los 204,406 automóviles livianos con los que cuenta la ciudad al momento del estudio (Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente 2008). Sin embargo, no se tiene información sobre el depósito de nitrógeno de la ciudad.

1.2. Planteamiento del problema

La atmósfera terrestre está conformada en gran parte por nitrógeno. Sin embargo, más del 99% del mismo no está disponible para más del 99% de los organismos debido a que su forma molecular N_2 es muy estable y sólo es utilizable por algunos microorganismos fijadores de nitrógeno (Galloway et al. 2003). La molécula de nitrógeno puede ser dividida para formar nitrógeno reactivo (Nr) mediante procesos que involucran altas temperaturas como la quema de combustibles fósiles que libera óxidos de nitrógeno (NO_x). La producción y aplicación de fertilizantes nitrogenados es otra vía de producción de Nr, en particular en forma de amoníaco (NH_3) y amonio (NH_4) (Galloway et al. 2003; 2008). Estos compuestos son liberados a la atmósfera y pueden ser transportados por miles de kilómetros o permanecer en el área de producción, donde se transfieren (se depositan) de la atmósfera hacia los ecosistemas (Galloway et al. 2003; 2008). Este proceso se puede llevar a cabo mediante la precipitación que transporta sustancias gaseosas o partículas desde la atmósfera hacia la superficie del ecosistema, o cuando los contaminantes se dirigen hacia la superficie de los ecosistemas por acción de la gravedad, por ejemplo en forma de partículas (Pineda-Rojas y Vanegas 2008). Debido al aumento de la población mundial que demanda la producción de alimentos y energía (Galloway et al. 2004) la producción antropogénica de Nr ha aumentado de 16 Tg N/año en 1860 a 210 Tg N/año en 2005 (Galloway et al. 2004; 2008). A consecuencia de este incremento en el Nr disponible a nivel global, se está produciendo un proceso de acumulación de nitrógeno en el ambiente en todas las escalas espaciales, tanto local, regional y global (Galloway et al. 1995).

La adición de N típicamente incrementa la producción primaria de las plantas, incrementando la tasa de crecimiento mediante la fijación de CO_2 (Le Bauer y Treseder 2008). Sin embargo, el aumento exponencial en la liberación de Nr a la atmósfera y posterior depósito ha llevado a la saturación de varios ecosistemas en Europa y Estados Unidos, condición que ha conducido a la pérdida de diversidad en dichas regiones (Bobbink et al. 2010). La pérdida de

diversidad como resultado del aumento drástico en el depósito de nitrógeno está relacionada con la toxicidad por exceso de N, que puede causar el incremento de la acidez en los ecosistemas (Vogt et al. 2006; Lu et al. 2009), y con ello puede disminuir la tasa fotosintética (Brown et al. 1996; Granath et al. 2012), producir desbalance de nutrientes (Nakaji et al. 2001), y la disminución de los pigmentos fotosintéticos (Ying-Chun et al. 2010).

Naturalmente la baja disponibilidad de nitrógeno en los ecosistemas a menudo limita las tasas de crecimiento de las plantas (Vitousek y Howarth 1991). Condición bajo la cual los ecosistemas se han adaptado y a menudo han producido una gran diversidad de especies de plantas (Bobbink et al. 1998). Esto es especialmente notable en plantas epífitas debido a que están adaptadas a un ambiente más limitado por el nitrógeno que las plantas que tienen contacto directo con el suelo del bosque (Hietz et al. 1999; Wania et al. 2002). En particular, debido a que adquieren sus nutrientes primordialmente de la atmósfera (Benzing 1998; Stewart et al. 2002; Wania et al. 2002; Zotz y Bader 2009). Por lo que estas plantas adaptadas a un suministro limitado de nitrógeno pueden ser sensibles a un aumento excesivo en el depósito de nitrógeno atmosférico.

1.3. Hipótesis

Hipótesis fase de campo

Dado que la población de Morelia es inferior al millón de habitantes y que su desarrollo industrial es pequeño en comparación con otras ciudades capitales Mexicanas, el impacto de la contaminación por nitrógeno atmosférico en plantas de *Laelia speciosa* solo podrá ser apreciable a nivel isotópico, siendo la abundancia de ^{15}N diferente entre las plantas del campo y las plantas de la ciudad.

Hipótesis fase experimental

De la segunda parte de este estudio (deposito de nitrógeno simulado) se origina la siguiente hipótesis: dado que el nitrógeno es un factor limitante en la mayoría de ecosistemas, el aumento drástico en la disponibilidad de este elemento tendría como resultado un desequilibrio fisiológico en las plantas expuestas a dicho aumento.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar la fuente y metabolismo fotosintético para la orquídea epífita *Laelia speciosa* en dos sitios con uso de suelo diferentes, así como el efecto del depósito de nitrógeno simulado sobre la fisiología de ésta.

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer cómo cambia la fuente y contenido de nitrógeno de plantas que habitan en el campo y la ciudad.
- Evaluar el efecto de la posición en el dosel, sobre la fuente de nitrógeno usada por *Laelia speciosa*
- Determinar las variaciones en el metabolismo fotosintético de plantas de *L. speciosa* localizadas en diferentes posiciones del dosel y de plantas creciendo en la ciudad, así como su relación con el contenido de carbono.
- Comparar las características isotópicas del depósito de nitrógeno, así como el contenido de nitrógeno de las series de pseudobulbos en el año de desarrollo de cada uno, en dos sitios diferentes.
- Investigar el efecto del depósito de N simulado en la producción de órganos (Hojas, pseudobulbos y flores) en *L. speciosa*.
- Determinar la relación entre el depósito de nitrógeno simulado y el contenido de carbono y nitrógeno.
- Conocer el efecto del depósito de nitrógeno simulado en la respuesta fisiológica de plantas de *L. speciosa*.
- Comprobar la relación entre el aumento del depósito de nitrógeno simulado con el contenido de clorofila.
- Evaluar el efecto del depósito de nitrógeno simulado sobre los $\delta^{15}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de *L. speciosa*.

1.5. Referencias

- Ammann M., Siegwolf R., Pichlmayer F., Suter M., Saurer M. y Brunold C. 1999. Estimating the uptake of traffic-derived NO₂ from ¹⁵N abundance in Norway spruce needles. *Oecologia* 118: 124–131.
- Benzing D.H. 1989. Vascular epiphytism in America. En: Tropical Rain Forest Ecosystems: biogeographical and ecological studies. Ecosystems of the world 14B. (Lieth H. y Werger M.J.A. (eds.)). Elsevier, New York, p.133–154.
- Benzing, D.H. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bobbink R., Hicks K., Galloway J., Spranger T., Alkemade R., Ashmore M., Bustamante M., Cinderby S., Davidson E., Dentener F., Emmett B., Erisman J.W., Fenn M., Gilliam F., Nordin A., Pardo L. y De Vries W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*. 20(1):30–59.
- Bobbink R., Hornung M. y Roelofs J.G.M. 1998. The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology*. 86:738–738.
- Boyce R.L., Friedland A.J., Chamberlain C.P. y Poulson S.R. 1996. Direct canopy nitrogen uptake from ¹⁵N-labeled wet deposition by mature red spruce. *Canadian Journal of Forest Research*. 26:1539–1547.
- Bragazza L., Limpens J., Gerdol R., Grosvernier P., Hájek M., Hájek T., Hajkova P., Hansen I., Iacumin P., Kutnar L., Rydin H. y Tahvanainen T. 2005. Nitrogen concentration and $\delta^{15}\text{N}$ signature of ombrotrophic Sphagnum mosses at different N deposition levels in Europe. *Global Change. Biology*. 11:106–114.

- Brown K.R., Thompson W.A., Camm E.L., Hawkins B.J. y Guy R.D. 1996. Effects of N addition rates on the productivity of *Picea Sitchensis*, *Thuja plicata*, and *Tsuga heterophylla* seedlings II. Photosynthesis, ¹³C discrimination and N partitioning in foliage. *Trees*. 10:198–205.
- Fontoura T. y Reinert F. 2009. Habitat utilization and CAM occurrence among epiphytic bromeliads in a dry forest from southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica*. 32:521–530.
- Galloway J.N., Aber J., D: Erisman J.W., Seitzinger S.P., Howarth R.W., Cowling E.B. y Cosby B.J. 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience*. 53(4):341–356.
- Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G., Boyer E.W., Howarth R.W., Seitzinger S.P., Asner G.P., Cleveland C., Green P., Holland E., Karl D.M., Michaels A.F., Porter J.H., Townsend A. y Vörösmarty C. 2004. Nitrogen cycles: past, present and future. *Biogeochemistry*. 70:153–226.
- Galloway J.N., Schlesinger W.H., Levy H II., Michaels A. y Schnoor J.L. 1995. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. *Global Biogeochemical Cycles*. 9:235–252.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J. W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., Martinelli L.A., Seitzinger S.P., y Sutton M.A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320:889–892.
- Granath G., Strengbom J. y Rydin H. 2012. Direct physiological effects of nitrogen on Sphagnum: a greenhouse experiment. *Functional Ecology*. 26:353–364.
- Halbinger F. y Soto M.A. 1997. *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. En: Hágsater E., Soto M.A., Greenwood E., Dressler R.L., Cribb P.J., Rzedowski J.,

- Catling P.M., Sheviak C.J. y Chiang F. (eds.). *Laelias of México, Orquídea (Méx.)*15: 133-142. México City, México.
- Hágsater E., Soto-Arenas M.A., Salazar G.A., Jimenez R.M., López-Rosas M.A. y Dressler R.L. 2005. *Las orquídeas de México*. Chinoín Productos Farmacéuticos, S.A. de C.V. México.
- Heaton T.H.E. 1990. $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of NO_x from vehicle engines and coal-fired power stations. *Tellus* 42:304–307.
- Hietz P., Wanek W. y Popp M. 1999. Stable isotopic composition of carbón and nitrogen content in vascular epiphytes along an altitudinal transect. *Plant, Cell and Environment*. 22:1435–1443
- Hoering T. 1957. The isotopic composition of the ammonia and the nitrate ion in rain. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.12:97–102.
- Kiga T., Watanabe S., Yoshikawa K., Asano K., Okitsu S., Tsunogai, U. y Narukawa, K., 2000. In evaluation of NO_x formation in pulverized coal firing by use of nitrogen isotope ratios. En: Internat. Joint Power Generation Conf., Miami Beach.
- Le Bauer D.S. y Treseder K.K. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89: 371–79.
- Lu X.K., Mo J.M., Gundersen P., Zhu W.X., Zhou G.Y., De-Jun L.I. y Xu Zhang 2009. Effect of simulated N deposition on soil exchangeable cations in three forest types of subtropical China. *Pedosphere*.19:189–98
- Mardegan S.F., Nardoto G.B., Higuchi N., Reinert F. y Martinelli L.A. 2011. Variation in nitrogen use strategies and photosynthetic pathways among vascular epiphytes in the Brazilian Central Amazon. *Revista Brasileira de Botanica*. 34(1):21-30.

- Medina E., Delgado M., Throughton J.H. y Medina J.D. 1977. Physiological ecology of CO₂ fixation in Bromeliaceae. *Flora*. 166:137-152.
- Medina E., Olivares E., Díaz M. y Van Der Merwe N. 1989. Metabolismo ácido de crasuláceas en bosques húmedos tropicales. Monographs En: Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden. 27:56–67.
- Miranda F. 1997. Sobrevivencia de artesanías prehispánicas En Manos Michoacanas. Instituto de Investigaciones Históricas. Gob. Del Edo. De Michoacán, Colegio de Michoacán, UMSNH, México. pp 35–48.
- Moore H. 1977. The isotopic composition of ammonia, nitrogen dioxide and nitrate in atmosphere. *Atmospheric Environment*. 11:1239–1243.
- Nakaji-T., Fukami M., Dokiya Y. y Izuta T. 2001. Effects of high nitrogen load on growth, photosynthesis and nutrient status of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora* seedlings. *Trees*. 15:453–461.
- Núñez-Olivera N., Martínez-Abaigar J., Tomás R. Beaucourt N. Arróniz-Crespo M. 2004. Briófitos de ríos y bioindicación del cambio climático. Una experiencia en La Rioja. *Zubía Monográfico 22 (Issn 0213-4306)*.
- Pearson J., Wells D.M., Seller K.J., Bennett A., Soares A., Woodall J. y Ingrouille M.J. 2000. Traffic exposure increases natural N-15 and heavy metal concentrations in mosses. *New Phytologist*. 147, 317–326.
- Pineda-Rojas A.L. y Venegas, L.E. 2008. Dry and wet deposition of nitrogen emitted in Buenos Aires city to waters of de la Plata River. *Water, Air, & Soil Pollution*. 193(1-4):175–188.
- Power S.A. y Collins C.M. 2010. Use of *Calluna vulgaris* to detect signals of nitrogen deposition across an urban–rural gradient. *Atmospheric Environment*. 44(14):1772–1780.

- Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente 2008. Inventario de Emisiones Contaminantes a la Atmósfera para la Zona Metropolitana de Morelia y Cinco Municipios. Gobierno del Estado de Michoacán
- SEMARNAT Diario Oficial 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Solga A., Burkhardt J. y Frahm J.P. 2006. A New Approach to Assess Atmospheric Nitrogen Deposition byway of Standardized Exposition of Mosses. *Environmental Monitoring and Assessment*. 116:399–417
- Soto-Arenas M. 1994. Population studies in Mexican orchids. En: Pridgeon A.M. (eds.) Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Glasgow. HMSO Publ.
- Soto-Arenas M.A. y Solano-Gómez A.R. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. En: Soto-Arenas M.A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Stewart G.R., Aidar M.P.M., Joly C.A. y Schmidt S. 2002. Impact of point source pollution on nitrogen isotope signatures ($\delta^{15}\text{N}$) of vegetation in SE Brazil. *Oecologia*. 131:468–472.
- Xue-Yan L., Hua-Yun X., Cong-Qiang L., You-Yi L. y Hong-Wei X. 2008. Tissue N content and ^{15}N natural abundance in epilithic mosses for indicating atmospheric N deposition in the Guiyang area, SW China. *Applied Geochemistry*. 23:2708–2715.
- Vitousek P.M. y Howarth R.W. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13:87–115.

- Vogt R.D., Seip H.M., Larssen T., Zhao D., Xiang R., Xiao J., Jiahai Luo y Yu Zhao 2006. Potential acidifying capacity of deposition experiences from regions with high NH₄⁺ and dry deposition in China. *Science of Total Environ.* 367:394–404.
- Xue-Yan L., Hua-Yun X., Cong-Qiang L., You-Yi L. y Hong-Wei X. 2008. Tissue N content and ¹⁵N natural abundance in epilithic mosses for indicating atmospheric N deposition in the Guiyang area, SW China. *Applied Geochemistry.* 23:2708–2715.
- Wania R., Hietz P. y Wanek W. 2002. Natural ¹⁵N abundance of epiphytes depends on the position within the forest canopy: source signals and isotope fractionation. *Plant, Cell and Environment.* 25:581–589.
- Wilson E.J. y Tiley C. 1998. Foliar uptake of wet-deposited nitrogen by Norway spruce: An experiment using ¹⁵N. *Atmospheric Environment.* 32:513–518.
- Winter K. y Smith J.A.C. 1996. “An introduction to crassulacean acid metabolism: biochemical principles and biological diversity”, En: Crassulacean acid metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and evolution. Winter K. y Smith J.A.C. (eds). Springer Berlin Alemania.
- Ying-Chun L., Hou-Bao F., Yan-Yan L., Wen-Fei L. y Ying-Hong Y. 20010 Effects of simulated nitrogen deposition on growth and photosynthesis of 1-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) seedlings. *Acta Ecologica Sinica.* 30:150–154
- Zotz G. y Bader M.Y. 2009. Epiphytic plants in a changing world-global: Change effects on vascular and non-vascular epiphytes. *Progress in Botany.* 70:147-170.

Capítulo 2

Fuentes de nitrógeno y metabolismo

fotosintético de la orquídea epífita *Laelia*

speciosa en dos sitios con diferentes uso de suelo

en Michoacán, México.

“En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida”.

LEE SMOLIN 1955



2.1. Introducción

El depósito de nitrógeno atmosférico es la tercera causa de pérdida de biodiversidad después del cambio de uso de suelo y el cambio climático (Sala et al. 2000). Desde la última mitad del siglo XX ha ocurrido un aumento del 120% en la liberación de nitrógeno reactivo (Nr) a la atmósfera, en particular de compuestos como; amonio y óxidos de nitrógeno resultado del aumento de las actividades humanas como la quema de combustibles fósiles, la producción y aplicación de fertilizantes nitrogenados, y el cultivo de plantas de consumo humano que fijan N_2 (Phoenix et al. 2006; Galloway et al. 2008). Una vez en la atmósfera el NO_x y el NH_3 sufren una serie de transformaciones químicas y aunado a procesos atmosféricos resultan en la deposición de una mezcla de estos compuestos en los ecosistemas (Templer et al. 2012).

Al respecto, se ha observado que los musgos son buenos indicadores de contaminación atmosférica cuando crecen sobre las rocas sin acceso a nutrientes del suelo, debido a que obtienen su suministro de nutrientes directo y exclusivamente del depósito atmosférico, conservando la señal isotópica de los compuestos asimilados (Virgiani et al. 2004). Se puede determinar las fuentes de N en la atmósfera por medio de isótopos estables presentes en los organismos, ya que la abundancia de $\delta^{15}N$ en el aire o plantas de regiones con un alto depósito de nitrógeno, como las zonas urbanas, se diferencia de la abundancia encontrada en plantas del campo (Moore 1977; Ammann et al. 1999; Pearson 2000). Debido a que la nutrición de las plantas epífitas depende exclusivamente de los nutrientes que están disponibles en el dosel, incluyendo en mayor o menor medida el depósito atmosférico, las plantas epífitas pueden ser buenos indicadores de contaminación atmosférica y ayudar a identificar las fuentes de contaminación (Benzing 1990; Stewart et al. 2002; Zambrano et al. 2009; Abril y Bucher 2009).

El hecho que las raíces de las plantas epífitas no tengan contacto con el suelo del bosque del cual puedan obtener agua, hace de este hábitat un ambiente "árido", aún en zonas de alta precipitación, por lo que muchas especies de epífitas

han desarrollado adaptaciones fisiológicas como el metabolismo ácido de las crasuláceas CAM (Benzing 1990; Andrade y Nobel 1997; Silvera et al 2009). Esta vía fotosintética se caracteriza porque la fijación de CO₂ se lleva a cabo principalmente en la noche cuando la temperatura del aire es relativamente baja, lo que permite que las plantas CAM tengan una mayor eficiencia en el uso del agua que las plantas C₃ (Nobel 1991; Cushman 2001; Andrade et al. 2010). Investigaciones de la composición isotópica ($\delta^{13}\text{C}$) de plantas con diferentes metabolismos fotosintéticos brindan información con respecto a los cambios en la proporción de CO₂ fijado durante el día o la noche (Griffiths 1992). La abundancia del ¹³C puede variar de acuerdo a la asimilación de CO₂ ya que la PEP-c discrimina en menor medida que la RUBISCO en contra del ¹³C, lo que significa que los $\delta^{13}\text{C}$ serán menos negativos para plantas CAM que para plantas C₃ (Elheringer y Osmond 1989).

La abundancia natural de isótopos estables de nitrógeno y la concentración de nutrientes de las epífitas son afectados por la posición en el dosel; ya que, las epífitas que crecen en ramas más gruesas y que tienen acceso al suelo del dosel reciben un aporte menor de nitrógeno directamente de la lluvia que aquellas que crece en ramas más pequeñas y alejadas del tronco principal (Hofstede y Wolf 1993; Nadkarni et al. 2000; Hietz et al. 2002). En el suelo del dosel se encuentran una gran variedad de microorganismos que descomponen la materia orgánica (Vance y Nadkarni 1990), este proceso causa la discriminación en contra del ¹⁴N o del ¹⁵N produciendo un $\delta^{15}\text{N}$ diferente del proveniente de fuentes atmosféricas (Hietz et al. 2002).

De los diferentes tipos de epífitas vasculares las orquídeas han sido las más exitosas en colonizar la copa de los árboles, ya que casi dos de cada tres epífitas son orquídeas (Benzing 1990). De estas *Laelia speciosa* Kunth Schltr es una orquídea endémica de la parte central de México, típica de bosques de encino, principalmente *Quercus deserticola* y otros forofitos de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y la parte sureste del Altiplano Mexicano, se establece en climas templados a subhúmedos entre los 1250 y los 2500 m.s.n.m.

Además, es una de las orquídeas de mayor importancia cultural en México (Soto-Arenas 1994).

Existen varios estudios sobre la abundancia de ^{15}N en diferentes plantas por ejemplo: en pastos (Stewart et al. 2002; Schwinning et al. 2005; Temper et al. 2012), árboles (Jung et al. 1997; Stewart et al. 2002; Emmett et al. 1998; Dail et al. 2009; Ying-chung et al. 2010), hierbas y algunas epífitas vasculares pertenecientes a las familias Araceae, Bromeliaceae y Orchidaceae (Stewart et al. 2002; Hietz et al. 2002). Sin embargo, la información disponible sobre la interacción entre depósito de nitrógeno atmosférico resultado de la actividad humana con orquídeas epífitas neotropicales aún permanece escasa. De este modo, para poder estudiar la respuesta y las implicaciones que pudiese tener sobre *Laelia speciosa* el depósito de nitrógeno atmosférico es necesario conocer las fuentes que esta orquídea usa para su nutrición en lugares con diferentes usos del suelo, así como la respuesta fisiológica derivada del aumento progresivo del depósito de nitrógeno.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Área de estudio

El estudio fue llevado a cabo en dos sitios del estado de Michoacán, México. El primer sitio, denominado “campo” en el resto de este capítulo, fue el Cerro el Olvido municipio de Tzintzuntán (19° 37' 59" N, 101° 29' 09" O, a 2361 m.). Se encuentra a 30 kilómetros al oeste de Morelia, capital del estado de Michoacán. El sitio es un bosque de encino, dominado por *Quercus deserticola* Trel. (Fagaceae), especie que es el principal forofito de *Laelia speciosa* (Soto-Arenas 1994). La precipitación anual promedio es de 758 mm y las lluvias se presentan principalmente en junio, julio y agosto. Los vientos dominantes proceden del suroeste y noroeste. La temperatura promedio anual es de 16.3 °C (Normales meteorológicas 1971-2000, Servicio Meteorológico Nacional 2011).

El segundo sitio, denominado “ciudad”, fue el Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM campus Morelia (19° 38' 55.9" N; 101° 13' 45" O, a 1967 m), donde los vientos dominantes proceden del suroeste y noroeste, la precipitación anual promedio es de 773 mm y la temperatura promedio anual es de 16.3 °C (Normales meteorológicas 1971-2000, Servicio Meteorológico Nacional 2011). Allí, plantas provenientes de un sitio de rescate en Michoacán, en donde actualmente se extrae materiales para construcción, fueron expuestas durante 8 años en una casa de sombra del jardín botánico de la UNAM Morelia al ambiente de dicho centro urbano, estas plantas fueron mantenidas en su sustrato original (ramas de *Quercus deserticola*).

2.2.2. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad

El musgo *Braunia* sp. fue seleccionado para este estudio como bioindicador del depósito atmosférico de nitrógeno y de su señal isotópica en los sitios considerados, ya que la concentración interna de N en tejidos de musgos aumenta de manera proporcional a la magnitud del depósito de nitrógeno (Solga

et al. 2005; Wilson et al. 2009). Además, los musgos también presentan bajo fraccionamiento isotópico, o discriminación en contra del isotopo pesado, durante la absorción de nitrógeno, de manera que su $\delta^{15}\text{N}$ es similar al del depósito atmosférico del lugar donde crecen (Bragazza et al. 2005). Se tomaron muestras de *Braunia* sp. que crecía adyacente a las orquídeas (mismo sustrato) en cada sitio. Adicionalmente como control del depósito de nitrógeno atmosférico en el Cerro El Olvido se colectaron muestras del musgo que habita en roca caliza totalmente expuesta a la atmosfera denominado "roca". Estos musgos no reciben ningún aporte de materia orgánica al no existir vegetación cercana.

Se tomaron muestras de materia orgánica encontrada entre los pseudobulbos de las plantas colectadas y materia adyacente a las raíces, también se colectaron muestras de hojas del árbol huésped (*Quercus deserticola*) con el fin de precisar la fuente de nitrógeno que reciben las plantas localizadas en las diferentes posiciones del dosel.

2.2.3. Material vegetal

Con el propósito de comparar el contenido de carbono, la fuente de nitrógeno y el metabolismo fotosintético de plantas que habitan en el campo y la ciudad. Se tomaron muestras de 4 individuos de *Laelia speciosa* localizados en dos posiciones de las copas de los árboles (posición exterior, localizadas a una altura de 5 m y a 3 m de distancia del tronco principal; y posición interior, altura menor a 3 m y distancia menor a 1 m del tronco principal de *Quercus deserticola* del campo y de orquídeas localizadas en la casa de sombra en la ciudad. De cada planta se tomó la hoja más reciente, el pseudobulbo que la contenía, además de raíces recién formadas.

La historia del depósito de nitrógeno en el sitio de estudio fue determinada mediante la colecta de los 10 pseudobulbos más recientes correspondientes a la última década, de cada una de 4 plantas. Considerando que *Laelia speciosa* produce un pseudobulbo cada año, el cual es conservado durante varios años (Hernández 1992; Soto-Arenas 1994; Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007).

2.2.4. Análisis químicos.

El material vegetal fue lavado con agua destilada hasta eliminar toda materia ajena al tejido y fue secado durante 24 horas a 80°C en un horno de convección por gravedad y molido durante 10 minutos a máxima velocidad hasta conseguir la textura de un polvo fino en un molino de bola (Retsch MM300; Retsch, Vienna, Austria). Se pesaron 4 miligramos de cada muestra en una capsula de estaño la cual fue doblada hasta conseguir la forma de una semiesfera e introducida a un espectrómetro de masas Carlo Erba EA 1110 (CE Elantech, Lakewood, NJ, EE.UU). Se analizaron los siguientes parámetros: contenido de carbono, contenido de nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, así como la proporción de C/N de cada muestra.

Las proporciones isotópicas de las muestras son expresadas usando la fórmula:

$$\delta\text{‰} = (R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

donde R es la relación entre el isótopo pesado y el liviano (por ejemplo $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), R_{muestra} es la proporción en la muestra y $R_{\text{estándar}}$ es la proporción en el material estándar de composición conocida y única para cada isótopo.

2.2.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SigmaPlot 12.0 (SYSTAT software, Chicago IL. EE.UU 2011). Se efectuó un ANOVA a una vía o dos vías con el fin de comparar la composición isotópica, la razón C/N, así como el contenido de nitrógeno y carbono de los individuos de dos posiciones en el dosel y una tercera posición en la ciudad. El método Holm-Sidak fue empleado como prueba post-hoc. Los datos se presentan como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por cada posición).

2.3. Resultados

2.3.1. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad

Ni la posición en el dosel, ni el sitio representaron un factor determinante en el contenido de carbono y nitrógeno en *Braunia* sp. siendo de $37.32 \pm 0.91\%$ y $1.88 \pm 0.164\%$ de peso seco, respectivamente (cuadro 2.1). Los $\delta^{13}\text{C}$ de *Braunia* sp. no presentaron diferencia significativa entre las diferentes posiciones alcanzando $-26.1 \pm 0.5\text{‰}$ ($p < 0.05$). Los $\delta^{15}\text{N}$ de *Braunia* sp. en la ciudad cuyos valores alcanzaron $3.33 \pm 0.1\text{‰}$ presentó diferencia significativa con *Braunia* sp. del Cerro el Olvido ($p < 0.05$; exterior, interior y roca). La posición en el dosel mostró tener influencia en los $\delta^{15}\text{N}$ de *Braunia* sp. ya que los musgos de la posición exterior, con un $\delta^{15}\text{N}$ de $-4.67 \pm 0.95\text{‰}$, fueron los más empobrecidos y difirieron significativamente de aquellos de la posición interior que presentaron valores de $\delta^{15}\text{N}$ de $-1.7 \pm 0.11\text{‰}$ ($p < 0.05$). Sin embargo no se presentó diferencia entre los musgos de la posición exterior e interior con aquellos que crecen en las rocas que presentaron un $\delta^{15}\text{N}$ promedio de $-3.4 \pm 0.15\text{‰}$ (cuadro 2.1). Los tejidos de *Braunia* sp. presentaron una proporción de C/N de 21.5 ± 0.8 y no se observaron diferencias significativas entre las muestras provenientes de las distintas posiciones (cuadro 2.1).

Los $\delta^{15}\text{N}$ de la materia orgánica encontrada entre los pseudobulbos de plantas de la posición interior fueron de $-0.87 \pm 0.23\text{‰}$, no se hallaron rastros de materia orgánica en las plantas localizadas en la posición exterior. A su vez las hojas del árbol huésped (*Quercus deserticola*) alcanzaron valores de $\delta^{15}\text{N}$ de $-1.21 \pm 0.13\text{‰}$ (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Porcentaje de peso seco de carbono y nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y C/N en tejidos de *Braunia* sp. y materia orgánica del suelo del dosel en dos sitios y dos posiciones en el dosel, así como musgos provenientes de rocas del campo. Los datos son mostrados como promedio ± 1 . e.e. ($n = 4$ individuos por posición).

	%C	%N	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	C/N
<i>Braunia</i> sp (ciudad)	38.6 ± 0.6	2.01 ± 0.05	-23.6 ± 0.7	3.3 ± 0.1	20.2 ± 0.7
<i>Braunia</i> sp (Exterior)	35.4 ± 2.4	1.6 ± 0.3	-25.9 ± 0.9	-4.6 ± 0.9	23.3 ± 0.2
<i>Braunia</i> sp (Interior)	36.1 ± 1.0	2.2 ± 0.1	-26.6 ± 0.7	-1.7 ± 0.1	18.1 ± 1.04
<i>Braunia</i> sp. (Roca)	1.5 ± 0.03	39 ± 0.2	-28.3 ± 0.1	-3.4 ± 0.1	24.5 ± 0.3
Suelo del dosel	46.8 ± 0.6	1.4 ± 0.1	-25.4 ± 0.2	-0.8 ± 0.2	33.6 ± 2.7
Hojas de <i>Quercus</i>	45.9 ± 0.3	1.7 ± 0.1	-26.4 ± 0.2	-1.2 ± 0.1	26.2 ± 1.5

2.3.2 Contenido de carbono y nitrógeno.

El contenido de carbono de cada órgano (hoja, raíz y pseudobulbo) de *Laelia speciosa* fue $45.03 \pm 0.31\%$ del peso seco ($n = 4$ individuos por cada posición) no se encontró diferencia significativa entre posiciones del dosel ni con las plantas que crecen en la ciudad, tampoco se encontró diferencia significativa entre los órganos ($p > 0.05$; Figura 2.1A).

El contenido de nitrógeno de las hojas de *Laelia speciosa* fue igual en las plantas de la posición externa, interna y de la ciudad siendo este de $1.24 \pm 0.1\%$ de peso seco. De manera similar, el contenido de nitrógeno de los pseudobulbos, que fue de $0.54 \pm 0.1\%$ tampoco varió entre las plantas provenientes de las tres posiciones del dosel ($p > 0.05$; Figura 2.1B). El contenido de nitrógeno entre las raíces de plantas de la posición exterior y de la ciudad, que fue de $0.97 \pm 0.05\%$ (del peso seco), no presentó diferencias significativas (Figura 2.1B). En cambio, las raíces de las plantas de la posición interior presentaron un contenido de nitrógeno mayor ($P < 0.05$), alcanzando $1.69 \pm 0.44\%$ del peso seco (Figura 2.1B).

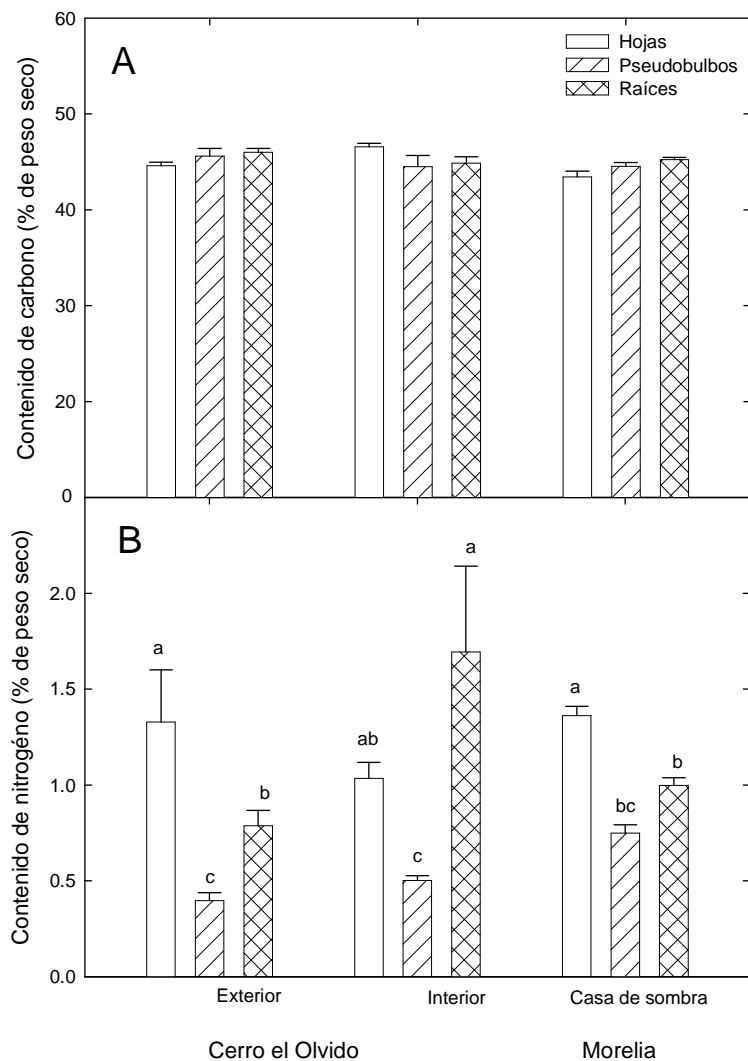


Figura 2.1. Contenido: de (A) carbono y (B) nitrógeno en individuos de *Laelia speciosa*. en dos sitios de Michoacán México. Los datos son mostrados como promedio \pm 1. e.e. (n = 4 individuos por posición). Las letras indican diferencias significativas entre lugares, posiciones y plantas.

2.3.3. Metabolismo fotosintético

Los $\delta^{13}\text{C}$ de *Laelia speciosa* no mostraron diferencia significativa entre órganos (hojas, pseudobulbos y raíces) o posiciones (exterior, interior y ciudad; $p > 0.05$; Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. $\delta^{13}\text{C}$ en hojas, raíces y pseudobulbos de *Laelia speciosa*. en dos sitios y dos posiciones en el dosel del Cerro El Olvido. Los datos son mostrados como promedio ± 1 . e.e. (n = 4 individuos por posición).

Órgano	Exterior	Interior	Casa de sombra
Hoja	$-16.80 \pm 0.2\text{b}$	$-18.93 \pm 0.6\text{b}$	$-16.53 \pm 0.4\text{b}$
Pseudobulbo	$-17.72 \pm 0.3\text{b}$	$-18.42 \pm 0.7\text{b}$	$-15.77 \pm 0.8\text{b}$
Raíz	$-17.55 \pm 1.0\text{b}$	$-16.66 \pm 0.9\text{b}$	$-16.99 \pm 0.5\text{b}$

2.3.4. $\delta^{15}\text{N}$ de *Laelia speciosa*

Los $\delta^{15}\text{N}$ en hojas de *Laelia speciosa* ubicadas en la posición exterior e interior no presentan diferencias entre sí alcanzando un $\delta^{15}\text{N}$ de $-3.35 \pm 0.4\text{‰}$ ($p > 0.05$; Figura 2.2). Las hojas de plantas localizadas en la ciudad cuyos valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron $5.6 \pm 0.2\text{‰}$ presentaron diferencias significativas con la posición exterior e interior ($p < 0.05$; Figura 2.2). Los pseudobulbos no presentaron diferencias significativas en los valores de $\delta^{15}\text{N}$ que fueron en promedio de $-2.8 \pm 0.45\text{‰}$ entre la posición exterior e interior del dosel (campo), pero sí con los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas de la ciudad que fueron de $5.5 \pm 0.01\text{‰}$ (Figura 2.2). A su vez, el $\delta^{15}\text{N}$ de las raíces de la posición exterior e interior que no mostraron diferencias significativas entre sí, cuyo valor fue de $-2.99 \pm 0.5\text{‰}$, pero sí se diferenciaron ($p < 0.05$) de aquellas plantas localizadas en la ciudad con un $\delta^{15}\text{N}$ de $3.68 \pm 0.7\text{‰}$ (Figura 2.2).

2.3.5. Proporción de carbono nitrógeno (C/N)

La proporción C/N de las hojas de plantas fue de 40.7 ± 2.3 y no se observaron diferencias significativas entre la posición exterior e interior ($p > 0.05$). Las hojas de plantas mantenidas en la ciudad alcanzaron una proporción

C/N de 32.97 ± 1.0 y la diferencia con las otras posiciones fue evidente ($p < 0.05$; Figura 2.2).

Los valores de C/N de los pseudobulbos de *Laelia speciosa* fueron significativamente diferentes entre las posiciones ($p < 0.05$). De este modo, aquellos que crecen en la posición exterior mostraron una proporción de C/N de 127.6 ± 16.3 , mientras que en los pseudobulbos de la posición interior fue de 93.5 ± 4.5 , y los pseudobulbos de plantas de la ciudad alcanzaron los valores promedio más bajos de 47.9 ± 9.5 (Figura 2.2). Las raíces de plantas que crecen en la posición exterior y en la ciudad no presentaron diferencia significativa entre sí alcanzando valores de C/N de 50.01 ± 1.9 ; no obstante, las raíces de plantas que crecen en la posición interior del dosel si presentaron diferencia en la proporción de C/N con las demás posiciones siendo esta de 28.1 ± 5.8 ($p < 0.05$; Figura 2.2).

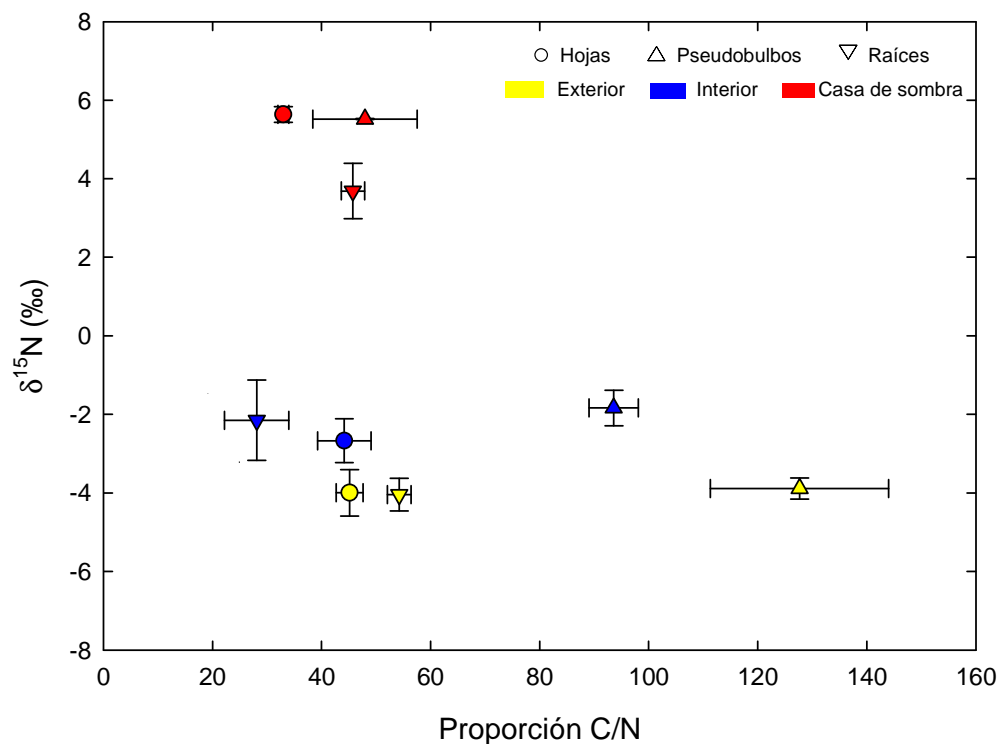


Figura 2.2. Proporción de C/N y $\delta^{15}\text{N}$ en órganos de *Laelia speciosa*. Provenientes de dos sitios del estado de Michoacán. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. (n = 4 individuos por posición).

2.3.6. Historia del depósito de nitrógeno de *Laelia speciosa*

Las secuencias de pseudobulbos mostraron que aquellos situados en la posición exterior e interior del dosel no tienen diferencia significativa entre sí; $\delta^{15}\text{N}$ de $-4.37 \pm 0.09\text{‰}$ y $-2.04 \pm 0.18\text{‰}$, respectivamente. Los $\delta^{15}\text{N}$ de los pseudobulbos de las plantas localizadas en la ciudad aumentan progresivamente desde un mínimo de $-0.1 \pm 1.6\text{‰}$ en el pseudobulbo más antiguo (número 1 de la figura 2.3), mientras que en el segundo pseudobulbo el $\delta^{15}\text{N}$ fue de $-0.08 \pm 1.6\text{‰}$, en el tercer pseudobulbo fue de $1.14 \pm 1.9\text{‰}$ y en el cuarto fue de $3.0\text{‰} \pm 0.1$. A partir del quinto pseudobulbo la señal isotópica se torna más positiva alcanzando su máximo y manteniéndose estable hasta el decimo pseudobulbo que fue el más recientemente formado; el valor de $\delta^{15}\text{N}$ de los 6 últimos pseudobulbos formados fue de $4.76 \pm 0.22\text{‰}$ ($p > 0.05$; Figura 2.3).

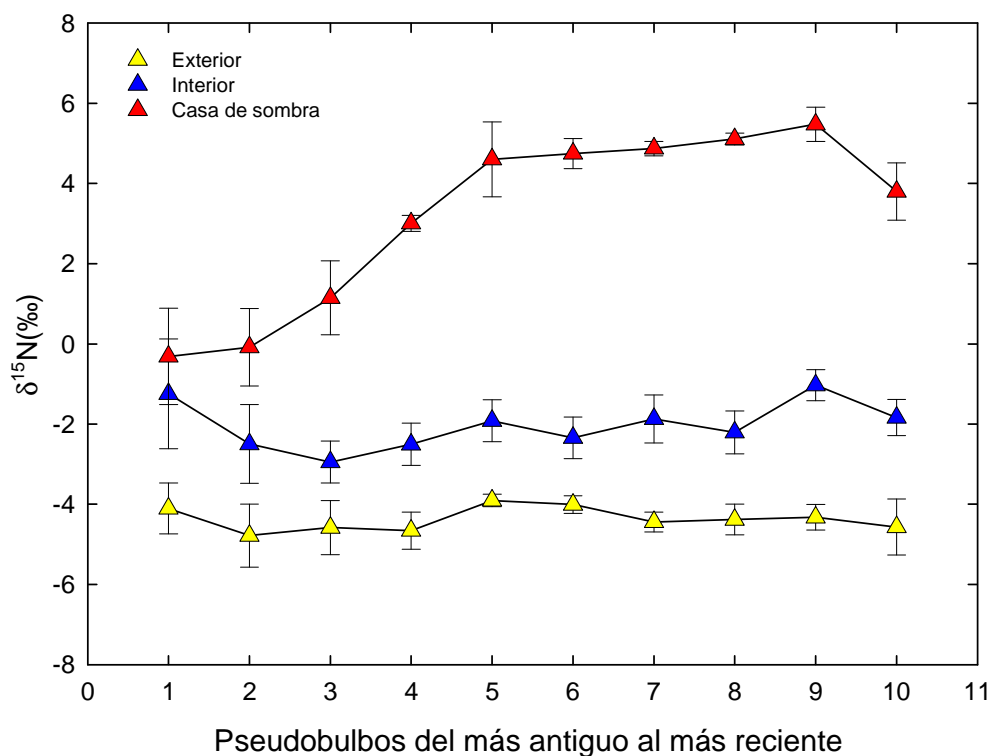


Figura 2.3. $\delta^{15}\text{N}$ en series de 10 pseudobulbos de *Laelia speciosa*, donde el número 1 representa el más antiguo y el número 10 el más reciente. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. ($n = 4$ individuos por lugar y posición).

2.3.7. La proporción de C/N en el cambio de hábitat de *Laelia speciosa*

Las series de pseudobulbos de la posición exterior e interior mostraron diferencia significativa entre sí, alcanzando valores de C/N de 134.5 ± 2.7 y 99.6 ± 2.6 respectivamente ($p < 0.05$). La proporción C/N de la serie de pseudobulbos de plantas en la ciudad no mostró diferencia significativa en los primeros 8 pseudobulbos con las otras posiciones siendo estos de 130.4 ± 2.1 ($p > 0.05$), pero a partir del noveno pseudobulbo los valores disminuyeron a 81.1 ± 10.8 en el noveno y alcanzaron valores de 48.4 ± 13.5 en el decimo pseudobulbo el cual es significativamente diferente ($p < 0.05$; Figura 2.4).

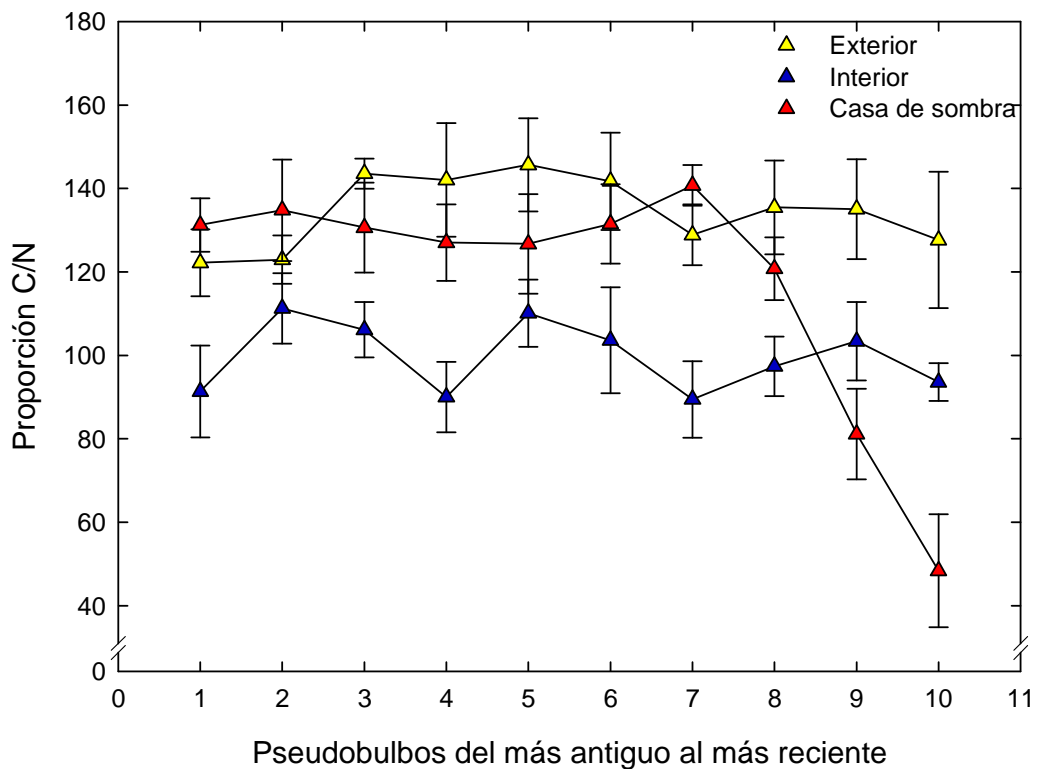


Figura 2.4. Proporción C/N en series de 10 pseudobulbos de *Laelia speciosa* donde el número 1 representa el más antiguo y el número 10 el más reciente; en dos posiciones del dosel y de plantas de rescate creciendo en la ciudad. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. ($n = 4$ individuos por lugar y posición).

2.4. Discusión

2.4.1. Fuentes de nitrógeno en el campo y la ciudad

Los musgos mostraron un contenido de carbono menor al encontrado en la orquídea en cerca de un 8%, esto puede ser el resultado de que las plantas no vasculares carecen de cutícula, lo cual permite que el agua entre y salga de los tejidos libremente. En consecuencia son incapaces de mantener un potencial hídrico constante que les impide mantener un intercambio gaseoso continuo en consecuencia muestran menor contenido de C que las plantas vasculares (Titus y Wagner 1984).

En este estudio no se encontró diferencia entre el contenido de nitrógeno de musgos ubicados en la ciudad con aquellos del campo, esto sugiere que la concentración de nitrógeno atmosférico en el lugar de estudio en la ciudad de Morelia no es significativamente alta para que se pueda apreciar una diferencia en el contenido de nitrógeno entre campo y la ciudad. La falta de diferencia entre sitios de estudio concuerda con los hallazgos hechos en dos especies de musgos *Braunia secunda* y *Thuidium delicatulum* que después de 13 semanas de recibir riego con diferentes dosis de N no mostraron cambios en el contenido tisular de N (Barrios 2009). Por otro lado, los $\delta^{13}\text{C}$ de los musgos fueron típicos de plantas C_3 los cuales oscilan entre -37.5‰ a -21.3‰ (Teeri 1981; Elheringer y Osmond 1989).

A su vez el musgo *Braunia* sp. no mostró diferencia significativa en la proporción C/N en ninguna de las posiciones y sitios evaluados. Esto contrasta con otros estudios, como por ejemplo en el cual musgos del centro de Londres tienen una proporción C/N de 32 mientras que aquellos que se encuentran a mayor distancia al centro de la ciudad alcanzan valores de C/N de 56 (Power y Collins 2010). Lo que sugiere que el depósito de nitrógeno de Morelia no es lo suficientemente alto para que pueda ser registrado en los tejidos de *Braunia* sp.

La materia orgánica del suelo del dosel se descompone gracias a que en él se encuentra una gran variedad de microorganismos cuya actividad descomponedora influye en la composición isotópica del sustrato, en particular los $\delta^{15}\text{N}$ (Hietz et al. 1999; 2002). De modo que la señal isotópica de las plantas que tienen acceso al suelo del dosel tendería a ser más positiva que las plantas que dependen exclusivamente de la atmósfera. En este estudio no se encontró materia orgánica en las ramas más delgadas y alejadas del tronco principal, además los $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas de las diferentes posiciones no mostraron diferencia entre sí ni con la materia orgánica, con lo que se sugiere que la actividad microbiana en el suelo del dosel del sitio estudiado es baja.

2.4.2. Contenido de carbono y nitrógeno.

El contenido típico de carbono de una planta es de 45% del peso seco (Epstein 1972; 1999), aunque este porcentaje puede variar dependiendo del órgano, del estado de desarrollo y del hábitat (Hew y Yong 2004). El contenido de carbono puede variar de 40% en especies tropicales a 61% en especies subtropicales y mediterráneas (Thomas y Martin 2012). En orquídeas epífitas a 2000m en un bosque de Costa Rica es de 46% de carbono (Cardelús y Mack 2010). Los individuos de *Laelia speciosa* en el campo y la ciudad en el presente estudio tuvieron un contenido de carbono del 45.03% lo que muestra una correspondencia con lo encontrado en otras plantas epífitas.

El contenido de nitrógeno del tejido vegetal generalmente es de 1.5% del peso seco, aunque puede variar de 1.6 a 2.4% en monocotiledóneas herbáceas (Chapman 1965; Mills y Jones 1996 Epstein 1972; 1999). Aquí se encontró una variación entre los diferentes órganos de *Laelia speciosa*. En particular, los pseudobulbos mostraron el menor contenido de nitrógeno debido a que este órgano de almacenamiento, sirve principalmente como reservorio de almidón, aunque también puede almacenar en menor cantidad N, P, K (Davidson 1960; Hew y Ng 1996; Ng y Hew 2000).

Especies de orquídeas epífitas de Veracruz, al este de México, contienen 1.8% de N (Hietz et al.1999). Mientras que en Costa Rica el contenido de N es de 1.15% (Cardelús y Mack 2010) y en el amazonas es de 0.8% (Mardegan 2011). Dichas especies crecen en ambientes donde las actividades industriales son pequeñas, por lo que su principal fuente de N es el aire limpio. El contenido de nitrógeno de nitrógeno en *Laelia speciosa* en este estudio fue de 1.24% concuerda con lo encontrado en otras especies epífitas y sugiere que no tienen un aporte de nitrógeno diferente al aire limpio del campo.

El velamen es una estructura típica de las orquídeas epífitas para la obtención de nutrientes y agua en el dosel y consiste de varias capas de células muertas rodeando la raíz (Madison 1977). El mayor contenido de nitrógeno en las raíces de plantas que crecen en la posición interior, está relacionado con el contacto que las raíces (velamen) establecen con el suelo del dosel, el cual posee mayor contenido de N resultado de la materia en descomposición que allí se acumula y descompone. Sin embargo, el contenido de nitrógeno de la materia orgánica encontrada junto con las orquídeas es menor al de estas raíces, esto sugiere que puede haber una fuente adicional no evaluada aquí tal como micorrizas. Por el contrario, las plantas de la posición exterior las cuales no tienen acceso a la materia orgánica que se puede acumular en las ramas más gruesas, y su única fuente de nitrógeno es la atmósfera mostraron tener menor contenido de N, en esta posición el velamen de la raíz no tiene acceso a la misma cantidad de nitrógeno que las plantas de la posición interior. Asimismo, las raíces de las plantas de la ciudad cuya fuente primordial de N es la atmósfera al igual que las plantas en la posición exterior, y al igual que estas presentaron un contenido de nitrógeno menor que el de las plantas de la posición interior.

2.4.2. Metabolismo fotosintético

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en órganos de *Laelia speciosa* en el Cerro El Olvido y Morelia están en un rango de -18.93‰ y -15.77‰ , estos valores están incluidos en el rango establecido para plantas CAM que exhiben valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre

-22‰ y -12‰ (Elheringer y Osmond, 1989). Las orquídeas epífitas que habitan a altitudes mayores a 1500 metros sobre el nivel del mar presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ más cercanos a plantas C_3 que a plantas CAM (Hietz et al. 1999; Silvera et al. 2009). Pero debido a la cantidad de lluvia recibida por estas plantas en la región de estudio cerca de 1000 mm al año expresan fotosíntesis CAM que se evidencia en sus valores de $\delta^{13}\text{C}$ (Avadhani y Arditti, 1981; Avadhani et al. 1982). Del mismo modo que otras especies del género *Laelia* exhiben valores de $\delta^{13}\text{C}$ típicos de plantas CAM pero de zonas más bajas, como por ejemplo, *L. rubescens* tiene valores de $\delta^{13}\text{C}$ de -16.6‰ (Silvera et al. 2010). Al comparar los valores $\delta^{13}\text{C}$ entre plantas mantenidas en la ciudad y del campo no se observó diferencia ya que están localizadas en altitudes similares por encima de los 1900 metros y debajo de los 2400 metros y reciben cantidades de lluvia similares, por lo que están expuestas a las mismas limitaciones de agua resultando en la expresión de fotosíntesis CAM (Silvera et al. 2009).

2.4.3. $\delta^{15}\text{N}$ de *Laelia speciosa*

Las plantas que crecen cerca de fuentes contaminantes como carreteras e industrias presentan $\delta^{15}\text{N}$ positivos, pues se encuentran enriquecidas en comparación con las plantas de lugares donde estas actividades son considerablemente menores (Moore 1977; Ammann et al. 1999; Power y Collins. 2010). Consistente con este hecho los $\delta^{15}\text{N}$ de plantas localizadas en Morelia fueron positivos mientras que los $\delta^{15}\text{N}$ de plantas provenientes del Cerro El Olvido fueron negativos. Esto sugiere que la señal isotópica del nitrógeno de la ciudad y que es asimilado por las plantas proviene principalmente de actividad industrial, mientras que las plantas que habitan en el campo asimilaron el nitrógeno atmosférico del aire limpio del Cerro El Olvido que no tiene actividad industrial (Moore 1977; Ammann et al. 1999; Power y Collins 2010). Los $\delta^{15}\text{N}$ de hojas de *Laelia speciosa* del Cerro el Olvido coincidieron con los de *Anthurium* sp., *Stenospermation* sp., *Aechmea* sp., *Guzmania* sp., *Streptocalyx* sp., y cuatro orquídeas *Encyclia* sp., *Octomeria* sp., *Maxillaria* sp.1 y sp.2 en La Amazonia

Brasileña -3.90‰ , los de *Scaphyglottis* sp. en un bosque de Costa Rica (-3.9‰ a -4.3‰) y los de *Ornithocephalus inflexus*, *Epidendrum longipetalum*, y *E. polyanthum* en un bosque de Veracruz (-4.2‰ ; Hietz et al. 1999; Wania et al. 2002; Cardelús y Mack 2010; Mardegan et al. 2011). El hecho de que los $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas en el campo fueron similares independientemente de su posición en el dosel sugiere que el nitrógeno que están absorbiendo es principalmente atmosférico. Estos resultados concuerdan con lo hallado en un bosque de Costa Rica donde orquídeas, bromelias y helechos presentaron $\delta^{15}\text{N}$ similares independientemente de su posición en el dosel (Wania et al. 2002).

Los $\delta^{15}\text{N}$ de tejidos de las plantas resultan del llamado fraccionamiento isotópico durante la absorción y asimilación del nitrógeno y el $\delta^{15}\text{N}$ de la fuente (Handley y Raven, 1992; Evans, 2001). El fraccionamiento isotópico entre la planta y su sustrato depende de los rasgos fisiológicos de la planta, de la forma química del nitrógeno y de la concentración externa de N (Robinson 2001). Debido a que no se encontraron diferencias entre los $\delta^{15}\text{N}$ de las hojas, pseudobulbos y raíces de *Laelia speciosa* en la ciudad, se concluye que el fraccionamiento isotópico durante el proceso de translocación entre órganos es muy bajo o ausente; estos resultados sugieren que esta orquídea no discrimina en contra del ^{15}N al momento de la absorción de nitrógeno con la concentración actual de nitrógeno atmosférico en Morelia.

2.4.4. Proporción de carbono nitrógeno (C/N)

La proporción C/N indica la relación entre la masa de carbono y la masa de nitrógeno presente en un compuesto, es un indicador que ayuda a entender la cantidad de nitrógeno presente en un tejido. Por ejemplo una proporción C/N de 10:1 significa que hay diez unidades de carbono por cada unidad de nitrógeno en la sustancia. La proporción C/N en hojas de orquídeas epífitas de la Amazonia Brasileña alcanzan valores de 56 (Mardegan et al. 2010). Mientras que los de especies de Costa Rica son de 43.6 (Cardelús y Mack 2010). Dichos valores son similares a los encontrados en hojas de *Laelia speciosa* en este estudio. Sin

embargo, la proporción C/N de los pseudobulbos de plantas del campo fue mayor que en los de plantas de la ciudad, esto sugiere la acumulación del nitrógeno extra recibido del depósito de nitrógeno de la ciudad en los pseudobulbos. La proporción C/N encontrada en musgos de las dos posiciones concuerda con lo encontrado en plantas epífitas de Costa Rica en las cuales los valores de C/N en cuatro posiciones del dosel fueron 24 (Wania et al. 2002). Lo que supondría mayor sensibilidad por parte de la orquídea al depósito de nitrógeno que el musgo, apreciable con la proporción de nitrógeno en los pseudobulbos.

2.4.5. Historia del depósito de nitrógeno de *Laelia speciosa*

En las series de pseudobulbos de las plantas provenientes del sitio de rescate en el campo que fueron mantenidas en la ciudad durante varios años, se observó que los pseudobulbos más antiguos originados en el campo conservaron los $\delta^{15}\text{N}$ propios de orquídeas que asimilaron nitrógeno proveniente de aire limpio similares a los que se observaron en los pseudobulbos de las plantas del Cerro El Olvido. Sin embargo, con el traslado de las plantas a la ciudad, la abundancia de ^{15}N de los nuevos pseudobulbos aumentó hasta alcanzar valores positivos típicos de plantas que crecen en centros urbanos. Estos asimilaron el poco nitrógeno atmosférico que se deposita en la ciudad de Morelia.

De acuerdo a los datos se puede afirmar que al menos 7 de los 10 pseudobulbos fueron producidos en la ciudad. Los primeros pseudobulbos formados después del traslado a la ciudad no poseen el $\delta^{15}\text{N}$ típico de la ciudad, sino que tienen una combinación del $\delta^{15}\text{N}$ del campo y de la ciudad. De este modo se puede apreciar como los pseudobulbos más viejos reasignan el poco nitrógeno a aquellos que están en proceso de formación y en este caso asignan el nitrógeno adquirido en el campo combinándolo con el nitrógeno absorbido en la ciudad, pero después de varios años y varios pseudobulbos el nitrógeno del campo es agotado quedando únicamente el absorbido en la ciudad.

2.4.6. La proporción de C/N en el cambio de hábitat de *Laelia speciosa*

La acumulación de nitrógeno en plantas debido al incremento en el suministro de este nutriente ha sido ampliamente descrita, así por ejemplo en musgos sometidos a dosis crecientes de N en un gradiente de depósito atmosférico presentan una proporción C/N distintiva de acuerdo a la concentración atmosférica del lugar donde se encuentran (Solga et al. 2005; Wilson et al. 2009; Power y Collins 2010). La disminución en la proporción C/N en los pseudobulbos formados en la ciudad es el resultado de la suma entre el aporte de N de pseudobulbos más antiguos y el aporte de N que fue asimilado del depósito atmosférico de Morelia como lo sugieren los resultados de isótopos de nitrógeno (Whigham 1984). Adicionalmente estos pseudobulbos muestran un proceso de acumulación de N proveniente del depósito atmosférico de Morelia en los dos pseudobulbos más recientes. Como resultado de la capacidad de almacenamiento de estos órganos (Hew y Ng 1996; Ng y Hew 2000).

2.5. Conclusiones

- La principal fuente de nitrógeno para *Laelia speciosa* en el campo y en la ciudad fue el depósito atmosférico, aunque la señal isotópica varía según el tipo de actividad humana del sitio donde habitan.
- La posición en el dosel no tuvo efecto sobre la fuente de nitrógeno que usa *Laelia speciosa* en el campo. El contenido de carbono y nitrógeno no se ve influenciado por la posición en el dosel, a excepción de las raíces de la posición interior.
- *Laelia speciosa* presentó $\delta^{13}\text{C}$ típicos de plantas CAM, dichos valores fueron constantes en cada uno de los sitios y posiciones del dosel, con lo que la posición en el dosel no es un factor que determina los $\delta^{13}\text{C}$.
- La historia del depósito de nitrógeno registrada en los pseudobulbos de *L. speciosa* muestra que estas plantas absorben el nitrógeno del lugar que habitan y que los pseudobulbos de la ciudad están acumulando nitrógeno atmosférico proveniente de las actividades industriales en Morelia a pesar de su baja magnitud.
- $\delta^{15}\text{N}$ es un indicador efectivo para comparar las fuentes de nitrógeno que usa *Laelia speciosa* en los diferentes ambientes que habita y su estrecha relación con el tipo de actividad humana cercana.

2.6. Referencias

- Abril A.B. y Bucher E.H. 2009. A comparison of nutrient sources of the epiphyte *Tillandsia capillaries* attached to trees and cables in Cordoba, Argentina. *Journal of Arid Environments*. 73:393–395
- Ammann M., Siegwolf R., Pichlmayer F., Suter M., Saurer M. y Brunold C. 1999. Estimating the uptake of traffic-derived NO₂ from ¹⁵N abundance in Norway spruce needles. *Oecologia*. 118:124–131.
- Andrade J.L. y Nobel P.S. 1997. Microhabitats and water relations of epiphytic cacti and ferns in a lowland neotropical forest. *Biotropica*. 29:3,261-270.
- Avadhani P.N. y Arditti J. 1981. Carbon fixation in orchids. In: *Proceedings of World Orchid Symposium*, pp. 79–85, Harbour Press, Sydney.
- Avadhani P.N.; Goh C.J.; Rao A.N. y Arditti J. 1982. Carbon fixation in orchids. En: *Orchid Biology, Reviews and Perspectives II*, Arditti J. (Ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Benzing D.H. 1990. *Vascular epiphytes: general biology and related biota*, Cambridge University Press, ISBN 0-521-26630-0, Cambridge, England.
- Benzing D.H. 1998. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change*. 39:519–540.
- Bragazza L., Limpens J., Gerdol R., Grosvernier P., Hájek M., Hájek T., Hajkova P., Hansen I., Iacumin P., Kutnar L., Rydin H. y Tahvanainen T. 2005. Nitrogen concentration and $\delta^{15}\text{N}$ signature of ombrotrophic *Sphagnum* mosses at different N deposition levels in Europe. *Global Change Biology*. 11:106–114.
- Cardelús C.L. y Mack M.C. 2010. The nutrient status of epiphytes and their host trees along an elevational gradient in Costa Rica. *Plant Ecology*. 207:25–37.

- Chapman H.D. 1965. Diagnostic Criteria for plants and Soils. Berkely, University of California Division of Agricultural Sciences. p.p. 1–793.
- Cushman J.C. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*. 127:1439–1448.
- Dail D.B., Holinger D.Y., Davidson E.A. y Fernandez I. 2009. Distribution of nitrogen-15 tracers applied to the canopy of a mature spruce-hemlock stand, Howland, Maine, USA. *Oecologia*. 160:589–599.
- Davidson O.W. 1960. Principles of orchid nutrition. En: Proceedings of the Third World Orchid Conference. Staples Printers Ltd, Rochester, p.p. 224–233.
- Ehleringer J.R. y Osmond B.O. 1989. Stable isotopes, En: *Plant physiological ecology*, Pearcy R.W., Ehleringer J., Mooney H.A. y Rundel P.W. (Eds), p.p. 281–300, Chapman & Hall, ISBN 0713126906, London, England.
- Emmett B.A., Kjenaas O.J., Gundersen P., Koopmans C., Tietema A. y Sleep D. 1998. Natural abundance of ¹⁵N in forests across a nitrogen deposition gradient. *Forest Ecology and Management*. 101:9–18.
- Epstein E. 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Wiley, New York.
- Epstein E. 1999. Silicon. *Annual. Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:641–664.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., Martinelli L.A., Seitzinger S.P., Sutton M.A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320:889–92.
- Griffiths H. 1992. Carbo isotopic discrimination and the integration of carbon assimilation pathways in terrestrial CAM plants. *Plant cell and environment*. 15:1051–1062.

- Hágsater E., Soto-Arenas M.A., Salazar G.A., Jimenez R.M., López-Rosas M.A. y Dressler R.L. 2005. Las orquídeas de México. Chinoín Productos Farmacéuticos, S.A. de C.V. México.
- Handley L.L. y Raven J.A. 1992. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant, Cell and Environment* 15:965–985.
- Hernández-Apolinar M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. (Orchidaceae). Tesis (licenciatura). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hew C.S. y Ng C.K.Y. 1996. Changes in mineral and carbohydrate content in pseudobulbs of the C₃ epiphytic orchid hybrid *Oncidium Goldiana* at different growth stages. *Lindleyana*. 11:125–134.
- Hew C. y Yong W. 2004. The physiology of tropical orchids in relation to the industry 2nd ed. ISBN 981-238-801-X.
- Hietz P., Wanek W. y Popp M. 1999. Stable isotopic composition of carbon and nitrogen content in vascular epiphytes along altitudinal transect. *Plant, Cell and Environment*. 22:1435–1443.
- Hietz P., Ausserer J. y Schindler G. 2002. Growth, maturation and survival of epiphytic bromeliads in a Mexican humid montane forest. *Journal of Tropical Ecology*. 18:177–191.
- Hietz P., Wanek W., Wania R. y Nadkarni N.M. 2002. Nitrogen-15 natural abundance in a montane cloud forest canopy as an indicator of nitrogen cycling and epiphyte nutrition. *Oecologia*. 131:350–355.
- Hofstede R.G.M. Wolf J.H.D. 1993. Epiphytic biomass and nutrient status of a Colombian upper montane rain forest. *Selbyana* 14:37–45.

- Jung K., Gebauer G., Gehre M., Hoffmann D., Weissflog L. y Schüürmann G. 1997. Anthropogenic impacts on natural nitrogen isotope variations in *Pinus sylvestris* stands in an industrially polluted area. *Environmental Pollution*. 97:175–181.
- Lube S. y Zotz G. 2003. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology*. 17:598–604.
- Mardegan S.F., Nardoto G.B., Higuchi N., Reinert F. y Martinelli L.A. 2011. Variation in nitrogen use strategies and photosynthetic pathways among vascular epiphytes in the Brazilian Central Amazon. *Revista Brasileira de Botânica*. 34(1):21–30.
- Mills H.A. y Jones J.B. Jr. 1996. Plant Analysis Handbook II. MicroMacro Publishing Athens Georgia, U.S.A. 422 p.
- Moore H. 1977. The isotopic composition of ammonia, nitrogen dioxide, and nitrate in the atmosphere. *Atmospheric Environment*. 11:1239–1243.
- Nadkarni N.M., Lawton R.O., Clark K.L., Matelson T.J. y Schaefer D. 2000. Ecosystem ecology and forest dynamics. In *Monteverde – Ecology and Conservation of a Tropical Cloud Forest* (Eds N. Nadkarni & N. T. Wheelwright), p.p. 303–350. Oxford University Press, New York, USA.
- Newman B. 2009. Orchids as indicator of ecosystem health in urban bushland fragments. Tesis doctoral. Murdoch University Australia.
- Ng C. y Hew C. 2000. Orchid pseudobulbs 'false' bulbs with a genuine importance in orchid growth and survival! Review. *Scientia Horticulturae*. 83:165–172.
- Nobel P.S. 1991. Achievable productivities for certain CAM plants: basis for high values compared with C3 and C4. *New Phytology*. 119:183–205.

- Pearson J., Wells D.M., Seller K.J., Bennett A., Soares A., Woodall J. y Ingrouille M. J. 2000. Traffic exposure increases natural ^{15}N and heavy metal concentrations in mosses. *New Phytologist*. 147(2):317–326.
- Phoenix G.K., Hicks W.K., Cinderby S., Kuylenstierna C.I., Stock W.D., Dentener FJ., Giller K.E., Austin A.T., Lefroy D.B., Gimeno B.S., Ashmore M.R. y Ineson P. 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: the need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology*. 12:470–476.
- Power S.A. y Collins C.M. 2010. Use of *Calluna vulgaris* to detect signals of nitrogen deposition across an urban–rural gradient. *Atmospheric Environment*. 44(14):1772–1780
- Servicio Meteorológico Nacional. Normales meteorológicas 1971-2000. . Consultado el 6/05/2012.
- Silvera K., Santiago L.S.; Cushman J.C. y Winter, K. 2009. Crassulacean acid metabolism and epiphytism linked to adaptive radiations in the Orchidaceae. *Plant Physiology*. 149(4):1838–1847.
- Silvera K., Santiago L.S., Cushman J.C. y Winter K. 2010. The incidence of crassulacean acid metabolism in Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: a checklist of the flora of Panama and Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 163(2):194–222.
- Schwinning S., Starr B., Wojcik N., Miller M., Ehleringer J. y Sanford R. 2005. Effects of Nitrogen Deposition on an Arid Grassland in the Colorado Plateau Cold Desert. *Rangeland Ecology Management*. 58:565–574.
- Solga A., Burkhardt J., Zechmeister H.G. y Frahm J.P. 2005. Nitrogen content, ^{15}N natural abundance and biomass of the two pleurocarpous mosses *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt. And *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr. in relation to atmospheric nitrogen deposition. *Environmental Pollution*. 134:465–473.

- Soto-Arenas M. 1994. Population studies in Mexican orchids. En: Pridgeon A.M. (eds.) Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Glasgow. HMSO Publ.
- Soto-Arenas M.A. y Solano-Gómez A.R. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. En: Soto-Arenas M.A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Stewart G.R., Aida M.P.M., Joly C.A. y Schmidt S. 2002. Impact of point source pollution on nitrogen isotope signatures ($\delta^{15}\text{N}$) of vegetation in SE Brazil. *Oecologia*. 131:468–472.
- Teeri J.A. 1981. Stable carbon isotope analysis of mosses and lichens growing in xeric and moist habitats. *Bryologist*. 84:82–84.
- Templer P.H., Pinder R.W. y Goodale C.L. 2012. Effects of nitrogen deposition on greenhouse-gas fluxes for forests and grasslands of North America. *Frontier Ecology Environment* 10(10):547–553.
- Thomas S.C. y Martin A.R. 2012. Carbon Content of Tree Tissues: A Synthesis. *Forests*. 3(2):332–352.
- Titus J.E. y Wagner D.J. 1984. Carbon Balance for Two Sphagnum Mosses: Water Balance Resolves a Physiological Paradox. *Ecological Society of America*. 65(6):1765–1774.
- Vance E.D. y Nadkarni N.M. 1990. Microbial biomass and activity in canopy organic matter and the forest floor of a tropical cloud forest. *Soil Biol Biochem* 22:677–684.

- Vingiani S., Adamo P. y Giordano S. 2004. Sulphur, nitrogen and carbon content of *Sphagnum capillifolium* and *Pseudevernia furfuracea* exposed in bags in the Naples urban area. *Environmental Pollution*. 129(1):145–158.
- Wania R., Hietz P. y Wanek W. 2002. Natural ^{15}N abundance of epiphytes depends on the position within the forest canopy: source signals and isotope fractionation. *Plant, Cell and Environment*. 25:581–589.
- Whigham D.F 1984. Biomass and Nutrient Allocation of *Tipularia Discolor* (Orchidaceae). *Oikos*. 42(3):303–313.
- Wilson D., Stock W.D. y Hedderson T. 2009. Historical nitrogen content of bryophyte tissue as an indicator of increased nitrogen deposition in the Cape Metropolitan Area, South Africa. *Environmental Pollution*. 157:938–945.
- Ying-Chun L., Hou-Bao F., Yan-Yan L., Wen-Fei L. y Ying-Hong Y. 2010. Effects of simulated nitrogen deposition on growth and photosynthesis of 1-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) seedlings. *Acta Ecologica Sinica* 30:150–154.
- Zotz G., Bogusch W., Hietz P. y Ketteler N. 2010. Growth of epiphytic bromeliads in a changing world: the effects of CO_2 , water and nutrient supply. *Acta Oecologica*. 36:659–665.

Capítulo 3

Efectos fisiológicos del depósito de nitrógeno simulado sobre *Laelia speciosa*

“El momento elegido por el azar vale siempre más que el momento elegido por nosotros mismos.”.

PROVERBIO CHINO

“Amat victoria curam.”.

ANONIMO



3.1. Introducción

El nitrógeno (N) es un elemento esencial en la nutrición vegetal. Las especies de muchos ecosistemas terrestres están adaptadas a condiciones de baja disponibilidad de N, una condición que a menudo conduce a comunidades de plantas con alta diversidad de especies (Bobbink et al. 1998). El N que es empleado por los ecosistemas se deriva de tres fuentes principales: fijación biológica, mineralización y depósito atmosférico (Bobbink et al. 2010). Antes de la agricultura intensiva y de la revolución industrial, el depósito atmosférico de nitrógeno era de alrededor de 15 Tg N año⁻¹ en 1860, sin embargo éste aumentó a 156 Tg N año⁻¹ en 1995 y más recientemente a 187 Tg N año⁻¹ en 2005 siendo una de las fuentes preponderante de N (Galloway et al. 2008).

El factor principal que produce el cambio en el ciclo global del nitrógeno es el incremento anual en la liberación de nitrógeno reactivo (Nr) debido a la producción y consumo de alimentos y energía (Galloway et al. 2004). El nitrógeno reactivo (Nr) incluye todas las formas biológicamente activas, químicamente reactivas y compuestos de N activos en la atmósfera y en la biosfera. Así, el Nr incluye formas reducidas de N (NH₃, NH₄⁺), formas inorgánicas oxidadas (NO_x, HNO₃, NO₂, NO₃⁻) y compuestos orgánicos como urea, amidas, aminoácidos y proteínas (Bobbink et al. 2010). Las mayores fuentes del NO_x son la quema de combustibles fósiles y biomasa (carbón y leña); mientras que las actividades agrícolas (producción de fertilizantes y abono) son las principales fuentes de NH₃ (Galloway et al. 2004).

Las consecuencias del cambio en el ciclo y depósito de nitrógeno en ecosistemas han sido documentados en Europa y Norte América donde distintas comunidades han sufrido pérdida de especies, y su composición es similar a los de sitios con alta disponibilidad de N (Bobbink et al. 1998; 2010).

El nitrógeno puede presentar efectos positivos como el aumento de la producción primaria neta, pero puede causar efectos negativos a largo plazo cuando el N satura los sistemas naturales, siendo las formas reducidas (amoníaco

y amonio) las que pueden presentar mayores efectos en las plantas que crecen en ambientes bajo grandes aportes de nitrógeno (Roelofs et al. 1996; Kleijn et al. 2008; Wei et al. 2012). Una vez que se incrementa la disponibilidad de amonio, este compuesto puede ser tóxico para las plantas, especialmente para aquellas que habitan en lugares donde el nitrato había sido la forma dominante. Como resultado, se observa un desarrollo muy pobre en raíces y brotes, sobre todo en especies sensibles de hábitats con un pH entre 4.5 y 6.5 (Bobbink et al. 2010).

Las epífitas son algunas de las especies más sensibles a cambios ambientales y son biomonitores particularmente sensibles a la contaminación atmosférica por N (Benzing 1998; Stewart et al. 2002; Zotz y Bader 2009). Por ejemplo las epífitas de zonas cercanas a centros urbanos y cultivos han mostrado efectos negativos a menudo asociados a altas concentraciones de N atmosférico (Pearce y Van der Wal 2008). Altas concentraciones de NH_3 o NO_3 puede producir cambios en la química de la corteza del árbol huésped, modificando la estructura de especies de dicho hábitat epifito (por plantas que crecen únicamente en lugares ricos en compuestos de nitrógeno asimilable) e incrementando o eliminando especies acidofíticas (plantas que crecen en sitios ácidos; Bobbink et al. 2010). Por ejemplo, *Lobaria pulmonaria* una especie epifita de liquen que fue estudiada en un área con magnitudes de depósito de N que iban desde 10 a 50 kg de $\text{N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, mostró que prefiere los lugares con tasas de depósito menores a 20 kg de $\text{N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Mitchell et al. 2004).

Hasta el momento los trabajos en depósito de nitrógeno se han llevado a cabo en países Europeos y en Estados Unidos desde 1980 (Vitousek et al. 1997; Emmet et al. 1998; Ying-Chun et al. 2010), y más recientemente en China (Li et al. 2003) enfocados principalmente en el efecto del depósito de nitrógeno en la composición de comunidades de bosques y arbustos; así como el efecto del depósito de nitrógeno en el crecimiento y fotosíntesis de árboles (Nakaji et al. 2001; 2002; Li et al. 2004) y musgos (Van Der Heiden et al. 2000; Arroniz-Crespo et al. 2008; Granath et al. 2009). Sin embargo no se reportan estudios del efecto del depósito de nitrógeno en orquídeas epífitas, en particular para México. Dado que el nitrógeno es un factor limitante en la mayoría de los ecosistemas

terrestres el aumento en la concentración de este elemento tendría como resultado un desequilibrio fisiológico de las plantas sometidas a este. Este capítulo examina el impacto de la adición progresiva de nitrógeno en el desempeño fisiológico de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico

El experimento fue llevado a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM campus Morelia, donde individuos de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr (Orchidaceae) de 4 años de edad, provenientes de cultivo in-vitro, fueron sembrados en macetas de plástico que contenían rocas de tezontle (una roca volcánica, inerte y porosa) en una casa de sombra durante dos años, en donde se simularon las condiciones de luz y temperatura del dosel propio de lugares donde estas plantas crecen. Se utilizaron 120 plantas seleccionadas al azar y divididas en 6 grupos de 20.

3.2.2. Soluciones nutritivas

Se estableció un periodo de aclimatación de dos meses. Cada planta fue regada semanalmente con 12.5 ml de una solución de Hoagland No. 2 modificada para que no contuviera compuestos nitrogenados (Hoaglan y Arnon 1950; Nobel y de la Barrera 2002), dicho volumen es equivalente a la precipitación que recibirían las plantas en su hábitat natural. Se omitieron de esta solución los compuestos nitrogenados con el fin de variar las concentraciones de N sin afectar la concentración de las otras sales (Nobel y de la Barrera 2002).

Transcurridos los dos meses de riego con la solución de macro y micronutrientes se adicionó NH_4NO_3 a los 12.5 ml de macro y micronutrientes

por planta, permaneciendo los macro y micronutrientes sin cambio (todas las soluciones fueron preparadas usando agua destilada). La composición y concentración final de las soluciones simularon seis diferentes escenarios de depósito de nitrógeno, como se indica a continuación: Un control que simuló un depósito de 0 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ y:

- | | |
|---|---|
| 1.) 2.5 kg de N ha ⁻¹ año ⁻¹ | 2.) 10 kg de N ha ⁻¹ año ⁻¹ |
| 3.) 20 kg de N ha ⁻¹ año ⁻¹ | 4.) 40 kg de N ha ⁻¹ año ⁻¹ |
| 5.) 80 kg de N ha ⁻¹ año ⁻¹ . | |

Este experimento fue llevado a cabo durante 26 semanas, desde diciembre de 2011 hasta junio de 2012, lapso que comprende el periodo de crecimiento y floración de esta orquídea (Hernández-Apolinar 1992; Soto-Arenas 1994; Soto-Arenas y Solano Gómez 2007). Al finalizar el riego se midieron varios parámetros fisiológicos con el fin de determinar el efecto del depósito de nitrógeno simulado sobre *Laelia speciosa*, estos parámetros fueron:

3.2.3 Fenología

Al finalizar las 26 semanas de riego con las diferentes dosis de N se midió: el número de hojas y de pseudobulbos producidos en dicho periodo. Las flores fueron contadas cada semana durante todo el periodo de riego para llevar el registro del total producido ya que estas tienen corta duración.

3.2.4. Conductancia estomática

La conductancia estomática fue medida durante un periodo de 24 horas cada dos horas dos veces, en 5 plantas por cada dosis de nitrógeno (número máximo de hojas producidas en la dosis de 80 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ que fue el que menos hojas produjo de los tratamientos). En los tratamientos restantes fue seleccionado este mismo número de plantas al azar, a pesar de haber producido más hojas, estas mediciones fueron llevadas a cabo usando un porómetro de hoja (Decagon Devices, modelo SC-1, WA EE.UU).

3.2.4. Fluorescencia de la clorofila

Para evaluar el posible daño al fotosistema II, producto del estrés por la simulación de diferentes escenarios de depósito de nitrógeno; el máximo rendimiento del fotosistema II (F_v/F_m fluorescencia variable/fluorescencia máxima), fue medido usando un fluorómetro (OPTI-SCIENCE 05-30p EE.UU.). Las mediciones se realizaron en 5 plantas por dosis de nitrógeno, las cuales fueron adaptadas a la oscuridad durante 20 minutos.

3.2.5. Contenido de clorofila

La concentración tisular de clorofila a, b y total se midió de acuerdo a Lichtenthaler (1987). Se seleccionaron las hojas de 5 plantas al azar por cada dosis de nitrógeno. La extracción de la clorofila se llevó a cabo macerando las hojas con un mortero y un pistilo en frío (3°C) en una solución acuosa de acetona (80% v/v) y se llevó hasta un volumen final de 20 ml. Se midió la absorbancia a 663 y 646 nm con un espectrofotómetro EZ 301 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU). Se determinó el contenido de clorofila (gramos m^{-2}) mediante las siguientes formulas por Lichtenthaler (1987).

$$\text{Clorofila a (C}_a\text{)} = 12.25A_{663} - 2.79A_{646}$$

$$\text{Clorofila b (C}_b\text{)} = 21.5A_{646} - 5.1A_{663}$$

$$\text{Clorofila Total (C}_T\text{)} = C_a + C_b$$

3.2.6. Análisis químicos: Contenido de carbono, nitrógeno, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$.

Se colectaron las hojas de 5 plantas por cada dosis de nitrógeno, que fueron lavadas con agua destilada hasta eliminar toda materia externa al tejido de la orquídea, fueron secadas durante 24 horas a 80°C en un horno de convección por gravedad. Las muestras se trituraron durante 10 minutos a máxima velocidad hasta conseguir la textura de un polvo fino en un molino de bola (Retsch MM300; Retsch, Vienna, Austria) y se colocaron 4 miligramos en una capsula de estaño la

cual fue doblada hasta conseguir la forma de una semiesfera e introducida a un espectrómetro de masas (IRMS por su siglas en ingles, Carlo Erba EA 1110 EE.UU).

Las proporciones isotópicas de las muestras son expresadas usando la fórmula:

$$\delta\%o = (R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

donde R es la relación entre el isótopo pesado y el liviano (por ejemplo $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), R_{muestra} es la proporción en la muestra y $R_{\text{estándar}}$ es la proporción en el material estándar de composición conocida y única para cada isótopo.

Adicionalmente se determinó la discriminación isotópica que acompaño la absorción y asimilación de NH_4NO_3 mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta = \delta^{15}\text{N}_s - \delta^{15}\text{N}_p$$

donde Δ es la discriminación, $\delta^{15}\text{N}_s$ es el $\delta^{15}\text{N}$ del sustrato (solución de N) y $\delta^{15}\text{N}_p$ es el $\delta^{15}\text{N}$ del producto, la planta (Evans et al. 1996; Evans 2001).

3.2.7. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa SigmaPlot 12.0 (Statistical Analyses Inc. EE.UU 2011). Un ANOVA a una vía fue efectuado, con el fin de comparar el efecto de las diferentes dosis de N. El método Holm-Sidak fue empleado como prueba post-hoc. Los datos se presentan como promedio \pm e.e. (n = 5 individuos).

3.3. Resultados

3.3.1. Fenología

La producción de hojas y pseudobulbos no presentó diferencia significativa entre el control y las dosis 2.5 y 10 kg N ha⁻¹ año⁻¹ con una producción de 1.01 ± 0.06 hojas. Las plantas que recibieron la dosis de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ produjeron 1.35 ± 0.1 hojas y las de 40 y 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ produjeron 0.7 ± 0.05 hojas, siendo significativamente diferentes estos promedios entre sí ($p < 0.05$, Figura 3.1). A su vez la producción de pseudobulbos en las plantas sin nitrógeno y las de 2.5, 10 y 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ fue en promedio de 0.95 ± 0.02; las plantas que recibieron 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ produjeron en promedio 1.3 ± 0.1 pseudobulbos; la producción promedio de pseudobulbos de plantas que recibieron 40 y 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ fue de 0.67 ± 0.02 ($p < 0.05$). Finalmente, las plantas sin nitrógeno y las de 2.5, 10 y 40 kg N ha⁻¹ año⁻¹ produjeron en promedio 0.3 ± 0.05 flores, las plantas de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ produjeron el mayor numero de flores 0.85 ± 0.1 ($p < 0.05$), mientras que no se presento producción en plantas regadas con 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ ($p < 0.05$; Figura 3.1).

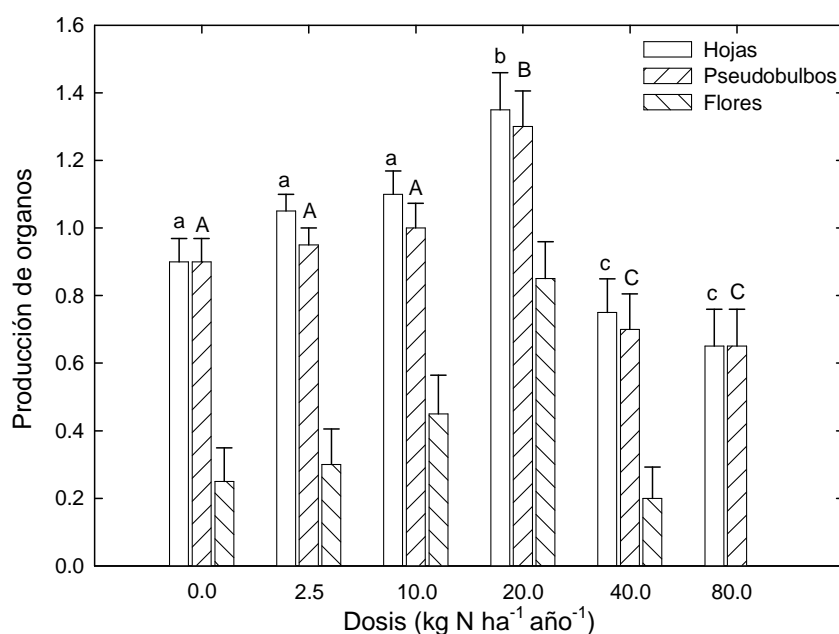


Figura 3.1. Producción de hojas (en blanco), pseudobulbos (líneas diagonales a la derecha) y flores (diagonales a la izquierda) en plantas de *Laelia speciosa*. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 20 plantas por dosis). Las letras: minúsculas (hojas), mayúsculas (pseudobulbos) indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$.

3.3.2. Conductancia estomática

Laelia speciosa únicamente presentó actividad estomática diurna, principalmente entre las 6:00 h y las 18:00 h, alcanzando su máximo a las 12 horas (Figura 3.2). La conductancia estomática máxima fue registrada al mediodía en plantas que recibieron la dosis de nitrógeno equivalente a 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹, siendo esta de 41.825 ± 0.88 mmol m⁻² s⁻¹ y ($p < 0.001$) con plantas sometidas a otras dosis de N (Figura 3.3). Las plantas que recibieron la dosis de nitrógeno equivalente a 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ mostraron los valores más bajos de conductancia estomática de 20.2 ± 1.27 mmol m⁻² s⁻¹ al mediodía (Figura 3.3).

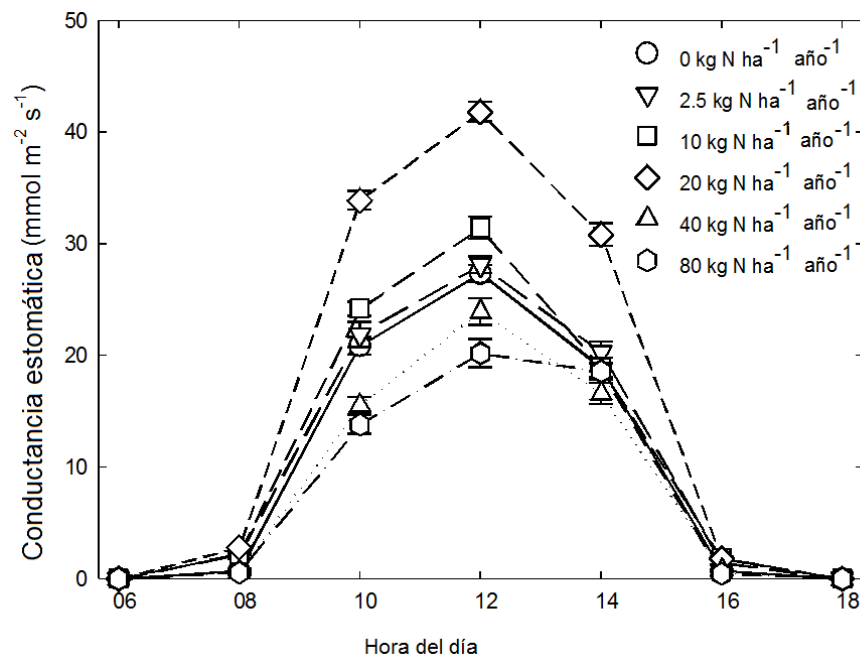


Figura 3.2. Conductancia estomática mmol m⁻² s⁻¹ durante 12 horas en plantas regadas con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$).

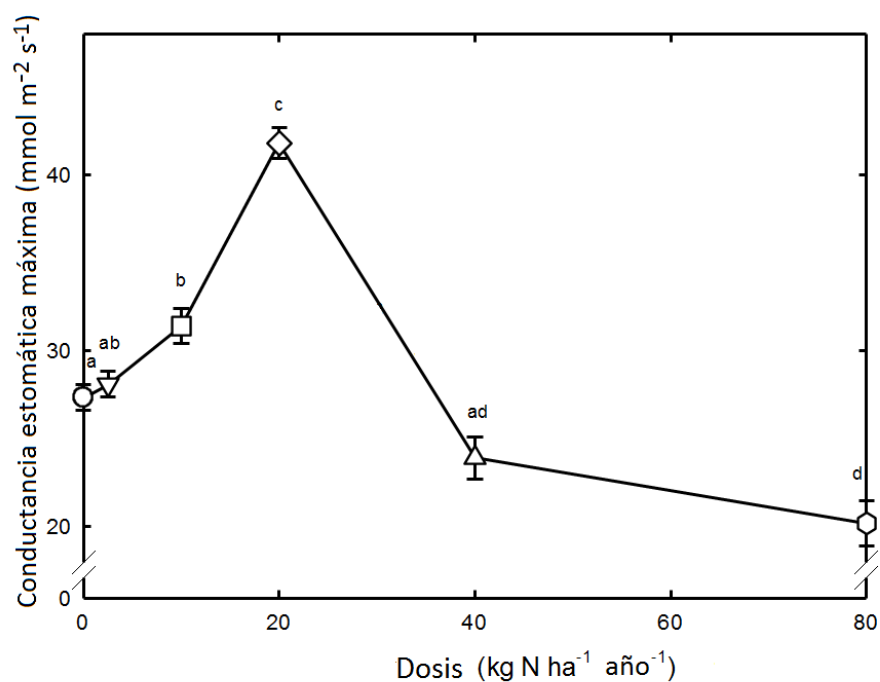


Figura 3.3. Conductancia estomática máxima $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al medio día de plantas sometidas a riego con diferentes dosis de nitrógeno. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e ($n = 5$ plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$).

3.3.3. Fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila F_v/F_m para plantas control y las dosis de nitrógeno de 2.5, 10 y 20 $\text{kg N ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ fue en promedio de 0.81 ± 0.01 y ($p < 0.05$) con plantas sometidas a las dosis de 40 y 80 $\text{kg N ha}^{-1} \text{año}^{-1}$ siendo la F_v/F_m de estas un 23.4% menor alcanzando valores de 0.62 ± 0.025 de F_v/F_m (Figura 3.4).

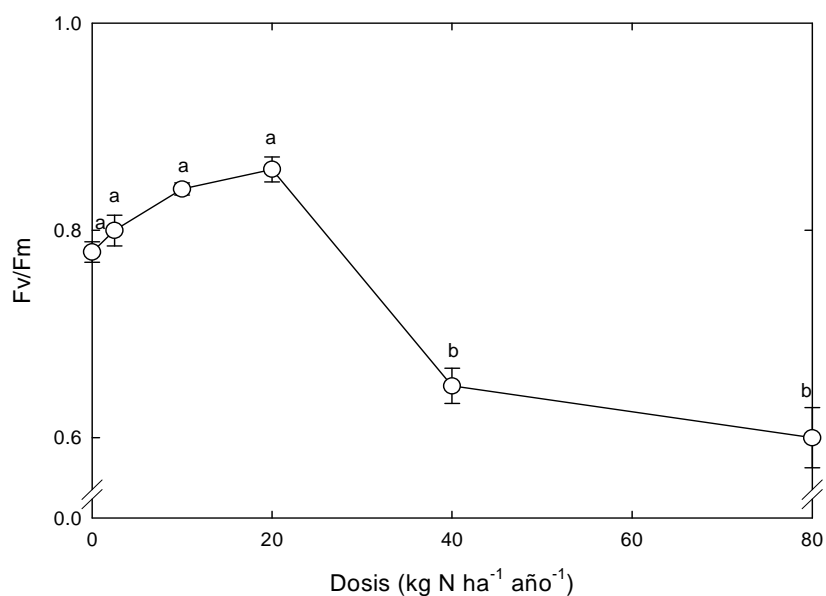


Figura 3.4. Fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) en plantas adaptadas a la oscuridad por 20 minutos y expuestas a riego con un control y 5 dosis de nitrógeno durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$).

3.3.4. Contenido de carbono y nitrógeno

El contenido de carbono de *Laelia speciosa* aumentó con la dosis de nitrógeno, alcanzando su máximo en 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ con un 46.2 ± 0.25 % del peso seco, siendo significativamente diferente ($p < 0.05$) a los valores alcanzados por las plantas sometidas a dosis de 0, 2.5 y 10 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Figura 3.5A). No se encontró diferencia significativa entre el contenido de carbono de plantas que recibieron las dosis de 40 kg N ha⁻¹ año⁻¹ y 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹. El menor contenido de carbono fue encontrado en plantas que recibieron dosis de 2.5 kg N ha⁻¹ año⁻¹ que alcanzaron 44.4 ± 0.13 % del peso seco (Figura 3.5A).

El contenido de nitrógeno en *Laelia speciosa* mostró una relación directamente proporcional con la dosis de nitrógeno. De este modo, el mínimo contenido de nitrógeno se encontró en plantas control las cuales no recibieron nitrógeno (1.17 ± 0.03 % de peso seco), sin presentar diferencia significativa con plantas regadas con 2.5 y 10 kg N ha⁻¹ año⁻¹ (Figura 3.5B). Por el contrario las

orquídeas que fueron regadas con dosis de 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ mostraron el mayor contenido de nitrógeno con 1.76 ± 0.02% ($p > 0.05$, Figura 3.5B).

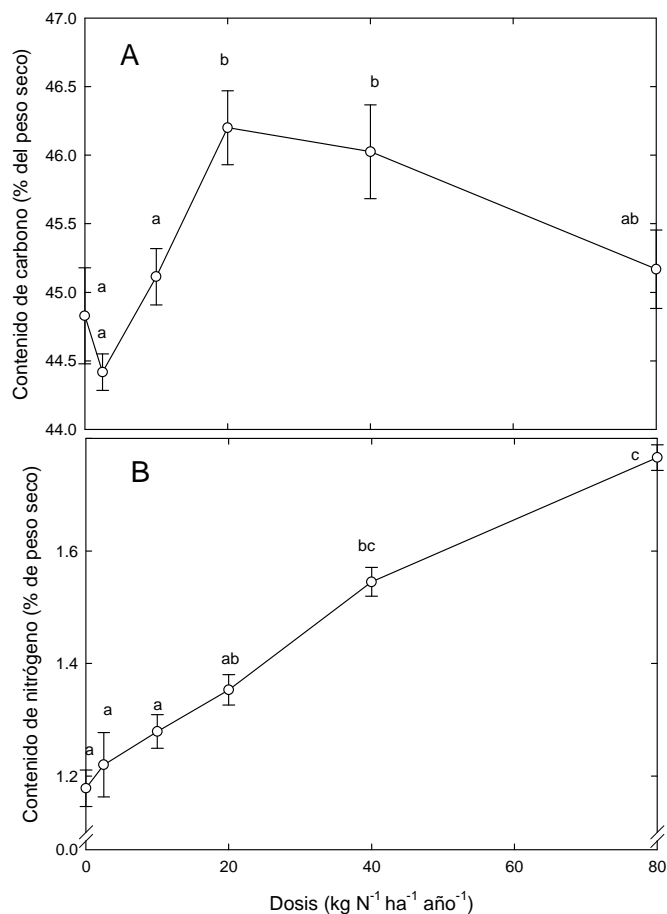


Figura 3.5. Contenido de carbono (A) y nitrógeno (B) como porcentaje de peso seco en hojas de plantas de *Laelia speciosa*. Los datos son mostrados como promedio ± e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis ($p < 0.05$).

3.3.5. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila b no mostro diferencia significativa entre dosis de N ($p > 0.05$), a su vez la clorofila a exhibió su máximo en plantas de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ siendo esta concentración la optima en producción de clorofila. La clorofila total de *Laelia speciosa* aumentó con el incremento en la dosis de nitrógeno alcanzando el máximo en plantas que recibieron una dosis de 20 kg N

ha⁻¹ año⁻¹ las cuales tuvieron $0.66 \pm 0.03 \text{ g m}^{-2}$ ($p < 0.05$; Figura 3.6). Por el contrario las concentraciones mayores a esta causaron una reducción del contenido de clorofila total que alcanzó $0.41 \pm 0.003 \text{ g m}^{-2}$ en plantas que recibieron dosis de $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ($p < 0.05$; Figura 3.6).

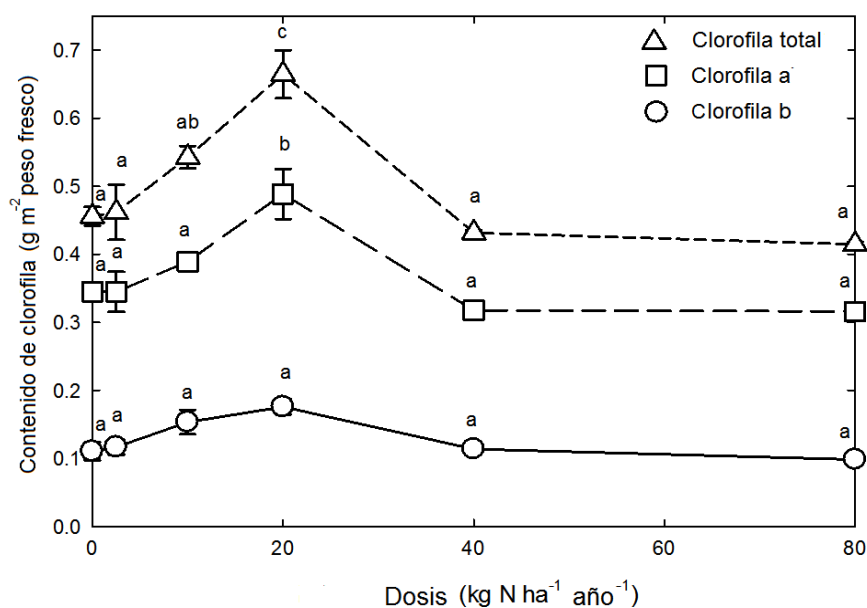


Figura 3.6. Contenido de clorofila a (cuadro), clorofila b (círculo) y clorofila total (triángulo) de plantas de *Laelia speciosa* al finalizar tratamiento, con un control y 5 dosis de nitrógeno durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e ($n = 5$ plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$.

3.3.6. $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y la discriminación isotópica de *Laelia speciosa*

Los $\delta^{13}\text{C}$ de *L. speciosa* no mostraron diferencia significativa entre plantas que recibieron las diferentes dosis de N, incluso con el control que no contenía nitrógeno que en promedio fueron de $-14.67 \pm 0.17\text{‰}$. De este modo los $\delta^{13}\text{C}$ no fueron influenciados por la dosis de nitrógeno (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. $\delta^{13}\text{C}$ en hojas de *Laelia speciosa* sometida a un control y seis dosis de N durante 26 semanas. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e. ($n = 5$ plantas).

Dosis de N en kg N ha ⁻¹ año ⁻¹	$\delta^{13}\text{C}\text{‰}$
Control (0)	-15.506 ± 0.076 ^a
2.5	-14.623 ± 0.084 ^a
10	-14.46 ± 0.029 ^a
20	-14.65 ± 0.068 ^a
40	-14.377 ± 0.071 ^a
80	-14.449 ± 0.058 ^a

Los $\delta^{15}\text{N}$ de plantas sometidas a riego con diferentes concentraciones de N mostraron una discriminación activa en contra de este isotopo a medida que la concentración de N aumentó. Ya que al comparar los $\delta^{15}\text{N}$ de la solución suministrada de NH_4NO_3 de $1.09 \pm 0.1\text{‰}$; con los $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas que fueron regadas con esta solución se aprecia que el aumento en la concentración de N significó un descenso en los $\delta^{15}\text{N}$, así: en plantas que no recibieron nitrógeno los $\delta^{15}\text{N}$ fueron de $1.35 \pm 0.11\text{‰}$ y de aquellas con $2.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ fue de $1.07 \pm 0.03\text{‰}$ (Figura 3.7). Los $\delta^{15}\text{N}$ de plantas regadas con 20 y 40 kg N ha⁻¹ año⁻¹ fueron significativamente diferentes de las restantes ($p < 0.05$) de igual modo las plantas regadas con una dosis de 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ mostraron los $\delta^{15}\text{N}$ más bajos alcanzaron $-3.14 \pm 0.2\text{‰}$ ($p < 0.05$; Figura 3.7).

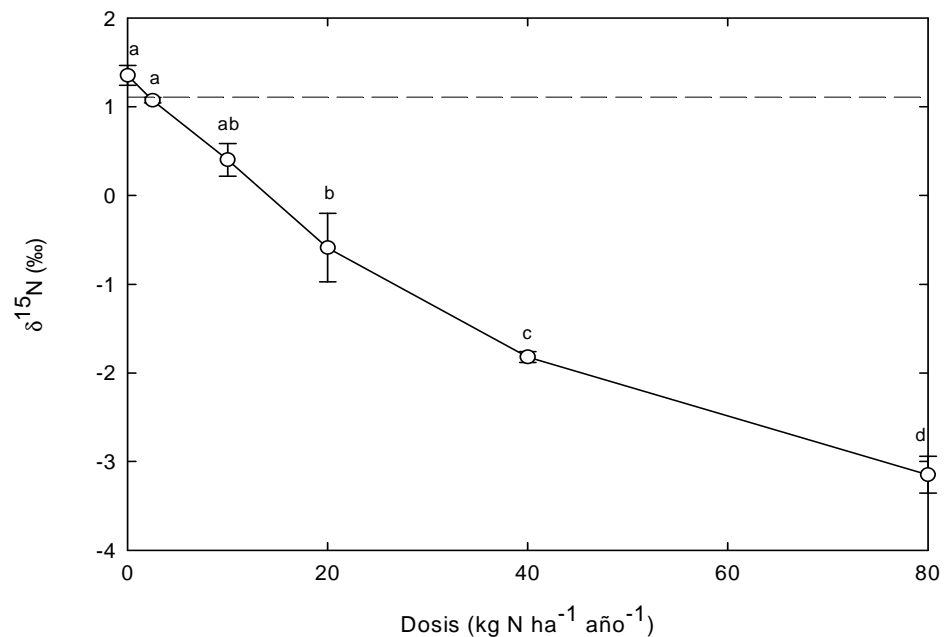


Figura 3.7. Composición isotópica de $\delta^{15}\text{N}$ de *L. speciosa*, la línea punteada indica el $\delta^{15}\text{N}$ de la solución en plantas sometidas a riego con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$.

El aumento en la discriminación isotópica (Δ) mostró una relación directa con el incremento en la dosis de N; ya que (Δ) mínima fue observada en plantas sometidas a riego con dosis de $2.5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ alcanzado valores de $0.01 \pm 0.03\text{‰}$, por otra parte la máxima (Δ) se observó en plantas con dosis de $80 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ siendo esta de $4.23 \pm 0.2\text{‰}$, ($p < 0.05$ entre dosis de N; Figura 3.8).

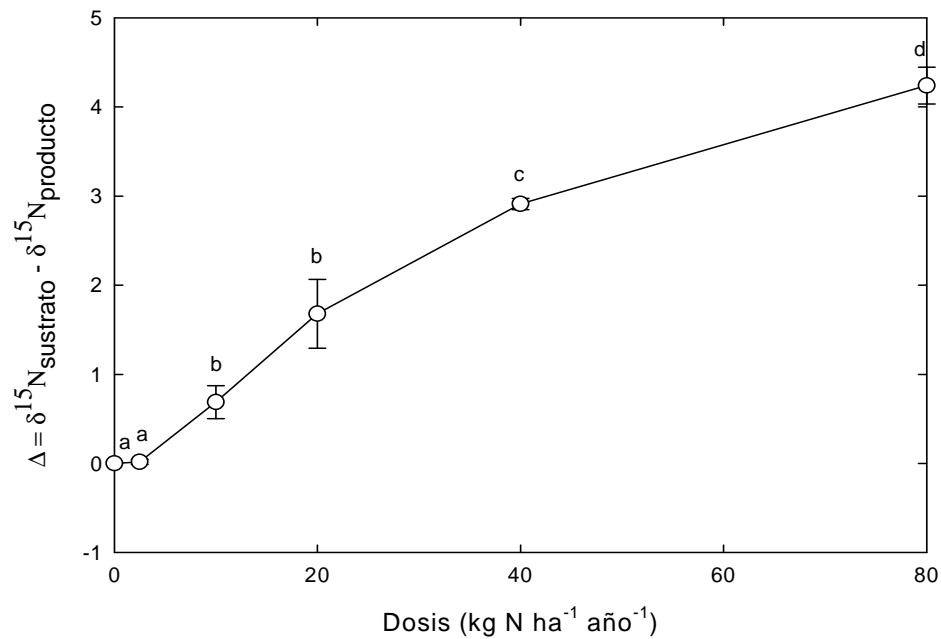


Figura 3.8. Discriminación isotópica durante la absorción y asimilación de NH_4NO_3 al finalizar 26 semanas de riego con diferentes dosis de N. Los datos son mostrados como promedio \pm e.e (n = 5 plantas por dosis). Las letras indican diferencia significativa entre dosis $p < 0.05$.

3.4. Discusión

3.4.1. Fenología

Se observó un incremento en la productividad de las plantas expuestas a las dosis más bajas de N (2.5 y 10 kg N ha⁻¹ año⁻¹). En comparación, las plantas regadas con una dosis de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ que recibieron un aporte extra de nutrientes produjeron en promedio 30% más pseudobulbos en 26 semanas. Por el contrario dosis mayores a esta produjeron un detrimento en la producción de hojas, pseudobulbos y flores como resultado de los efectos tóxicos por exceso de N. Lo que concuerdan con lo encontrado en plantas de frijol verde *Phaseolus vulgaris* sometidas a diferentes dosis de N (Sánchez et al. 2000). Una adición constante de N a largo plazo junto con limitación de otros nutrientes restringe la capacidad de algunas plantas para incrementar la masa foliar (Asner et al. 1997; Aber et al. 1998). La adición de N en plantas de *L. speciosa* mostró incrementar la productividad cuando las dosis son menores o iguales a 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹, sin embargo al incrementarse esta dosis la productividad de estas plantas se ve reducida.

3.4.2. Conductancia estomática

Diferentes factores afectan la capacidad fotosintética y la conductancia estomática, como el déficit de presión de vapor, temperatura, estrés hídrico, cantidad de luz y el contenido de N (Lambers et al. 2008). Pero, ya que en este estudio estos factores fueron mantenidos iguales para todas las plantas a excepción del contenido de N, además el nitrógeno es un componente importante de las proteínas de los tilacoides (Rubisco y fosfoenol piruvato carboxilasa) y del ciclo de Calvin, órganos en los cuales se representan la mayor proporción de N (Evans 1989), los resultados del presente estudio sugieren que el exceso de N afectó estos componentes celulares representado en la conductancia estomática de *L. speciosa*, siendo ésta promovida por el aumento en el suministro de

nitrógeno alcanzando su máximo en plantas regadas con la dosis de 20 kg. Por el contrario, las plantas que fueron regadas con dosis mayores a ésta, presentaron una reducción del 55.5% en este parámetro fisiológico. Ya que el nitrógeno puede actuar como un agente señalizador para la apertura y cierre de estomas, un desbalance en su suministro puede significar un descontrol en este sistema, particularmente bajo grandes dosis de este elemento (Raven 2002). Esto sugiere que las orquídeas regadas con dosis mayores a 20 kg de N año⁻¹ pueden estar experimentando un desequilibrio nutricional como resultado del exceso de nitrógeno ya que las concentraciones de fósforo y magnesio se pueden ver reducidas en plantas sometidas a grandes dosis de N (Nakaji et al. 2001; Wortman et al. 2012).

3.4.3. Fluorescencia de la clorofila

La disminución de Fv/Fm es un indicador de estrés, ya que cuando la tasa de transporte de electrones (ETR) es bloqueada por algún factor a nivel del sitio de oxidación del PSII, los niveles de la fluorescencia disminuyen (Poorter 2000; Maxwell y Jonson 2000; Baker 2008; Hogewoning y Harbinson 2007; Lichtenthaler et al. 2007; Calatayud et al. 2008; Guidi y Degl'Innocenti 2008; Massacci et al. 2008). Los valores normales de Fv/Fm en hojas de plantas saludables de la mayoría de especies son de aproximadamente 0.83 (Bjorkman y Demmig 1987). En el presente estudio, las plantas sometidas a bajas dosis de N presentaron valores de fluorescencia de clorofila cercanos a 0.8, mientras que en plantas regadas con dosis mayores al óptimo de 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ se produjo un descenso en este parámetro. Esto sugiere que las plantas de *Laelia speciosa* sufrieron estrés como resultado de las altas dosis de N. Debido a que la mayoría de los estreses induce en la plantas daño oxidativo de las estructuras celulares (Biswal y Biswal 1999; Arróniz-Crespo 2008), la simulación del depósito de nitrógeno en este estudio puede estar causando este daño en *L. speciosa* representado en la disminución de Fv/Fm ya que altas dosis de N producen una disminución en la cantidad de hidratos de carbono necesarios para proveer del

sustrato a los procesos de carboxilación (Bauer et al. 2004). El daño oxidativo es causado por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a consecuencia del incremento en el traspaso de energía hacia moléculas de O₂ formando una serie de complejos que alteran el estatus redox del estroma y de la membrana tilacoidal, lo cual causa una baja en la eficiencia de los fotosistemas, disminución en el fijación de CO₂, pérdida del uso eficiente del agua, entre otras (Murata et al. 2007).

3.4.4. Contenido de carbono y nitrógeno

El contenido de carbono en plantas de *L. speciosa* aumentó a medida que la dosis de nitrógeno fue incrementada hasta los 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹, pero al rebasar esta dosis óptima el contenido de carbono disminuyó levemente, este patrón puede ser relacionado con la eficiencia cuántica del PSII (Fv/Fm). Este descenso en la fijación de CO₂ puede significar que la planta no puede prevenir los efectos tóxicos derivados del exceso de N (Magalhaes et al. 1992).

Uno de los efectos derivados del riego con grandes dosis de N es el aumentó en la concentración de aminoácidos y amidas (Allen y Raven 1987; Blacquièrre et al. 1988, Chaillou et al. 1991; Majerowicz et al. 2000). El aumentó en la concentración de aminoácidos está relacionado con la exposición de la planta a grandes dosis de N en forma de NH₄⁺, adicionalmente muchas especies de plantas han mostrado el uso preferencial por NH₄⁺ sobre NO₃⁻ (Cruz et al. 1993; Majerowicz et al. 2000; Nakaji et al 2001). El uso preferencial del ion NH₄⁺ es a causa de que la planta invierte menor cantidad de energía en el proceso de asimilación (Persson y Näsholm 2002), de este modo el aumento del contenido de nitrógeno en las orquídeas regadas con diferentes dosis de N puede ser atribuido al incremento del NH₄⁺ intercelular lo que puede producir una falla en la enzima encargada de la fijación del NO₃⁻ (nitrato reductasa) como fue descrito en musgos expuestos a altas concentraciones de N (Soares y Pearson 1997; Liu et al. 2011). Estos productos nitrogenados pueden ser almacenados en la célula, especialmente en la vacuola debido a su enorme capacidad para almacenar metabolitos y

productos de desecho (Blumwald 2000; Andreev 2001). Lo que explica el aumento en el contenido de nitrógeno pero la disminución de la clorofila.

3.4.5. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila total es proporcional al contenido de nitrógeno en la hoja (Evans 1989), siendo este contenido de clorofila típicamente de 0.4–0.5 g m⁻² en plantas C₃ y C₄, además de la cactácea hemiepipita CAM *Hylocereus undatus* (Nobel 1999; Nobel y de la Barrera 2002). Nuestros resultados muestran que las hojas de las plantas de *Laelia speciosa* que no recibieron nitrógeno tuvieron un contenido de clorofila total similar a plantas C₃ y C₄, sin embargo a medida que la dosis de N fue incrementada el contenido total de clorofila también se incrementó sufriendo una drástica disminución a mayores dosis. Este resultado concuerda con lo encontrado en la orquídea *Catasetum fimbriatum* cultivada in vitro en la cual el contenido de clorofila aumentó con la dosis de N y sufrió un descenso a mayores concentraciones de N (Majerowicz et al. 2000). Resultados que también fueron encontrados en abetos de 1 año en los que se observó un aumento del contenido de clorofila total de 1200 mg kg⁻¹ a 1600 mg kg⁻¹ cuando recibieron dosis de 12 g N m⁻² año⁻¹, pero mostraron una reducción en el contenido de clorofila total de 1600 mg kg⁻¹ a 1100 mg kg⁻¹ al aumentar la dosis a 48 g N m⁻² año⁻¹ (Ying-Chun et al. 2010). Lo que evidencia que altas dosis de nitrógeno inducen a la disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos (Baxter et al. 1992; Lin et al. 2007). Esta reducción en el contenido de clorofila total puede ser explicada por el desequilibrio nutricional producido por el descenso en magnesio (componente central de la molécula de clorofila) en la proporción N:Mg de la planta a consecuencia del aumento en la dosis y contenido de N (Nakaji et al. 2001; Wortman et al. 2012). También puede ser explicada por la toxicidad producto del exceso de nitrógeno al interior de las células como resultado del descenso en el pH por la liberación de protones (H⁺) que puede impedir la producción de pigmentos fotosintéticos como la clorofila (Britto y Konzucker 2002).

3.4.6. Contenido de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ y la discriminación isotópica de *Laelia speciosa*

La conductancia estomática mostró que estas plantas mantienen intercambio gaseoso durante el día, indicando que la enzima carboxilante (Rubisco) fue la encargada de la fijación de CO_2 , esta enzima es la responsable de los $\delta^{13}\text{C}$ de plantas C_3 que presenta un rango típico de -33‰ a -22‰ (Elheringer y Osmond 1989). Sin embargo, los $\delta^{13}\text{C}$ de *Laelia speciosa* en este estudio fueron más cercanos al rango de las plantas CAM de -22‰ a -12‰ (Elheringer y Osmond 1989). Varios estudios en fijación de CO_2 han sugerido que las orquídeas de hojas delgadas presentan fotosíntesis C_3 , mientras que las orquídeas de hojas gruesas y suculentas exhiben fotosíntesis CAM (Avadhani et al. 1982). *Laelia speciosa* cuenta con hojas gruesas y suculentas (datos no mostrados) lo que sugiere, además de los $\delta^{13}\text{C}$ que esta orquídea cuenta con algún grado de fotosíntesis CAM. Esta diferencia entre los $\delta^{13}\text{C}$ y la conductancia estomática puede ser el resultado de varios factores: primero, la conductancia estomática fue medida en hojas ya desarrolladas las cuales recibieron riego constante durante varias semanas y se ha observado en otras plantas CAM que al ser sometidas a riego constante cambian de fijación nocturna a fijación diurna de CO_2 (Silvera et al. 2005) y segundo, los $\delta^{13}\text{C}$ en el rango de las plantas CAM pueden ser el resultado de la translocación de carbohidratos provenientes de los pseudobulbos más antiguos que fueron formados cuando la planta fijaba el CO_2 en la noche y en consecuencia los $\delta^{13}\text{C}$ de estos son diferentes. Otras orquídeas de los géneros *Cattleya*, *Brassavola* y *Sophranitis* también han sido reportadas como plantas CAM (Avadhani y Arditti 1981; Avadhani et al. 1982; Silvera et al. 2005).

La discriminación isotópica en contra del ^{15}N aumenta con el incremento en la concentración externa de N (Evans 2001; Flores et al. 2011). Patrón que fue observado en plantas de *L. speciosa* del presente estudio. La nutrición con NO_3^- eleva los valores de $\delta^{15}\text{N}$, por el contrario cuando la fuente de N es NH_4^+ , el efecto es inverso especialmente cuando las plantas están sufriendo de toxicidad por nitrógeno (Ariz et al. 2011). La disminución en los valores de ^{15}N de las hojas de *L. speciosa* junto con el aumento en la discriminación isotópica sugieren que

estas plantas absorbieron preferencialmente NH_4^+ a mayores dosis de nitrógeno. Resultados que concuerdan con lo encontrado en *Capsicum annuum* que fue regado con una solución que contenía ambos iones NH_4^+ y NO_3^- y cada uno contribuyó con el 50% de N, estas plantas mostraron una discriminación isotópica de $2.60\text{‰} \pm 0.08$ (Flores et al. 2011). Por otra parte la discriminación no fue diferente de 0‰ para *Lycopersicon esculentum* creciendo con $50 \mu\text{M}$ NH_4^+ (Evans et al 1996). Mientras que fue de 0.9 a 5.8‰ en *Pinus sylvestris* con una dosis de 4.6 mM de NH_4^+ (Högberg et al. 1999). A su vez en *Oryza sativa* fue de 4.1‰ a 1.4 mM de NH_4^+ y 12.6‰ a 7.3 mM de NH_4^+ (Yoneyama et al. 1991). Finalmente la discriminación isotópica en *Trapa japonica* durante la absorción de NH_4^+ fue de aproximadamente 2.0‰ cuando la concentración de N fue de 80 ppm (Maniruzzaman y Asaeda 2012). Es plausible, entonces, que la acumulación de nitrógeno es principalmente NH_4^+ cuando es suministrado en dosis altas de NH_4NO_3 a *L. speciosa*.

3.5. Conclusiones

- El depósito de nitrógeno simulado a concentraciones menores o iguales a 20 kg N ha⁻¹ año⁻¹ puede actuar como fertilizante en *Laelia speciosa* por el incremento en la producción de órganos, pero puede ser tóxico en concentraciones mayores disminuyendo el número de hojas, pseudobulbos y flores.
- *Laelia speciosa* puede estar sujeta a vulnerabilidad si el depósito de nitrógeno de las áreas en las cuales habita alcanza una concentración de 40 kg N ha⁻¹ año⁻¹ ya que esta concentración representa el punto crítico en el cual el desempeño fisiológico de esta planta se ve afectado.
- El contenido de nitrógeno en hojas de *Laelia speciosa* mostró un aumento significativo acompañado de un descenso en el contenido de carbono a grandes dosis de nitrógeno.
- Cuando las dosis de nitrógeno aumentan, el ¹⁵N disminuye y la discriminación isotópica aumenta, en estrecha relación con la absorción preferencial de iones NH₄⁺.
- Los δ¹³C de las orquídeas que recibieron diferentes dosis de nitrógeno no fueron afectados por la dosis de N siendo este último factor irrelevante en la abundancia de ¹³C en *L. speciosa*.

3.6. Referencias

- Aber J.D., McDowell W., Nadelhoffer K.J., Magill A., Berntso G.M., Kamakea M., McNulty S., Currie W., Rustad L. y Fernandez I. 1998. Nitrogen saturation in temperate forest ecosystems—hypothesis revisited. *Bioscience*. 48:921–934.
- Allen S. y Raven J.A. 1987. Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: The role of long distance transport. *Journal of Experimental Botany*. 38:580–596.
- Andreev I.M. 2001. Functions of the vacuole in higher plant cells. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48:672–680.
- Ariz I., Cristina C., Moran J.F., González-Moro M.B., García-Olaverri C., González-Murua C., Martins-Loução M.A. y Aparicio-Tejo P.M. 2011. Depletion of the heaviest stable N isotope is associated with $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ toxicity in NH_4^+ -fed plants. *BCM Plant Biology*. 11:83.
- Arróniz-Crespo M., Leake J.R., Horton P., y Phoenix G.K. 2008. Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilization in acidic grassland. *New Phytologist*. 180(4):864–74.
- Asner G.P., Seastedt T.R. y Townsend A.R. 1997. The decoupling of terrestrial carbon and nitrogen cycles. *Bioscience*. 47:226–234.
- Avadhani P.N. y Arditti J. 1981. Carbon fixation in orchids. En: Proceedings of World Orchid Symposium, pp. 79–85. Harbour Press, Sydney.
- Avadhani P.N.; Goh C.J.; Rao A.N. y Arditti J. 1982. Carbon fixation in orchids. En: Orchid Biology, Reviews and Perspectives II. Arditti J. (Ed.). Cornell University Press, Ithaca, New York.

- Baker N.R. 2008. Chlorophyll Fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology*. 59:89–113.
- Bauer G.A., bazzaz F.A., Minocha R., Long S., Magill A., Aber J. y Berntson G.M. 2004. Effects of chronic N additions on tissue chemistry, photosynthetic capacity, and carbon sequestration potential of a red pine (*Pinus resinosa* Ait.) stand in the NE United States. *Forest Ecology and Management*. 196(1):173–186.
- Baxter R., Emes M.J. y Lee J.A. 1992. Effects of an experimentally applied increase in ammonium on growth and amino-acid metabolism of *Sphagnum cuspidatum* Ehrh. ex. Hoffm. from differently polluted areas. *New Phytologist*. 120:265–274.
- Benzing D.H. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benzing, D.H. 1998. Vulnerabilities of tropical forests to climate change: The significance of resident epiphytes. *Climatic Change*. 39:519–540.
- Björkman O. y Demmig B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*. 170:489–504.
- Biswal B. y Biswal U.C 1999. Photosynthesis under stress: stress signals and adaptive response of chloroplasts. En: Handbook of Plant and Crop Stress, Pessaraki M. (ed). pp. 315–336, Marcel Dekker Inc., ISBN 0-8247-1948-4, New York.
- Blacquièrè T., Hofstra R. y Stulen I 1988. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* L. and *Plantago major* L. ssp. major. III. Nitrogen metabolism. *Plant Soil*. 104:129–141.
- Blumwald E. 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology*. 12:431–434.

- Bobbink R., Hicks K., Galloway J., Spranger T., Alkemade R., Ashmore M., Bustamante M., Cinderby S., Davidson E., Dentener F., Emmett B., Erisman J.-W., Fenn M., Gilliam F., Nordin A., Pardo L., y De Vries W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications*. 20(1):30–59.
- Bobbink R., Hornung M. y Roelofs J.G.M. 1998. The effects of air-borne nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. *Journal of Ecology*. 86:738–738.
- Britto T. y Kronzucker H. 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review, *Journal of Plant Physiology* 159:567–584.
- Calatayud A., Gorbe E., Roca D. y Martínez P.F. 2008. Effect of two nutrient solution temperatures on nitrate uptake, nitrate reductase activity, NH_4^+ concentration and chlorophyll a fluorescence in rose plants. *Environmental and Experimental Botany*. 64:65–74.
- Chaillou S., Vessey J.K., Morot-Gaudry J.F., Raper C.D. Jr., Henry L.T. y Boutin J.P. 1991. Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. *Journal of Experimental Botany*. 42:189–196.
- Cruz C., Lips S.H. y Martins-Loucao M.A. 1993. Nitrogen assimilation and transport in carob plants. *Physiologia Plantarum*. 89:524–531.
- Ehleringer J.R. y Osmond B.O. 1989. Stable isotopes. En: Plant physiological ecology. Pearcy R.W., Ehleringer J.R., Mooney H.A. y Rundel P.W. (Eds). pp. 281–300. Chapman & Hall, London, England.
- Emmett B.A., Boxman D., Bredemeier M., Gundersen P., Kjønnaas O.J., Moldan F., Schleppe P., Tietema A., y Wright R.F. 1998. Predicting the effects of atmospheric nitrogen deposition in conifer stands: evidence from the NITREX ecosystem-scale experiments, *Ecosystems* 1:352–360.

- Evans R.D., Bloom A.J., Sukrapanna S.S. y Ehleringer J.R. 1996. Nitrogen isotope composition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. T-5) grown under ammonium or nitrate nutrition. *Plant Cell and Environment*. 19:1317–1323.
- Evans R.D. 2001. Physiological mechanisms influencing plant nitrogen isotope composition. *TRENDS in Plant Science*. 6(3):121–126.
- Evans J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia*. 78:9–19.
- Flores P., Murray P.J., Hellín P. y Fenoll J. 2010. Influence of N doses and form on ¹⁵N natural abundance of pepper plants: considerations for using δ¹⁵N values as indicator of N source. *Journal science of food and agriculture*. 91:2255–2258.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erisman J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., Martinelli L.A., Seitzinger S.P. y Sutton M.A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320:889–892.
- Galloway J.N., Dentener F.J., Capone D.G., Boyer E.W., Howarth R.W., Seitzinger S.P., Asner G.P., Cleveland C., Green P., Holland E., Karl D.M., Michaels A.F., Porter J.H., Townsend A. y Vörösmarty C. 2004. Nitrogen cycles: past, present and future. *Biogeochemistry*. 70:153–226.
- Granath G., Strengbom J., Breeuwer A., Heijmans M., Berendse F., y Rydin Hakan 2009. Photosynthetic performance in *Sphagnum* transplanted along a latitudinal nitrogen deposition gradient *Oecologia* 159:705–715.
- Guidi L. y Degl’Innocenti E. 2008. Ozone effects on high light-induced photoinhibition in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*. 174:590–596.
- Hernández-Apolinar M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (H.B.K.) Schltr. (Orchidaceae). Tesis (licenciatura). Departamento de Biología,

Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
México.

- Hoagland D.R. y Arnon D.I. 1950. The culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experimental Circle*. 347:1–32.
- Högberg P., Högberg M.N., Quist M.E, Ekblad A. y Näsholm T. 1999. Nitrogen isotope fractionation during nitrogen uptake by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris*. *New Phytologist*.142:569–576
- Hogewoning S.W. y Harbinson J. 2007. Insights on the development, kinetics, and variation of photoinhibition using chlorophyll fluorescence imaging of a chilled, variegated leaf. *Journal of Experimental Botany*. 58:453–463.
- Kleijn D., Bekker R.M., Bobbink R., de Graaf M.C.C. y Roelofs J.G.M. 2008. In search for key biogeochemical factors affecting plant species persistence in heathlands and acidic grasslands: a comparison of common and rare species. *Journal of Applied Ecology*. 45:680–687.
- Lambers H., Chapin S. y Pons T. 2008. Plant Physiological Ecology Second Edition. Springer Sciences Business Media, LLC.
- Li D., Jiangming M., Yunting F., Shaolin P. y Gundersen P. 2003. Impact of nitrogen deposition on forest plants. *Acta Ecologica Sinica*. 23(9):1891–1900.
- Liu W., Liu B., Lei C., Zhang Y. y Guo W. 2011. Physiological responses of *Pogonatum cirratum* subsp. *fuscatum* living in different habitats to simulated nitrogen deposition. *Acta Ecologica Sinica*. 31(6):291–297.
- Lin Y., Duan L., Yang Y.S, Zhao D.W., Zhang D.B. y Hao J.M. 2007. Contribution of simulated nitrogen deposition to forest soil acidification in area with high sulfur deposition. *Environmental Science*. 28(3):640–646.
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*. 148:350–382.

- Lichtenthaler H.K., Ac A., Marek M.V., Kalina, J. y Urban O. 2007. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:577–588.
- Magalhaes J.R., Huber D.M. y Tsai C.Y. 1992. Evidence of increased ^{15}N -ammonium assimilation in tomato plants with exogenous α -ketoglutarate. *Plant Science* 85:135–141.
- Majerowicz N., Kerbauy G.B., Nievola C.C. y Suzuki R.M. 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*. 44:195–206.
- Maniruzzaman M. y Asaeda T. 2012. Fractionation of Stable Isotopes of Nitrogen in *Trapa japonica* During Uptake of NH_4^+ -N. *Research in Plant Biology*. 2(2):48–52.
- Massacci A., Nabiev S.M., Pietrosanti L., Nematov S.K., Chernikova T.N., Thor K. y Leipner J. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46:189–195.
- Maxwell K. y Johnson G. 2000. Chlorophyll fluorescence –a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51:659–668.
- Mitchell R.J., Sutton M.A., Truscott A.M., Leith I.D., Cape J.N., Pitcairn C.E.R. y Van Dijk N. 2004. Growth and tissue nitrogen of epiphytic Atlantic bryophytes: effects of increased and decreased atmospheric N deposition. *Functional Ecology*. 18:322–329.
- Murata N., Takahashi S. Nishiyama Y. y Allakhverdiev S.I 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica Biophysica Acta*. 1767:414–421.

- Nakaji T., Fukami M., Dokiya Y. y Izuta T. 2001. Effects of high nitrogen load on growth, photosynthesis and nutrient status of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora* seedlings. *Trees*. 15:453–461.
- Nobel P.S. 1999. Physicochemical and Environmental Plant Physiology, second Ed. Academic Press, San Diego California.
- Nobel P.S. y de la Barrera E. 2002. Nitrogen Relations for net CO₂ uptake by the cultivated hemiepiphytic cactus, *Hylocerus undatus*. *Scientia Horticulturae* 96:281–292.
- Pearce I.S.K. y Van der Wal R. 2008. Interpreting nitrogen pollution thresholds for sensitive habitats: the importance of concentration versus dose. *Environmental Pollution*. 152:253–256.
- Persson P. y Nåsholm T. 2002. Regulation of amino acid uptake in conifers by exogenous and endogenous nitrogen. *Planta*. 215:639–644.
- Poorter H.N. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different level of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27:597–607.
- Raven J. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist*. 153:371–386.
- Roelofs J.G.M., Bobbink R., Brouwer E. y De Graaf M.C.C. 1996. Restoration ecology of aquatic and terrestrial vegetation of non-calcareous sandy soils in the Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica*. 45:517–541.
- Sánchez E., Soto J., García P.C., López-Lefebvre L., Rivero R., Ruíz J.M. y Romero L. 2000. Phenolic compounds and oxidative metabolism in green vean plants under nitrogen toxicity. *Australian journal of plant physiology*. 27:973–978.

- Silvera K.; Santiago L.S. y Winter K. 2005. Distribution of Crassulacean acid metabolism in orchids of Panama: evidence of selection for weak and strong modes. *Functional of Plant Biology*. 32(5):397–407.
- Soto-Arenas M. 1994. Population studies in Mexican orchids. En: Pridgeon, A.M. (eds.) Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Glasgow. HMSO Publ.
- Soto-Arenas M. A. y Solano-Gómez A. R. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F.
- Soares A. y Pearson J. 1997. Short-Term physiological responses of mosses to atmospheric ammonium and nitrate. *Water, Air, and soil pollution*. 93:225–242.
- Stewart G.R., Aidar M.P.M., Joly C.A. y Schmidt S. 2002. Impact of point source pollution on nitrogen isotope signatures ($\delta^{15}\text{N}$) of vegetation in SE Brazil. *Oecologia*. 131:468–472.
- Tcherkez G. y Farquhar G.D. 2006. Isotopic fractionation by plant nitrate reductase, twenty years later. *Functional Plant Biology*. 33:531–537.
- Wei X., Blanco J.A., Jiang H. y Kimmins J.P. 2012. Effects of nitrogen deposition on carbon sequestration in Chinese fir forest ecosystems. *Science of the Total Environment*. 416:351–361.
- Wortman E., Tomaszewski T., Waldner P., Schleppi P., Thimonier A., Eugster W., Buchmann N. y Sievering H. 2012. Atmospheric nitrogen deposition and canopy retention influences on photosynthetic performance at two high nitrogen deposition Swiss forests. *Tellus B*. 64:17216.

- Van Der Heijden E., Verbeek S.K. y Kuiper J.C. 2000. Elevated atmospheric CO₂ and increased nitrogen deposition: affects on C and N metabolism and growth of the peat moss *Sphagnum recurvatum* P. Beauv. Var *mucronatum* (Russ.) Warnst. *Global Change Biology*. 6:201–212.
- Vitousek P.M. y Farrington H. 1997, Nutrient limitation and soil development: experimental test of a biogeochemical theory. *Biogeochemistry*. 37:63–82.
- Ying-Chun L., Hou-Bao F., Yan-Yan L., Wen-Fei L., Ying-Hong Y. 2010. Effects of simulated nitrogen deposition on growth and photosynthesis of 1-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) seedlings. *Acta Ecologica Sinica*. 30:150–154.
- Yoneyama T., Omata T., Nakata S. y Yazaki J. 1991. Fractionation of Nitrogen Isotopes during the Uptake and Assimilation of Ammonia by Plants. *Plant & Cell Physiology*. 32(8):1211–1217.
- Zotz G. y Bader M.Y. 2009. Epiphytic plants in a changing world-global: Change effects on vascular and non-vascular epiphytes. *Progress in Botany*. 70:147–170.
- Zotz G., Bogusch W., Hietz P. y Ketteler N. 2010. Growth of epiphytic bromeliads in a changing world: the effects of CO₂, water and nutrient supply. *Acta Oecologica*. 36:659–665.

Capítulo 4

Discusión general

La siguiente etapa esta al doblar la esquina.



4.1. Discusión general

En este trabajo se determinó la fuente de nitrógeno que la orquídea epífita *Laelia speciosa* emplea para su nutrición en dos lugares con diferente uso de suelo del estado de Michoacán, así mismo se determinó los efectos que el depósito de nitrógeno simulado tiene en la fisiología de esta orquídea a partir de un experimento de invernadero. La fuente de nitrógeno de *L. speciosa* en el campo fue casi en su totalidad el aire limpio, situación que se ha mantenido durante al menos los últimos 10 años de acuerdo a los $\delta^{15}\text{N}$ de las series de pseudobulbos. Por su parte las plantas que fueron trasladadas de un sitio de rescate en el campo a la ciudad y mantenidas allí durante los últimos 8 años obtuvieron su nitrógeno principalmente del aire de la ciudad, dicho aire contiene trazas de contaminación por actividad industrial y vehicular, esto pudo ser detectado mediante la señal isotópica registrada por las plantas. Las orquídeas sometidas a diferentes cantidades de nitrógeno mostraron que las dosis menores o iguales a $20 \text{ kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ les sirve como fertilizante ya que incrementaron el número de órganos producidos, así como la conductancia estomática y el contenido de clorofila. Por el contrario las dosis mayores o iguales a 40 y 80 $\text{kg de N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ tuvieron efectos tóxicos sobre las plantas.

Laelia speciosa mostró ser especialmente sensible a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno dada su fuerte dependencia de fuentes atmosféricas para la obtención de nutrientes en el ambiente epífita. Esto se evidencia cuando al aumentar la dosis de nitrógeno sobre los $20 \text{ kg de N año}^{-1}$ la fisiología de la orquídea se vio afectada, de manera similar a lo que se observa en los musgos *Braunia secunda*, *Pseudoscleropodium purum*, *Rhytidiadelphus squarrosus*, *Thuidium delicatulum*, el pino *Pinus densiflora* y el abeto *Cunninghamia lanceolata* (Nakaji et al. 2001; Arróniz-Crespo et al. 2008; Barrios 2009; Ying-Chun et al. 2010). En contraste dos especies de bromelias epifitas *Tillandsia recurvata* y *T. usneoides*, no se detecta ningún efecto aún cuando la dosis alcanza

los 40 kg de N año⁻¹ (Barrios 2009), ni el cedro Japonés *Cryptomeria japonica* al que aplicaron dosis de hasta 340 kg de N año⁻¹ (Nakaji et al. 2001).

A pesar de los efectos fisiológicos adversos que sobre *Laelia speciosa* supone el aumento en la disponibilidad de nitrógeno, el bajo contenido de este nutriente en las orquídeas que crecen en la ciudad muestra que el depósito de nitrógeno en Morelia no fue suficientemente alto para considerarse tóxico para las planas que lo reciban. Y ya que el parque vehicular de Morelia apenas alcanza 9.7% de los 2,118,096 automóviles que circulan en la Ciudad de México donde, en combinación con una intensa actividad industrial causan un depósito de nitrógeno de hasta 46 kg de N ha⁻¹ año⁻¹, se estima que el depósito de nitrógeno no debe rebasar los 5 kg de N ha⁻¹ año⁻¹ (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010; Calidad del aire en la Ciudad de México Informe 2010).

El depósito de nitrógeno actual en el área de distribución de *L. speciosa* no representa un riesgo para esta orquídea, como sí lo representan otras circunstancias tal como la extracción masiva de segmentos de platas y la pérdida del hábitat (Soto-Arenas 1994). Adicionalmente distintos escenarios de cambio climático estiman un aumento de la distribución de comunidades tropicales, restando terreno a bosques templados de coníferas y de encinos, más aún *Quercus deserticola* principal forofito de *L. speciosa* por su limitada distribución desaparecería en los próximos años (Conde et al. 1995; Villers-Ruiz y Trejo-Vázquez 2000; Sala et al. 2000).

Ya que este estudio fue llevado a cabo a pequeña escala en una ciudad mediana con poca industria, futuras investigaciones deben considerar el efecto del depósito de nitrógeno atmosférico sobre la vegetación próxima a regiones altamente pobladas con un desarrollo industrial mayor al de Morelia, como el valle de México. También se deben considerar las consecuencias de la cercanía a zonas de agricultura intensiva como el Valle del Yaqui, donde se gestó la revolución verde. En dichos ambientes se puede evaluar entre otros, la distribución y la magnitud del depósito de nitrógeno en el paisaje, que puede mostrar el riesgo al que estarían sujetas las especies de plantas que hacen parte de

los diferentes ecosistemas en el área de influencia de estas actividades humanas. El área de influencia puede ser estimada con la ayuda de la dirección de los vientos que en el caso particular de la Ciudad de México se tiene bien caracterizada, donde se podría implementar una red de monitoreo del depósito de nitrógeno usando organismos indicadores como epifitas vasculares y musgos para determinar la magnitud del depósito de nitrógeno (Arciga 2010).

La magnitud del depósito de nitrógeno cambia de acuerdo a la distancia con la fuente y con ella cambian la composición y densidad de especies (Pitcairn et al. 1998; 2002). Se espera la desaparición de especies nitrofilicas cuando el producto liberado sea NH_3^+ o NH_4^+ , mientras que la desaparición de especies acidofílicas estaría facilitada por la liberación de NO_2^- o NO_3^- , y la aparición de otras especies en las zonas más cercanas a la fuente sería evidente. A medida que la distancia aumenta y la influencia del depósito de nitrógeno disminuye, la producción primaria aumentaría debido a la fertilización por dichos compuestos nitrogenados.

Con el aumento en la liberación de nitrógeno en el tiempo a nivel global que, paso de 15 Tg N año⁻¹ en 1860 a 187 Tg N año⁻¹ en 2005 (Galloway et al. 2008), la huella isotópica, la magnitud, la fuente y la distribución del depósito de nitrógeno pueden ser comparadas en las diferentes épocas históricas mediante muestras de plantas de herbario provenientes de las zonas que en la actualidad son influenciadas por fenómenos antropogénicos (Stewart et al. 2002).

La orquídea epífita *Laelia speciosa* tomó el nitrógeno principalmente de la atmósfera y en menor medida del suelo del dosel. Este nitrógeno puede provenir de diferentes fuentes tal como el aire limpio que es característico del campo o también puede tomarlo del aire de la ciudad que contiene los desechos liberados a la atmósfera como resultado de las actividades propias de los centros urbanos. Esto fue detectado con la ayuda de isotopos estables cuya abundancia relativa indica la procedencia del nitrógeno. En particular la señal isotópica del nitrógeno fue positiva en Morelia y negativa en el Cerro El Olvido. La posición en el dosel

no fue un factor determinante en la cantidad y fuente de nitrógeno que asimilaron las plantas. El depósito de nitrógeno de Morelia fue bajo; sin embargo, su señal isotópica fue fácilmente rastreable en las plantas que lo tomaron como única fuente de nitrógeno. En magnitudes bajas, como la que se estimó en Morelia, el depósito de nitrógeno puede tener un efecto fertilizante. Caso contrario fue observado en las plantas que recibieron dosis de 40 y 80 kg de N ha⁻¹ año⁻¹, las cuales tuvieron de efectos tóxicos, probablemente causados por la asimilación preferencial de iones NH₄⁺ sobre NO₃⁻.

Los hallazgos de este estudio muestran las diferentes fuentes de nitrógeno que pueden ser usadas por *Laelia speciosa* para su nutrición dependiendo del sitio donde habitan y del tipo de actividad humana que allí se realice. Este estudio también muestra el efecto que el depósito de nitrógeno simulado tiene sobre la fisiología de esta orquídea epífita y las implicaciones para su persistencia en el futuro.

4.2. Referencias

- Arciga–Pedraza A. 2010. Evaluación del Potencial Bioindicador de la Depositación de Nitrógeno de dos Musgos Comunes en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo.
- Arróniz-Crespo M., Leake J.R., Horton P., y Phoenix G.K. 2008. Bryophyte physiological responses to, and recovery from, long-term nitrogen deposition and phosphorus fertilization in acidic grassland. *New Phytologist*. 180(4):864–74.
- Barrios E.Y. 2009. Organismos Potenciales para Estudios de Bioindicación de la Depositación de Nitrógeno en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo.
- Conde, C., O. Sánchez, y C. Gay, 1995, “Escenarios básicos regionales”, en México ante el cambio climático. Primer Taller de Estudio de País: México ante el cambio climático, Cuernavaca, Morelos, México, pp. 39-43.
- Galloway J.N., Townsend A.R., Erismán J.W., Bekunda M., Cai Z., Freney J.R., Martinelli L.A., Seitzinger S.P. y Sutton M.A. 2008. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions and potential solutions. *Science* 320:889–892.
- Nakaji T., Fukami M., Dokiya Y. y Izuta T. 2001. Effects of high nitrogen load on growth, photosynthesis and nutrient status of *Cryptomeria japonica* and *Pinus densiflora* seedlings. *Trees*. 15:453–461.
- Sala O.E., Chapin III S.F., Armesto J.J., Berlow E., Bloomfield J., Dirzo R., Huber-Sanwald E., Huenneke L.F., Jackson R.B., Kinzig A., Leemans R., Lodge D.M., Mooney H.A., Oesterheld M., Poff N.L., Sykes M.T., Walker B.H., Walker M. y Wal D.H. 2000. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *SCIENCE*. March 2000, vol. 287.

- Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. 2010. Calidad del aire en la Ciudad de México Informe 2010. México DF.
- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2010. Estudio de emisiones y actividad vehiculares en Morelia, Michoacán, Reporte final.
- Soto-Arenas M. 1994. Population studies in Mexican orchids. En: Pridgeon A.M. (eds.) Proceedings of the 14th World Orchid Conference, Glasgow. HMSO Publ.
- Stewart G.R., Aidar M.P.M., Joly C.A. y Schmidt S. 2002. Impact of point source pollution on nitrogen isotope signatures ($\delta^{15}\text{N}$) of vegetation in SE Brazil. *Oecologia*. 131:468–472.
- Pitcairn C.E.R., Leith I.D., Sheppard L.J., Sutton M.A., Fowler D., Munro R.C., Tang S., y Wilson D. 1998. The relationship between nitrogen deposition, species composition and foliar nitrogen concentrations in woodland flora in the vicinity of livestock farms. *Environmental Pollution*. 120S:41–48.
- Pitcairn C.E.R., Skibaa U.M., Sutton M.A., Fowler D., Munro R. y Kenned V. 2002. Defining the spatial impacts of poultry farm ammonia emissions on species composition of adjacent woodland ground flora using Ellenberg Nitrogen Index, nitrous oxide and nitric oxide emissions and foliar nitrogen as marker variables. *Environmental Pollution*. 119:9–21.
- Ying-Chun L., Hou-Bao F., Yan-Yan L., Wen-Fei L., Ying-Hong Y. 2010. Effects of simulated nitrogen deposition on growth and photosynthesis of 1-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) seedlings. *Acta Ecologica Sinica*. 30:150–154.
- Villers-Ruiz L. y Trejo-Vázquez I. 2000. El cambio climático y la vegetación en México. En *México: una visión hacia el siglo XXI. El cambio climático en México*. Gay García C. (Compilador). Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, US Country Studies Program. México, 220 p. ISBN 968-36-7562-X.