

TESIS DOCTORAL

**Energetización de la membrana,  
mecanismos de incorporación de carbono  
inorgánico y nutrientes y homeostasis de  
nitrato en la angiosperma marina  
*Posidonia oceanica* L. (Delile)**

**Delia García Pérez**

FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento de Botánica  
y Fisiología Vegetal.  
Área de Fisiología Vegetal

Programa Doctorado  
Biotecnología Avanzada  
Julio 2019



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA


**Directores: Lourdes Rubio  
José Antonio Fernández**





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Delia García Pérez

 <http://orcid.org/0000-0002-7001-370X>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



Fotografía portada: Javier Murcia  
Tomado de Ruiz *et al.*, 2015.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**Facultad de Ciencias**

**Energetización de la membrana, mecanismos  
de incorporación de carbono inorgánico y  
nutrientes y homeostasis de nitrato en la  
fanerógama marina *Posidonia oceanica* L.  
(Delile)**

**TESIS DOCTORAL**

**Delia García Pérez**

**Programa Doctorado Biotecnología Avanzada**

**Julio 2019**

**Directores: D<sup>a</sup> Lourdes Rubio**

**D. José Antonio Fernández**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



D<sup>a</sup> LOURDES RUBIO VALVERDE, Profesora Titular de Universidad y D. JOSÉ ANTONIO FERNÁNDEZ GARCÍA, Catedrático de Universidad, ambos adscritos al Área de Fisiología Vegetal de la Universidad de Málaga,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación: **Energetización de la membrana, mecanismos de incorporación de carbono inorgánico y nutrientes y homeostasis de nitrato en la angiosperma marina *Posidonia oceanica* L. (Delile)**, realizado por D<sup>a</sup> DELIA GARCÍA PÉREZ bajo nuestra dirección en el Dpto. de Botánica y Fisiología Vegetal (Área de Fisiología Vegetal), se considera finalizado y puede ser presentado para su evaluación y defensa como Tesis Doctoral en el marco del Programa de Doctorado Biotecnología Avanzada de la Universidad de Málaga.

RUBIO  
VALVERDE  
LOURDES -  
25338639E

Firmado digitalmente  
por RUBIO VALVERDE  
LOURDES - 25338639E  
Fecha: 2019.07.23  
13:35:42 +02'00'

Fdo. Dra. D<sup>a</sup> Lourdes Rubio Valverde

FERNANDEZ  
GARCIA JOSE  
ANTONIO -  
24886238P

Firmado digitalmente  
por FERNANDEZ  
GARCIA JOSE  
ANTONIO - 24886238P  
Fecha: 2019.07.23  
18:47:50 -07'00'

Fdo. Dr. D. José Antonio Fernández García

Málaga, a 23 de Julio de 2019



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



La presente Tesis Doctoral ha sido desarrollada dentro del grupo de investigación de la Junta de Andalucía *Ecofisiología de Sistemas Acuáticos* (RNM 176) y ha sido financiada por los proyectos de investigación *Efecto de la acidificación del agua de mar, incremento de CO<sub>2</sub> y de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas* (CTM2011-30356), y *Efecto del incremento de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en la homeostasis del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> citoplasmático en angiospermas marinas* (CTM2014-58055), ambos del Ministerio de Economía y Competitividad.

La doctoranda ha sido beneficiaria de una beca de Formación de Personal Investigador de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación del Ministerio de Economía y Competitividad con referencia BES-2012-052685.

Parte de los resultados incluidos en esta memoria han sido presentados en el *XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal* (Junio 2015, Toledo, España) y en la *XV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal* (Junio 2017, Barcelona, España), y se han publicado en dos artículos en sendas revistas científicas (ANEXO):

Rubio, L., García-Pérez, D., García-Sánchez, M.J., Niell, F.X., Felle, H.H. & Fernández, J.A. 2017. The effect of elevated inorganic carbon on cytosolic pH reveals a direct transport of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the marine angiosperm *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Plant Cell & Environment*, 1-11.

Rubio, L., García-Pérez, D., García-Sánchez, M.J. & Fernández, J.A. 2018. Na<sup>+</sup>-dependent high affinity nitrate, phosphate and amino acids transport in leaf cells of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1570.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

*Si se define la inteligencia como la capacidad de resolver problemas,  
las plantas tienen mucho que enseñarnos.*

**Stefano Mancuso**

*Para poder dar conmigo,  
recorrí todas las sendas.  
Me equivoqué de caminos.  
Anduve toda la Tierra  
hasta que al fin dí conmigo.  
El que se busca se encuentra.*

**Manuel Alcántara**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## AGRADECIMIENTOS

*Tesis* se titula una película de Amenábar de los 90 que ví durante mi adolescencia, etapa en la que forjamos nuestra personalidad, la que nos determina gran parte del resto de nuestra vida. Tras ver aquella película de terror-suspense la idea de que una tesis era algo maligno y demasiado sacrificado caló en mí. Por entonces no imaginaba que llegaría a este momento.

La Tesis para mí no sólo ha sido el reto intelectual inherente a la misma, sino además un reto de crecimiento personal. Y eso los humanos sólo somos capaces de hacerlo interaccionando con otros seres humanos. Y hablo así, en términos de especie, porque es lo que todos somos al menos, seres humanos, lo único que somos cuando llegamos a este mundo al nacer. Conforme crecemos empezamos a tener consciencia de nuestra entidad como individuo, y aunque muchos se quedan ahí, algunos incluso llegan a ser personas. Por eso estas líneas van dedicadas a todos aquellos que me han ayudado a crecer y llegar a ser mejor persona.

Al contrario que en la película, afortunadamente mis directores Lourdes Rubio y José Antonio Fernández, han sobrevivido a esta Tesis. Dúo de trabajadores infatigables, investigadores natos, intelectuales por excelencia, a ellos van mis primeros agradecimientos. Sin duda esta Tesis ha sido posible gracias a vosotros. Gracias de corazón por darme la oportunidad de trabajar a vuestro lado, por vuestro apoyo en todo momento, por guiarme en esta carrera de fondo y por haberme enseñado a jugar y disfrutar con vuestros “carísimos juguetes”.

A M<sup>a</sup> Jesús, Xavier y Hubert, por sus interesantes conversaciones y aportaciones a la mejora de los artículos publicados.

A mis compañeros de Electrofisiología: inicialmente Bea y Karima, que me enseñaron los pequeños trucos del funcionamiento del laboratorio y me trataron como una más desde el primer día; a los que han pasado fugazmente, Kinia, Cristina, Alex, por hacer más amenos los días que compartimos; a Jordi, el más reciente y a quien deseo todo lo mejor en esta nueva etapa; y a Lola, la mejor compañera de laboratorio que se pueda tener, creo que nunca voy a encontrarme trabajando tan a gusto como contigo, tú y yo nos entendemos, tu amistad es una de las mejores cosas que me llevo de esta etapa.

A mis otros principales compañeros en el día a día: Elena, siempre dispuesta a ayudar, modelo de calma y responsabilidad; Sergio, uno de los culpables de mi reciente afición a correr, con la que realmente soy más feliz; Cande, siempre atenta y pendiente de mí, dispuesta a arreglar el mundo compartiendo una cerveza; a Isa, mi pequeña domina, mi compañera por excelencia, a la hora de comer, de ir al deporte, de tantos viernes por la tarde de *solì pandi* y de tantas y tantas charlas hasta las mil; a Juanillo, siempre dispuesto a venir conmigo a por agua de mar, mi mejor compañero de muestreos, terapias acompañadas de comida basura y de aventuras en general, más que un mejor amigo mi segundo hermano pequeño; y por supuesto a los compañeros becarios Pablo, Marta y Luis y no becarios pero compañeros de sala: Nieves, Rocío, Héctor, Miguel y Rafa.

A los miembros del departamento de Biología Vegetal: Fernando, José Ángel, Antonio, Carolina, Sara, Eva y Lola por ayudarme en todo aquello que he necesitado y tratarme siempre con afecto.

No puedo dejar de nombrar a los miembros del área de Fisiología Animal: Margarita, M<sup>a</sup> Dolores, Mar y Silvia, por las amenas tertulias durante el almuerzo, y especialmente a Manolo por su inestimable ayuda en la preparación de cortes histológicos.

Y como no, a los miembros del departamento de Ecología, Raquel, María, Kike, Gordillo, Concha, por abrirme las puertas y dejarme un huequito en la cámara de 15°C y a las *Ecogirls* María, Miriam, Conchi y en especial a Rakelita, y su *Technicon*.

A mis compañeros de muestreos: Pablo, con quien descubrí los primeros rodales de *Posidonia*, Roberto y Paula, dispuestos a mojarse incluso en días señalados como Nochebuena; Claudia, mi compi de buceo con botella, y, en ocasiones, mi querida perrita Hada, mi más fiel compañera, ¡si tú hablaras!

Al equipo del Istituto di Biofisica del CNR en Génova: Laura, Anna, Joachim, Giulia, y Claudia, por hacerme sentir como en casa, y en especial a Armando, por darme la oportunidad de descubrir el mundo del patch-clamp. Y cómo no a *le Bellissime del CNR*: Alice, Eleonora, Sara y Asma, gracias por hacer de mi estancia en Génova unos meses inolvidables. Con lo temerosa que llegué, realmente me dio mucha pena irme, me hubiera quedado allí para siempre.

A Ignacio y Carmen, por sus largas conversaciones, sabios consejos y ese “lo estás haciendo bien” que tanto he necesitado durante los últimos meses.

Y llega el momento de mi familia, la cual requiere mención especial. Gracias a mis hermanos, Héctor y Darío, por estar ahí cuando menos lo esperas, y mis cuñadas, Yolanda y Julia María, por ser justo lo que ellos necesitan y engrandecer nuestra familia. A mi cuñado Carlos, por sacar siempre el punto divertido y romper los momentos de tensión con unas risas, y a mis adorados Bruno y Leo, por las *sobri-terapias* en las que *yo te calmo, tú me calmas* y las tardes de jugar a los experimentos. A mi hermana, Tamara, mi ejemplo a seguir como persona, como profesional, como madre, como todo. Siempre tienes las palabras adecuadas para decir las verdades con amor y cariño y poder afrontar la realidad con serenidad. Ser tu hermana es mi mayor orgullo.

A mi padre, mi gran ayuda en la sombra, el que pasa desapercibido y sin embargo es pieza clave del puzzle. Aquel *bonito paisaje* reflejaba el amor por el entorno natural que me has inculcado desde pequeña y me ha hecho en gran parte llegar hasta aquí. A mi madre, mi referente, la que siempre ha creído en mí y me ha animado a seguir adelante. Gracias por darme siempre todo por mí, mamá.

A mi hija, Blanca, que me ha dado la fuerza y la motivación en la última fase de este trabajo; y a ti, Nobeto, mi compañero de vida, gracias por cuidarme, comprenderme y apoyarme en todo, aunque eso haya significado estar tanto tiempo a mil kilómetros, pero como tú dices sólo son kilómetros.

Y en general a toda mi familia, los Pérez, los García y los Mitxelena.

Gracias a todos por formar, en diferentes niveles, mi red de apoyo, porque gracias a vosotros “al final todo sale bien, y si no ha salido bien, es que no es el final”.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



*A mi madre, Iselina*

*A mi hija, Blanca*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ÍNDICE



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

	Página
<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	<b>I</b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	<b>V</b>
<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>IX</b>
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1.- Las plantas vasculares del medio marino.</b>	<b>3</b>
<b>2.- Incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas</b>	<b>8</b>
<b>3.- Incremento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, acidificación oceánica e incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas</b>	<b>18</b>
<b>4.- OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>21</b>
<b>1.- Material Vegetal</b>	<b>23</b>
<i>1.1.- Taxonomía, distribución y morfología de Posidonia oceanica</i>	<b>23</b>
<i>1.2.- Recolección y mantenimiento en condiciones de laboratorio</i>	<b>29</b>
<i>1.3.- Germinación de semillas</i>	<b>30</b>
<i>1.4.- Estructura histológica</i>	<b>31</b>
<b>2.- Electrofisiología</b>	<b>33</b>
<i>2.1.- Medida del potencial de membrana. Fabricación de microelectrodos simples</i>	<b>33</b>
<i>2.2.- Medida de la actividad iónica intracelular: microelectrodos ión selectivos</i>	<b>35</b>
<i>2.3.- Medida del pH extracelular</i>	<b>40</b>

	<b>Página</b>
<b>3.- Diseño experimental</b>	<b>41</b>
<b>3.1.- Energética del plasmalema y permeabilidad relativa <math>P_{Na^+}/P_{K^+}</math></b>	<b>41</b>
3.1.1.- Efecto de la transición luz - oscuridad sobre el $E_m$	41
3.1.2.- Efecto de la fusicocina sobre el $E_m$ y el $pH_{ext}$	42
3.1.3.- Permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$ y concentración citosólica de $Na^+$	43
<b>3.2.- Estudio de la incorporación de bicarbonato (<math>HCO_3^-</math>)</b>	<b>45</b>
3.2.1.- Efecto del incremento de $CO_2$ sobre el $E_m$ y el pH citosólico	45
3.2.2.- Transporte de bicarbonato y fotosíntesis	46
<b>3.3.- Estudio de la incorporación de nitrato (<math>NO_3^-</math>)</b>	<b>49</b>
3.3.1.- Efecto del $Na^+$ sobre la incorporación de $NO_3^-$	50
3.3.2.- Efecto del incremento de la concentración de $HCO_3^-$ sobre la incorporación de $NO_3^-$	51
3.3.3.- Determinación de la $[NO_3^-]_c$ . Efecto de la transición luz - oscuridad y del incremento de $C_i$	52
<b>3.4.- Estudio de la incorporación de fósforo inorgánico (<math>P_i</math>)</b>	<b>53</b>
3.4.1.- Determinación de la tasa de incorporación de $P_i$ . Efecto del $Na^+$	53
3.4.2.- Efecto del incremento de la concentración de $HCO_3^-$ sobre la incorporación de $P_i$	54
3.4.3.- Efecto del $Na^+$ sobre la incorporación de $P_i$ en alto $HCO_3^-$	54
<b>3.5.- Estudio del transporte de aminoácidos (<i>L-Ala</i> y <i>L-Cys</i>)</b>	<b>55</b>
<b>4.- Análisis de datos</b>	<b>56</b>

	Página
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>57</b>
<b>1.- Obtención de plántulas de <i>Posidonia oceanica</i></b>	<b>59</b>
<b>2.- Energética del plasmalema y permeabilidad relativa <math>P_{Na^+}/P_{K^+}</math></b>	<b>60</b>
<i>2.1.- Efecto de la transición luz - oscuridad sobre el <math>E_m</math></i>	<b>60</b>
<i>2.2.- Efecto de la fusicocina sobre el <math>E_m</math> y el <math>pH_{ext}</math></i>	<b>61</b>
<i>2.3.- Permeabilidad relativa <math>P_{Na^+}/P_{K^+}</math> y concentración citosólica de <math>Na^+</math></i>	<b>62</b>
<b>3.- Incorporación de bicarbonato</b>	<b>65</b>
<i>3.1.- Efecto del incremento de <math>CO_2</math> sobre el <math>E_m</math> y el <math>pH</math> citosólico</i>	<b>68</b>
<i>3.2.- Transporte de bicarbonato y fotosíntesis</i>	<b>68</b>
<b>4.- Estudio de la incorporación de nitrato, fósforo inorgánico y aminoácidos</b>	<b>73</b>
<i>4.1.- Incorporación de nitrato (<math>NO_3^-</math>)</i>	<b>73</b>
4.1.1.- Efecto del $Na^+$ sobre la incorporación de $NO_3^-$	75
4.1.2.- Efecto del incremento de la concentración de $HCO_3^-$ sobre la cinética de incorporación de $NO_3^-$	79
4.1.3.- Medida de la concentración citosólica de nitrato ( $[NO_3^-]_c$ )	80
<i>4.2.- Incorporación de fósforo inorgánico (<math>P_i</math>)</i>	<b>83</b>
4.2.1.- Determinación de la tasa de incorporación de $P_i$ . Efecto del $Na^+$	83
4.2.2.- Efecto del incremento de la concentración de $HCO_3^-$ sobre la incorporación de $P_i$	85
4.2.3.- Efecto del $Na^+$ sobre la cinética de incorporación de $P_i$ en alto $HCO_3^-$	88
<i>4.3.- Incorporación de aminoácidos (<i>L-Ala</i> &amp; <i>L-Cys</i>). Efecto del <math>Na^+</math></i>	<b>89</b>

	Página
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>93</b>
<b>1.- Energética del plasmalema y permeabilidad relativa <math>P_{Na^+}/P_{K^+}</math></b>	<b>95</b>
<i>1.1.- P. oceanica conserva una <math>H^+</math>-ATPasa como bomba primaria</i>	96
<i>1.2.- La permeabilidad a <math>Na^+</math> respecto a <math>K^+</math> del plasmalema es muy restringida</i>	97
<b>2.- Incorporación de bicarbonato (<math>HCO_3^-</math>) en <i>P. oceanica</i></b>	<b>99</b>
<i>2.1.- Incorporación directa de <math>HCO_3^-</math> mediante un simporte <math>H^+/HCO_3^-</math> en células del mesófilo foliar</i>	100
<i>2.2.- Utilización de <math>HCO_3^-</math> para la fotosíntesis en <i>P. oceanica</i></i>	102
<i>2.3.- Incorporación de <math>HCO_3^-</math> y homeostasis aniónica</i>	104
<i>2.4.- La incorporación de <math>HCO_3^-</math> acoplada a <math>H^+</math> contribuye a los CCM en <i>Posidonia oceanica</i></i>	105
<b>3.- Energética y transporte de <math>NO_3^-</math>, <math>P_i</math> y aminoácidos en <i>Posidonia oceanica</i></b>	<b>107</b>
<b><i>3.1.- Transporte de <math>NO_3^-</math> en <i>P. oceanica</i></i></b>	<b>108</b>
3.1.1.- La incorporación de $NO_3^-$ disminuye en oscuridad	110
3.1.2.- El transporte de $NO_3^-$ es dependiente de $Na^+$	111
3.1.3.- La incorporación de $NO_3^-$ aumenta en alto $HCO_3^-$	115
3.1.4.- Regulación de la concentración citosólica de $NO_3^-$	115
<b><i>3.2.- Transporte de <math>P_i</math> en <i>P. oceanica</i></i></b>	<b>117</b>
3.2.1.- El transporte de $P_i$ es dependiente de $Na^+$	119
<b><i>3.3.- El <math>Na^+</math> también es el ión motriz para el transporte de los aminoácidos L-Ala y L-Cys</i></b>	<b>121</b>



	<b>Página</b>
<b>4.- Modelo general de energización del plasmalema e incorporación de nutrientes en <i>P. oceanica</i></b>	<b>122</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>127</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>131</b>
<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS</u></b>	<b>163</b>
<b><u>ÍNDICE DE TABLAS</u></b>	<b>169</b>
<b><u>ANEXO: Publicaciones</u></b>	<b>173</b>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ABREVIATURAS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Abreviaturas

APS	Fotosíntesis aparente ( <i>Apparent Photosynthesis</i> )
ASW	Agua de mar artificial ( <i>Artificial Sea Water</i> )
AZ	Acetazolamida
BTP	Bis Tris Propano: 1,3-bis [tris (hidroximetil) metilamino] propano
CA	Anhidrasa carbónica ( <i>Carbonic Anhydrase</i> )
CCM	Mecanismos de concentración de carbono ( <i>Carbon Concentrating Mechanism</i> )
$C_i$	Carbono inorgánico
$Cl_c^-$	Concentración citosólica de $Cl^-$
$CP_{HCO_3^-}$	Punto de compensación para el $HCO_3^-$ ( <i>Bicarbonate Compensation Point</i> )
DIC	Carbono inorgánico disuelto ( <i>Dissolved Inorganic Carbon</i> )
DIDS	Ácido 4,4'- diisotiocianatostilbeno - 2,2' disulfónico
$\Delta E_m$	Despolarización de la membrana
$\Delta G'$	Incremento de energía libre de Gibbs
DM	Biomasa seca ( <i>Dry Mass</i> )
$D_{max}$	Despolarización máxima
$\Delta\tilde{\mu}_j/F$	Gradiente de potencial electroquímico para el ión $j$
$E_m$	Potencial de membrana
$E_j^N$	Potencial de Nernst para el ión $j$
$E_D$	Potencial de difusión
EZ	Etoxizolamida
FC	Fusicocina
$K_M$	Constante de Michaelis & Menten
MES	Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico

MON	Monensina
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino]PropanoSulfónico
$\text{Na}^+_c$	Concentración citosólica de $\text{Na}^+$
NPPB	Ácido Nitro-PhenylPropylamino-Benzoico
NSW	Agua de mar natural ( <i>Natural Sea Water</i> )
$p$	Probabilidad asociada al estadístico de contraste
$P_{\text{Cl}^-}$	Permeabilidad de la membrana para el ión $\text{Cl}^-$
$\text{pH}_c$	pH citosólico
$\text{pH}_{\text{ext}}$	pH externo
$P_i$	Fósforo inorgánico
$P_{\text{K}^+}$	Permeabilidad de la membrana para el ión $\text{K}^+$
$P_{\text{Na}^+}$	Permeabilidad de la membrana para el ión $\text{Na}^+$
PVC	Cloruro de polivinilo
SD	Desviación estándar ( <i>Standard Deviation</i> )
SHAM	Ácido salicil hidroxámico
THF	Tetrahidrofurano
$z_j$	Carga eléctrica del ión $j$

## **RESUMEN**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Las fanerógamas marinas constituyen el único grupo de angiospermas que ha colonizado el medio marino, desarrollando mecanismos de adaptación a un ambiente caracterizado por una elevada salinidad, un pH alcalino y una baja disponibilidad de nutrientes. En este trabajo se ha determinado el sistema que energiza la membrana plasmática y su permeabilidad relativa a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , los mecanismos de transporte de  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  y aminoácidos, y la homeostasis citosólica de  $\text{NO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de la fanerógama marina *Posidonia oceanica* L. (Delile). La principal metodología empleada ha sido la electrofisiología, usando microelectrodos ión-selectivo de aplicación interna (citósol) y externa. Además, se ha analizado la respuesta fotosintética al incremento de  $\text{C}_i$  disuelto ( $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$ ) mediante la medida polarográfica de oxígeno. Los resultados indican que la bomba primaria de la membrana plasmática es una  $\text{H}^+$ -ATPasa de tipo P, sensible a fusicocina y que la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  es muy baja ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0.0046 \pm 0.0012$ ). La adición de  $\text{HCO}_3^-$  despolariza la membrana y provoca la acidificación transitoria del citósol, indicando que el  $\text{HCO}_3^-$  es incorporado en simporte con  $\text{H}^+$ . A dicha acidificación le sigue una alcalinización que se inhibe por EZ, lo que sugiere la deshidratación interna del  $\text{HCO}_3^-$ . La constante de semisaturación ( $S_{0.5} = 0.35 \pm 0.07 \text{ mM HCO}_3^-$ ) similar a la afinidad del transporte ( $K_M = 0.36 \pm 0.04 \text{ mM HCO}_3^-$ ) sugiere un mecanismo eficiente de incorporación este ión. Por otra parte, la adición de concentraciones micromolares de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{P}_i$  provoca despolarizaciones de la membrana plasmática, que se saturan respecto a la concentración añadida ( $K_M = 8.7 \pm 1 \text{ }\mu\text{M NO}_3^-$  y  $K_M = 5.8 \pm 0.8 \text{ }\mu\text{M P}_i$ ) y son dependientes de la presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio, mostrando también una cinética de saturación para este ión ( $K_M = 7.2 \pm 2 \text{ mM Na}^+$  para el  $\text{NO}_3^-$  y  $K_M = 4.3 \pm 0.5 \text{ mM Na}^+$  para el  $\text{P}_i$ ). La adición de  $100 \text{ }\mu\text{M NO}_3^-$  incrementa en  $0.4 \pm 0.2 \text{ mM}$  la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  ( $17 \pm 2 \text{ mM Na}^+$ ). En oscuridad, el transporte de  $\text{NO}_3^-$  es menor y aumenta la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  ( $5.7 \pm 0.2 \text{ mM}$ ). El aumento del  $\text{HCO}_3^-$  en el medio provoca la disminución del  $\text{NO}_3^-$  citosólico, y el aumento del transporte de  $\text{NO}_3^-$ , lo que sugiere un flujo de salida de  $\text{NO}_3^-$  inducido por alto  $\text{HCO}_3^-$ . Las tasas netas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{P}_i$  disminuyen más del 70% en ausencia de  $\text{Na}^+$ . Esta dependencia de  $\text{Na}^+$  también se observa en el transporte de alta afinidad de los aminoácidos L-Ala y L-Cys ( $K_M = 37 \pm 11 \text{ }\mu\text{M}$  y  $K_M = 10 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$ , respectivamente). Así, *P. oceanica* usa los  $\text{H}^+$  para impulsar la incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$ , cuya deshidratación interna provocaría la disminución de  $\text{NO}_3^-$  en el citósol, mientras que la incorporación de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  y aminoácidos está mediada por transportadores de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$ , mecanismo que parece ser clave en el proceso de adaptación de las fanerógamas marinas al medio ambiente marino.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## SUMMARY



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

Seagrasses are unique plants, the only group of flowering plants to colonize the sea; they occur on every continental margin, except Antarctica, and form keystone coastal ecosystems (den Hartog & Kou, 2006). Along the Mediterranean coast, *Posidonia oceanica* (L.) Delile is an endemic species of great ecological significance (Aires *et al.*, 2011) that covers around 2% of the total Mediterranean surface (Duarte, 1990; Gobert *et al.*, 2006).

One of the major challenges that faced these angiosperms was the adaption to an environment characterized by a high salinity, alkaline pH and a low essential nutrient concentration, as nitrate and phosphate. In respect to salt tolerance, the maintenance of a high negative membrane potential ( $E_m$ ), generated by primary pumps, seems to be crucial (Shabala & Mackay, 2011). In the case of seagrasses, membrane potential values are around -160 mV (Rubio & Fernández, 2019), relatively more negative values compared to those described for most marine algae (Gutknecht & Dainty, 1968; Gradmann & Boyd, 1995), or in root cells of terrestrial halophytes such as *Atriplex hastata* (between -130 and -140 mV; Anderson *et al.*, 1977), *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa* (-140 mV in plants grown in the absence of  $\text{Na}^+$ , Bose *et al.*, 2015) or *Halimione (= Atriplex) portulacoides* (-140 mV in plants grown in full strength  $\text{K}^+$ , Ait-Hammou *et al.*, 2014).

In vascular plants the primary pump responsible for energizing the plasma membrane is a P-type  $\text{H}^+$ -ATPase, an electrogenic enzyme that extrudes positive charges ( $\text{H}^+$ ) and consequently generates a negative membrane potential (Palmgrem, 2001). Plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPases are irreversibly activated by the phytotoxin fusicoccin, a response that has been used to identify this enzyme in plants (Marrè, 1979). As flowering plants lacking  $\text{Na}^+$  pumps (Pedersen *et al.*, 2012), marine angiosperms also use P-type  $\text{H}^+$ -ATPases to energize the plasma membrane (Fernández *et al.*, 1999). Molecular evidence of the existence of a salt tolerant proton pump has been given for *Zostera marina* (Fukuhara *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 2016), and Fernández *et al.* (1999) also provided physiological evidence of a fusicoccin (FC) sensitive proton pump in this seagrass species.

The restriction to  $\text{Na}^+$  influx through the plasma membrane is another mechanism to face up to salinity. In the presence of respiratory inhibitors, such as cyanide (NaCN) and salicylhydroxamic acid (SHAM), the plasma membrane of ATP-depleted cells depolarize until the so-called diffusion potential ( $E_D$ ) is reached (Felle,

## Summary

1981). This value, defined by the Goldman-Hodgking-Katz equation, represents the passive ionic distribution of  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  on the two sides of the plasma membrane. This depends on the ion concentration gradients and also on the ease with which those ions cross the membrane (i.e. on their permeability coefficients) (Nobel, 2009). In plant cells,  $K^+$  is the most permeable ion, followed by  $Na^+$  and  $Cl^-$ , whose permeability is as much as 1% - 0.1% lower than that of  $K^+$  (Nobel, 2009). The response of the  $E_D$  to changes in the external  $K^+$  concentration has been used in *Z. marina* to determine the plasma membrane  $Na^+/K^+$  permeability ratio, resulting in a particularly low value (0.003; Fernández et al., 1999) compared with *Arabidopsis thaliana* (0.67 in root protoplasts; Demidchik & Tester, 2002; Volkov et al., 2003) or even with halophytes such as *H. portulacoides* (0.19 in epidermal root cells; Rubio et al., 2009). Thus, seagrasses are able to maintain cytosolic  $Na^+$  concentrations under 20 mM (Rubio et al., 2005; 2011) similar values to those measured in terrestrial glycophytes (Carden et al., 2003) but much lower than the proposed values for terrestrial halophytes, for which predictions are 70 and 200 mM  $Na^+$  in plants grown in the presence of 50 and 400 mM  $Na^+$ , respectively (Flowers et al., 2015).

Seagrasses also face up to the acquisition of dissolved inorganic carbon for photosynthesis. The low diffusion rate of dissolved  $CO_2$  and also the low rate constant of the un-catalysed dehydration of  $HCO_3^-$  at the pH of natural seawater (NSW, from 7.9 to 8.2) may result in limitation of  $CO_2$  supply for photosynthesis (Falkowski & Raven, 2007; Raven, 1984). Photosynthetic use of  $HCO_3^-$  has been described for a vast majority of marine macroalgae and seagrasses (Koch et al., 2013 and references therein). Marine angiosperms are described as  $HCO_3^-$  users (Beer et al., 2002; Borum et al., 2016; Koch et al., 2013). The use of  $HCO_3^-$  for photosynthesis in seagrasses can be outlined in two basic models:

(a) Apoplastic conversion of  $HCO_3^-$  to  $CO_2$  and  $OH^-$  catalysed by an external carbonic anhydrase (CA). This is a process that should be sensitive to acetazolamide (AZ), a plasma membrane-impermeable inhibitor of CA (Beer et al., 2002; Björk et al., 1997; Invers et al., 1997, 1999; James & Larkum, 1996). A subset of this category could be the conversion of  $HCO_3^-$  to  $CO_2$  in external acid regions, and this mechanism does not necessarily need external CA: acidification speeds up the  $HCO_3^-$  to  $CO_2$  conversion and establishes a higher  $CO_2 : HCO_3^-$  ratio than in seawater and in the rest of the boundary layer (Beer et al., 2002; Hellblom & Axelsson, 2003). When

supplemented with acid regions, this model of external  $\text{HCO}_3^-$  dehydration can constitute a  $\text{CO}_2$  concentration mechanism (Ferrier, 1980; Walker *et al.*, 1980).

(b) The second model would be a direct uptake of  $\text{HCO}_3^-$ , by means of a symport, energized by  $\text{H}^+$ , as has been proposed by Hellblom *et al.* (2001), Beer *et al.* (2002), Mercado *et al.* (2003), and Giordano *et al.* (2005). Due to their lineage, seagrasses are expected to use  $\text{H}^+$ -ATPases to energize the plasma membrane (Pedersen *et al.*, 2012); thus, both mechanisms for  $\text{HCO}_3^-$  use could be favoured. Proton efflux through the plasma membrane could create acid apoplastic regions where the conversion of  $\text{HCO}_3^-$  to  $\text{CO}_2$  could be accelerated, as described for Charophyte algae (Ferrier, 1980; Walker *et al.*, 1980). However, there have been no direct demonstrations of apoplastic acid zones in seagrasses because they must occupy smaller areas (Raven & Beardall, 2016), although in these smaller areas, the inwardly directed  $\text{H}^+$  gradient generated by  $\text{H}^+$ -ATPases makes inward  $\text{HCO}_3^-$  symport with  $\text{H}^+$  feasible (Beilby & Bisson, 2012; Lucas *et al.*, 1983).

$\text{HCO}_3^-$  use in seagrasses has been mainly studied by monitoring short-term photosynthetic response to inhibitors (such as AZ) that act on externally functioning CA or by using buffers to inhibit boundary layer acidification (Beer *et al.*, 2002). Thus, *P. oceanica* and *Posidonia australis* have been reported to dehydrate  $\text{HCO}_3^-$  in the apoplast (Invers *et al.*, 1999; James & Larkum, 1996), although Invers *et al.* (2001) did not exclude the possibility of a direct  $\text{HCO}_3^-$  uptake in *P. oceanica*. On the other hand, *Z. marina* (Hellblom *et al.*, 2001), the sun morphotype of *Zostera noltii* (Mercado *et al.*, 2003), as well as a number of tropical species (Uku *et al.*, 2005) seem to take up  $\text{HCO}_3^-$  directly. Finally, in two temperate species from Australia, *Halophila ovalis* and *Syringodium isoetifolium*, a direct uptake of  $\text{HCO}_3^-$  has also been proposed (Borum *et al.*, 2016). Few works, both on seagrasses or other aquatic plants, employ direct ionic measurements to reveal which form of inorganic carbon ( $\text{CO}_2$  or  $\text{HCO}_3^-$ ) enters the cells in  $\text{HCO}_3^-$  users at the alkaline pH of seawater (Beer *et al.*, 2002; Raven & Beardall, 2016).

To investigate the inorganic carbon species that crosses the plasma membrane, one alternative to the use of externally added inhibitors could be the measurement of cytosolic pH ( $\text{pH}_c$ ) in response to inorganic carbon pulses. Depending on which inorganic carbon form enters the cell, a different response of  $\text{pH}_c$  could be expected. The external (catalysed) dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  would allow some of the resulting  $\text{CO}_2$

## Summary

to enter the cells, acidifying the cytoplasm, as shown by Ballesteros *et al.* (1998). In contrast,  $H^+$ -driven  $HCO_3^-$  transport should initially acidify the cytoplasm, but then, after the internal dehydration of  $HCO_3^-$  to  $CO_2$ , the  $OH^-$  generation should render the cytosol alkaline.

Apart from  $H^+$ ,  $Na^+$  or  $Cl^-$  could be also considered to drive  $HCO_3^-$  transport in marine plants.  $Na^+$ -dependent photosynthetic  $HCO_3^-$  uptake has been reported for cyanobacteria (Badger *et al.*, 2002; Badger & Price, 2003). Also, the existence of an anion exchanger has been proposed for the direct uptake of  $HCO_3^-$  in marine algae (Drechsler *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 2014; Larsson & Axelsson, 1999). Interestingly, in the seagrass *Z. marina*, it has been shown that  $Na^+$  is the driving ion for the high-affinity uptake of  $NO_3^-$  and  $P_i$  (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005) and a salt-dependent stimulation of photosynthesis has been reported for *Zostera muelleri* (Millhouse & Strother, 1986, 1987). The operation of  $Na^+$  or  $Cl^-$  as the driving ion for  $HCO_3^-$  uptake would result in a different effect on  $pH_c$  and cytosolic concentrations of each driving ion. If  $Na^+$  were the driving ion, a simultaneous uptake of  $HCO_3^-$  and increase of cytosolic  $Na^+$  would occur; if  $Cl^-$  were the driving ion, cytosolic  $Cl^-$  would decrease at the same time that  $HCO_3^-$  is transported into the cell. In none of these cases would there be an initial acidification of  $pH_c$ .

If it would operate, a  $HCO_3^-$  transporter could play a major role in organisms with a biophysical carbon-concentrating mechanism (CCM; Raven *et al.*, 2014; Raven & Beardall, 2016). Although the extracellular catalysed conversion of  $HCO_3^-$  to  $CO_2$  is an important mechanism for  $HCO_3^-$  use in marine macroalgae and seagrasses, it does not concentrate  $CO_2$  above the equilibrium concentration (Beer *et al.*, 2002). To be part of a CCM, the catalysed dehydration of  $HCO_3^-$  has to take place in an acidic (intra or extra) cellular compartment to give a high  $CO_2$  equilibrium concentration (Giordano *et al.*, 2005). In contrast, active transport of  $HCO_3^-$  across the plasma membrane and its subsequent intracellular catalysed conversion to  $CO_2$  has been proposed as a CCM in algae (Giordano *et al.*, 2005) and also in seagrasses (Beer *et al.*, 2002; Raven *et al.*, 2008).

Nitrogen and phosphorus are essential nutrients for plants, whose availability may limit biomass maintenance and growth. Seawater is a high salinity and alkaline medium with low concentrations of N and P, often below  $5 \mu M$  in the Mediterranean Sea (Bethoux *et al.*, 2005). The seagrass *Posidonia oceanica* is limited by N and P



(Alcoverro *et al.*, 1997), but is able to grow under nutrient concentrations low enough (less than 5  $\mu\text{M}$  of dissolved inorganic nitrogen and 1  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ ) to limit the proliferation of other species, as *Cymodocea nodosa* (Alcoverro *et al.*, 1997, Pérez *et al.*, 1991). To take up nutrients at low external concentrations plants have to: (i) evolve transport systems with the capability to bind the free ion species with a very low  $K_M$  and (ii) a powerful system to energize the movement of the ions across the plasma membranes to overcome the high, outwardly directed, ion motive force. In the case of the seagrass *Zostera marina*, the only characterized so far, the  $\text{Na}^+$  electrochemical gradient is used to drive the high-affinity uptake of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$  in both roots and leaves (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005).

In terrestrial vascular plants, where  $\text{H}^+$ -ATPase energizes the plasma membrane (Pedersen *et al.*, 2012),  $\text{NO}_3^-$  transport depends on the cellular energy supply and is coupled to the proton electrochemical gradient (Miller *et al.*, 2007).  $\text{NO}_3^-$  uptake by single cells is associated with depolarization of the plasma membrane, i.e., an increase in the positive charge inside the cell (Crawford *et al.*, 1998). To account for both, the membrane depolarization and the coupling with the proton gradient, it has been proposed that  $\text{NO}_3^-$  uptake is mediated by a  $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ , and therefore an electrophoretic symport mechanism (Miller & Smith, 1996; Lupini *et al.*, 2016).

On the other hand, terrestrial plants have evolved a range of physiological and morphological responses that may enhance  $\text{P}_i$  acquisition under limiting conditions (through symbiotic strategies, root architectural changes, extrusion of organic acids and acid phosphatases by roots; reviewed by Amtmann *et al.*, 2016; Péret *et al.*, 2011 & Péret *et al.*, 2014). As in the case of  $\text{NO}_3^-$ , transport of inorganic phosphate requires energy and is also driven by the proton electrochemical gradient generated by the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase (Ulrich-Eberius *et al.*, 1981; Rausch & Bucher, 2002).

In contrast to terrestrial plants, seagrasses, as aquatic plants, can take up mineral nutrients through roots and also through leaves (reviewed by Romero *et al.*, 2006). However, there are several lines of evidence which indicate that leaf tissues have a high affinity for nutrient uptake and can substantially contribute to total nutrient acquisition in these plants (Burkholder *et al.*, 2007 and references therein). As a vascular plant, *Z. marina* plasma membrane is energized by a  $\text{H}^+$ -ATPase (Fernández *et al.*, 1999); nevertheless, unlike terrestrial vascular plants, high-affinity  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$  transport mechanisms are fuelled not by  $\text{H}^+$  but  $\text{Na}^+$  in both, root and mesophyll leaf cells

## Summary

(García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). Na<sup>+</sup>-coupled transport systems had been previously described in marine organisms, as in the case of the Na<sup>+</sup>-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in marine cyanobacteria (Lara *et al.*, 1993; Shibata *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2004) or the Na<sup>+</sup>-dependent NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, glucose and amino acids uptake systems in marine diatoms (Hellebust, 1978; Rees *et al.*, 1980). In addition, phosphate transport has been reported to be stimulated by Na<sup>+</sup> in several green algae (Raven, 1984). However, no functional evidences, apart from the case of *Z. marina*, of Na<sup>+</sup>-dependent high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> uptake systems has been presented in the vascular plant literature.

The use of Na<sup>+</sup> as driving ion for nutrient uptake depends on the maintenance of an inwardly directed electrochemical potential for Na<sup>+</sup>. *Z. marina* maintains homeostatic cytosolic concentrations of Na<sup>+</sup> around 10 mM (Rubio *et al.*, 2005) and does it in two ways, first by restricting the plasma membrane permeability to Na<sup>+</sup> (Fernández *et al.*, 1999) and second by the operation of an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger that takes Na<sup>+</sup> out from the cytosol (Rubio *et al.*, 2011). Thus, living in the presence of 500 mM Na<sup>+</sup>, a membrane potential below -160 mV guarantees an inwardly directed Na<sup>+</sup> motive force almost 3-fold higher than that for H<sup>+</sup> at the seawater pH, close to 8.2 (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). Consequently, Na<sup>+</sup>-coupled transport systems could be an important achievement for seagrasses to colonize the marine environment.

Therefore, the aim of this work was: the identification of the primary pump for plasma membrane energization in *P. oceanica*; to investigate the effect of photosynthetic HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> use on pH<sub>c</sub>, cytosolic Na<sup>+</sup> and cytosolic Cl<sup>-</sup> in order to reveal the presence of a transport system for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; to study mechanisms and kinetics of the high-affinity transport systems for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P<sub>i</sub> and amino acids (alanine and cysteine) in the mesophyll leaf cells of the marine angiosperm *P. oceanica*; in addition, the effect of inorganic carbon increase on cytosolic NO<sub>3</sub><sup>-</sup> homeostasis has been also analysed .

Results show a  $E_m$  measured in *P. oceanica* leaf cells in NSW of  $-174 \pm 4$  mV, a value that is more negative than those observed in *Z. marina* ( $-156 \pm 10$  mV; Fernández *et al.*, 1999) and the marine angiosperm *Cymodocea nodosa* ( $-160$  mV, Rubio & Fernandez, 2019). Considering that seagrasses are angiosperms, their primary plasma membrane pump should be an H<sup>+</sup>-ATPase, which would energize the activity of H<sup>+</sup> cotransporters. Because seawater has a pH between 7.9 and 8.2 and contains around 0.5M Na<sup>+</sup>, this ion could be a better driving ion than H<sup>+</sup>, as observed in *Z. marina*

(García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). However sodium pumps, that would prevent high internal  $\text{Na}^+$  accumulation, have not been found in vascular plants yet (Pedersen *et al.*, 2012). The addition of the phytotoxin FC to the assay medium (NSW) should stimulate  $\text{H}^+$ -ATPase activity leading to extracellular acidification. The fact that FC hyperpolarizes the plasma membrane of *P. oceanica* and the finding that external pH strongly decreases (Figure 16) whereas the cytosolic  $\text{Na}^+$  changes only marginally in response to FC (from  $17 \pm 2$  to  $15 \pm 2$  mM) clearly indicate that this species possesses a  $\text{H}^+$  pump, which energizes the plasma membrane.

*P. oceanica* mesophyll leaf cells exhibit very low plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  permeability ratio ( $0.0046 \pm 0.0012$ ) and a low cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration ( $17 \pm 2$  mM; Figure 18), values similar to that reported for *Z. marina* (Fernández *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2005). The cytosolic  $\text{Na}^+$  value is in the range of those measured in terrestrial glycophytes, but much lower than the proposed values for terrestrial halophytes, between 70 and 200 mM  $\text{Na}^+$  in plants grown in the presence of 50 and 400 mM  $\text{Na}^+$ , respectively (Flowers *et al.*, 2015). The increased cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration ( $20 \pm 2$  mM) observed after the addition of the respiratory inhibitors NaCN/SHAM (1 mM) suggests that the maintenance of the low cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration in *P. oceanica* results not only of the very low plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  permeability ratio, but also the operation of an active  $\text{Na}^+$  efflux mechanism at the plasma membrane as had been characterized in the case of *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2011).

To evaluate the possible operation of an  $\text{HCO}_3^-$  transport system and its driving ion,  $E_m$  and cytosolic concentrations of ions  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  were monitored simultaneously in the mesophyll leaf cells of *P. oceanica* by double-barrelled microelectrodes (Figure 19). Measurements were performed in NSW and also in the presence of the internal CA inhibitor EZ. Mesophyll leaf cells of *P. oceanica* showed a  $\text{pH}_c$  of  $7.3 \pm 0.03$  in NSW. Several reactions following the addition of  $\text{HCO}_3^-$  stand out and suggest the existence of a plasma membrane  $n\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$  symporter in this species. Bicarbonate depolarizes the plasma membrane voltage and transiently acidifies the cytosol, indicating that  $\text{HCO}_3^-$  is transported into the cells by an  $\text{H}^+$ -symport, as described for the plasma membrane  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  symport in *Sinapis alba* (Felle, 1994). This pH drop will give rise to the observed transient hyperpolarization of  $E_m$  due to the stimulation of the  $\text{H}^+$  pump. To test the possibility that  $\text{CO}_2$  arising from external dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  was the reason for the  $\text{pH}_c$  effects,  $\text{CO}_2$ -enriched NSW that

## Summary

reaches a pH of 7.9 was used. The slow and small effect on  $E_m$  and  $\text{pH}_c$  acidification evoked by the addition of 1000 ppm  $\text{CO}_2$  to NSW (Figure 20) indicates that the initial cytosolic acidification is not caused by  $\text{CO}_2$  entrance rendered by the apoplastic dehydration of  $\text{HCO}_3^-$ , but due to the  $\text{H}^+$  being used as the driving ion for  $\text{HCO}_3^-$  uptake. Initial cytosolic acidification is followed by an alkalization, suggesting an internal dehydration of  $\text{HCO}_3^-$ . The sensitivity of the long-term  $\text{pH}_c$  response to EZ (Figure 19) also indicates that  $\text{HCO}_3^-$ , after being symported with  $n\text{H}^+$ , is dehydrated internally in a reaction catalysed by CA. Then, the  $\text{OH}^-$  generated by dehydration could contribute to the observed long-term pH increase, before they are leaked from the cell. The presence of EZ does not affect the transport because it does not inhibit either the initial depolarization or the acidification of the cytosol, but it does affect the cytosolic alkalization and photosynthesis because it inhibits the internal dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  and hence the formation of  $\text{CO}_2$  and  $\text{OH}^-$ . A similar effect has been described for phytoplankton species that are  $\text{HCO}_3^-$  users (Tortell *et al.*, 1997) in which EZ does not affect the internal accumulation of dissolved inorganic C (DIC) but inhibits photosynthesis. However, the lack of a quick response of cytosolic  $\text{Na}^+$  ( $17 \pm 2$  mM) and cytosolic  $\text{Cl}^-$  ( $9.5 \pm 1$  mM; Figure 19) seems to rule out the implication of these ions in  $\text{HCO}_3^-$  transport. Although hyperpolarization has no effect on  $\text{Cl}^-$  efflux, membrane depolarization and the onset of cytosolic  $\text{Cl}^-$  diminution suggest the involvement of plasma membrane S-type anion channels, whose activation takes place when cells depolarize (Roberts, 2006; Roelfsema *et al.*, 2012). In terrestrial angiosperm guard cells, these channels activate when the concentration of  $\text{HCO}_3^-$  (not  $\text{CO}_2$ ) increases and the  $\text{pH}_c$  is alkaline (Xue *et al.*, 2011), which are similar conditions to those observed in *P. oceanica* in the presence of high  $\text{HCO}_3^-$ . The sensitivity of  $\text{Cl}^-$  electrodes to  $\text{NO}_3^-$  (Felle, 1994; Miller & Zhen, 1991) allows hypothesizing that  $\text{HCO}_3^-$  enrichment not only produces  $\text{Cl}^-$  efflux but may also evoke  $\text{NO}_3^-$  efflux. This unexpected effect of  $\text{HCO}_3^-$  enrichment may be important not only for cytosolic anion homeostasis but for the mineral nutrition of marine organisms at elevated  $\text{CO}_2$ .

To study the role of  $\text{HCO}_3^-$  in *P. oceanica* photosynthesis, external pH was monitored during dark-light transitions in C-free NSW supplemented with 2 mM  $\text{HCO}_3^-$  (Figure 21). In NSW, the onset of light evoked a significant increase of the external pH from  $7.93 \pm 0.15$  to  $8.56 \pm 0.05$ , whereas in C-free NSW supplemented with 2 mM  $\text{HCO}_3^-$ , this pH increase was smaller (from  $7.92 \pm 0.03$  to  $8.25 \pm 0.07$ ).

Although at pH 7.9 the formation of CO<sub>2</sub> cannot be ruled out in the C-free NSW supplemented with 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, considering that in these conditions the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration would be almost 120-fold higher than the CO<sub>2</sub> concentration, these results suggest that the use of 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> could represent up to 40% of the photosynthetic alkalization of the external medium compared with the control NSW. Nevertheless, these results do not exclude the possibility of CO<sub>2</sub> transport in *P. oceanica*. To exclude the effect of CO<sub>2</sub> formation in C-free NSW, APS rates were measured as O<sub>2</sub> evolution in both NSW (control) and C-free NSW supplemented with 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, both at pH 8.5 to impair the spontaneous formation of CO<sub>2</sub> (Figure 21). Photosynthesis rate in C-free NSW supplemented with 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> was approximately 40% of the APS measured in control NSW, consistent with a photosynthetic use of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in this species.

To analyse HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake kinetics, the initial and transient  $E_m$  depolarization induced by the addition of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and APS rates of *P. oceanica* leaves were measured at saturating irradiance in C-free NSW, adjusted to pH 8.5 and supplemented with increasing NaHCO<sub>3</sub> concentrations, from 0.01 to 10 mM NaHCO<sub>3</sub> (Figure 22; Table 5). APS values reached saturation around 2.5 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> with a half saturation constant ( $S_{0.5}$ ), that yields an estimation of the affinity for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, of  $0.35 \pm 0.07$  mM. This value together with the low bicarbonate compensation point obtained ( $0.09 \pm 0.01$  mM) suggests an efficient mechanism for the photosynthetic use of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in *P. oceanica*. Moreover the  $S_{0.5}$  value is similar to the half saturation constant ( $0.36 \pm 0.04$  mM) obtained for membrane depolarizations as a function of added HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure 22; Table 5). This coincidence suggests that the affinity of the transporter determines the  $S_{0.5}$  for photosynthesis. These data are in agreement with the data reported by Invers *et al.* (2001) using a similar approach (APS vs. DIC curves) for *P. oceanica* ( $S_{0.5}$  of  $0.44 \pm 0.17$  mM), *Z. marina* ( $0.56 \pm 0.18$  mM), *Phyllospadix torreyi* ( $0.80 \pm 0.26$  mM) and *C. nodosa* ( $0.26 \pm 0.06$  mM).

To complement the information on the mechanism for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in *P. oceanica*, APS was measured in the presence of different inhibitors and in NSW supplemented with 1000 ppm of CO<sub>2</sub> or 3 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figure 23). Data in this study show that photosynthesis of *P. oceanica* was decreased by approximately 50% in the presence of the plasma membrane-permeable CA inhibitor EZ, which points to inhibition of an intracellular CA and a lower conversion of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> to CO<sub>2</sub>, limiting the

## Summary

CO<sub>2</sub> supply for Rubisco. The effect of AZ, the inhibitor of the external CA, was considerably lower, around 5%, and was not significant. Interestingly, APS of *P. oceanica* shows a significant increase (around 50%) in NSW supplemented by 3 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> respect the control (NSW) in contrast to the similar values observed in NSW and in NSW enriched with 1000 ppm CO<sub>2</sub>. This supports the model of a reliance on HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake for photosynthesis. The absence of a photosynthesis increase at a similar level of CO<sub>2</sub>, which is close to the potential level in year 2100 (800 ppm; IPCC-Collins *et al.*, 2013), has been recently described for nine seagrass species from south-west Australia (Borum *et al.*, 2016). In those species, a significant increase of photosynthesis was reached at concentrations higher than 8000 ppm CO<sub>2</sub>, indeed over the estimated maximum CO<sub>2</sub> (2000 ppm) predicted for the atmosphere before year 2300 (Caldeira & Wickett, 2003). Finally, APS was not diminished by the addition of the plasma membrane anion transport blockers DIDS (0.1 mM) or NPPB (0.1 mM) to the NSW, suggesting that anion influx does not affect CO<sub>2</sub>/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> usage in *P. oceanica* photosynthesis.

In order to analyze if a Na<sup>+</sup> dependence of high-affinity transporters for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> occurs in *P. oceanica*, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> depletion assays were performed in leaves incubated in artificial seawater with or without Na<sup>+</sup>. In artificial seawater (ASW) containing 500 mM NaCl, N-starved *P. oceanica* leaves completely depleted external NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (100 μM) after 22 h of incubation, while in the absence of Na<sup>+</sup> the external concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> remained around 80 μM at the end of incubation (Figure 29). In the case of P<sub>i</sub> uptake assays, P-starved leaves depleted external P<sub>i</sub> (10 μM) at 4 -fold higher uptake rates in ASW containing 500 mM NaCl, than in the absence of Na<sup>+</sup> (Figure 33). Among the seagrasses, this pattern has been only described in the case of *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). In full strength Na<sup>+</sup> artificial seawater, *P. oceanica* NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> net uptake rates show values in the same range than those quoted at saturating nutrient concentrations in different seagrasses (Tables 6 and 7 respectively), where, as observed in *P. oceanica*, slightly higher rates are observed for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (3.7-75 μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>) than for P<sub>i</sub> uptake, 0.014-43 μmol P<sub>i</sub> g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> (Touchette & Burkholder, 2000). The decrease of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> uptake rates by *P. oceanica* leaves in the absence of Na<sup>+</sup> strongly suggests the operation of Na<sup>+</sup>-dependent mechanisms for the uptake of both nutrients, as has been previously characterized in *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005).



To characterize the transport system mechanisms that mediate the high-affinity uptake of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  and amino acids in the seagrass *P. oceanica* the effect of micromolar concentration additions on membrane potential of mesophyll leaf cells was analyzed for each nutrient. Additions of micromolar concentrations of  $\text{NO}_3^-$  evoked rapid plasma membrane depolarizations in mesophyll leaf cells of N-starved plants (Figure 25). Measurable changes were evident even at 5  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  and showed saturation at concentrations around 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ . Ion transport across membranes leaves an electrical trace such as membrane depolarizations when the net charge that enters the cells is positive. Such membrane depolarizations have been extensively used as a quote of the activity of transport systems (Sanders *et al.*, 1984). Since the magnitude of the depolarizations reflects a net positive charge that crosses the membrane, in the case of anions, such as  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{P}_i$ , the membrane depolarization reveals the function of symport mechanisms fuelled by a positive driving ion. As depolarizations are an integral function of the net charge carried by the  $\text{NO}_3^-$  transport system, the concentration dependence of the depolarizations can be used for the estimation of the affinity of this system for  $\text{NO}_3^-$ . Fitting the data to the Michaelis-Menten equation yielded a  $K_M$  value of  $8.7 \pm 1$   $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  and a maximum depolarization of  $6.3 \pm 0.2$  mV. This semisaturation constant for  $\text{NO}_3^-$  transport is higher than the reported value in single mesophyll leaf cells of *Z. marina* ( $K_M = 2.3 \pm 0.78$   $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ ; García-Sánchez *et al.*, 2000) but is much lower than those reported for the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  uptake in terrestrial plants, close to 60  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  in barley (Glass *et al.*, 1992) or *Arabidopsis* (Okamoto *et al.*, 2006; reviewed in Wang *et al.*, 2012). On the other hand, the  $\text{NO}_3^-$ -induced depolarizations were lower in the dark than in the light, but also showed saturation kinetics with a similar  $K_M$  value,  $8.2 \pm 1.7$   $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  but with maximum depolarization reduced by half (Figure 25). In addition, in the presence of 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$ -induced depolarizations were higher than in ASW with 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  (Figure 30).

As previously reported for *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000),  $\text{NO}_3^-$ -induced depolarizations were not detected in  $\text{Na}^+$ -free ASW in *P. oceanica* mesophyll leaf cells. However, after the addition of 30 mM  $\text{Na}^+$  to the assay media, the  $\text{NO}_3^-$ -induced depolarization was recovered (Figure 26). To investigate this  $\text{Na}^+$ -dependence, the depolarization induced by 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  was assayed at different external  $\text{Na}^+$  concentrations. As expected for a  $\text{Na}^+$ -dependent transport system,  $\text{NO}_3^-$ -induced

## Summary

depolarizations showed saturation kinetics at increasing  $\text{Na}^+$  concentrations (Figure 27). Data were fitted to the Michaelis-Menten equation rendering a semisaturation constant of  $7.2 \pm 1.1$  mM  $\text{Na}^+$  and a maximum restored depolarization of  $4.3 \pm 0.1$  mV, that was effectively saturated at concentrations around 50 mM  $\text{Na}^+$ , supporting the  $\text{Na}^+$ -dependence for the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  uptake in *P. oceanica* mesophyll leaf cells.

To further analyze the  $\text{NO}_3^-/\text{Na}^+$  symport, the effect of  $\text{NO}_3^-$  addition on the cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration was measured (Figure 28). The addition of 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  simultaneously evoked a membrane depolarization and the increase of cytosolic  $\text{Na}^+$  ( $17 \pm 2$  mM  $\text{Na}^+$ ) by  $0.4 \pm 0.2$  mM  $\text{Na}^+$ . This effect is similar to that formerly found in the case of  $\text{Na}^+$ -dependent high-affinity  $\text{NO}_3^-$  transport in the seagrass *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2005) revealing the coupling  $\text{NO}_3^-/\text{Na}^+$  uptake and suggesting the use of  $\text{Na}^+$  as driving ion for the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  uptake in those species.

Due to the effect of dark and the elevated  $\text{HCO}_3^-$  concentration in the assay medium on  $\text{NO}_3^-$  transport, cytosolic  $\text{NO}_3^-$  measurements were done in mesophyll leaf cells of *P. oceanica* during light-dark transitions and in the presence of a high concentration of inorganic carbon (1000 ppm  $\text{CO}_2$  or 5 mM  $\text{HCO}_3^-$ ) in the assay media. These measurements, carried out for the first time in a seagrass by double-barrelled  $\text{NO}_3^-$  selective microelectrodes, rendered a cytosolic  $\text{NO}_3^-$  concentration ( $\text{NO}_3^-_c$ ) of  $5.7 \pm 0.2$  mM in mesophyll leaf cells incubated in NSW under light conditions. This value is in the range of the values found in *Chara corallina* (1.6 mM  $\text{NO}_3^-_c$ ; Miller & Zhen, 1991), in the epidermal root cells of maize (*Zea mays*; 3.1 mM  $\text{NO}_3^-_c$ ) and barley (*Hordeum vulgare*; 4.9 mM  $\text{NO}_3^-_c$ ) (Miller & Smith, 1996) or in *Arabidopsis* root and leaf cells ( $2.2 \pm 0.5$  mM and  $2.8 \pm 0.7$  mM respectively; Cookson *et al.*, 2005). Dark conditions increase the cytosolic  $\text{NO}_3^-$  concentration up to  $8.5 \pm 1.1$  mM  $\text{NO}_3^-$  (Figure 31). This result, together with the lower  $\text{NO}_3^-$  transport previously observed in dark conditions, indicates a decrease of N assimilation probably due to the absence of photosynthetic activity. On the other hand, enrichment of natural seawater with 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  evokes the on-going decrease of cytosolic  $\text{NO}_3^-$ , from  $5.7 \pm 0.2$  to  $4.8 \pm 0.7$  mM after 40 min of treatment. This diminution of the  $\text{NO}_3^-_c$  is not observed in continuous bubbling the NSW with 1000 ppm  $\text{CO}_2$ , in the presence or in the absence of 100  $\mu\text{M}$  EZ (Figure 32). These results, strongly suggest an outward  $\text{NO}_3^-$  flow through S-type anion channels induced by the internal dehydration of  $\text{HCO}_3^-$ , that could be relevant in future scenarios of elevated inorganic carbon, since the chronic diminution of cytosolic  $\text{NO}_3^-$



concentration could impair nitrogen assimilation and would contribute to the N biomass dilution (Taub & Wang, 2008).

In the case of  $P_i$  uptake, additions of micromolar concentrations of  $P_i$  (5-100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) to ASW containing 10 mM  $\text{HCO}_3^-$  evoked rapid membrane depolarizations in P-starved plants (Figure 35).  $P_i$ -induced depolarizations showed saturation kinetics and fitting of the data to the Michaelis-Menten equation rendered a  $K_M$  value of  $5.8 \pm 1 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  and a maximum depolarization of  $5.7 \pm 0.2 \text{ mV}$  (Figure 36). Therefore, as observed in *Z. marina*, mesophyll leaf cells of *P. oceanica* also exhibit a high-affinity transport system for  $P_i$  uptake. The semisaturation constant value obtained is lower for  $P_i$  than for  $\text{NO}_3^-$ , pointing out the higher affinity for  $P_i$  uptake in this species. In addition, semisaturation constant for  $P_i$  uptake kinetics is higher than that obtained in epidermal root cells of *Z. marina* (1.5  $\mu\text{M}$ ; Rubio *et al.*, 2005) but similar to the values reported in leaves of the seagrasses *Zostera noltii* (12.1  $\mu\text{M}$   $P_i$ ; Pérez-Lloréns *et al.*, 1995), *Thalassia hemprichii* (7.7  $\mu\text{M}$   $P_i$ ; Stapel *et al.*, 1996.) or *Thalasia testudinum* (11.9  $\mu\text{M}$   $P_i$ ; Gras *et al.*, 2003) and in the range of the high-affinity  $K_M$  values described among members of the  $\text{H}^+$ -symporter (PHS) family in vascular terrestrial plants (Rae *et al.*, 2003).

In addition, no  $P_i$ -induced depolarizations were observed in  $\text{Na}^+$ -free ASW. As found for  $\text{NO}_3^-$ , depolarizations induced by saturating phosphate concentrations (25  $\mu\text{M}$   $P_i$ ) showed  $\text{Na}^+$ -dependence and rendered a saturation curve at increasing  $\text{Na}^+$  (Figure 37). Semisaturation constant for  $\text{Na}^+$  was  $4.3 \pm 0.5 \text{ mM}$ , a lower value than the quoted for  $\text{NO}_3^-$  transport, suggesting a higher efficiency for  $P_i$  transport than for  $\text{NO}_3^-$  in *P. oceanica* mesophyll leaf cells. Maximum restored depolarization at increasing  $\text{Na}^+$  concentrations was  $4.5 \pm 0.1 \text{ mV}$ , which effectively saturated at 50 mM  $\text{Na}^+$ . Therefore, results shown in this work demonstrated that a  $\text{Na}^+$ -coupled high-affinity  $P_i$  transport system operates at the plasma membrane of mesophyll leaf cell of *P. oceanica*.

$\text{Na}^+$ -dependence of both high-affinity transport systems is half-saturated at low millimolar  $\text{Na}^+$  concentrations but are higher than the  $K_M$  for  $\text{Na}^+$  reported in *Z. marina* for the high-affinity  $\text{NO}_3^-$  transport (0.72 mM  $\text{Na}^+$ ; García-Sánchez *et al.*, 2000) and are also higher than the value reported for  $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$  transport in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (2.58 mM  $\text{Na}^+$ ; Rees *et al.*, 1980) or the  $\text{Na}^+$  semisaturation constant for  $\text{Na}^+$  of the high-affinity  $\text{HCO}_3^-$  transporters found in cyanobacteria (1 and 1.7 mM; Price *et al.*, 2004). In any case, these low-millimolar  $K_M$  values for  $\text{Na}^+$  imply

## Summary

that the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$  high-affinity transporters of *P. oceanica*, as well as those of *Z. marina*, would be functioning at saturating  $\text{Na}^+$  concentrations in seawater.

To explore the existence of other transport systems fuelled by  $\text{Na}^+$  in *P. oceanica*, the transport of the amino acids was also analyzed. After a survey among the complete list of them, the two that caused a significant response were alanine (L-Ala) and cysteine (L-Cys). As in the case of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$ , the addition of micromolar concentrations of L-Ala evoked rapid membrane depolarizations in mesophyll leaf cells of N-starved plants. Since both amino acids exhibit equivalent p*H* value (6.1), at the p*H* of seawater (8.2) both solutes show a net negative charge; thus, to depolarize the membrane a net influx of positive charge is needed. In both cases, L-Ala and L-Cys induced depolarizations showed saturation kinetics and values were fitted to the Michaelis-Menten equation, rendering a  $K_M$  value of  $37 \pm 11 \mu\text{M}$  L-Ala and  $10 \pm 1 \mu\text{M}$  L-Cys, both values corresponding with a high affinity amino acid transport system (Figure 38). However, cysteine transport exhibited lower saturation concentration (around  $40 \mu\text{M}$  L-Cys) and lower maximum depolarization than alanine kinetics, which saturated at  $100 \mu\text{M}$  L-Ala. Several lines of evidence support the premise that dissolved organic nitrogen utilization is widespread among seagrasses, which provides these species with a competitive advantage over macroalgae in oligotrophic environments (Van Engeland *et al.*, 2011; Nafie *et al.*, 2014). Saturation kinetics of amino acid transport had been previously reported for the tropical seagrasses *Thalassia hemprichii*, *Halodule uninervis*, and *Cymodocea rotundata*, showing  $K_M$  values from 3.5 to  $10.5 \mu\text{M}$  (Vonk *et al.*, 2008), which are similar to the value obtained in mesophyll leaf cells of *P. oceanica* for cysteine but are lower than the  $K_M$  for alanine.

As in the case of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$ , the depolarizations were only recorded in ASW containing  $\text{Na}^+$  (Figure 39), suggesting that amino acid/ $\text{Na}^+$  symport systems operate at the plasma membrane of *P. oceanica*. However, in contrast to the results of this work, no evidence for  $\text{Na}^+$ -dependent amino acid uptake systems has been previously described in seagrasses. Interestingly, the  $K_M$  values of the high-affinity amino acid transport found in *P. oceanica* leaf cells are similar to those reported in kinetics analysis of lysine/histidine-type LHT1 transport activity, from 7.4 to  $44.8 \mu\text{M}$  (Svennerstam *et al.*, 2011). In terrestrial vascular plants this transporter functions as a general amino acid permease similar to other AAPs which, when expressed in yeast or oocytes, mediate  $\text{H}^+$ -

coupled, Na<sup>+</sup>-independent, uptake of a wide variety of amino acids, reviewed by Tegeder *et al.* (2014).

Considering the high Na<sup>+</sup> concentration (500 mM) of the seawater and the rather negative membrane potential (-174 mV) measured in *P. oceanica* leaf cells, the inwardly directed Na<sup>+</sup> electrochemical gradient (in millivolts) results in -260 mV, two-fold higher than the H<sup>+</sup> motive force value (-121 mV) calculated in *P. oceanica*, considering the cytosolic pH of mesophyll leaf cells (7.3) and the seawater pH (8.2). Comparisons of Na<sup>+</sup> electrochemical gradient against those calculated for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> provide an estimation of Na<sup>+</sup> stoichiometry of the transport systems. Considering the low NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> concentrations of the Mediterranean Sea and cytosolic concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (6 mM) and P<sub>i</sub> (5 mM) similar to the values previously discussed for *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2005), around 350 mV are needed to energize the transport of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and P<sub>i</sub> into *P. oceanica* leaf cells. This means that a stoichiometry of 2Na<sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and 2Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> would render enough energy to make the transport thermodynamically feasible. Thus, Na<sup>+</sup>-dependent high-affinity transport mechanisms found in *P. oceanica* mesophyll leaf cells seem to support that secondary adaptation of vascular plants to alkaline and high Na<sup>+</sup> environments, such as seawater, is based, together with other adaptation processes, on exploiting the high inwardly directed electrochemical gradient for Na<sup>+</sup>, despite the widespread plasma membrane H<sup>+</sup> economy in vascular plants.

Figures are included in the main text. Thesis conclusions are shown on page 129.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1 Las plantas vasculares del medio marino

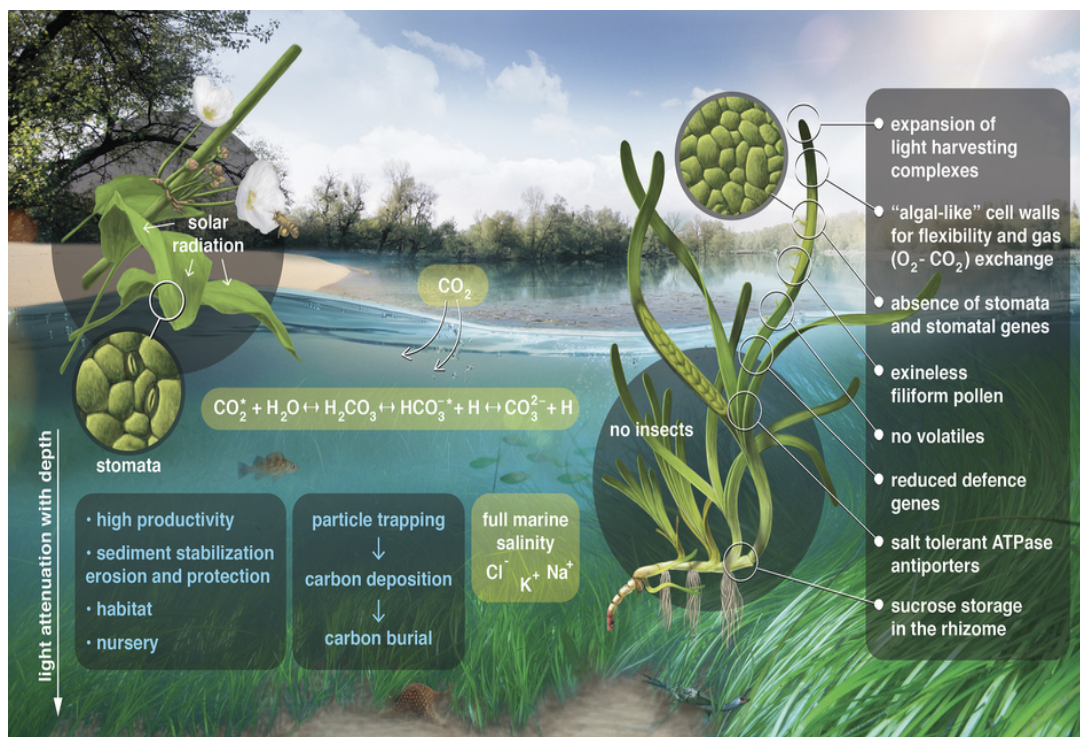
Las fanerógamas marinas son el único grupo de angiospermas que ha abandonado el medio terrestre para volver a vivir sumergidas en el mar, en el que posiblemente haya sido el mayor cambio en la evolución de las plantas con flores. Se trata de un grupo polifilético de plantas monocotiledóneas, constituido por unas 72 especies pertenecientes a 4 familias del orden Alismatales (Les *et al.*, 1997). Tres de ellas, las familias Zosteraceae, Cymodoceae y Posidoniaceae, clasificadas anteriormente como subfamilias de Potamogetonaceae, son exclusivamente fanerógamas marinas (den Hartog, 1970). La cuarta familia, Hydrocharitaceae, incluye tres géneros de fanerógamas marinas, aunque 14 géneros son plantas de agua dulce (den Hartog & Kuo, 2006). La familia Posidoniaceae posee un único género, *Posidonia*, que comprende 7 especies entre las que *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile destaca por ser la única presente en el hemisferio norte, siendo endémica del Mediterráneo (Gobert *et al.*, 2006).

Las fanerógamas marinas se encuentran adaptadas a la vida en un medio acuático, salino y alcalino, poseen una polinización hidrófila y se anclan al sustrato mediante un sistema de fuertes rizomas, siendo capaces de completar su ciclo de vida completamente sumergidas y de competir con éxito con otras especies de organismos marinos. Por ello reúnen las características para ser consideradas las únicas plantas vasculares marinas (Arber, 1920; den Hartog, 1970). Este grupo de plantas son características de aguas homoiohalinas y habitan un rango de profundidad que abarca desde los 90 metros (Duarte, 1991) hasta la mitad de la zona intermareal, donde se encuentran algunas especies del género *Zostera*, *Cymodocea*, *Halodule* y *Halophylla* (den Hartog & Kuo, 2006). Así, las fanerógamas marinas más que un grupo taxonómico constituyen un grupo ecológico funcional (Les *et al.* 1997; Les & Tippery 2013) que forman la base de uno de los ecosistemas costeros más productivos y ampliamente distribuidos en el planeta (Larkum *et al.*, 2006).

La colonización del medio marino por parte de estas angiospermas tuvo lugar durante el Cretácico (hace alrededor de 140 m.a) en al menos tres ocasiones independientes (Les *et al.*, 1997). Si bien el hábitat marino ofrecía un ecosistema libre de competidores terrestres, las fanerógamas marinas tuvieron que adaptarse a la vida en el mar en un proceso reverso de evolución (Williams, 2016) en el que muchos de los mecanismos que previamente habían permitido la colonización del medio terrestre se

## Introducción

modificaron en este grupo taxonómico respecto al resto de plantas vasculares. Los mecanismos de adaptación desarrollados por las fanerógamas marinas han quedado fijados en sus genomas, como revela la secuenciación completa del DNA de *Zostera marina* primero (Olsen *et al.*, 2016) y de *Z. muelleri* pocos meses después (Lee *et al.*, 2016), ambas de clima templado en el hemisferio norte y sur, respectivamente. En la Figura 1 se resumen algunas de las adaptaciones del grupo para la vida en el mar, entre las que se incluyen: pérdida de estomas, ausencia de compuestos volátiles como los terpenoides, reducción de genes de defensa, desaparición de genes relacionados con la protección frente a la radiación UV, hojas hidrodinámicas en las que se reduce la cutícula y aparición de tejido aerenquimático para la facilitar la flotación y la incorporación de carbono inorgánico ( $C_i$ ) del agua entre otras (Olsen *et al.*, 2016; Larkum *et al.*, 2017).



**Figure 1.** Summary of physiological and structural adaptations developed by seagrasses in their colonization of the sea. Ecosystem services are shown in blue. Physical processes related to salinity, light and inorganic carbon availability shown in white within light-green boxes. Gene losses and gains associated with morphological and physiological processes shown in white within the dark-green box on the right. Taken from Olsen *et al.*, 2016.



Por otra parte, en la colonización del medio acuático, las fanerógamas marinas se han adaptado a un medio salino, relativamente estable, caracterizado por una alta concentración de sodio (0.5 M), un pH alcalino (en torno a 8.2) y una baja disponibilidad de nutrientes esenciales como nitrato o fosfato (Romero *et al.*, 2006).

La adaptación a la salinidad conlleva solventar el efecto tóxico del incremento de  $\text{Na}^+$  en el citosol: a nivel celular provoca la disminución de la síntesis proteica, daños osmóticos relacionados con la pérdida de agua en las células, la inhibición del transporte de nutrientes y, como consecuencia, la muerte celular; mientras que a nivel de planta completa se observa la pérdida de hojas o la inhibición del crecimiento de las raíces (Hasegawa *et al.*, 2000; Tester & Davenport, 2003). Al tratarse de un ión positivo, la entrada de  $\text{Na}^+$  en las células vegetales se ve favorecida tanto por el gradiente de concentración, dirigido hacia dentro de la célula, como por la diferencia de potencial eléctrico de la membrana, negativo en el citosol, favoreciendo la entrada pasiva de dicho ión (Cheeseman, 1988). Por ello, la base de los mecanismos de tolerancia al  $\text{Na}^+$  incluyen tanto la regulación de los mecanismos de entrada pasiva de este ión, permeabilidad de la membrana, como la capacidad de la célula para mantener la incorporación de agua en situaciones de bajo potencial hídrico externo. Así, tales mecanismos incluyen la disminución de la entrada pasiva de  $\text{Na}^+$ , la extrusión activa del mismo, la compartimentalización y la síntesis de osmolitos compatibles (Munns & Tester, 2008).

Los mecanismos de tolerancia a salinidad se manifiestan en un amplio rango de adaptaciones, que comprenden desde el nivel celular hasta el de planta completa (Flowers *et al.*, 2015; Yeo, 1998). A nivel celular, el mantenimiento de un potencial de membrana ( $E_m$ ) altamente negativo parece ser crucial para la tolerancia a la salinidad en halófitas (Shabala & Mackay, 2011). Las fanerógamas marinas poseen valores de  $E_m$  en torno a -160 mV (Rubio & Fernández, 2019), valor relativamente más negativo comparado con los descritos para la mayoría de algas marinas (Gutknecht & Dainty, 1968; Gradmann & Boyd, 1995) o incluso en comparación con el de las células de la raíz de halófitas como *Atriplex hastata* (entre -130 y -140 mV; Anderson *et al.*, 1977), *Atriplex lentiformis* y *Chenopodium quinoa* (-140 mV en plantas crecidas en ausencia de  $\text{Na}^+$ , Bose *et al.*, 2015) o *Halimione (=Atriplex) portulacoides* (-140 mV en plantas crecidas en suficiencia de  $\text{K}^+$ , Ait-Hammou *et al.*, 2014).

## Introducción

La diferencia de potencial eléctrico a ambos lados de la membrana plasmática de una célula refleja la energía disponible en la misma. El  $E_m$  de las células vegetales se debe a dos componentes: un componente difusivo, generado por la distribución asimétrica de iones a ambos lados de la membrana; y un segundo componente, metabólico, resultante de la actividad electrogénica de una bomba primaria que utiliza la energía liberada en la hidrólisis de ATP para el transporte de iones (Spanswick, 1981; Palmgren, 1998; Nobel, 2009). Las plantas vasculares terrestres utilizan una  $H^+$ -ATPasa de tipo P como bomba primaria de la membrana plasmática, que media la salida de  $H^+$  hacia el apoplasto consumiendo energía metabólica y generando un gradiente de potencial electroquímico para los  $H^+$  dirigido hacia el citosol (Palmgren, 2001; Falhof *et al.*, 2016). De manera clásica, la actividad de estas bombas de tipo P se ha identificado mediante la respuesta a la fitotoxina fusicocina (FC), la cual es un agonista irreversible de las ATPasas de tipo P (Marrè, 1979). No obstante, esta herramienta diagnóstica no permite discernir entre  $H^+$ -ATPasa o  $Na^+$ -ATPasa de tipo P, a no ser que se determine el ión que atraviesa la membrana. En este sentido, se observó que la adición de 10  $\mu$ M de esta fitotoxina al agua de mar provocaba una rápida hiperpolarización de la membrana plasmática en las células del mesófilo foliar de *Z. marina* y la acidificación del medio externo, resultados que indican la actividad de una  $H^+$ -ATPasa de tipo P como bomba primaria en esta fanerógama marina (Fernández *et al.*, 1999). Asimismo, las aproximaciones moleculares indican que en el caso de las plantas vasculares no se han conservado bombas de  $Na^+$ , por lo que se espera que las fanerógamas marinas usen  $H^+$ -ATPasas para energizar la membrana plasmática (Garcíadeblás *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2012). Es el caso de *Z. marina* (Fernández *et al.*, 1999), especie en la que además se han identificado los genes que codifican para la  $H^+$ -ATPasa del plasmalema que es tolerante a la salinidad (Muramatsu *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2016).

Además del mantenimiento de un potencial de membrana negativo, otro de los mecanismos de tolerancia a la salinidad es minimizar la entrada pasiva de  $Na^+$  al objeto de mantener una elevada relación  $K^+/Na^+$  en el citoplasma (Shabala & Mackay, 2011). La restricción de la entrada pasiva de  $Na^+$  viene determinada por la permeabilidad de la membrana a este ión, la cual puede estudiarse mediante el uso de inhibidores de la respiración, tales como cianuro, en cuya presencia el componente metabólico del potencial de membrana se inhibe. El potencial de membrana resultante es el potencial de difusión ( $E_D$ ), y refleja la asimetría de los iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  entre el citosol y el

exterior de la célula (Nobel, 2009). En células vegetales el  $K^+$  es el ión más permeable, seguido del  $Na^+$  y del  $Cl^-$ , cuya permeabilidad es entre un 1% y un 0.1% la del  $K^+$  (Nobel, 2009). Así, la respuesta del  $E_D$  a cambios de la concentración externa de  $K^+$  en presencia de 0.5 M  $Na^+$  permitió determinar la permeabilidad relativa a  $Na^+$  respecto a  $K^+$  ( $P_{Na^+}/P_{K^+}$ ) de la membrana en *Z. marina*, cuyo valor resultó extraordinariamente pequeño ( $P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.003$ ; Fernández *et al.*, 1999) indicando una alta restricción a la entrada pasiva de  $Na^+$  en esta especie. Por otra parte, estudios de *patch-clamp* muestran que la permeabilidad de los canales catiónicos de la membrana de las fanerógamas marinas *Zostera muelleri* y *P. oceanica* son altamente selectivos para  $K^+$  respecto al  $Na^+$  (Garrill *et al.*, 1994; Carpaneto *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que las fanerógamas marinas, frente a halófitas terrestres como *Thellungiella halophila* ( $P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.12$ , Demidchik & Tester, 2002), mantendrían una extraordinaria restricción a la entrada de  $Na^+$ .

Por otra parte, la extrusión de  $Na^+$  desde el citoplasma también favorece el mantenimiento de bajas concentraciones de  $Na^+$  en el citosol. En el caso de *Z. marina*, se ha descrito la extrusión activa de  $Na^+$  mediada por un antiportador  $Na^+/H^+$  de la membrana plasmática de las células del mesófilo foliar (Rubio *et al.*, 2011). Este sistema parece estar codificado por el gen *SOS1*, clonado en *Cymodocea nodosa* (*CnSOS1A* y *CnSOS1B*; Garcíadeblás *et al.*, 2007) y encontrado en el genoma de *Z. marina* (Zosma28g00970.1; Olsen *et al.*, 2016). Así, la ruta SOS parece ser responsable del mantenimiento de la homeostasis de  $Na^+$  y tolerancia a la salinidad no sólo en *Arabidopsis* donde fue inicialmente descrita (Zhu, 2002), sino también en fanerógamas marinas.

Con todo ello, las fanerógamas marinas son capaces de mantener concentraciones citosólicas de  $Na^+$  por debajo de 20 mM (Rubio *et al.*, 2005; 2011), valores similares a los observados en plantas glicófitas terrestres (Carden *et al.*, 2003) pero mucho menores que los propuestos para halófitas terrestres, con valores de entre 70 y 200 mM  $Na^+$  en plantas crecidas en presencia de 50 y 400 mM  $Na^+$ , respectivamente (Flowers *et al.*, 2015).

## Introducción

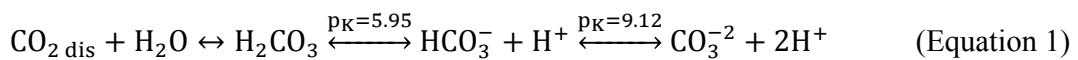
El mantenimiento de una baja concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol, además de evitar el efecto tóxico, asegura el mantenimiento de un elevado gradiente de potencial electroquímico para el  $\text{Na}^+$ , lo que permite el uso de dicho ión para energizar la incorporación de nutrientes, tal como se ha demostrado para el transporte de alta afinidad de nitrato y fosfato en *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). Esta especie mantiene concentraciones homeostáticas de  $\text{Na}^+$  alrededor de 10 mM (Rubio *et al.*, 2005) y lo hace, tal como se ha descrito anteriormente, restringiendo la permeabilidad de la membrana plasmática al  $\text{Na}^+$  (Fernández *et al.*, 1999) y a través de un sistema de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que expulsa  $\text{Na}^+$  fuera del citosol (Rubio *et al.*, 2011). Así, en el medio marino, con 500 mM  $\text{Na}^+$  y un pH alcalino (8.2), un potencial de membrana por debajo de -160 mV garantiza una fuerza  $\text{Na}^+$  motriz hacia el interior celular casi 3 veces mayor que para el  $\text{H}^+$  (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). En consecuencia, la presencia de sistemas de transporte acoplados a  $\text{Na}^+$  parece ser una importante ventaja de las fanerógamas marinas en la colonización del medio marino. En este sentido, analizar si el modelo de energización de la membrana propuesto para *Z. marina* se mantiene en otras fanerógamas marinas resulta esencial para comprender el proceso de adaptación de estas especies al medio marino. Por ello, es determinante la medida del potencial de membrana, así como el estudio de la bomba primaria que lo mantiene, y de la permeabilidad de la membrana a los principales iones del medio para investigar los mecanismos de incorporación de nutrientes en este tipo de plantas.

## **2 Incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas**

Al vivir completamente sumergidas en el agua de mar, las fanerógamas marinas han tenido que adaptarse a un medio altamente salino (0.5 M NaCl), alcalino (pH entre 7.9 y 8.2) y con baja disponibilidad de nutrientes esenciales como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{P}_i$ . Teniendo además en cuenta la limitación que supone la difusión de iones en los ecosistemas acuáticos (Beer *et al.*, 1980), las fanerógamas marinas han desarrollado nuevas estrategias estructurales y fisiológicas que parecen ser importantes para el intercambio  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , la incorporación de nutrientes y la homeostasis iónica de las células de la hoja (Olsen *et al.*, 2016).

De este modo, a diferencia de las plantas terrestres, las fanerógamas marinas pueden incorporar nutrientes no sólo por la raíz, sino también a través de las hojas. Es más, existen numerosas evidencias que indican que el tejido foliar tiene una mayor afinidad en el transporte de nutrientes y que pueden contribuir de forma sustancial al total de su incorporación (Burkholder, *et al.*, 2007). Por ejemplo, en algunas fanerógamas marinas establecidas sobre sustratos rocosos, como las praderas que forma *Amphibolis antarctica* (y en ocasiones *P. oceanica*), casi todos los requerimientos nutricionales inorgánicos se incorporan a través de la hoja (Terrados & Williams, 1997).

Uno de los principales retos a los que se enfrentan las angiospermas adaptadas a la vida en el medio marino es la incorporación de carbono inorgánico para la fotosíntesis. En plantas acuáticas, tanto el CO<sub>2</sub> como el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> son potenciales fuentes de carbono, pero mientras que el CO<sub>2</sub> puede difundir a través de la membrana plasmática, el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> necesita sistemas de transporte específicos para entrar en la célula (Larkum *et al.*, 1989). Sin embargo, debido al equilibrio del carbono inorgánico en el agua de mar (Ec. 1), el CO<sub>2</sub>, constituye tan sólo un 1% del total de carbono inorgánico disuelto (DIC) disponible.



(Valores de pKs para una Tª de 15°C y una salinidad de 35‰ descritos por Millero *et al.*, 2006)

A un pH 8.2 en el agua de mar, el ión HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> es la forma de C<sub>i</sub> más abundante, representando el 90% del total de DIC, mientras que el 9% restante corresponde al ión carbonato (CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>). El bajo valor de la tasa de deshidratación espontánea del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> al pH del agua de mar junto con la baja tasa de difusión del CO<sub>2</sub> a través de la membrana podría suponer un factor limitante en el suministro de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis en plantas marinas (Falkowski & Raven, 2007; Raven, 1984).

Las fanerógamas marinas crecen en ambientes de concentración de carbono inorgánico disuelto relativamente alta y estable (DIC; 2.1-2.3 mM) y con concentraciones de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> más de 100 veces mayores que de CO<sub>2</sub> disuelto en agua (2.0-2.5mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> vs 10-15 µM CO<sub>2</sub>). El uso fotosintético del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se ha estudiado en una amplia mayoría de macroalgas y fanerógamas marinas (revisado en Koch *et al.*, 2013). Se sabe que las angiospermas marinas utilizan el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fuente de C<sub>i</sub> (Beer *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2013; Borum *et al.*, 2016; Larkum *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha descrito que los sistemas de incorporación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> que poseen son relativamente

## Introducción

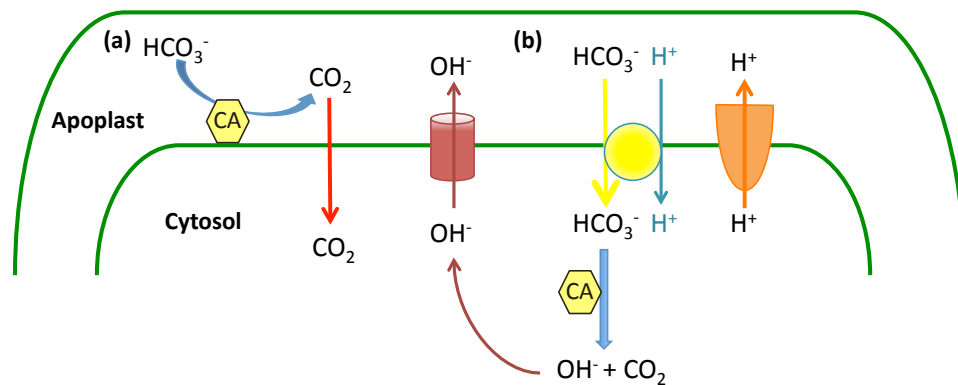
ineficientes en comparación con las macroalgas (Durako 1993; Beer & Koch 1996; Invers *et al.* 1999; Poschenrieder *et al.*, 2018). Esta relativa menor eficiencia parece ser consecuencia del origen terrestre de las fanerógamas marinas, cuya colonización del medio marino tuvo lugar bajo una atmósfera mucho menos enriquecida en CO<sub>2</sub> que la atmósfera inicial (Beer & Koch, 1996; Poschenrieder *et al.*, 2018).

Ya que la mayoría de las especies de fanerógamas marinas son plantas C<sub>3</sub>, su fotosíntesis no está saturada por la disponibilidad actual de carbono inorgánico (Koch *et al.* 2013). En consecuencia, un incremento de la presión parcial de CO<sub>2</sub> podría aumentar la tasa de fotosíntesis así como reducir el coste energético en relación a la fotorrespiración (Raven *et al.* 2014; Borum *et al.*, 2016). No obstante, el impacto del incremento del CO<sub>2</sub> atmosférico sobre la fotosíntesis de las fanerógamas marinas podría variar en función del uso del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fuente de C<sub>i</sub> en estas especies.

El uso del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para la fotosíntesis en angiospermas marinas puede ser resumido en dos modelos básicos:

(a) Conversión de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>2</sub> y OH<sup>-</sup> en el apoplasto catalizada por una anhidrasa carbónica externa (CA, *Carbonic Anhydrase*). Este proceso debe ser sensible a acetazolamida (AZ), un inhibidor no permeable a la membrana plasmática (Fig. 2a; Beer *et al.*, 2002; Björk *et al.*, 1997; Invers *et al.*, 1997, 1999; James & Larkum, 1996). Una variación de este proceso podría ser la conversión de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>2</sub> en regiones ácidas del apoplasto, de forma que la acidificación aceleraría la conversión de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>2</sub> y establecería una mayor relación CO<sub>2</sub>:HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> que en el agua de mar y en el resto de la capa limítrofe (Beer *et al.*, 2002; Hellblom & Axelsson, 2003). La presencia de estas bandas ácidas se ha descrito en caráceas, donde la extrusión localizada de H<sup>+</sup> produce zonas ácidas y alcalinas alternas como sucede en los filamentos del alga de agua dulce *Chara corallina* (Lucas & Berry, 1985; Shimmen *et al.*, 2003). Cuando se complementa con las regiones ácidas, este modelo de deshidratación externa de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> se considera un mecanismo de concentración de CO<sub>2</sub> (Ferrier, 1980; Walker *et al.*, 1980).

(b) Incorporación directa de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mediante un simporte energizado por H<sup>+</sup> (Fig. 2b), como ha sido propuesto para *Cymodocea nodosa*, *Zostera marina*, *Ruppia maritima* o *Halophila ovalis* (Invers *et al.*, 1999; Hellblom *et al.*, 2001; Beer *et al.*, 2002; Uku *et al.*, 2005).



**Figure 2.** Model for  $\text{HCO}_3^-$  utilization in seagrasses: (a) Apoplastic dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  catalysed by an external carbonic anhydrase (CA) and  $\text{CO}_2$  diffusion into the cytosol. (b) Direct uptake of  $\text{HCO}_3^-$  by means of a  $\text{H}^+$  energized symport, and subsequent internal CA-mediated  $\text{HCO}_3^-$  conversion into  $\text{CO}_2$  and  $\text{OH}^-$ .

Ambos mecanismos para la utilización del  $\text{HCO}_3^-$  podrían verse favorecidos por el uso de  $\text{H}^+$ -ATPasas para energizar la membrana plasmática. La salida de protones a través de la misma crearía regiones ácidas en el apoplasto donde la conversión de  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  podría ser acelerada como se ha descrito para las caráceas (Ferrier, 1980; Walker *et al.*, 1980). No obstante, en el caso de las fanerógamas marinas no se ha descrito la existencia de este tipo de bandas ácidas en el apoplasto, las cuales, en el caso de existir ocuparían áreas pequeñas (Raven & Beardall, 2016), si bien el gradiente de  $\text{H}^+$  hacia el interior celular generado por  $\text{H}^+$ -ATPasas en estas pequeñas áreas hace factible la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  en simporte con  $\text{H}^+$  (Beilby & Bisson, 2012; Lucas *et al.*, 1983).

En cualquier caso, la anhidrasa carbónica jugaría un papel importante en la producción primaria de algunas fanerógamas marinas (Tsuzuki & Miyachi, 1989; Badger & Price, 1994; Beer & Rehnberg, 1997; Poschenrieder *et al.*, 2018), contribuyendo a satisfacer la demanda de carbono inorgánico de estas plantas en condiciones naturales. Esta contribución representa un 25% en *Posidonia australis* (James & Larkum, 1996), un 75% en *Z. marina* (Beer & Rehnberg, 1997), un 53% en *P. oceanica* y un 35% en *C. nodosa* (Campbell & Fourqurean, 2013).

En fanerógamas marinas el uso de  $\text{HCO}_3^-$  ha sido estudiado principalmente mediante la medida a corto plazo de la respuesta de la fotosíntesis a inhibidores (como AZ) que actúan en el funcionamiento externo de la CA, o mediante tampones para inhibir la acidificación de la capa límite (Beer *et al.*, 2002). De este modo, se ha observado que *P. oceanica* y *P. australis* son capaces de deshidratar el  $\text{HCO}_3^-$  en el



## Introducción

apoplasto (Invers *et al.*, 1999; James & Larkum, 1996), aunque Invers *et al.* (2001) no descartan la posibilidad de una incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  en *P. oceanica*. Por otro lado, *Z. marina* (Hellblom *et al.*, 2001), el morfotipo de sol de *Zostera noltii* (Mercado *et al.*, 2003), así como otras numerosas especies tropicales (Uku *et al.*, 2005) parecen incorporar el  $\text{HCO}_3^-$  directamente. Finalmente, en otras dos especies de fanerógamas de aguas templadas de Australia, *Halophila ovalis* y *Syringodium isoetifolium*, también se ha propuesto una incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  (Borum *et al.*, 2016).

Algunos trabajos, tanto de fanerógamas marinas como de otras plantas acuáticas, utilizan la medida directa de iones para investigar qué forma de carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$ ) entra en las células de plantas que utilizan el  $\text{HCO}_3^-$  al pH alcalino del agua de mar (Beer *et al.*, 2002; Raven & Beardall, 2016). Así, para averiguar qué especies de  $\text{C}_i$  atraviesan la membrana plasmática, una alternativa al uso de inhibidores añadidos al medio externo podría ser la medida del pH citosólico ( $\text{pH}_c$ ) en respuesta a pulsos de carbono inorgánico. En función de la forma de carbono inorgánico que entra en la célula, el efecto sobre el  $\text{pH}_c$  sería diferente. La deshidratación externa del  $\text{HCO}_3^-$  (catalizada por CA) podría resultar en la entrada por difusión pasiva de  $\text{CO}_2$ , acidificando el citoplasma tal y como está descrito para la hepática *Riccia fluitans* por Ballesteros *et al.* (1998). Por el contrario, un transporte de  $\text{HCO}_3^-$  mediado por  $\text{H}^+$  inicialmente acidificaría el citoplasma, pero después de la deshidratación interna del  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$ , los  $\text{OH}^-$  generados volverían a alcalinizar el citosol.

Puesto que ambos modelos de utilización del  $\text{HCO}_3^-$  tienen un coste energético (Raven *et al.*, 2014), la membrana plasmática ha de ser energizada cualquiera que sea el mecanismo presente (Raven & Hurd, 2012). Ambos modelos podrían estar principalmente asociados a la actividad de una  $\text{H}^+$ -ATPasa como bomba primaria, ya que las bombas de protones impulsadas por ATP son capaces de acidificar el apoplasto, facilitando la conversión del  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  disuelto. En este caso, la producción de CA externa unida a la membrana para catalizar la que de otra forma sería una conversión química lenta del  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$ , también supondría un gasto energético (Larkum *et al.*, 1989). De igual forma, se necesita energía para establecer y mantener el gradiente de protones a través de la membrana que impulse el cotransporte de protones y  $\text{HCO}_3^-$  así como para la síntesis de CA interna que catalice la conversión de  $\text{HCO}_3^-$  en  $\text{CO}_2$  (Beer *et al.*, 2002).



Por otro lado, además del  $H^+$ , el  $Na^+$  y el  $Cl^-$  también podrían tenerse en cuenta para impulsar el transporte de  $HCO_3^-$  en las fanerógamas marinas. La incorporación de  $HCO_3^-$  para la fotosíntesis dependiente de  $Na^+$  se ha descrito en cianobacterias (Badger *et al.*, 2002; Badger & Price, 2003). Además, la existencia de un intercambio con aniones ha sido propuesta para la incorporación directa de  $HCO_3^-$  en algas marinas (Drechsler *et al.*, 1993; Fernández *et al.*, 2014; Larsson & Axelsson, 1999). Cabe destacar la estimulación de la fotosíntesis dependiente de  $Na^+$  observada en *Z. muelleri* (Millhouse & Strother, 1986, 1987). El uso de  $H^+$ ,  $Na^+$  o  $Cl^-$  como iones motrices en la incorporación de  $HCO_3^-$  daría como resultado un efecto diferente sobre el  $pH_c$  y las concentraciones citosólicas de cada uno de ellos. Si el  $Na^+$  fuera el ión motriz, tendría lugar un aumento de la concentración citosólica de  $Na^+$  de forma simultánea a la incorporación de  $HCO_3^-$ ; si fuera el  $Cl^-$  el ión motriz, la concentración de  $Cl^-$  en el citoplasma disminuiría al mismo tiempo que el  $HCO_3^-$  fuera incorporado a la célula. En ninguno de los casos se daría una acidificación inicial del  $pH_c$ . En la literatura, la presencia de sistemas de incorporación de  $HCO_3^-$  impulsados por  $Na^+$  y  $Cl^-$  se ha evidenciado mediante el uso de inhibidores específicos como monensina (MON; Pressman 1976; Pressman & Fahim 1982), ácido 4,4'- diisotiocianatostilbeno-2,2' disulfónico (DIDS), y ácido Nitro-PhenylPropylamino-Benzoico (NPPB; Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995).

Por otra parte, la presencia de un transportador de  $HCO_3^-$  tendría un papel importante en organismos con mecanismos de concentración de carbono (CCMs, Raven *et al.*, 2014; Raven & Beardall, 2016). Los mecanismos de concentración de carbono implican la acumulación de  $CO_2$  en el cloroplasto, dando lugar a una mayor concentración que en el resto del medio en el estado de equilibrio durante la fotosíntesis (Raven *et al.*, 2014). Aunque la conversión de  $HCO_3^-$  a  $CO_2$  catalizada en el exterior celular es un mecanismo importante de utilización del  $HCO_3^-$  en fanerógamas y macroalgas marinas, no es capaz de elevar la proporción de  $CO_2$  a concentraciones por encima del equilibrio (Beer *et al.*, 2002). Para constituir un CCM, la deshidratación de  $HCO_3^-$  catalizada ha de tener lugar en un compartimento ácido (intra o extra) celular, para que la concentración de  $CO_2$  en el equilibrio sea lo bastante elevada (Giordano *et al.*, 2005). Por el contrario, un transporte activo de  $HCO_3^-$  a través de la membrana plasmática y su posterior conversión a  $CO_2$  catalizada en el interior celular ha sido propuesto como un CCM en algas (Giordano *et al.*, 2005) así como en fanerógamas

## Introducción

marinas (Beer *et al.*, 2002; Raven *et al.*, 2008). Sin embargo no hay estudios publicados que demuestren esto en fanerógamas marinas, seguramente debido a la compleja estructura de su hoja, con diferentes tipos celulares fotosintéticos y no fotosintéticos así como espacios aéreos intercelulares.

Dentro de la incorporación de nutrientes, además del C, el N y el P, son elementos fundamentales para el funcionamiento de la célula. La fanerógama marina *P. oceanica* tiene un crecimiento limitado por N y P (Alcoverro *et al.*, 1997), aunque es capaz de crecer a concentraciones bastante bajas de ambos nutrientes, habitualmente por debajo de 5  $\mu\text{M}$  en el Mar Mediterráneo (Bethoux *et al.*, 2005), pudiendo competir con la proliferación de otras especies como *Cymodocea nodosa* (Alcoverro *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1991). Así, para incorporar los nutrientes a tan bajas concentraciones externas y poder mantener la producción primaria las fanerógamas marinas han debido desarrollar:

- (i) Sistemas de transporte de alta afinidad (con muy baja  $K_M$ ), dada la baja concentración de N y P en el medio marino.
- (ii) Un potente sistema para energizar el movimiento de iones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{P}_i$  a través de la membrana plasmática capaz de compensar la elevada fuerza ión motriz hacia el exterior celular de tales aniones.

El nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para las plantas. Constituye compuestos celulares como aminoácidos, proteínas, nucleósidos fosfato y ácidos nucleicos entre otras macromoléculas orgánicas, por lo que su disponibilidad puede limitar el mantenimiento y crecimiento de la biomasa (Touchette & Burkholder, 2000).

En plantas vasculares los sistemas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  presentes se clasifican en dos tipos: sistemas de transporte de baja afinidad (*Low-Affinity Transport System* - LATS) y sistemas de transporte de alta afinidad (*High-Affinity Transport System* -HATS). Los LATS muestran cinéticas de tipo lineal y su contribución a la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  es significativa a concentraciones en el medio externo por encima de 1 mM. Los HATS son sistemas de cinética saturable y median el transporte de  $\text{NO}_3^-$  a bajas concentraciones (1  $\mu\text{M}$  - 1 mM) en el medio externo (Crawford & Glass, 1998).

En *Arabidopsis* se han descrito dos tipos de HATS: un transportador constitutivo (cHATS), que se encuentra disponible incluso cuando las plantas no han sido previamente suplementadas con  $\text{NO}_3^-$ , y un transportador inducible (iHATS) que es estimulado por  $\text{NO}_3^-$  en el medio externo (Crawford & Glass, 1998; Miller *et al.*, 2007). En la misma especie modelo dos familias de genes codifican potencialmente para proteínas transportadoras responsables de la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  en la raíz o la distribución en la planta: NRT1, con 53 miembros y NRT2, con 7 miembros (Forde, 2000; Orsel *et al.*, 2002). La familia NRT1 (*nitrate transporter*) o también llamada PTR (*peptide transporter*) incluye transportadores de nitrito (Sugiura *et al.*, 2007), péptidos (Komarova *et al.*, 2008) y aminoácidos (Zhou *et al.*, 1998) pasando a denominarse NPF (Léran *et al.*, 2014). Las proteínas de esta familia son los principales constituyentes de los LATS. Sin embargo, a elevadas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ , algunas de ellas como NRT1.1 en *Arabidopsis* (Liu & Tsay, 2003) y MtNRT1.3 en *Medicago truncatula* (Morère-LePaven *et al.* 2011), funcionan como transportadores de doble afinidad implicados tanto en HATS como en LATS. Por su parte, los transportadores de la familia NRT2, son los principalmente implicados en los HATS, si bien de los 7 componentes identificados en *Arabidopsis*, 6 necesitan de una segunda proteína, NAR2 (*Nitrate Assimilation Related protein*) para el transporte de  $\text{NO}_3^-$  (Kotur *et al.*, 2012).

En plantas vasculares terrestres, donde la  $\text{H}^+$ -ATPasa energiza la membrana plasmática (Pedersen *et al.*, 2012), el transportador NRT2.1 funciona en simporte con  $\text{H}^+$  (Zhou *et al.*, 2000), siendo este modelo el más aceptado para la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidad en plantas (William & Miller, 2001; Miller *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2012). La incorporación de  $\text{NO}_3^-$  en células individuales se encuentra asociada a la despolarización de la membrana plasmática, es decir, a un aumento de las cargas positivas en el interior de la célula (Crawford *et al.*, 1998). Para explicar la despolarización de la membrana junto con el acoplamiento del gradiente de protones, se ha propuesto que la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  está mediada por  $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ . Se trata por tanto de un mecanismo tipo simporte y electroforético (Miller & Smith, 1996; Lupini, *et al.*, 2016).

A diferencia de las plantas vasculares terrestres, los mecanismos de transporte de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$  (y  $\text{P}_i$ ) de la membrana plasmática de *Z. marina* no están impulsados por  $\text{H}^+$  sino por  $\text{Na}^+$  tanto en las células de la raíz como en el mesófilo foliar (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). Estos sistemas de transporte

## Introducción

dependientes de  $\text{Na}^+$  muestran cinéticas de saturación en el rango micromolar, y presentan constantes de semisaturación ( $K_M$ ) similares a los de algas marinas (2-13  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ ; De Boer, 1985) pero mucho menores que los transportadores de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidad de plantas terrestres, con valores cercanos a 60  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  en cebada (Glass *et al.*, 1992) o *Arabidopsis* (Okamoto *et al.*, 2006; revisado en Wang *et al.*, 2012). Sistemas de transporte acoplados a  $\text{Na}^+$  se han descrito previamente en otros organismos marinos como es el caso de la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$  en cianobacterias marinas (Shibata *et al.*, 2002; Price *et al.*, 2004) o los sistemas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$ , glucosa y aminoácidos dependientes de  $\text{Na}^+$  en diatomeas marinas (Rees *et al.*, 1980; Raven, 1984). Sin embargo, no existen evidencias funcionales, aparte del caso de *Z. marina*, de sistemas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  (y  $\text{P}_i$ ) de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  en la literatura de plantas vasculares. Por tanto, el transportador NRT2.1 podría haber evolucionado hacia el uso de  $\text{Na}^+$  como ión motriz en el caso de las angiospermas marinas.

Por otra parte, la medida de la concentración de nitrato en el citosol es esencial para determinar el mecanismo de transporte de nitrato a nivel de plasmalema ya que el gradiente electroquímico de este ión a través de la membrana plasmática determina la fuerza ión motriz necesaria para la incorporación del mismo. Además, los cambios en la concentración citosólica de nitrato pueden ser un posible mecanismo de regulación de la incorporación de dicho nutriente (King *et al.*, 1993). Varias técnicas han sido utilizadas para determinar la concentración de nitrato intracelular, que pueden agruparse entre las que miden la que cantidad de  $\text{NO}_3^-$  total en el citoplasma (incluyendo los orgánulos intracelulares), como el análisis compartimentado del flujo de salida de marcadores radioactivos y el fraccionamiento celular; y las que estiman la cantidad de  $\text{NO}_3^-$  en el citosol, como las basadas en la actividad nitrato reductasa o el uso de microelectrodos selectivos para nitrato (Siddiqi & Glass, 2002). Por tanto, existe un amplio rango de valores descritos para la concentración intracelular de nitrato en función del método de medida empleado (Siddiqi & Glass, 2002; Britto & Kronzucker, 2003). Sin embargo, sólo el uso de microelectrodos selectivos para nitrato es capaz de determinar la actividad iónica *in vivo* y en consecuencia generar valores más precisos (Walker *et al.*, 1995; Miller & Smith, 2008).

Además del flujo de iones a través de la membrana, diferentes procesos celulares determinan la magnitud de la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$ , como es la asimilación a través de la actividad nitrato reductasa (NR). Esta enzima se ve afectada por cambios en el medio ambiente como luz, oscuridad, pH y concentración de  $\text{CO}_2$  (revisado en Kaiser & Huber, 2001). Las alteraciones en el medio externo pueden reflejarse en cambios en la concentración citosólica de nitrato que a su vez pueden suponer una señal celular aportando una conexión entre los cambios en el medio ambiente y las repuestas celulares (Miller & Smith, 2008). En consecuencia, la concentración intracelular de nitrato se ve sometida a variaciones, si bien el mantenimiento dentro de un rango de concentraciones es esencial debido a la toxicidad que supone la acumulación de nitrato citosólico (Miller & Smith, 2008).

Por otro lado, dentro del *pool* de nitrógeno orgánico disuelto (DON), los aminoácidos constituyen una fracción aportada por la descomposición de materia orgánica pero a la vez relativamente lábil y por tanto con una elevada tasa de reemplazo (Bronk *et al.*, 2002). Además de las formas inorgánicas, las fanerógamas marinas son capaces de incorporar N en forma de aminoácidos lo que puede suponer una ventaja competitiva especialmente en ambientes oligotróficos. Sin embargo, hasta el momento pocos son los trabajos que han estudiado esta forma de incorporación de N (Bird *et al.*, 1998; Vonk *et al.*, 2008; Van Engeland *et al.*, 2011).

Por su parte, el fósforo juega un papel esencial en el metabolismo vegetal ya que, entre otros, está implicado en conservar y transferir energía en el metabolismo celular. Además, es un componente estructural indispensable de los ácidos nucleicos, coenzimas, nucleótidos, fosfoproteínas, fosfolípidos y azúcares fosfato (Raghothama, 1999; Schachtman *et al.*, 1998; Poirier & Bucher, 2002). Sin embargo, la concentración de  $\text{P}_i$  en el agua de mar se encuentra entre 0.1 - 1.7  $\mu\text{M}$ , aunque puede llegar hasta valores de 20  $\mu\text{M}$  en el agua intersticial del sedimento en zonas habitadas por fanerógamas marinas (Touchette & Burkholder, 2000).

En plantas vasculares terrestres, la incorporación de  $\text{P}_i$  de alta afinidad está mediada por los transportadores PHT1 pertenecientes a la familia multigénica *PHT1* con 9 miembros en *Arabidopsis* (revisado en Nussaume *et al.*, 2011). Estos sistemas de transporte, al igual que en el caso del  $\text{NO}_3^-$ , también requieren energía y se encuentran generalmente acoplados al gradiente de potencial electroquímico de  $\text{H}^+$  generado por la

## Introducción

H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática, impulsando de este modo la actividad de simportadores H<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> (Ullrich-Eberius *et al.*, 1984; Rausch & Bucher, 2002). En el caso de *Z. marina*, la incorporación de P<sub>i</sub> de alta afinidad está mediada por un sistema de transporte dependiente de Na<sup>+</sup> (Rubio *et al.*, 2005), el cual no había sido caracterizado anteriormente en otras plantas vasculares (Rausch & Bucher, 2002). No obstante, sí se ha comprobado que el transporte de P<sub>i</sub> se estimula por Na<sup>+</sup> en numerosas algas verdes (Raven, 1984; Reid *et al.*, 2000).

### **3 Incremento de CO<sub>2</sub> atm, acidificación oceánica e incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas**

Durante las últimas décadas se ha venido alertando del aumento de la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera (CO<sub>2</sub> atm) y sus consecuencias sobre el cambio climático. Hoy día existe una amplia aceptación en la comunidad científica acerca del incremento de CO<sub>2</sub> atm (el principal gas de efecto invernadero) generado por la actividad humana y el consecuente aumento de la temperatura en la superficie de la tierra (IPCC, 2013). La concentración de CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera en la actualidad es de 409 ppm (NOAA-CCGG, 2019) y, no sólo continúa aumentando, sino que la velocidad con que lo está haciendo se ha acelerado en los últimos años. Algunos modelos predicen que la concentración de CO<sub>2</sub> aumentará hasta 550 ppm a mediados de este siglo y probablemente llegue o incluso supere las 1000 ppm en el año 2100 (Royal Society, 2005; IPCC-Collins *et al.*, 2013).

Los océanos constituyen el 70% de la superficie terrestre y tienen un papel fundamental en numerosos procesos de la Tierra. Además albergan una gran variedad de hábitats y ecosistemas de miles de especies de organismos. Antes de la revolución industrial, los océanos constituían una fuente de CO<sub>2</sub> neta a la atmósfera, pero durante los últimos 250 años se han convertido en un sumidero de CO<sub>2</sub> (Sabine *et al.*, 2004; Sabine & Feely, 2007). Actualmente la mayor parte de las emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub> a la atmósfera son, con el tiempo, absorbidas por los océanos, afectando a la química del carbono. El incremento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, hace que se desplace el equilibrio aire-agua, aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> en los océanos. El incremento de CO<sub>2</sub> provoca la disminución del pH del agua de mar, es decir, aumenta la concentración de H<sup>+</sup> (Eq. 1), lo que se denomina acidificación de los océanos. Así, el

pH oceánico en superficie ha disminuido 0.1 unidades desde el comienzo de la era industrial y se prevé que siga disminuyendo durante este siglo con consecuencias potencialmente adversas para la biota marina (IPCC-Ciais *et al.*, 2013). Si la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera alcanza las 1000 ppm, se estima que el pH en las aguas oceánicas superficiales baje de 0.06 a 0.3 - 0.4 unidades de pH a finales de siglo según las diferentes regiones (Orr *et al.*, 2005; IPCC-Ciais *et al.*, 2013). Además, debido al equilibrio entre CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (Eq. 1), el aumento de CO<sub>2</sub> conlleva el incremento de la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> dando lugar a una mayor concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC).

Al actual pH oceánico (entre 7.9 y 8.2; IPCC, 2013), el CO<sub>2</sub> constituye la menor parte de DIC, pero tendrá el mayor porcentaje de incremento (>250%) entre los componentes del DIC al igual que la caída de pH consecuencia del aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico previsto para 2100. Por el contrario, la mayor proporción de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sólo incrementará un 24% en 2100. No obstante en términos absolutos (mol Kg<sup>-1</sup>) el nivel de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentará más que el de CO<sub>2</sub> (Raven *et al.*, 2005). Estos cambios fundamentales en la química oceánica probablemente tengan consecuencias biológicas en cascada en los ecosistemas marinos (Hofmann *et al.*, 2010).

La disminución del pH oceánico, no sólo afecta a la química del carbono, sino que también altera la especiación iónica de otros nutrientes como el hierro, el amonio y el fosfato. Si bien la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> parece no cambiar, el descenso de pH supondría una mayor relación NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> por la disminución de la cantidad de NH<sub>3</sub>, así como un descenso de las concentraciones de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> (Zeebe & Wolf-Gladrow, 2001). De este modo, la acidificación oceánica puede afectar a los mecanismos de incorporación de nutrientes y su energética en el caso de las fanerógamas marinas. Aparentemente, el cambio de pH aumentaría tanto el gradiente de H<sup>+</sup>, favoreciendo a los sistemas de transporte acoplados a este ión, como el gradiente de Na<sup>+</sup>, por aumento de la actividad del antiportador de la membrana plasmática Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. No obstante, dada la elevada y constante concentración de Na<sup>+</sup> en el AMN (0.5 M), el gradiente de potencial electroquímico para dicho ión ( $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}/F$ ) siempre será mayor que para los H<sup>+</sup>. En este sentido, la acidificación externa supondría una menor concentración de Na<sup>+</sup> en el citosol, en beneficio de los mecanismos dependientes de Na<sup>+</sup>. Además, ya que la mayoría de fanerógamas marinas están limitadas por la actual disponibilidad de C<sub>i</sub> (Koch *et al.* 2013), es de esperar que la fotosíntesis de las mismas aumente con el



## Introducción

progresivo incremento de  $\text{CO}_2$  y  $\text{HCO}_3^-$  en el agua (Borum *et al.*, 2016). Sin embargo, el aumento del DIC podría además tener consecuencias importantes en la homeostasis iónica.

Por tanto, la acidificación oceánica es un efecto muy importante en el contexto del cambio climático, si bien la amenaza que supone al medio ambiente marino ha sido reconocida recientemente. No obstante, aún se desconoce una gran mayoría de los procesos químicos y biológicos que pueden verse afectados. Por tanto, el estudio de los procesos que pueden verse alterados supone un reto complejo y significativo para poder predecir el impacto de la acidificación oceánica en especies de interés como las fanerógamas marinas.

## **4 OBJETIVOS**

1. Caracterización electrofisiológica de la membrana plasmática de la angiosperma marina *Posidonia oceanica*. Identificación de la bomba primaria responsable de la energización del plasmalema en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* y determinación de la permeabilidad relativa de la membrana plasmática a  $\text{Na}^+$  con respecto a  $\text{K}^+$ .
2. Caracterización del uso de  $\text{HCO}_3^-$  como fuente de carbono inorgánico para la fotosíntesis en *P. oceanica*. Determinación del efecto de la adición de  $\text{HCO}_3^-$  sobre el  $\text{pH}_c$  y la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ .
3. Caracterización de los mecanismos de incorporación de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  y aminoácidos (L-Alanina y L-Cisteína) en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Determinación mediante técnicas electrofisiológicas de los parámetros cinéticos y del ión motriz responsable del transporte.
4. Caracterización del efecto del incremento de  $\text{HCO}_3^-$  sobre la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{P}_i$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Determinación del efecto del aumento de  $\text{CO}_2$  o  $\text{HCO}_3^-$  sobre la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$ .



## **MATERIAL & MÉTODOS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1 Material Vegetal

### 1.1 Taxonomía, distribución y morfología de *Posidonia oceanica*

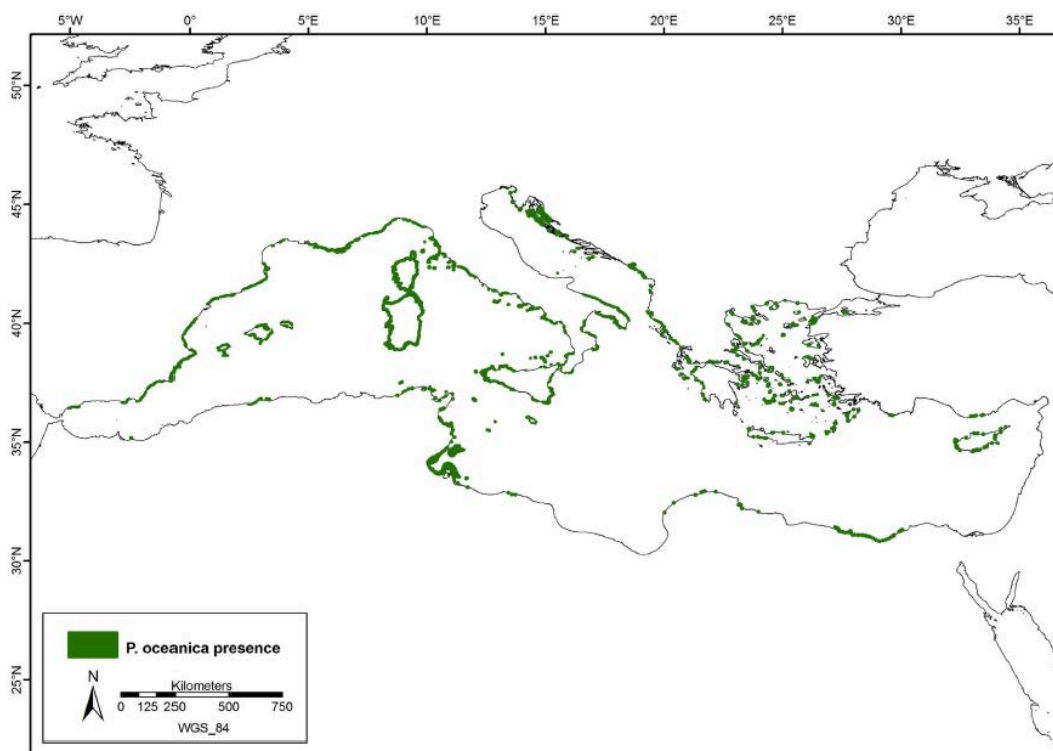
*Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile es una angiosperma marina perteneciente a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida. Esta especie se incluye en el orden Alismatales, familia Posidoniaceae, (den Hartog, 1970). Su nombre hace alusión a la deidad griega Poseidón (dios del mar) y también se conoce como “hierba de Neptuno” o “alga de vidrieros”.

De las 7 especies que comprenden el género *Posidonia*, se trata de la única presente en el hemisferio norte, siendo endémica del Mediterráneo. Las 6 restantes (*P. angustifolia* Cambridge & Kuo, *P. australis* J.D. Hooker, *P. denhartogii* Kuo & Cambridge, *P. kirkmanii* Kuo & Cambridge, *P. ostenfeldii* den Hartog y *P. sinuosa* Cambridge & Kuo) se encuentran distribuidas a lo largo de la costa sur de Australia (den Hartog, 1970, Robertson 1984). Además de la separación geográfica, parece que la especie mediterránea y las australianas muestran divergencias en su material genético (Waycott & Les, 2000; Waycott *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2011) que indican que la separación de los dos grupos tuvo lugar relativamente pronto en la historia evolutiva de las fanerógamas marinas, probablemente durante el Eoceno tardío, hace unos 40 m.a. De este modo, el origen del género *Posidonia* habría tenido lugar en el entonces presente Mar de Tethys (Aires *et al.*, 2011).

Aunque *Posidonia oceanica* es endémica del Mediterráneo, no es la única fanerógama marina presente en este mar, sino que comparte situación geográfica con otras 8 especies (*Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, *Zostera marina* Linnaeus, *Zostera noltii* Hornemann, *Halophila stipulacea* (Forsskål) Ascherson, *Halophila decipiens* Ostenfeld, *Ruppia maritima* Linnaeus, *Ruppia cirrhosa* (Petagna) Grande, y *Halodule wrightii* Ascherson) (Short *et al.*, 2007).

En el Mediterráneo, las praderas de *P. oceanica* cubren una superficie de 12 247 km<sup>2</sup> (Telesca *et al.*, 2015) (Fig. 3). Por el oeste, su presencia está asociada al límite de masas de agua de distinta densidad entre el Atlántico y el Mediterráneo que supone el estrecho de Gibraltar (Marbà *et al.*, 1996, Moreno *et al.*, 2004). Por el este, el límite de localización es más amplio en la costa norte que en la costa africana, estando ausente en la costa de Libano, Israel y Siria (Gobert *et al.*, 2006; Telesca *et al.*, 2015) (Fig. 3).

## Material & Métodos



**Figure 3.** Distribution of *P. oceanica* meadows in the Mediterranean Sea. Taken from Telesca *et al.*, 2015.

En España, las praderas de *P. oceanica* se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de la costa este y sur peninsular (Gerona, Tarragona, Castellón, Alicante, Murcia, Almería, Granada y Málaga), así como en las Islas Baleares, ocupando una superficie de 1727 km<sup>2</sup> (Telesca *et al.*, 2015). En Andalucía las praderas más extensas y densas de *P. oceanica* se localizan en la provincia de Almería, con 56 km<sup>2</sup> de praderas monoespecíficas y 11 km<sup>2</sup> de praderas mixtas con otras angiospermas y macroalgas. En el litoral de la provincia de Málaga, *P. oceanica* aparece de forma irregular y dispersa, observándose rodales de tamaño intermedio, y praderas con importantes discontinuidades. En Málaga, las poblaciones de *P. oceanica* ocupan un total de 0.53 km<sup>2</sup> que se distribuyen en tres grandes áreas: la oriental, en el tramo comprendido entre Molino de Papel (Arroyo de la Miel) y Nerja; zona centro, entre el faro de Calaburras y Calahonda; y el tramo entre el Saladillo y Estepona, con algunos rodales aislados en punta Chullera (POSIMED, 2014). Esta punta, situada muy próxima ya al Estrecho de Gibraltar y a la provincia de Cádiz, se puede considerar como el actual límite de distribución occidental de la especie (Moreno *et al.*, 2004).

En cuanto a los fondos, *Posidonia oceanica* se encuentra normalmente sobre sustratos arenosos de profundidad variable (hasta 40 m) (Pergent *et al.*, 1995). En el caso del Mediterráneo español, la especie forma praderas tanto sobre fondos rocosos como arenosos en el piso infralitoral, es decir, desde 0.5 m hasta una profundidad máxima que depende de la transparencia del agua, siendo la luz uno de los factores determinantes de la distribución y densidad de población de *P. oceanica* (Elkalay *et al.*, 2003). Esta profundidad máxima (o límite inferior) es mayor en aguas de Baleares (37 m) y el sureste peninsular (34 m), donde las aguas son en general más transparentes y oligotróficas, y menor en Cataluña (25 m), donde las aguas son menos transparentes y mesotróficas. En las localizaciones de la provincia de Málaga, salvo en la zona de la playa Molino de Papel (donde se alcanzan actualmente los 11 m de profundidad), las manchas se localizan sobre sustratos rocosos muy someros, o al abrigo de éstos, entre 0.5 y 6 m de profundidad (POSIMED, 2014). Hacia el estrecho de Gibraltar, otros factores diferentes a la luz limitan la distribución vertical de esta especie, como el hidrodinamismo, la temperatura o la disponibilidad de sustrato rocoso (POSIMED, 2014).

*Posidonia oceanica* requiere unas condiciones ambientales estables, aunque es una especie bien adaptada a las variaciones estacionales y espaciales de luz, temperatura y nutrientes. Está considerada estenohalina, es decir, poco tolerante a las variaciones de la salinidad, razón por la cual no se encuentra presente en ambientes estuáricos o hipersalinos del Mediterráneo español. Soporta un rango de salinidad entre 25-39 ‰ (Fernández-Torquemada & Sánchez-Lizaso, 2005; Sandoval-Gil *et al.*, 2012), aunque se desarrolla de manera óptima entre 36.5-38.5 ‰. A pesar de no ser resistente a la desecación, sí es capaz de tolerar un amplio rango de temperaturas (9-29°C) (Boudouresque & Meinesz, 1982), si bien el óptimo de crecimiento se da entre 13-18°C (Lee *et al.*, 2007 A). Además, *P. oceanica* soporta con dificultad ambientes con intenso hidrodinamismo, a pesar de haber desarrollado una buena estructura de anclaje al sustrato, al igual que otras angiospermas marinas (Raven, 1996).

## Material & Métodos

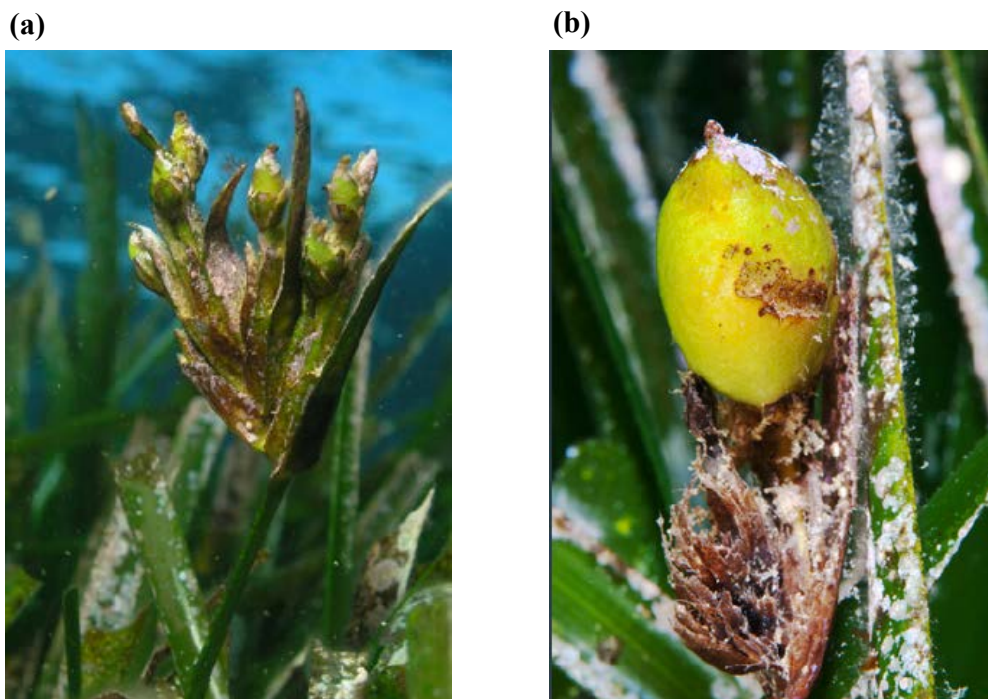
Dicha estructura comprende rizomas horizontales (plagiotropos) relativamente gruesos (hasta unos 10 mm) de los que surgen, hacia abajo las raíces, bastante lignificadas, y hacia arriba los rizomas verticales (ortótropos), que acaban en haces de entre 4 a 8 hojas (Fig. 4). Todos los tejidos tienen un sistema de espacios aéreos bien estructurados (aerénquima) (Raven, 1996) que facilita el intercambio gaseoso de las diferentes partes.



**Figure 4.** *P. oceanica* stand showing part of the vertical or orthotropic rhizome, as well as the rocky sediment that sustains it.

Se trata de plantas perennes, con hojas acintadas, alternas, paralelinervias (con 13-17 nervios interconectados por nervios secundarios transversales), de ápice redondeado, fuertemente pigmentadas (color verde oscuro) y de un tamaño de hasta 50-65 cm de longitud (aunque en ocasiones pueden alcanzar 1 metro o más) y 7-11 mm de ancho. En la base de las hojas existe un peciolo que, al caer la hoja, queda unido al rizoma dándole el aspecto de brocha característico. Además, las fibras foliares, con la acción del oleaje, forman bolas de 2-8 cm de diámetro, que se acumulan en las playas junto con otros restos de la planta (Salazar, 2009; Talavera & Gallego, 2010).

Las flores son hermafroditas y se encuentran agrupadas (entre 3-5) en inflorescencias situadas en los pedúnculos florales de unos 10 cm de longitud que surgen de la parte apical de los rizomas, entre las hojas de los haces (Fig. 5). La floración tiene lugar en otoño (octubre-noviembre, aunque en ocasiones desde finales de agosto) y al cabo de unos seis meses, en primavera y principios de verano, se produce la maduración de los frutos, similares a una oliva (de 1 cm de longitud, en baya y ovoideo) (Fig. 5) (Salazar, 2009; Talavera & Gallego, 2010). La reproducción sexual de *P. oceanica* no tiene lugar todos los años, y cuando se produce no aparece en todas las praderas, sino sólo en algunas zonas, por lo que es muy difícil de detectar. Aún se desconocen las causas de la variación espacial en la frecuencia de floración, aunque parece estar relacionada con la edad de las hojas (Balestri & Vallerini, 2003) o con diferencias ambientales de pequeña escala como variaciones en la radiación solar y, en consecuencia, en la temperatura (Motefalcone *et al.*, 2013). En general, las plantas que viven a menor profundidad son las que florecen con más frecuencia (Díaz-Almela *et al.*, 2005). No obstante, la propagación mediante reproducción sexual es escasa en esta especie y predomina el crecimiento vegetativo. Esto es extensible a la mayoría de las angiospermas marinas, pero es particularmente acusado en *P. oceanica*. (Salazar, 2009; Talavera & Gallego, 2010).



**Figure 5.** Organs of sexual reproduction of *P. oceanica*: **(a)** inflorescence and **(b)** fruit. Photographs by Juan M. Ruiz and Javier Murcia, respectively. Taken from Pérez *et al.*, 2015.



## Material & Métodos

El elevado tamaño que pueden alcanzar estas plantas, junto con las elevadas densidades ( $>1.000$  haces/m<sup>2</sup> y  $> 10.000$  hojas/m<sup>2</sup>), hace que el dosel foliar que forman actúen de auténticos “filtros” de luz, nutrientes y material particulado en suspensión. Las partículas que precipitan van rellenando los intersticios del complejo entramado de rizomas y raíces (Gacia & Duarte, 2001) que, al estar muy lignificados, son muy difíciles de descomponer y acaban formando un sustrato propio compactado por el material sedimentado y muy perdurable denominado “mata” (del francés “matte”, Matéo *et al.*, 1997). Debido al crecimiento vertical de los rizomas ortótropos el proceso descrito continúa en el tiempo produciendo una elevación del fondo marino a una tasa que se ha estimado entre 10 y 18 cm/siglo (Boudouresque & de Grissac, 1983; Matéo *et al.*, 1997). Esta dinámica se traduce en depósitos milenarios de materia orgánica que se elevan varios metros sobre el sustrato original. En zonas resguardadas del hidrodinamismo, dan lugar a estructuras denominadas “arrecife-barrera” de considerables dimensiones que atenúan la energía hidrodinámica incidente sobre la línea de costa, favoreciendo la formación de playas. En el litoral Mediterráneo andaluz se encuentra un ejemplo de estas estructuras biológicas milenarias, datadas en 6.000-7.000 años de antigüedad, en el declarado monumento natural del Arrecife Barrera de *Posidonia* frente a las poblaciones costeras de Roquetas de Mar y Aguadulce (Almería).

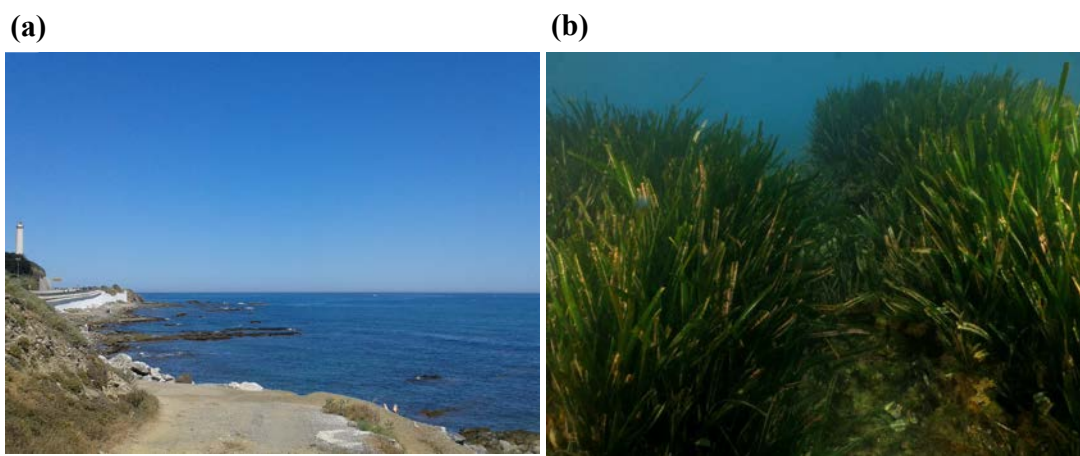
*Posidonia oceanica* se encuentra entre las especies de plantas de crecimiento más lento y de mayor longevidad (Arnaud-Haond *et al.*, 2012). Es característica de esta especie la reducida tasa de crecimiento de los rizomas, tanto ortótropos (0,5-1 cm/año) como plagiotropos (3-4 cm/año), no sólo con respecto al resto de especies presentes en las costas españolas, sino también con respecto al resto de especies de angiospermas marinas conocidas (Hemminga & Duarte, 2000). Este lento crecimiento del rizoma, junto con la escasa reproducción sexual, determinan una extremadamente baja resiliencia para esta especie, es decir, una muy baja capacidad de recuperarse tras una perturbación (González-Correa *et al.*, 2005; Pergent *et al.*, 2014). A esto se añade la elevada vulnerabilidad de las praderas de *P. oceanica* a las perturbaciones de origen humano (Boudouresque *et al.*, 2009). De ahí la elevada preocupación por su protección y conservación. Así las praderas de *Posidonia oceanica* son consideradas hábitats de interés prioritario por la Unión Europea, incluidas en el Anexo I de la Directiva Hábitat (92/43/CEE) y se encuentra incluida en el Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial en el Mediterráneo.



## 1.2 Recolección y mantenimiento en condiciones de laboratorio

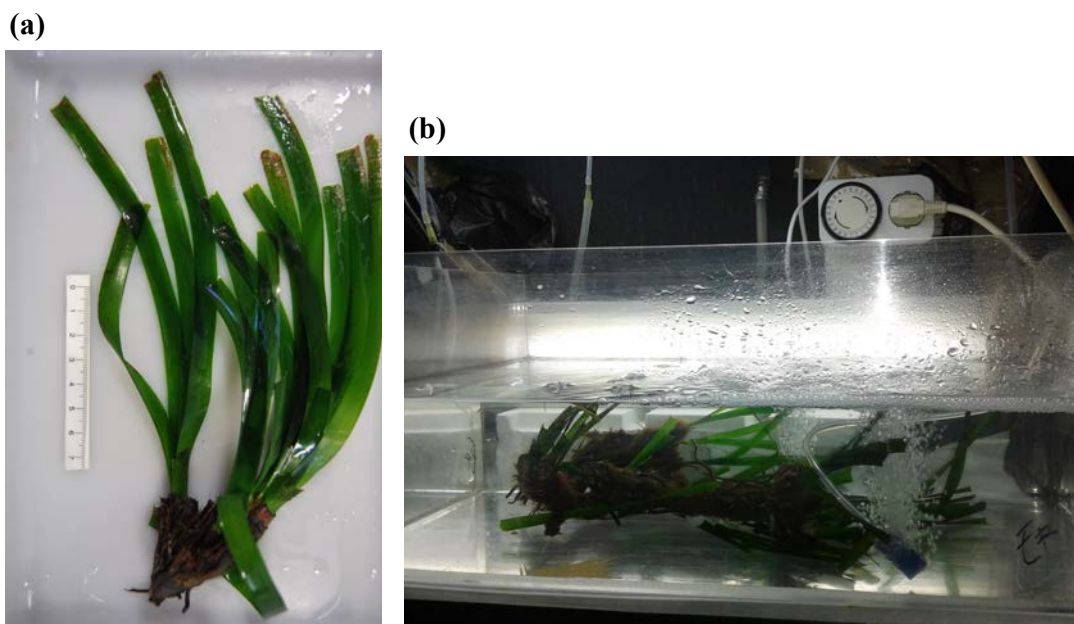
El presente trabajo se ha desarrollado principalmente en plantas adultas de *Posidonia oceanica* recogidas de varios rodales localizados en Punta de Calaburras (Mijas, Málaga; 36°30'23.4"N, 4°38'37.6"W) (Fig. 6). En este lugar aparece a poca profundidad (~2m) y cerca de la costa (~25m), por lo que la recolección se realizó mediante buceo superficial.

Las plantas se extrajeron conservando parte del rizoma, y se transportaron en una nevera portátil con agua de mar natural (NSW), llegando al laboratorio en no más de 1 hora tras el muestreo.



**Figure 6.** (a) Sampling zone of *P. oceanica* in Punta de Calaburras (Mijas, Málaga, 36°30'23.4"N, 4°38'37.6"W). (b) Stand of *P. oceanica* located about 2 m deep and 25 m from the coast in that location.

Una vez en el laboratorio, se retiraron las hojas y raíces dañadas. Así mismo, se eliminaron los epífitos mediante el rascado de la superficie de la hoja. Para ello, cuando fue necesario se utilizó una cuchilla. Este método permite la eliminación del 80% de las bacterias epífitas sin dañar el tejido foliar (Kirchman *et al.*, 1984, Dauby & Pouliceck, 1995). Seguidamente, las plantas se depositaron en acuarios de unos 25L de capacidad llenos de NSW filtrada con un diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Los acuarios se mantuvieron con aireación continua, a una temperatura de 15 °C y aplicando una intensidad de luz de 150  $\mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con un fotoperiodo de 16h luz - 8h oscuridad (Fig. 7). Previa a la realización de los experimentos, las plantas se mantuvieron en dichas condiciones controladas de laboratorio durante un período de aclimatación de 2-3 días. El agua de mar natural se renovó cada tres días, lo que permitió el mantenimiento de las plantas en un estado adecuado para la realización de experimentos durante un máximo de 1 mes.



**Figure 7.** *Posidonia oceanica* maintenance system. **(a)** *Posidonia oceanica* sheet collected at Punta de Calaburras (Mijas, Málaga). **(b)** Maintenance system of *Posidonia oceanica* in the laboratory at  $150 \mu\text{mol fot m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (16: 8 h Light: Osc),  $15^\circ\text{C}$  and in natural seawater.

### 1.3 Germinación de semillas

Para la germinación se recolectaron frutos de *P. oceanica* (también llamados olivas de mar) durante la segunda mitad de abril de 2015 en la zona del arrecife de barrera frente a la costa de Roquetas de Mar (Almería). De un total de 145, se seleccionaron 76 frutos verdes, con pedúnculo y sin signos de predación y/o dehiscencia (Fig. 8). El resto se correspondieron con frutos sin pedúnculo, oscurecidos, deteriorados o con semillas ya liberadas, los cuales se consideraron inviables y fueron desechados.

El proceso de germinación se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito por Balestri *et al.*, 1998 con algunas modificaciones. En resumen, los frutos se desinfectaron mediante inmersión durante 2 minutos en etanol al 70% (v/v) seguido de otros 2 minutos en hipoclorito sódico comercial diluido al 1.5% (v/v) en NSW filtrada (filtro Whatman Millipore GS  $0.22 \mu\text{m}$ ) y autoclavada. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron tres lavados con NSW estéril. A continuación se procedió a la extracción de la semilla mediante la sección longitudinal del fruto con un bisturí. Seguidamente las semillas se colocaron en tubos sigma con unos 35 mL de NSW filtrada y utilizando como soporte una malla de nylon. Para evitar la contaminación de las semillas, toda la manipulación se realizó en cabina de flujo laminar horizontal (Tellstar BH-100).

Finalmente los tubos se colocaron en la cámara de cultivo en las mismas condiciones que las plantas adultas (15 °C de temperatura, bajo una intensidad de luz de 150  $\mu\text{moles}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y con un fotoperiodo de 16h luz - 8h oscuridad). El agua de mar natural se renovó cada tres días.



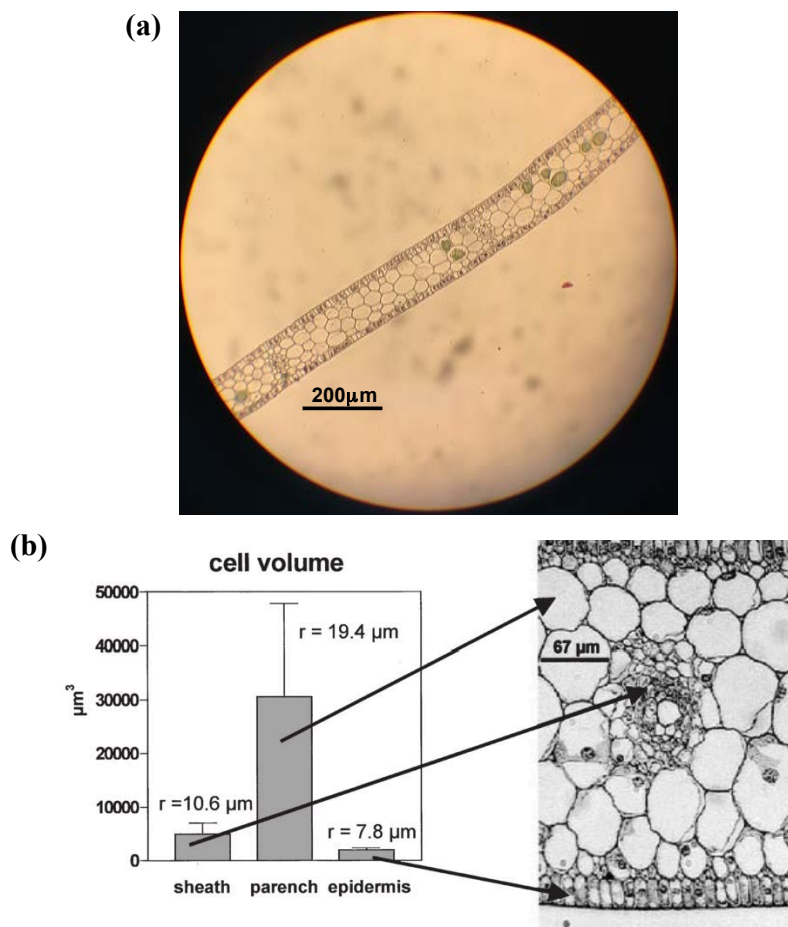
**Figure 8.** *Posidonia oceanica* fruits collected in the barrier reef in front of the coast of Roquetas de Mar (Almería).

#### 1.4 Estructura histológica

Para observar la estructura foliar de *P. oceanica* se eligieron hojas jóvenes completamente desarrolladas (parte central-intermedia del haz de hojas) correspondientes con edades histológicas de entre 25-50 días (Ott, 1980; Alcoverro *et al.*, 1998). Seguidamente se realizaron secciones de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$  de tres zonas distintas: basal, media y apical. A continuación los cortes se fijaron en FAA (10 mL formol 40%, 5 mL ácido acético glacial, 50 mL etanol 96%, 35 mL agua destilada) durante 24 h, se deshidrataron mediante inmersión en una serie de diluciones de etanol de creciente gradación y se incluyeron en parafina (modificado de Jensen, 1962). Posteriormente se realizaron cortes transversales a la dirección de crecimiento de la hoja de 7 - 10  $\mu\text{m}$  con un micrótopo (Leica modelo RM 2245) y se procedió a la tinción de los mismos con hematoxilina-eosina.

## Material & Métodos

La observación bajo el microscopio óptico (modelo Leitz Laborlux S) permitió distinguir una estructura foliar formada por: una única capa de células epidérmicas; el mesófilo, que ocupa la mayor parte del volumen de la hoja, con grandes células parenquimáticas; y los haces vasculares rodeados por las células de la vaina (Fig. 9) (Carpaneto *et al.*, 2004). Estos últimos se encuentran suficientemente separados y equidistantes, permitiendo entre ellos el acceso libre a las células del mesófilo una vez atravesada la epidermis.



**Figure 9.** (a) Cross section of *P. oceanica* leaf showing the epidermis, the mesophyll (with the characteristic large parenchymal cells) and a pair of vascular bundles. (b) Size distribution, depending on the cell type of the central leaf of a *P. oceanica* sheet. Taken from Carpaneto *et al.*, 2004.

## 2 Electrofisiología

### 2.1 Medida del potencial de membrana. Fabricación de microelectrodos simples

La medida del potencial de membrana ( $E_m$ ) se llevó a cabo en células del mesófilo foliar de plantas adultas de *P. oceanica* mediante microelectrodos de vidrio simple (Felle, 1981). Además, se realizó la misma medida en el mesófilo foliar y en la epidermis radicular de plántulas obtenidas a partir de la germinación de semillas en el laboratorio.

Para la medida del potencial de membrana en las hojas tanto de plantas adultas como de plántulas, se utilizó el mismo tipo foliar que el elegido para la observación de la estructura tisular, es decir, hojas centrales-intermedias del haz (primeras hojas jóvenes completamente desarrolladas). Una vez separada la hoja del haz, se realizaron secciones de unos 2 cm de longitud de la zona intermedia de la misma. Para eliminar parcialmente la epidermis y poder acceder fácilmente al mesófilo, las secciones de hoja se cortaron longitudinalmente y en bisel con la ayuda de un bisturí. En el caso de las raíces de plántulas, se cortaron secciones de unos 2.5 cm de longitud desde la zona apical sin ser biseladas. Los segmentos obtenidos, tanto de hojas como de raíces, se fijaron por los extremos con parafina en una cámara de perfusión. Ésta se cerró con un cubre-objeto de vidrio dejando un volumen útil de aproximadamente 1.5 mL, que se rellenó con medio de ensayo.

La cámara de perfusión se colocó en un microscopio (Leica, DM LS2). El medio de ensayo se hizo fluir por gravedad desde un matraz a un flujo constante de 10 mL  $\text{min}^{-1}$ . El exceso de medio se retiró mediante una pipeta Pasteur conectada a un sistema de succión. El flujo continuo aseguró el mantenimiento de la temperatura y de la composición, tanto iónica como gaseosa, del medio de ensayo en contacto con el tejido. Para la aplicación de un tratamiento determinado se accionó una llave de paso de tres vías que permitió el cambio de medio de ensayo sin alteraciones en el flujo (Fig. 10).

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de vidrio (Hilgenberg, nº1103203,  $0.75 \pm 0.05$  mm de diámetro interno y  $1.5 \pm 0.05$  mm de diámetro externo) de unos 5 cm de longitud mediante un estirador de vidrio vertical o *puller* David Kopf, Mod. 720. Los capilares constan de un filamento cilíndrico interno de 0.2 mm, que los hace más robustos y facilitan su llenado. El *puller* permite la regulación de la



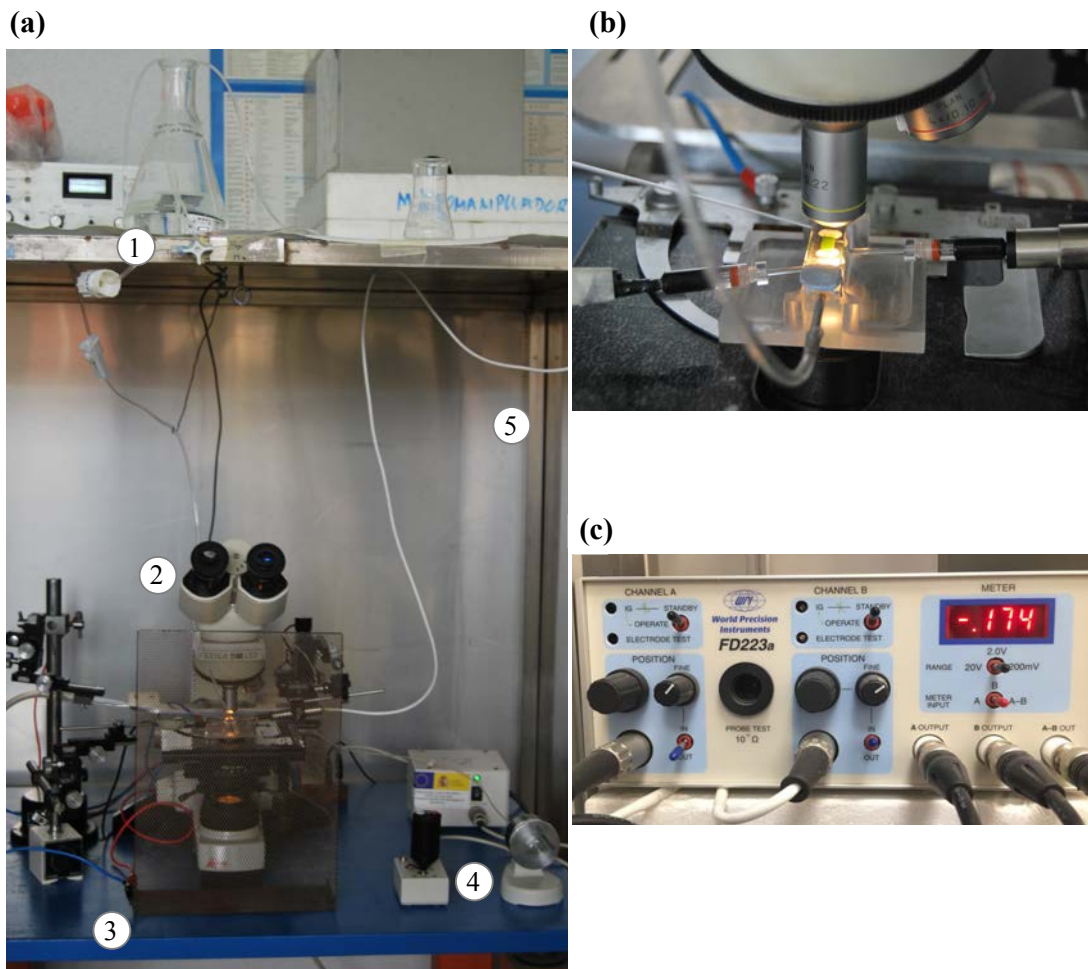
## Material & Métodos

temperatura con que se calienta el vidrio y la fuerza con que éste se estira y, de un trozo de capilar, genera dos puntas abiertas iguales cuyo diámetro externo oscila entre 0.2 y 0.5  $\mu\text{m}$ . Estos electrodos permiten atravesar la pared celular y atravesar el plasmalema sin alterar el funcionamiento de la célula.

El microelectrodo de medida se rellenó con una solución 0.5M KCl, que permite la conducción de la corriente eléctrica a través del mismo. Así mismo el microelectrodo de referencia o “tierra”, de diámetro de punta mayor (del orden de mm) también se rellenó con 0.5M KCl, pero solidificado con agar 3% (p/v), para evitar su vaciado. Ambos electrodos se colocaron en sendos porta electrodos o *holder*, que se rellenaron también de KCl (0.5M). Los *holders* tenían en su base un pellet de Ag- AgCl, que transmitía la corriente a las conexiones de cobre del preamplificador y al electrómetro (Fig. 10).

La sonda porta electrodo se colocó en un micromanipulador hidráulico (Narishige MO-109), sujetado a un macromanipulador eléctrico (Narishige MN-188) que permitía el posicionamiento del electrodo en el interior de la cámara de prefusión. El movimiento unidireccional de inserción del electrodo en la célula se realizó accionando el micromanipulador. Todo el sistema de micromanipulación se encontraba acoplado al microscopio, situado sobre una mesa flotante al objeto de minimizar las vibraciones. A su vez dicha mesa se alojaba en el interior de una Jaula de Faraday conectada a la toma de tierra del electrómetro, para eliminar las interferencias electromagnéticas. Dichas interferencias se evitaron en la parte delantera del sistema protegiendo el microscopio con una rejilla metálica también conectada a la toma de tierra del electrómetro (Fig. 10).

La medida del  $E_m$  se obtuvo como la diferencia de potencial eléctrico entre el microelectrodo insertado en la célula y el electrodo de referencia situado en el medio externo. El valor se midió a través de un electrómetro diferencial de alta impedancia, World Precision Instruments (WPI, Modelo FD 223a). El electrómetro recoge y amplifica la señal eléctrica de los electrodos, la cual se registró en continuo en un registrador de papel de dos canales Kipp & Zonen (Fig. 10).



**Figure 10.** Components of an electrophysiology rig. **(a):** (1) Flow system of the assay medium. (2) Microscope. (3) Floating table and grating. (4) Macromanipulator (left) and micromanipulator (right) controllers. (5) Faraday's box. **(b):** Detail of the perfusion chamber on the microscope stage and reference (left) and measure (right) microelectrodes. **(c):** Electrometer.

## 2.2 Medida de la actividad iónica intracelular: microelectrodos ión selectivos

Para la medida de la actividad iónica en el citosol se usaron microelectrodos ión selectivos (Felle & Bertl, 1986). Esta técnica permite la medida simultánea del potencial de membrana y de la diferencia de potencial generada por la actividad de un ión determinado en presencia de otros iones con una elevada sensibilidad (Ammann, 1986).

Para ello se fabricaron microelectrodos girados y estirados en un *puller* horizontal (Narishige PD-5, Japan) a partir de capilares dobles de vidrio de borosilicato de distinto diámetro externo (1.5 mm y 0.75 mm respectivamente, Hilgenberg, nº 1109104). Los electrodos se calentaron a 180 °C en una estufa (P-Selecta, modelo 208) durante 30 minutos para su completa deshidratación y, en caliente, se añadieron unas

## Material & Métodos

gotas de una solución 0.1% (v/v) de dimetil-dicloro-silano (DDS)/benceno al interior de la barra de mayor diámetro, tras lo cual se mantuvieron en la estufa a 180°C durante una hora más. Tras este proceso de *silanización*, los microelectrodos se depositaron en un cristizador con gel de sílice en su interior hasta su enfriamiento (Felle & Bertl, 1986; Ballesteros *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1999). Una vez fríos, se procedió al llenado de la barra de mayor diámetro con el sensor correspondiente al ión que se deseaba medir ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  o  $NO_3^-$ ) hasta unos 4-5 mm desde la punta. El sensor se preparó mezclando la resina selectiva para el ión a determinar ( $Na^+$ : cocktail ionóforo II (ETH 157), Fluka 99357;  $H^+$ : cocktail ionóforo I, Fluka 95293;  $Cl^-$ : cocktail ionóforo I, Fluka 99408) con una solución de cloruro de polivinilo (PVC) disuelto en tetrahidrofurano (THF) al 4 % (p/v) en una proporción 1:6 (Fernández *et al.*, 1999; Carden *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005). En el caso de los microelectrodos de  $NO_3^-$  se usó el cocktail Fluka 72549, que contiene PVC disuelto en THF. Una vez llenados, los microelectrodos se mantuvieron en posición horizontal en un cristizador con gel de sílice a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del THF, de manera que la resina con el ionóforo correspondiente formara un tapón en el interior de la punta de la barra de mayor diámetro del microelectrodo.

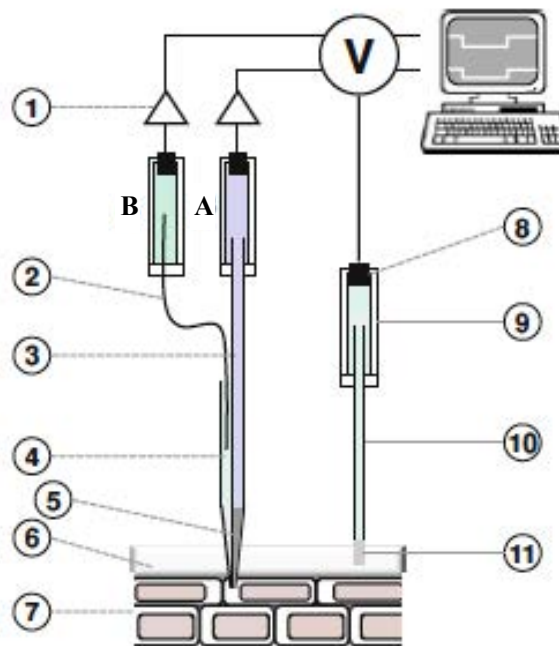
Antes de cada experimento, los microelectrodos se rellenaron con el correspondiente electrolito, el cual actuaría de puente eléctrico salino durante la medida (Tab. 1).

**Table 1.** Filling solutions of the ion-selective microelectrodes.

<i>Ion Selective</i>	<i>Sensor barrel</i>	<i>E<sub>m</sub> barrel</i>	<i>Reference</i>
$Na^+$	0.5 M NaCl	0.5 M KCl	Rubio <i>et al.</i> , 2005
$H^+$ (pH)	0.5 M KCl buffered at pH 4.3 (0.1 M MES/BTP)	0.5 M KCl	Fernández <i>et al.</i> , 1999
$Cl^-$	0.5 M KCl	0.5 M KCl	Planes <i>et al.</i> , 2015
$NO_3^-$	0.1 M NaCl & 0.1 M KCl	0.1 M KCl	Miller & Zhen, 1991



Para realizar la medida simultánea de la actividad citosólica del ión determinado y del potencial de membrana, la barra del microelectrodo doble con el sensor iónico se conectó a la sonda A del electrómetro, y la barra de menor diámetro, la del  $E_m$ , se conectó a la sonda B del mismo. Esta última conexión se realizó a través de un hilo de Ag clorinado en los extremos y recubierto de teflón en la zona de contacto con el aire. Tras conectar el electrodo de referencia, la diferencia entre la señal correspondiente a la barra del sensor iónico y a la del  $E_m$  (señal A - señal B) es la que determina la actividad del ión de interés (Fig. 11).



**Figure 11.** Diagrammatic representation of the circuit required for double-barrelled ion-selective microelectrode measurements: (1) Headstage signal amplifier. (2) Ag/AgCl coated Ag wire. (3) Glass ion-selective barrel. (4) Glass cell membrane potential barrel. (5) Ion-selective sensor plug in the tip. (6) Assay solution bathing plant. (7) Plant tissue with microelectrode tip in a cell (cytosol). (8) Ag/AgCl chloride coated pellet. (9) Holder. (10) Salt bridge. (11) Reference electrode agar solidified. Taken from Miller, 2012.

Según Ammann (1986), las propiedades de un microelectrodo ión-selectivo se determinan por las características:

- Tiempo de respuesta
- Límite de detección
- Selectividad
- Pendiente de calibración

De ellas, las dos últimas son las principales a la hora de determinar la calidad de cualquier tipo de electrodo ión-selectivo. La selectividad se define por su coeficiente  $K_{ji}^{pot}$ , el cual establece la sensibilidad del ionóforo para detectar un ión  $i$  que pudiera interferir en la medida del ión  $j$ . Para resinas selectivas ideales, o para muestras en las que no hay otros iones con la misma carga neta que el ión en cuestión, los  $K_{ji}^{pot}$  deben ser próximos a cero (Ammann, 1986); un valor menor que 1 indica una preferencia mayor por el ión principal  $j$  en relación con el ión que interfiere  $i$  (Ammann, 1986). Los logaritmos del coeficiente de selectividad para los ionóforos utilizados se muestran en la Tabla 2. En todos los casos, los coeficientes de selectividad son menores que 1, de manera que la presencia de los potenciales iones interferentes no tiene un efecto significativo sobre la medida del ión seleccionado.

**Table 2.** Selectivity coefficients logarithms of the resins used for the ion-selective microelectrodes in relation with the main interfering ions present in the assay media (NSW, ASW).

			<i>Reference</i>
<b>Na<sup>+</sup> Microelectrodes</b>	$\log K_{Na^+ H^+}^{pot}$	-1.4	Huser <i>et al.</i> , 1991
	$\log K_{Na^+ K^+}^{pot}$	-0.4	
<b>H<sup>+</sup> (pH) Microelectrodes</b>	$\log K_{H^+ Na^+}^{pot}$	-10.4	Umezawa <i>et al.</i> , 2000
	$\log K_{H^+ K^+}^{pot}$	-9.8	
<b>Cl<sup>-</sup> Microelectrodes</b>	$\log K_{Cl^- NO_3^-}^{pot}$	-1.2	Hauser <i>et al.</i> , 1994
	$\log K_{NO_3^- Cl^-}^{pot}$	-1.5	
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Microelectrodes</b>	$\log K_{NO_3^- H_2PO_4^-}^{pot}$	-2.1	Miller & Zhen, 1991 Zhen <i>et al.</i> , 1991
	$\log K_{NO_3^- HPO_4^{2-}}^{pot}$	-4.0	

En cuanto a la pendiente de calibración, idealmente la relación entre la señal emitida por el microelectrodo selectivo para un ión  $j$  y su actividad ( $a_j$ ) es linear-logarítmica y se determina matemáticamente por el potencial de Nernst (mV) para dicho ión ( $E_j^N$ ):

$$E_j^N = \frac{RT}{z_j F} \ln \frac{[j]_e}{[j]_i}$$

(Equation 2)

donde  $R$  es la constante de los gases ( $8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta (K),  $z$  es la carga del ión,  $F$  la constante de Faraday ( $96.5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$ ) y los subíndices  $e$ ,  $i$  se refieren a la concentración del ión  $j$  en la solución de calibración (exterior) y en el electrolito (interior del microelectrodo), respectivamente.

Según esta ecuación, la calibración del electrodo frente a un rango de soluciones estándar debe resultar una pendiente ( $s$ ) de 59 mV (a 25° C) por cada orden de magnitud en la variación de la concentración de un ión monovalente. Sin embargo, ningún electrodo ión selectivo tiene, en la práctica, una selectividad ideal para un ión determinado y, normalmente, hay más de un ión presente en la solución de ensayo. Por tanto, la calibración del electrodo es determinante para conocer el correcto funcionamiento del mismo.

Para ello, antes y después de cada experimento, se midió la diferencia entre la señal A y la señal B, en presencia de las soluciones patrón correspondientes (Tab. 3). En el caso de la medida de la actividad citosólica de  $\text{Na}^+$  y el pH, los calibrantes se realizaron sobre un fondo de KCl (96 mM), concentración que da lugar a una actividad de  $\text{K}^+$  próxima a la esperada en el citosol de células vegetales (Carden *et al.*, 2001), saturando así la interferencia de este ión. En el caso del  $\text{Cl}^-$ , se utilizó una solución base con 5mM  $\text{NaNO}_3$ , concentración de  $\text{NO}_3^-$  observada en el citosol de plantas vasculares terrestres (Miller & Smith, 2008). Por último, los calibrantes de  $\text{NO}_3^-$ , se realizaron sobre un fondo de KCl 10 mM y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, para evitar la interferencia del  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{P}_i$  en la medida (Miller & Zhen, 1991).

**Table 3.** Calibration solutions used for the ion selective microelectrodes.

<i>Ion Selective</i>	<i>Calibrants</i>	<i>Base Solution</i>	<i>Reference</i>
$\text{Na}^+$	1, 10, 25, 50, 100, 500 mM NaCl	96 mM KCl	Rubio <i>et al.</i> , 2005
$\text{H}^+$ (pH)	pH 5.3, 6.3, 7.3, 8.3 (2.5 mM MES/BTP)	96 mM KCl	Fernández <i>et al.</i> , 1999
$\text{Cl}^-$	1, 10, 25, 50, 100 mM NaCl	5 mM $\text{NaNO}_3$	Planes <i>et al.</i> , 2015
$\text{NO}_3^-$	0.1, 1, 10, 20 mM $\text{KNO}_3$	10 mM KCl, 50, 50, 46.5, 43 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Miller & Zhen, 1991

Ya que la concentración del ión  $j$  del electrolito es constante, la Ecuación 2 puede describirse como:

$$E_j^N = E_0^N + z_j s \log [j]_e$$

(Equation 3)

donde  $E_0^N$  es el potencial del electrodo cuando la  $[j]_e = 1$  M y  $s$  es la pendiente en mV por cambio en un orden de magnitud de la concentración externa del ión  $j$ . De este modo se obtuvieron las rectas de calibración cuyas correspondientes pendientes se muestran en la Tabla 4.

**Table 4.** Slopes calibration obtained for the ion selective microelectrodes.

<i>Ion Selective</i>	<i>Slope calibration (S)</i>
Na <sup>+</sup>	45 mV/pNa <sup>+</sup>
H <sup>+</sup> (pH)	47 mV/pH <sup>+</sup>
Cl <sup>-</sup>	35 mV/pCl <sup>-</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	53 mV/pNO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

### 2.3 Medida del pH extracelular

Para la medida del pH externo, se utilizaron minielectrodos que se prepararon de forma similar a la de los microelectrodos dobles de pH, pero partiendo de capilares de vidrio simples a los que previamente se les cerró parcialmente uno de los extremos mediante calor. Antes de la realización de cada experimento, el minielectrodo de pH se mantuvo durante 30 minutos en una solución de equilibrado compuesta por 500 mM NaCl, 10 mM KCl y tamponada a pH 4.5 con 3 mM MES. Posteriormente se procedió al calibrado del electrodo, mediante soluciones patrón de pH 6.3, 7.3, 8 y 9 elaboradas en base a NSW a la que se le añadió 3 mM MES/BTP. En el rango de pH testado la pendiente de la recta de calibración obtenida fue de 58 mV/unidad de pH. Al igual que en el caso de los microelectrodos intracelulares, la calibración se repitió tras la realización de cada experimento.

### 3 Diseño experimental

#### 3.1 *Energética del plasmalema y permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$*

La medida del potencial de membrana ( $E_m$ ) se realizó en primer lugar en células del mesófilo foliar de plantas adultas de *P. oceanica* en agua de mar natural (NSW). A continuación, se midió el  $E_m$  utilizando como medio de ensayo agua de mar artificial (ASW). La composición del ASW fue: 500 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.01 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.01 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y tamponada a pH 8.2 con 10 mM MOPS-BTP (ácido 3-[N-Morfolino]propanosulfónico - BisTrisPropano). Además, se realizó la misma medida en el mesófilo foliar y en la epidermis radicular de plántulas obtenidas a partir de la germinación de semillas en el laboratorio.

Para ello, las hojas escogidas tanto en plantas adultas como en plántulas, fueron hojas centrales-intermedias del haz, correspondiendo con el mismo tipo foliar que el elegido para la observación de la estructura tisular. Este tipo de hojas fue además el seleccionado para la realización de experimentos en adelante. En el caso de la medida en células de la epidermis radicular, se utilizaron secciones de raíces secundarias.

##### 3.1.1 Efecto de la transición luz - oscuridad sobre el $E_m$

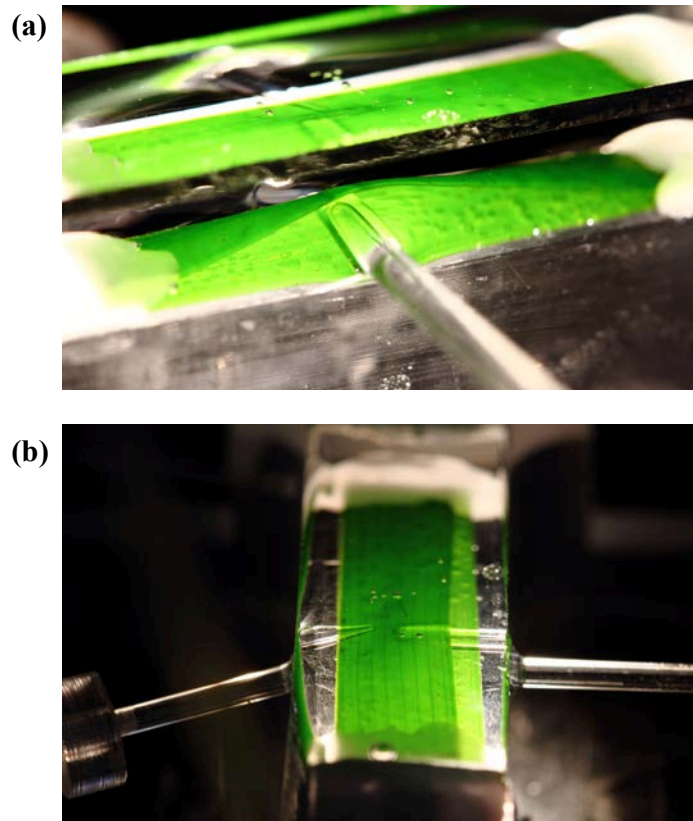
Para estudiar el efecto de la transición luz-oscuridad sobre el  $E_m$ , una vez obtenido un valor de estable del mismo en NSW y en presencia de 150  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (irradiancia medida con un radiómetro de sensor esférico modelo Li-Cor), se procedió a apagar la fuente de luz del microscopio, así como las presentes en el ambiente del laboratorio. Estas condiciones de oscuridad se mantuvieron hasta observarse un valor de  $E_m$  constante el tiempo (aproximadamente 30 minutos), momento en el cual se procedió al encendido de las lámparas correspondientes. Además, se realizaron experimentos en los que se prolongó la condición de oscuridad hasta un tiempo máximo de 2.5h.

### **3.1.2 Efecto de la fusicocina sobre el $E_m$ y el $pH_{ext}$**

Para determinar el efecto de la fusicocina (FC) sobre el  $E_m$  de hojas de plantas adultas de *P. oceanica* medido en NSW, una vez obtenido un valor estable de la diferencia de potencial eléctrico a ambos lados del plasmalema, se añadió al medio de ensayo  $5\mu\text{M}$  de FC. Estas condiciones se prolongaron durante 30 minutos, hasta observarse un valor constante del  $E_m$ .

Además, se midió el efecto de la adición de  $10\mu\text{M}$  de FC al NSW sobre el  $pH_{ext}$  mediante minielectrodos ión selectivos para  $\text{H}^+$ . Para ello, se utilizaron secciones de dos hojas de plantas adultas de *P. oceanica* enfrentadas por el envés y fijadas con parafina por sus extremos a la cámara de perfusión. De este modo se aprovechó la ligera curvatura inherente a la forma de la hoja para la introducción del minielectrodo de pH entre las dos secciones. No obstante antes de la fijación, se utilizó un capilar de vidrio que se colocó a modo de horma en el lugar donde posteriormente se introduciría el minielectrodo. El espacio quedaba cerrado con la ayuda del electrodo de referencia, que se posicionaba en el lateral izquierdo por encima de las hojas (Fig. 12). Durante la realización del experimento, se mantuvo un flujo continuo de  $1.5\text{ mL min}^{-1}$ . Una vez realizada la calibración del electrodo, se procedió a su colocación entre las hojas y se comenzó la medida del  $pH_{ext}$  en NSW. A continuación, se cambió el medio de ensayo por NSW con  $10\mu\text{M}$  de FC. La duración del experimento no fue mayor de una hora, ya que a pesar de la reducción del flujo, el tiempo de respuesta del minielectrodo de pH fue similar a la de los microelectrodos ión selectivos intracelulares, (0.6 segundos) observándose el inicio de la respuesta a FC en menos de 1 min tras su adición.

En ambos ensayos, las diluciones de FC se realizaron a partir de una disolución madre  $10\text{ mM}$  en etanol. No obstante la concentración máxima de etanol en el medio de ensayo fue siempre menor de  $0.4\%$  (v/v) y no tuvo efecto alguno en las medidas.



**Figure 12.** External pH measurement in *P. oceanica* leaves. **(a)** Lateral view of pH minielectrode placed between two leaves sections. **(b)** Frontal view of pH (right) and reference (left) electrodes. Pictures by Dr. D. Antonio Matas Arroyo.

### 3.1.3 Permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$ y concentración citosólica de $Na^+$

Para determinar el valor del  $E_D$  en hojas de plantas adultas de *P. oceanica*, se usó de cianuro sódico (NaCN), inhibidor de la citocromo oxidasa del complejo IV de la cadena transportadora de electrones, que impide la síntesis de ATP y consecuentemente la actividad de la bomba  $H^+$ -ATPasa (Felle, 1981). Una vez alcanzado un valor estable de  $E_m$  en NSW, se añadió al medio 1 mM de cianuro sódico (NaCN). La lenta repolarización espontánea observada tras la despolarización inicial se evitó añadiendo ácido salicilhidroxámico (SHAM), inhibidor de la respiración resistente a cianuro (Laties, 1982). La adición de ambos inhibidores se hizo a partir de disoluciones concentradas (1M). En el caso del NaCN, la solución concentrada se preparó en agua destilada; sin embargo, puesto que el SHAM no es soluble en agua, la disolución concentrada de este inhibidor se preparó en 2-metoxietanol ( $C_3H_8O_2$ , Fluka 64720), siendo despreciable la cantidad de metoxietanol añadida al medio de ensayo. A continuación se realizó la misma medida utilizando como medio de ensayo ASW.

El potencial de difusión en plantas puede predecirse de las asimetrías entre el exterior y el interior de la célula de los iones  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  y la permeabilidad de la membrana a dichos iones, según la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz:

$$E_D = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{K^+} [K^+]_e + P_{Na^+} [Na^+]_e + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_e}$$

(Equation 4)

donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  la temperatura absoluta (K),  $F$  la constante de Faraday ( $96.5 \text{ J mol}^{-1} \text{ mV}^{-1}$ ) y  $P_{K^+}$ ,  $P_{Na^+}$ ,  $P_{Cl^-}$  son las permeabilidades de la membrana para  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$  respectivamente. Los subíndices  $e$ ,  $i$  hacen referencia a la concentración del ión en el exterior e interior celular respectivamente.

La permeabilidad relativa de la membrana al  $Na^+$  con respecto a  $K^+$  ( $P_{Na^+}/P_{K^+}$ ) se determinó a partir de los valores del  $E_D$  para 10 mM, 1 mM y 0.1 mM KCl en el medio externo (ASW), asumiendo que las concentraciones internas de  $Na^+$  y  $K^+$  no varían y que la concentración externa de  $Na^+$  (500 mM) es muy superior a la citosólica (Fernández *et al.*, 1999). Ya que la concentración de KCl en el ASW es 10 mM, el primer valor de  $E_D$  correspondía con el obtenido tras la adición de 1mM NaCN/SHAM. Seguidamente se redujo la concentración de KCl en el ASW con cianuro a 1 mM y 0.1 mM. Finalmente se restauró la concentración inicial de KCl en el medio de ensayo con los sucesivos incrementos de un orden de magnitud.

Por otro lado, se midió la actividad citosólica de  $Na^+$  y el  $E_m$  de manera simultánea en células del mesófilo de hojas jóvenes de plantas adultas de *P. oceanica* incubadas en NSW mediante el uso de microelectrodos ión selectivos. La concentración citosólica del ión se estimó a partir del ajuste lineal de la señal del microelectrodo obtenida respecto al logaritmo de la concentración externa del ión presente en las soluciones de calibración (Equation 3).

Además, se determinó el efecto de la adición de NaCN sobre la actividad citosólica de  $Na^+$ . Para ello, una vez obtenido sendos valores estables de las señales emitidas por el microelectrodo doble, se procedió a la desactivación de la bomba primaria añadiendo 1mM de NaCN/SHAM. Finalmente se procedió al lavado del inhibidor del medio de ensayo.



### 3.2 *Estudio de la incorporación de bicarbonato*

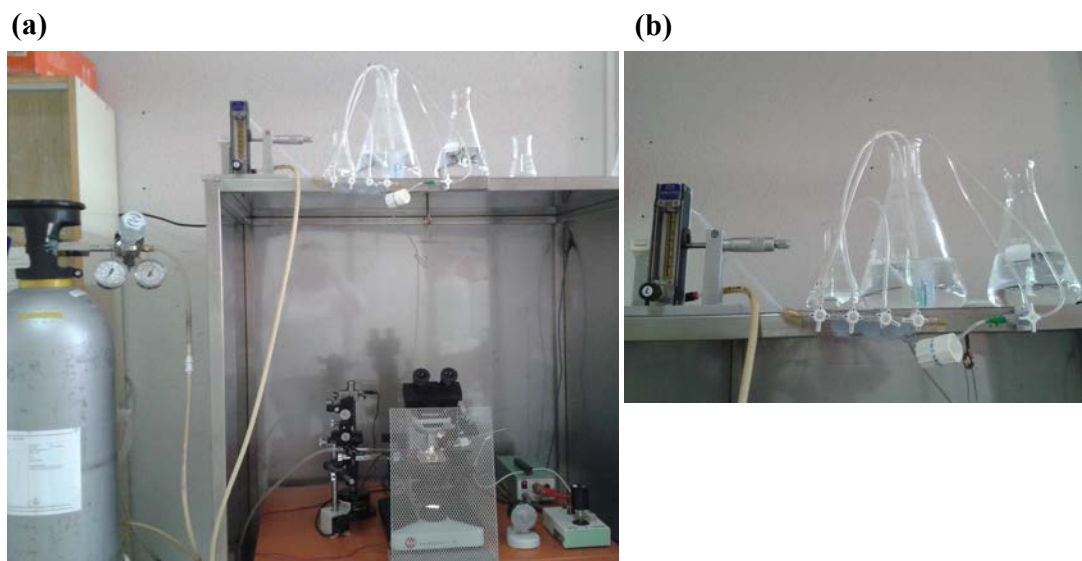
Se determinó el efecto del incremento de la concentración de  $\text{NaHCO}_3$  hasta un valor de 5 mM sobre el  $E_m$  junto con el pH, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  citosólicos ( $\text{pH}_c$ ,  $\text{Na}_c^+$  y  $\text{Cl}_c^-$ ). Para ello se emplearon microelectrodos dobles selectivos para cada ión. La medida se realizó en células del mesófilo foliar de plantas adultas de *P. oceanica* incubadas en NSW. Tras la obtención de los correspondientes valores constantes de  $E_m$  y  $\text{pH}_c$ , se añadió 3 mM de  $\text{NaHCO}_3$  al medio de ensayo (NSW).

La medida simultánea del  $E_m$  y el  $\text{pH}_c$  también se realizó en presencia del inhibidor de la anhidrasa carbónica (CA) etoxizolamida (EZ), derivado de las sulfanamidas permeable a la membrana capaz de inhibir tanto la CA externa como la que se encuentra en el interior de la célula. Para ello, se preparó como medio de ensayo NSW con 0.1 mM de EZ, añadido a partir de una disolución concentrada 10 mM en 0.05 N de NaOH. No obstante, la cantidad de NaOH añadida al medio de ensayo fue despreciable, y no varió el pH del agua de mar.

En cada caso la concentración citosólica del ión se estimó a partir del ajuste lineal de la señal del microelectrodo obtenida respecto al logaritmo de la concentración externa del ión presente en las soluciones de calibración (Equation 3).

#### 3.2.1 Efecto del incremento de $\text{CO}_2$ sobre el $E_m$ y el pH citosólico

Para determinar el efecto del aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  en el medio sobre el  $E_m$  y el  $\text{pH}_c$ , la medida mediante electrodos ión selectivos se inició en NSW. A continuación se cambió el medio de ensayo por NSW enriquecida en  $\text{CO}_2$ . Para ello previamente se burbujeó de manera continua el NSW con aire con 1000 ppm de  $\text{CO}_2$ . Un flujo de  $50 \text{ ml min}^{-1}$  (Fig. 13). Dicho burbujeo se mantuvo durante al menos una hora previa al inicio del ensayo. En estas condiciones de alto  $\text{CO}_2$ , el pH del NSW fue de 7.9. Una vez incrementado el  $\text{CO}_2$ , la respuesta se observó durante 20 minutos, tiempo al cabo del cual la señal se mantuvo estable.



**Figure 13.** Experimental setup for the assay medium (NSW) bubbling with 1000 ppm CO<sub>2</sub> (a) and detail (b). The assay medium was bubbled with 1000 ppm CO<sub>2</sub> at a rate of 50 ml min<sup>-1</sup> at least 1 hour before and during the full time of experiments. In these conditions the pH of NSW was measured as 7.9.

### 3.2.2 Transporte de bicarbonato y fotosíntesis

En primer lugar se midió la variación del pH externo durante el continuo de la transición oscuridad-luz. Para ello se emplearon minielectrodos H<sup>+</sup>-selectivos. El ensayo se realizó en NSW así como en NSW con 2 mM de NaHCO<sub>3</sub> como única fuente de C<sub>i</sub>. Este último medio de ensayo se obtuvo tras eliminar previamente el C<sub>i</sub> del medio bajando el pH de 2L de NSW hasta un valor de 3.3 mediante adición de 4 mL de HCl 1N. El mantenimiento en estas condiciones durante al menos 12h permitió la transformación del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por desplazamiento del equilibrio  $HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_2 + H_2O$  y favorecer la pérdida de DIC formándose CO<sub>2</sub> que es liberado al aire. Antes de la realización de los experimentos, se burbujeó el medio con aire sin CO<sub>2</sub> utilizando para ello un filtro con soda-lima (ADC BioScientific Limited). Para asegurar la liberación del CO<sub>2</sub> formado, dicho burbujeo se mantuvo durante al menos una hora previa al inicio del ensayo así como a lo largo del mismo. Seguidamente se ajustó el pH a 8.00 con MOPS/BTP 10 mM y finalmente se añadió 2 mM NaHCO<sub>3</sub>. Para la realización de cada experimento una vez calibrado y ubicado el minielectrodo entre las dos secciones de hoja y tras obtener una medida estable del pH<sub>ext</sub>, se procedió al apagado de las fuentes de luz. Transcurridos unos 30 minutos, se restauró la irradiancia inicial (150 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), momento en el que comenzó a observarse la respuesta buscada.

Por otro lado, se determinó la actividad fotosintética aparente (APS) en NSW, en NSW con 2 mM de NaHCO<sub>3</sub> como única fuente de C<sub>i</sub> y en NSW sin CO<sub>2</sub> y con distintas concentraciones de NaHCO<sub>3</sub> (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 y 10 mM). En estos dos últimos medios el pH se ajustó a pH 8.5 para evitar la formación espontánea de CO<sub>2</sub>. Para ello, se midió la evolución de O<sub>2</sub> liberado mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark (Hansatech - Norfolk, England) conectado a una caja de control y ésta a su vez a un registrador. El funcionamiento se basa en una membrana de teflón permeable al oxígeno en contacto con el medio de ensayo y bajo la cual se encuentra un ánodo y un cátodo bañados en KCl 3 M que actúa como electrolito. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos, el oxígeno es reducido en el cátodo, mientras que en el ánodo la plata se oxida. La corriente que fluye es proporcional a la cantidad de oxígeno producido.

Para la medida, se utilizaron secciones de hojas jóvenes de plantas adultas de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y 0.02 g de masa fresca, que se colocaron en la cámara transparente del sensor de oxígeno con un volumen de 1.5 mL del medio de ensayo correspondiente, a 20°C y una irradiancia de 150 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. La temperatura se mantuvo constante mediante recirculación de un baño de agua refrigerada, mientras que la intensidad de luz fue proporcionada por una bombilla halógena situada a la distancia adecuada de la cámara de reacción para conseguir el flujo fotónico deseado. Antes de la realización del experimento, se procedió al calibrado del electrodo de O<sub>2</sub> mediante la medida (cm) del punto de saturación de O<sub>2</sub> del medio. Para ello se añadieron 1.5 mL de NSW a la cámara del electrodo y se burbujó con gas N<sub>2</sub> en ausencia de planta, con el objetivo de conseguir una presión parcial de O<sub>2</sub> ( $P_{O_2}$ ) igual a cero. Seguidamente, se cambió el medio por nueva NSW y se dejó equilibrar durante al menos 20 minutos, obteniéndose de este modo la concentración de saturación de oxígeno, la cual depende de la temperatura y de la salinidad, y cuyo valor está tabulado (Riley & Chester, 1971).

El inicio de cada experimento comenzó con la medida de la tasa de respiración para cada segmento de hoja como el O<sub>2</sub> consumido dentro del volumen de la cámara de reacción en condiciones de oscuridad durante al menos 20 minutos. A continuación, se procedió al iluminado de la hoja durante al menos 10 minutos para la determinación de la tasa de fotosíntesis aparente (APS). Antes de cada medida en NSW con 2 mM de NaHCO<sub>3</sub> como única fuente de C<sub>i</sub>, se comprobó la ausencia de fotosíntesis en

## Material & Métodos

condiciones de luz y con el medio de ensayo libre de toda fuente de  $C_i$  (NSW sin C). Acto seguido se procedió a cambiar el medio por NSW sin  $CO_2$  y con 2 mM de  $NaHCO_3$ . Los parámetros que describen la curva se estimaron mediante el ajuste al modelo de Edwards & Walker (1983), y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}$  masa fresca  $\text{h}^{-1}$ .

Así mismo, se determinó el efecto de la concentración de  $NaHCO_3$  sobre la variación inicial del  $E_m$  en el mismo medio de ensayo (NSW sin  $CO_2$  ajustada a pH 8.5), medido con electrodos simples. En este caso las concentraciones de  $NaHCO_3$  utilizadas fueron: 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, y 10 mM y los valores de despolarización de la membrana observados se ajustaron al modelo de Michaelis & Menten.

Además, se realizaron medidas de la APS en presencia de los inhibidores de la CA, acetazolamida (AZ) y EZ, así como en presencia de una elevada concentración de  $C_i$  en el medio. Ambos inhibidores de la CA, difieren en que el primero, la AZ, no es permeable a la membrana, con lo que no es capaz de inhibir la CA interna. Para realizar el experimento se añadieron 15  $\mu\text{L}$  de una solución stock (10 mM) al volumen de la cámara (1.5 mL), dando lugar a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , concentración utilizada por otros autores para inhibir la actividad de la CA en condiciones experimentales similares (Björk *et al.* 1997). En ambos casos, la matriz utilizada para la realización de las disoluciones madre fue NaOH 0.05N.

El efecto sobre la medida de la APS del incremento de  $C_i$  en el medio de ensayo se determinó tanto en forma de  $CO_2$  como de  $HCO_3^-$ . Para enriquecer la concentración de  $CO_2$ , el NSW se burbujeó con aire con 1000 ppm de  $CO_2$  antes y durante la realización del experimento. En el caso del incremento de  $HCO_3^-$ , se añadió 3 mM de  $NaHCO_3$  al NSW.

Finalmente, al objeto de determinar el papel del  $Na^+$  y el  $Cl^-$  en el uso fotosintético del carbono, se estudió el efecto de los inhibidores monensina (MON), ácido 4,4'-Diisotiocianatostilbenato-2,2' DiSulfónico (DIDS) y ácido Nitro-PhenylPropylamino-Benzoico (NPPB) sobre la APS. La monensina es una molécula capaz de intercambiar iones  $Na^+$  (y  $K^+$ ) por  $H^+$  de forma electroneutra. Se trata por tanto de un ionóforo para iones  $Na^+$ , es decir, disipa el gradiente establecido para dicho ión entre la célula y el medio externo, y su efecto demuestra la existencia de transportadores de  $HCO_3^-$  en simporte con  $Na^+$  (Pressman 1976; Pressman & Fahim 1982). Por su parte,

el DIDS y el NPPB son inhibidores de canales aniónicos de la membrana, que afectan mayoritariamente al flujo de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$  (Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995).

Cada experimento se inició en NSW (1.5 mL) a la que posteriormente se añadieron 6  $\mu\text{L}$  de una disolución madre 25 mM de monensina en etanol ( $[\text{MON}]_{\text{F}}=100 \mu\text{M}$ ). Además, se realizaron medidas de la APS en ausencia de  $\text{Na}^+$  en el medio de ensayo. Para ello se utilizó ASW como control (500 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM  $\text{CaCl}_2$ , 55 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.01 mM  $\text{NaNO}_3$ , 0.01 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y tamponada a pH 8.2 con 10 mM MOPS-BTP) y ASW sin  $\text{Na}^+$  (en la que se sustituyó el NaCl por 800 mM sorbitol, y el  $\text{NaHCO}_3$  y el  $\text{NaNO}_3$  por las mismas concentraciones de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{KHCO}_3$  respectivamente).

La concentración de DIDS ensayada fue 100  $\mu\text{M}$ , la cual se añadió al NSW a partir de una solución stock 50 mM en 0.1 M  $\text{KHCO}_3$ . La adición al medio de la misma concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (200  $\mu\text{M}$   $\text{KHCO}_3$ ) en ausencia del inhibidor no tuvo repercusión alguna en el valor de la medida. En el caso del NPPB la solución stock 50 mM se preparó en etanol, añadiendo al medio de ensayo la misma concentración final (100  $\mu\text{M}$ ). El volumen de etanol, utilizado como matriz de las soluciones madre de monensina y NPPB tampoco tuvo efecto sobre el valor de la APS.

### 3.3 Estudio de la incorporación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

La caracterización de la incorporación de nitrato en *P. oceanica* comenzó midiendo mediante electrodos simples la respuesta del  $E_m$  de células del mesófilo foliar tras la adición de concentraciones crecientes de  $\text{NaNO}_3$ . Para ello, se seleccionaron haces de hojas que se incubaron previamente durante 14-17 días en ASW sin N pero sí con  $\text{P}_i$ . La composición del ASW fue: 500 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM  $\text{CaCl}_2$ , 55 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.01 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Para el medio de incubación el ASW se tamponó a pH 8.2 con 1N NaOH, mientras que para la medida del  $E_m$ , el pH se ajustó con 10 mM MOPS/BTP.

## Material & Métodos

Cada experimento comenzó con la medida del  $E_m$ , y acto seguido se procedió a la adición de concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  (Sigma-Aldrich) en el rango 5-250  $\mu\text{M}$  (5, 10, 25, 50 100, 250  $\mu\text{M}$ ) en la misma hoja. Posteriormente cada concentración se ensayó por triplicado en experimentos independientes. Los ensayos se realizaron en luz y en oscuridad.

### **3.3.1 Efecto del $\text{Na}^+$ sobre la incorporación de $\text{NO}_3^-$**

Al objeto de determinar el ión motriz en la incorporación de  $\text{NO}_3^-$ , se realizaron experimentos de electrofisiología con microelectrodos simples en los que se retiró el  $\text{Na}^+$  del medio y se sustituyó por 800 mM de sorbitol (ASW sin  $\text{Na}^+$ ). De este modo la osmolaridad, medida mediante un osmómetro crioscópico (Osmomat, modelo 030, Gonotec GmbH, Berlin, Germany), se mantuvo similar al ASW de experimentos anteriores (1.09 osmol  $\text{Kg}^{-1}$ ). En este medio libre de  $\text{Na}^+$ , el  $\text{C}_i$  se añadió como  $\text{KHCO}_3$ , y los pulsos de  $\text{NO}_3^-$  se añadieron como sal de  $\text{K}^+$  ( $\text{KNO}_3$ ). Además se utilizó un tercer medio en el que se añadió 30 mM de  $\text{NaCl}$  (ASW-30mM  $\text{Na}^+$ ). En este último, la fuerza osmótica del  $\text{Na}^+$  que resta hasta la concentración normal del agua de mar (500 mM) se compensó con una menor concentración de sorbitol (752 mM).

Los experimentos se llevaron a cabo en hojas de *P. oceanica* mantenidas en deficiencia de N durante 14-17 días, manteniendo de esta forma las condiciones del apartado anterior. Cada ensayo comenzó con la adición de la concentración saturante de  $\text{NaNO}_3$  (100  $\mu\text{M}$ ) en ASW (control). Seguidamente, se cambió el medio de ensayo por ASW sin  $\text{Na}^+$  y, una vez estabilizado el  $E_m$  en este nuevo medio (al cabo de 2h), se volvió a dar un pulso de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$ . Finalmente se restauró parcialmente el  $\text{Na}^+$  del agua de mar cambiando el medio de ensayo por ASW con 30 mM  $\text{Na}^+$  y se repitió el mismo procedimiento.

Para determinar la cinética del ión motriz en el transporte de  $\text{NO}_3^-$  se midió la variación del  $E_m$  por la adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$  en ASW en la que se incrementó progresivamente la concentración de  $\text{NaCl}$  en el rango 5 - 250 mM (5, 10, 25, 50, 100, 250 mM) a osmolaridad constante. Al igual que anteriormente, la medida se realizó mediante electrodos simples en células del mesófilo de hojas de *P. oceanica* mantenidas en deficiencia de N durante al menos 2 semanas.

Además se midió simultáneamente el  $E_m$  y la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citoplasma durante la adición de un pulso de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  al ASW. Para ello se utilizaron microelectrodos dobles selectivos para  $\text{Na}^+$ .

Finalmente, se determinaron las tasas de incorporación en las tres condiciones diferentes estudiadas hasta este punto: ASW-500 mM  $\text{Na}^+$  & luz, ASW-500 mM  $\text{Na}^+$  & oscuridad y ASW-0 mM  $\text{Na}^+$  & luz. Para ello, se tomaron secciones de hojas de *P. oceanica* (0.3-0.4 g masa fresca) previamente ayunadas de N durante 14 días, que se colocaron en matraces de 100 mL y se incubaron con 50 mL de medio. El ensayo se llevó a cabo a 25°C y en agitación orbital continua para un mantenimiento homogéneo del medio. Las incubaciones en luz se realizaron a intensidad constante y bajo la irradiancia de saturación (150  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Para cada tratamiento el ensayo se realizó por triplicado.

El inicio del experimento comenzó con la adición de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaNO}_3$  ( $\text{KNO}_3$  en el caso del ASW-sin  $\text{Na}^+$ ) tras 1 hora de incubación en el medio. A continuación se tomaron muestras de 1 mL del medio de ensayo a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h. El contenido de  $\text{NO}_3^-$  en cada muestra se analizó por el método colorimétrico descrito por García-Robledo *et al.*, 2014, en el cual el  $\text{VCl}_3$  reduce el  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  y éste reacciona con N-Naftil EtilenDiamida y sulfanilamida formando un producto coloreado que presenta una máximo de absorbancia a 550 nm. Las tasas de incorporación se estimaron como la pendiente del ajuste lineal del contenido de  $\text{NO}_3^-$  presente en el medio a lo largo del tiempo y se expresaron en función de la biomasa seca (DM).

### **3.3.2 Efecto del incremento de la concentración de $\text{HCO}_3^-$ sobre la incorporación de $\text{NO}_3^-$**

Se realizaron experimentos de electrofisiología con electrodos simples en hojas de *P. oceanica* en los que se midió la repuesta del  $E_m$  por la adición de concentraciones crecientes de  $\text{NO}_3^-$ , en ASW enriquecida en  $\text{C}_i$  con 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Previamente las plantas se mantuvieron en ASW (2 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) sin N durante 14-17 días., La respuesta a cada concentración (5, 10, 25, 50, 100 y 250 mM) y réplica (n=3) se midió en una hoja diferente. Cada experimento comenzó con la medida de un  $E_m$  estable en ASW (2 mM  $\text{HCO}_3^-$ ) y su variación por la adición de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  a



## Material & Métodos

ensayar. Seguidamente se cambió el medio de ensayo por ASW con 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, y se esperó a la estabilización del valor del  $E_m$  (entre 30-40 minutos). Finalmente se volvió a añadir la misma concentración de NaNO<sub>3</sub>.

### **3.3.3 Determinación de la concentración citosólica de nitrato ([NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>c</sub>). Efecto de la transición luz-oscuridad y del incremento de C<sub>i</sub>**

Se realizaron experimentos mediante microelectrodos dobles selectivos para NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en hojas mantenidas en NSW. De este modo se midió el  $E_m$  de forma simultánea a la actividad de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el citosol. Para estudiar el efecto de la transición luz-oscuridad sobre la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>c</sub>, una vez obtenido un valor estable para ambas variables en condiciones de luz saturante, se apagó la luz del microscopio y se observó la respuesta durante al menos 1 hora. Al cabo de este tiempo se volvió a restaurar la condición de luz inicial. El experimento se repitió 5 veces, 3 de ellas en hojas independientes.

Para determinar el efecto del incremento de C<sub>i</sub> en el medio sobre la variación de la concentración citosólica de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se realizaron experimentos añadiendo 3 mM NaHCO<sub>3</sub> al NSW (concentración final de 5 mM) por un lado y burbujando el NSW con aire con 1000 ppm de CO<sub>2</sub> por otro. En este último caso, el NSW se dejó equilibrar con el burbujeo de CO<sub>2</sub> 1 hora antes del inicio y durante todo el experimento. Además, se realizaron experimentos en NSW enriquecida en CO<sub>2</sub> y en presencia de 0.1 mM del inhibidor de la CA permeable a la membrana EZ. Cada experimento comenzó la medida estable del  $E_m$  junto con la [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>c</sub> en NSW. Seguidamente se cambió el medio por el enriquecido en C<sub>i</sub> y se observó la respuesta durante aproximadamente una hora. Para cada condición el ensayo se realizó por triplicado en hojas independientes de *P. oceanica* mantenidas en NSW.



### 3.4 *Estudio de la incorporación de fósforo inorgánico (P<sub>i</sub>)*

El estudio de la incorporación de P<sub>i</sub> en *P. oceanica* comenzó, con la medida del potencial de membrana mediante electrodos simples en respuesta a la adición de un pulso de P<sub>i</sub>. Para ello se añadieron concentraciones crecientes de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al medio de ensayo de plantas preincubadas en deficiencia de P<sub>i</sub> durante al menos 5 días. Este mantenimiento en ausencia de P<sub>i</sub> se prolongó hasta 19 días. El medio de incubación y de ensayo fue ASW compuesta por: 500 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.01 mM NaNO<sub>3</sub>. Para el medio de incubación el ASW se tamponó a pH 8.2 con 1N NaOH, mientras que para la medida del  $E_m$ , el pH se ajustó con 10 mM MOPS/BTP.

#### 3.4.1 Determinación de la tasa de incorporación de P<sub>i</sub>. Efecto del Na<sup>+</sup>

Para determinar la tasa de incorporación de P<sub>i</sub> en hojas de *P. oceanica*, se realizaron experimentos de depleción por triplicado en ASW-500 mM Na<sup>+</sup> y ASW-0 mM Na<sup>+</sup> en condiciones de luz (150 μmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). La composición del ASW fue: 500 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.01 mM NaNO<sub>3</sub>. En caso del medio sin Na<sup>+</sup> el NaNO<sub>3</sub> se reemplazó por 0.01 mM de KNO<sub>3</sub> y el agente osmótico utilizado fue cloruro de colina (500 mM), puesto que la presencia de sorbitol interfería en el método colorimétrico del verde malaquita (Fernández *et al.*, 1985) empleado para la determinación de P<sub>i</sub>. Al igual que en el caso de los medios con sorbitol, la osmolaridad del medio con cloruro de colina fue similar a la medida en ASW. Además en este caso se utilizaron secciones de hojas ayunadas de P durante 5 días en ASW sin P y con 0.01 mM NaNO<sub>3</sub>.

Cada experimento comenzó con la adición de 10 μM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tras el mantenimiento de las plantas durante al menos 1 hora en el medio correspondiente. Seguidamente se tomaron muestras de 1 mL a los tiempos 0, 10, 20, 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 9 y 24h. El contenido de P<sub>i</sub> de cada muestra se determinó midiendo la absorbancia a 660 nm del producto de reacción de la muestra con oxalato de verde malaquita, en medio ácido (Fernández *et al.*, 1985). Las tasas de incorporación de P<sub>i</sub> se calcularon a partir de la pendiente del ajuste lineal del contenido de P<sub>i</sub> en el medio con respecto al tiempo.

### 3.4.2 Efecto del incremento de la concentración de $\text{HCO}_3^-$ sobre la incorporación de $\text{P}_i$

El efecto del aumento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el medio sobre la incorporación de  $\text{P}_i$ , se determinó mediante experimentos de depleción en ASW con 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  (control) y en ASW con 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ . En esta ocasión las hojas se mantuvieron en deficiencia de  $\text{P}_i$  durante 7 días. Así, se determinó la tasa de incorporación de  $\text{P}_i$  en alto  $\text{NaHCO}_3$  (10 mM).

Por otro lado, se midió el efecto de la adición de concentraciones crecientes de  $\text{P}_i$  sobre el  $E_m$  en ASW con 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Para ello se utilizaron plantas de *P. oceanica* mantenidas durante 5-8 días en deficiencia de  $\text{P}_i$  (ASW con 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 0.01 mM  $\text{NaNO}_3$ ). Antes de comenzar cada experimento las secciones de hojas se mantuvieron en luz ( $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en la cámara de perfusión con flujo continuo de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$  en ASW con 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  durante 1 hora y en ASW con 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  durante 2 horas más. Una vez estabilizada la medida del  $E_m$  se añadieron las concentraciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ . Las medidas se realizaron mediante electrodos simples y cada conjunto de concentraciones crecientes se aplicó a una sola célula del mesófilo.

### 3.4.3 Efecto del $\text{Na}^+$ sobre la incorporación de $\text{P}_i$ en alto $\text{HCO}_3^-$

Para determinar el papel del  $\text{Na}^+$  en la incorporación de  $\text{P}_i$  en hojas de *P. oceanica*, se midió la variación del  $E_m$  por adición de un pulso 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en ASW con 10 mM  $\text{KHCO}_3$  y 0 mM de  $\text{NaCl}$ . Al igual que en experimentos anteriores, previamente las plantas se incubaron durante 5-9 días en ASW sin  $\text{P}_i$  (con 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  y 0.01 mM  $\text{NaNO}_3$ ). Antes del inicio de cada experimento, las secciones de hojas se mantuvieron en la cámara de perfusión bajo la irradiancia de saturación ( $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y con un flujo continuo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$  de ASW con 10 mM  $\text{KHCO}_3$  durante 1 hora y de ASW con 10 mM  $\text{KHCO}_3$  y 0 mM  $\text{Na}^+$  durante 2 horas más. En este medio libre de  $\text{Na}^+$  el nitrato se añadió como  $\text{KNO}_3$  y la osmolaridad se mantuvo constante añadiendo 800 mM de sorbitol. Una vez conseguido un valor constante de  $E_m$ , se añadió al medio de ensayo 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Además el procedimiento se repitió aumentando progresivamente la concentración de  $\text{Na}^+$ : 5, 10, 50, 100, 250 mM NaCl. Para las medidas se utilizaron microelectrodos simples y cada concentración y réplica se realizó en una sección de hoja diferente.

### 3.5 Estudio del transporte de aminoácidos (*L-Ala* & *L-Cys*)

Se analizó el efecto de la adición de concentraciones micromolares (100, 250 y 500  $\mu\text{M}$ ) de cada uno de los 20 aminoácidos en su forma levógira sobre el  $E_m$ . La medida se llevó a cabo mediante microelectrodos simples en hojas preincubadas en ausencia de N durante 7-9 días en ASW con 0.01 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y tamponada a pH 8.2 con 1N NaOH. Así mismo el medio de ensayo fue ASW sin N, con 0.01 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y tamponada a pH 8.2 con 10 mM MOPS/BTP. Únicamente en el caso de los aminoácidos *L-Ala* y *L-Cys* se registraron despolarizaciones de la membrana.

Seguidamente se llevó a cabo la caracterización cinética del transporte de estos aminoácidos, añadiendo al ASW sin N concentraciones crecientes de cada uno de ellos: 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  en el caso de la *L-Ala*, y 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$  en el caso de *L-Cys*. Las réplicas de las cinéticas de cada aminoácido se realizaron en hojas diferentes, si bien cada conjunto de concentraciones crecientes se aplicó a una misma célula del mesófilo.

Finalmente, una vez determinada la concentración de saturación para cada uno de estos aminoácidos, se estudió el papel del  $\text{Na}^+$  en la energética de su transporte. Así, se observó la variación del  $E_m$  por la adición de 250  $\mu\text{M}$  de *L-Ala* y 100  $\mu\text{M}$  de *L-Cys* en ASW con 0 mM NaCl (+800 mM de sorbitol).

#### **4 Análisis de datos**

El ajuste de los datos a modelos matemáticos, tanto lineales como de saturación se realizó mediante el programa informático Kaleida Graph 4.5 (Synergy Software). Los datos se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar (SD) de 3 a 5 réplicas independientes.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante test de comparación de medias por el estadístico de contraste t de Student o mediante Análisis de la Varianza (ANOVA) cuando el factor de influencia tenía más de dos niveles. Previamente se verificó en todos los casos los criterios de homocedasticidad y normalidad de los datos mediante la realización de la prueba de homogeneidad de la varianza (contraste de Levene) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov (con la corrección de Lilliefors). En todos los casos se consideró un límite de confianza ( $\alpha$ ) de 0.05. Para la realización de los cálculos estadísticos se utilizó el programa informático SPSS Statistics 25.0.

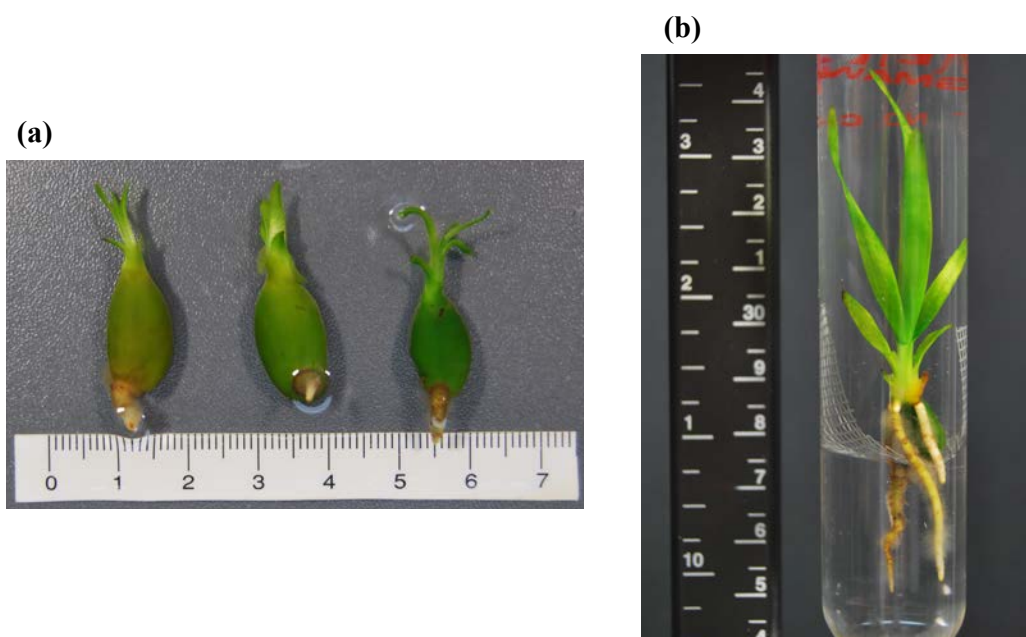
## **RESULTADOS**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1 Obtención de plántulas de *Posidonia oceanica*

Se seleccionaron 76 frutos de los recolectados en el arrecife de barrera frente a la costa de Roquetas de Mar (Almería), de los cuales se usó la mitad (38) para inducir la germinación de las semillas según se indica en *Material & Métodos* (apartado 1.3). La germinación de las semillas extraídas y colocadas individualmente en tubos sigma con NSW tuvo un rendimiento medio del 75%. Tal y como describe Balestri *et al.* (1998) el proceso de germinación comenzó con el desarrollo de la plúmula seguido de la emergencia en el polo opuesto de una blanquecina raíz principal al cabo de 3-5 días (Fig. 14a). Seguidamente, se observó el crecimiento del meristemo apical, apareciendo las primeras 2-3 hojas, y varias raíces adventicias al cabo de 15-20 días. Transcurrido un mes en NSW a 15°C bajo una intensidad de luz de 150  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y con un fotoperiodo de 16h luz - 8h oscuridad, se obtuvieron plántulas bien desarrolladas, de unos 9 cm de longitud (Fig. 14b), que se utilizaron para la realización de experimentos de electrofisiología. No obstante, el porcentaje de supervivencia de las plántulas hasta entonces fue menor que el de germinación (55%).



**Figure 14.** *Posidonia oceanica* seedlings. **(a)** Seedlings after 5 days of germination treatment. **(b)** A seedling after 1 month growing in filtered natural seawater (NSW). Fruits were surface-sterilized by rinsing in ethanol (70% v/v) for 2 min, followed by immersion in sodium hypochlorite (10 % v/v) diluted in filtered, autoclaved seawater for 2 min. Seeds were then removed aseptically and maintained at 15°C, 150  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and 16:8 h light:dark photoperiod in filtered NSW. The scale of both pictures shows a cm range.

## Resultados

Al cabo de 2 meses, las plantas se transfirieron a un vaso de precipitados con unos 5 L de NSW filtrada, utilizando como soporte una malla de nylon, debido al mayor requerimiento de volumen por el aumento de tamaño observado. En estas condiciones las plántulas pudieron ser mantenidas durante un año completo, siendo el tamaño máximo observado unos 20 cm de longitud desde el ápice de la raíz principal al extremo de la hoja de mayor tamaño.

## 2 Energética del plasmalema y permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$

El valor medio del potencial de membrana ( $E_m$ ) en células del mesófilo de hojas jóvenes de *P. oceanica* en agua de mar natural (NSW), fue de  $-174 \pm 4$  mV (n=27). Este valor fue similar al registrado en agua de mar artificial (ASW) ( $p=0.263$ ). Además, el valor de  $E_m$  observado en el mesófilo foliar de plántulas obtenidas a partir de la germinación de semillas en el laboratorio en ASW ( $-179 \pm 4$  mV, n=3) tampoco fue significativamente diferente ( $p=0.06$ ). En cambio, en las células de la epidermis radicular de dichas plántulas el  $E_m$  medido fue significativamente menos negativo ( $-140 \pm 6$  mV, n=20;  $p<0.001$ ).

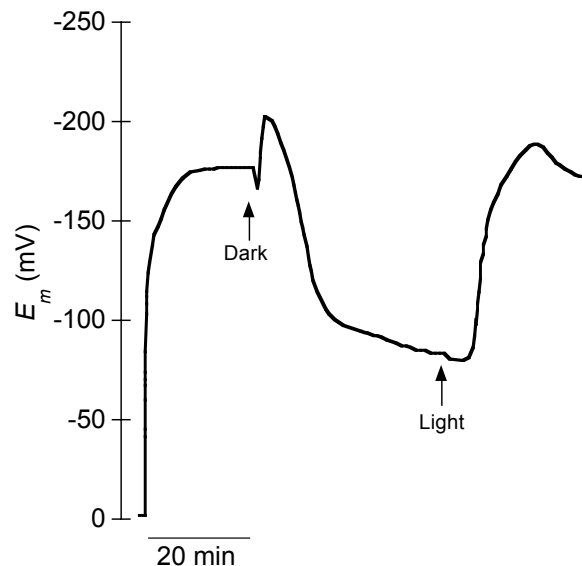
Debido a la dificultad técnica para realizar las medidas en las células epidérmicas de la raíz se decidió centrar el estudio en la hoja. Por otro lado, dada la similitud de los valores de  $E_m$  de las células del mesófilo foliar de plantas de diferente edad, y la poca disponibilidad de semillas que pudieron ser germinadas, la mayor parte del trabajo se desarrolló en hojas de plantas adultas.

### 2.1 Efecto de la transición luz - oscuridad sobre el $E_m$

En condiciones de luz ( $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), una vez alcanzado un  $E_m$  estable en NSW, la transición a oscuridad provocó una pequeña y rápida despolarización de la membrana, seguida de una hiperpolarización transitoria ( $\Delta E_m = -33 \pm 7$  mV; n=7) y finalmente de nuevo una despolarización, en esta ocasión lenta y de mayor magnitud, hasta un  $E_m = -87 \pm 8$  mV al cabo de 30 minutos; n=7 (Fig. 15). Al restaurar la iluminación, se observó una pequeña despolarización transitoria de la membrana ( $\Delta E_m = 3 \pm 1$  mV; n=7) seguida de la hiperpolarización de la misma ( $\Delta E_m = -105 \pm 10$  mV; n=7), para terminar con la recuperación del  $E_m$  inicial al cabo de 20 minutos (Fig. 15).



En experimentos en los que se prolongó la condición de oscuridad en el tiempo, la membrana se mantuvo despolarizada durante unos 50 minutos, tiempo al cabo del cual se observó el inicio de la repolarización de la membrana en condiciones de oscuridad.



**Figure 15.** Effect of light-dark transition on membrane potential ( $E_m$ ) of a *P. oceanica* mesophyll leaf cell. Measurements were performed in continuous perfusion of natural seawater (NSW). Trace is a representative record of 7 independent experiments.

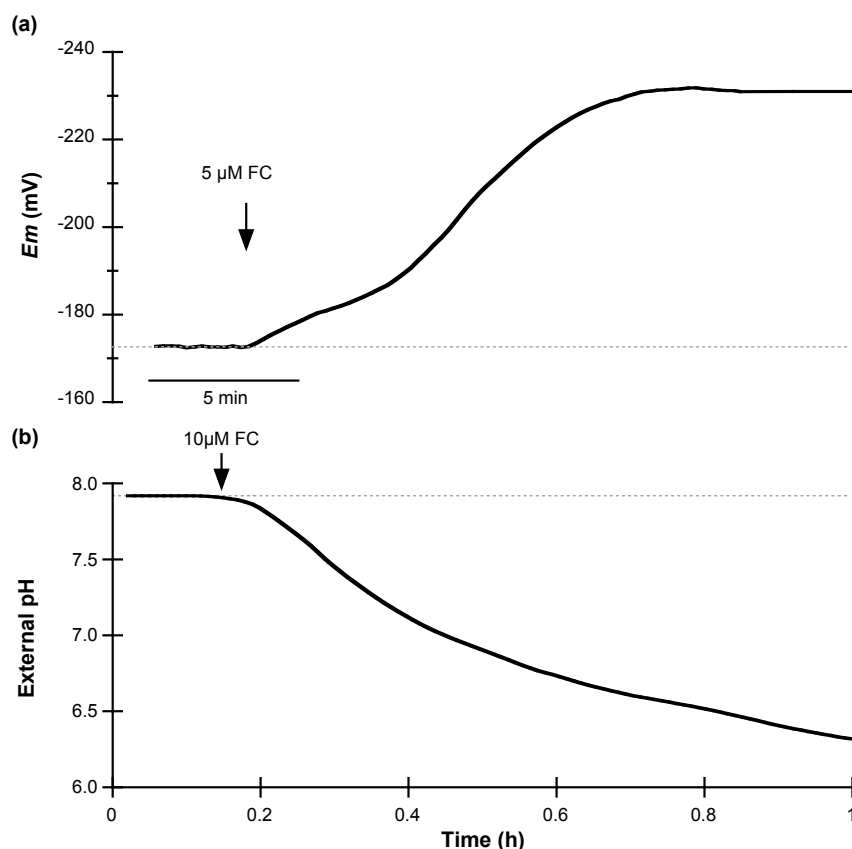
Esta respuesta, similar a la descrita para *Zostera marina* (Fernández *et al.*, 1999), se relaciona con la actividad de una  $H^+$ -ATPasa como bomba primaria. En oscuridad, al detenerse la asimilación fotosintética del  $CO_2$ , éste se acumula en el citosol, provocando la acidificación del mismo y la hiperpolarización inicial transitoria de la membrana debido a la salida del exceso de  $H^+$  (Fernández *et al.*, 1999).

## 2.2 Efecto de la fusicocina sobre el $E_m$ y el $pH_{ext}$

La fusicocina (FC) es una fitotoxina utilizada como indicadora de la actividad P-ATPasa y, especialmente, de la actividad de la  $H^+$ -ATPasa de plantas vasculares (Marrè *et al.*, 1979). Para determinar la presencia de esta ATPasa de tipo P como bomba primaria responsable de la generación del  $E_m$  en *P. oceanica* se analizó el efecto de la presencia de FC sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar y sobre el pH del medio. En el primer caso, una vez obtenido un  $E_m$  estable, la adición de  $5 \mu M$  de dicha fitotoxina al medio de ensayo (NSW) provocó una rápida hiperpolarización de la membrana, hasta  $-227 \pm 4$  mV ( $n=5$ ;  $p<0.001$ ) en 15 min. (Fig. 16a).

## Resultados

Por otra parte, la medida del pH del medio ( $pH_{ext}$ ), con minielectrodos selectivos para  $H^+$ , en el espacio formado entre dos secciones de hoja incubadas en NSW, reveló una acidificación del mismo, pasando de  $8.1 \pm 0.1$  a  $6.6 \pm 0.1$  ( $n=5$ ;  $p<0.001$ ) en 50 minutos tras la adición de  $10 \mu M$  de FC (Fig. 16b).



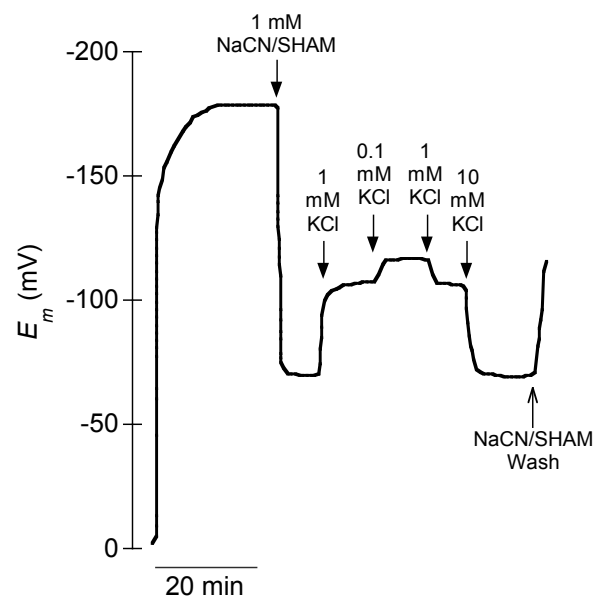
**Figure 16.** Effect of fusicoccin (FC) on membrane potential of mesophyll cells ( $E_m$ , mV) and on external pH of leaves of *Posidonia oceanica*. (a) Effect of the addition of  $5 \mu M$  FC on the membrane potential measured in natural seawater. (b) External pH variation induced in *P. oceanica* leaf pieces incubated in natural seawater after the addition of  $10 \mu M$  FC. Traces are a representative measurement of five similar experiments. Auxiliary (dotted grey) lines indicate the normal values of each variable in the absence of FC treatments.

### 2.3 Permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$ y concentración citosólica de $Na^+$

Según la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz, el valor del potencial de difusión ( $E_D$ ) viene determinado por la asimetría de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  a ambos lados de la membrana y la permeabilidad de la membrana a dichos iones. Así, variando la concentración externa de uno de ellos es posible estimar la permeabilidad relativa de la membrana. En este sentido, la permeabilidad relativa de la membrana a  $Na^+$  con respecto a  $K^+$  ( $P_{Na^+}/P_{K^+}$ ) en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*, se estimó midiendo el efecto de la variación de la concentración de  $K^+$  en el medio sobre el  $E_D$ .

El valor del potencial de difusión de dichas células se obtuvo tras la adición de 1 mM de NaCN/SHAM al medio de ensayo (ASW). Tal como se muestra en la Figura 17, la adición de ambos inhibidores de la respiración provocó la despolarización de la membrana hasta un valor estable de  $-77 \text{ mV} \pm 7 \text{ mV}$  ( $n=5$ ). Este valor fue similar al observado en los ensayos realizados en NSW ( $p=0.537$ ; datos no mostrados).

Una vez alcanzado un valor estable de  $E_D$  en ASW, la disminución de la concentración externa de  $\text{K}^+$  de 10 mM a 1 mM KCl provocó la hiperpolarización de la membrana ( $E_D = -107 \pm 3 \text{ mV}$ ;  $n=5$ ). Así mismo, una segunda disminución de la concentración externa de  $\text{K}^+$  de 1 mM a 0.1 mM KCl provocó nuevamente la variación del  $E_D$ , aunque en este caso el cambio fue menor ( $E_D = -110 \pm 1 \text{ mV}$ ;  $n=5$ ). Seguidamente, el aumento de la concentración externa de  $\text{K}^+$ , primero hasta 1 mM y después hasta 10 mM indujo la despolarización de la membrana hasta los respectivos valores de  $E_D$  previamente registrados a cada una de dichas concentraciones externas de  $\text{K}^+$ . Por último, la retirada del medio del cóctel inhibitor NaCN/SHAM provocó el inicio de la recuperación del  $E_m$  inicial (Fig. 17).



**Figure 17.** Effect of external  $\text{K}^+$  concentration variation on diffusion potential of *P. oceanica* mesophyll leaf cells. The addition of 1 mM NaCN and 1 mM SHAM to the assay medium (ASW) evokes the plasma membrane depolarization until the diffusion potential. After reaching a stable value in the presence of both respiratory inhibitors the external  $\text{K}^+$  concentration was varied as indicated. Trace is a representative record of 5 independent experiments.

## Resultados

La variación del  $E_D$  en función de la presencia de diferentes concentraciones externas de  $K^+$ , permitió calcular la  $P_{Na^+}/P_{K^+}$  a partir de la linealización del modelo de Goldman-Hodgkin-Katz (Ec. 4), asumiendo que la concentración citosólica de  $K^+$  (así como la de  $Na^+$  y  $Cl^-$ ) permanece constante al variar la concentración externa y considerando despreciable la concentración citosólica de  $Na^+$  respecto a la concentración externa (500 mM NaCl) (Fernández *et al.*, 1999):

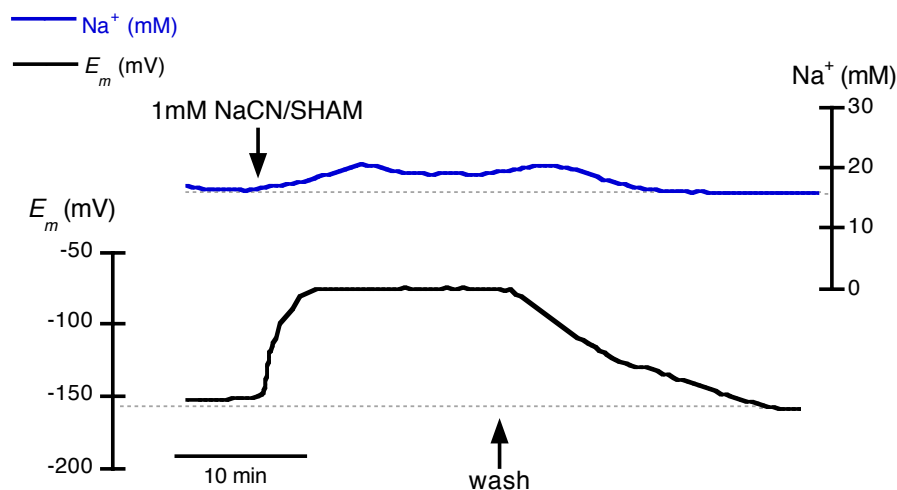
$$P_{Na^+}/P_{K^+} = \frac{B[K_2^+]_e - A[K_1^+]_e}{A[Na^+]_e - B[Na^+]_e}$$

(Equation 5)

donde  $A = 10^{\frac{E_1}{(-59)}}$ ,  $B = 10^{\frac{E_2}{(-59)}}$  y  $E_1$  y  $E_2$  los  $E_D$  a las concentraciones 1 y 2 de KCl en el medio de externo, es decir  $[K^+]_e = 10$  mM y  $[K^+]_e = 1$  mM.

Sustituyendo los valores en la ecuación, se obtuvo un valor medio para la relación  $P_{Na^+}/P_{K^+} = 0.0046 \pm 0.0012$  (n=5). Este valor indica que la permeabilidad de la membrana a  $K^+$  es tres órdenes de magnitud superior a la de  $Na^+$ , mientras que la concentración externa de  $Na^+$  es 50 veces mayor que la de  $K^+$ .

Esta permeabilidad restringida a  $Na^+$  podría estar relacionada con el mantenimiento de una baja concentración citosólica de este ión. En este sentido, se realizaron medidas de la concentración citosólica de  $Na^+$  ( $[Na^+]_c$ ) mediante el uso de microelectrodos selectivos. Las medidas se realizaron en células del mesófilo foliar incubadas en NSW, obteniéndose, tal como muestra el registro de la Figura 18, un valor de concentración citosólica de  $Na^+$  de  $17 \pm 2$  mM (n=6). En estas condiciones, la adición de 1mM de NaCN/SHAM al agua de mar produjo la disminución del potencial de membrana hasta alcanzar el correspondiente valor de  $E_D$ , mientras que la  $[Na^+]_c$  incrementó hasta un valor de  $20 \pm 2$  mM (n=3). Por otra parte, al retirar el cóctel inhibidor del medio de ensayo se observó el restablecimiento de los valores iniciales tanto de  $E_m$  como de  $[Na^+]_c$ . Estos resultados sugieren que, además de la permeabilidad restringida al  $Na^+$ , deben operar mecanismos activos que mantienen una baja concentración citosólica de este ión en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*.



**Figure 18.** Simultaneous measurements of membrane potential ( $E_m$ ) and cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration of mesophyll leaf cells of *P. oceanica* in NSW. Effect of the addition of 1mM NaCN/SHAM. A representative record of 3 independent experiments is shown. Auxiliary (dotted red) lines indicate the normal values of each variable before the addition of inhibitors.

### 3 Incorporación de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ )

El estudio del modelo de incorporación de carbono inorgánico se inició con la medida de forma simultánea del  $E_m$  y el pH citosólico ( $\text{pH}_c$ ) mediante el uso de microelectrodos dobles, selectivos para  $\text{H}^+$ . El experimento, realizado en plantas adultas de *P. oceanica* en NSW, reveló un pH en el citosol de las células del mesófilo foliar de  $7.3 \pm 0.03$  ( $n=12$ ). La adición de 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  al NSW, provocó una despolarización inicial y transitoria de la membrana de 3 mV seguida de una hiperpolarización hasta un valor de  $-183 \pm 1$  mV ( $n=5$ ). Aproximadamente 4 minutos después del incremento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el NSW, se observó una lenta despolarización de la membrana, hasta un valor de  $-162 \pm 2$  mV ( $n=5$ ;  $p=0.002$ ) en aproximadamente 20 minutos (Fig. 19a). Al mismo tiempo, se registró una acidificación del citosol ( $\text{pH} = 7.22 \pm 0.01$ ) seguida de una alcalinización del mismo ( $\text{pH} = 7.47 \pm 0.02$ ) (Fig. 19b).

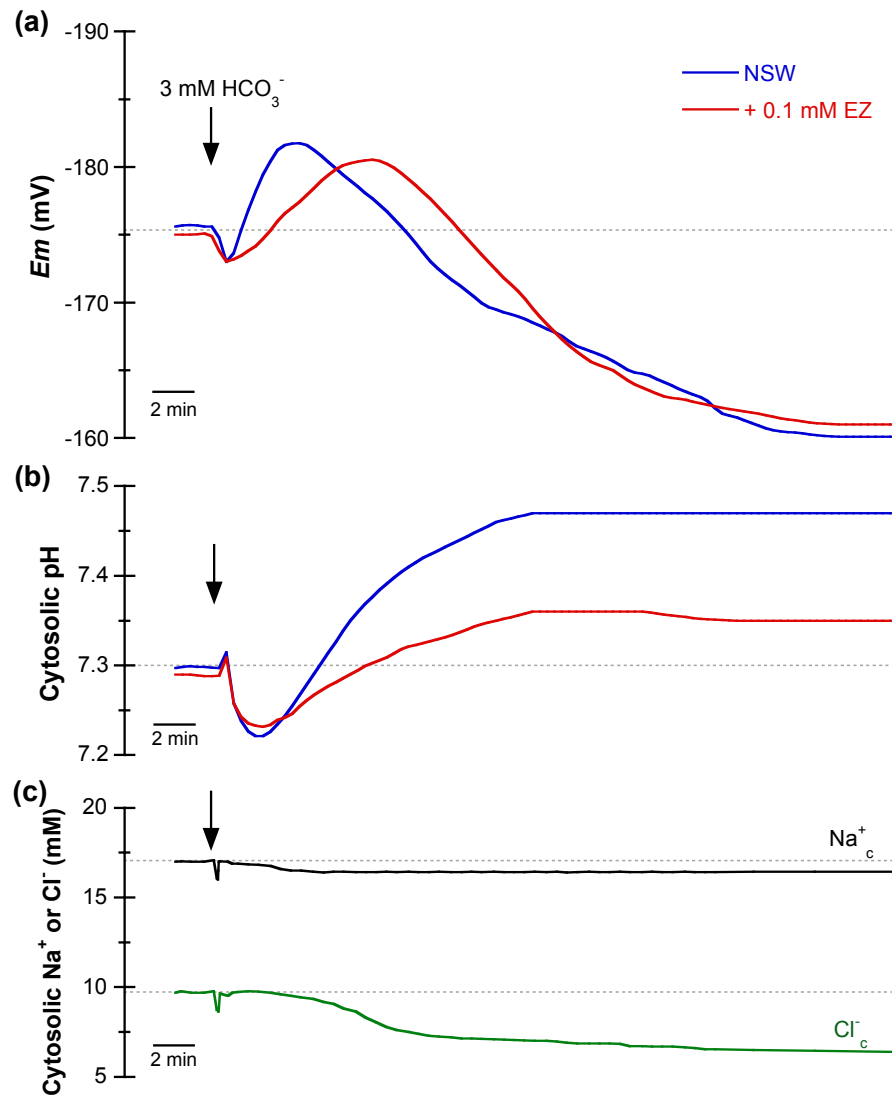
Para determinar el origen de la variación de pH observada en el citosol, se probó el efecto del inhibidor de la anhidrasa carbónica (CA) permeable a la membrana etoxizolamida (EZ). En presencia de 0.1 mM de EZ, los valores de  $E_m$  tanto inicial como final fueron similares a los obtenidos en ausencia del inhibidor. Sin embargo, la hiperpolarización inicial transitoria de la membrana causada por la adición de 3 mM

## Resultados

$\text{HCO}_3^-$  fue retardada y ligeramente menor ( $-181 \pm 3\text{mV}$ ,  $n=5$ ;  $p=0.33$ ) con respecto a las condiciones control (Fig. 19a). En cuanto al pH, la presencia de EZ no tuvo efecto sobre el pH citosólico inicial ( $7.28 \pm 0.02$ ,  $n=5$ ) ni sobre la acidificación inicial del citosol tras la adición de  $\text{HCO}_3^-$ . En cambio, la posterior alcalinización fue claramente menor en presencia del EZ, alcanzando un  $\text{pH} = 7.35 \pm 0.01$  ( $n=5$ ;  $p<0.001$ ) al cabo de 20 min tras la adición de  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 19b). La acidificación inicial, independiente de la presencia de EZ, sugiere que la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* podría estar mediada por un sistema de simporte con  $\text{H}^+$ .

Para determinar el ión que pudiera actuar como motriz en la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$ , además del  $\text{pH}_c$ , se midió el efecto de la adición de  $\text{HCO}_3^-$  sobre la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  mediante microelectrodos ión selectivos. Las medidas se realizaron en NSW, obteniéndose un valor de concentración de  $\text{Na}^+$  de  $17 \pm 2$  mM ( $n=6$ ), valor que fue mayor que el observado para el  $\text{Cl}^-$  en las mismas condiciones ( $9.5 \pm 1$  mM,  $n=3$ ) (Fig. 19c).

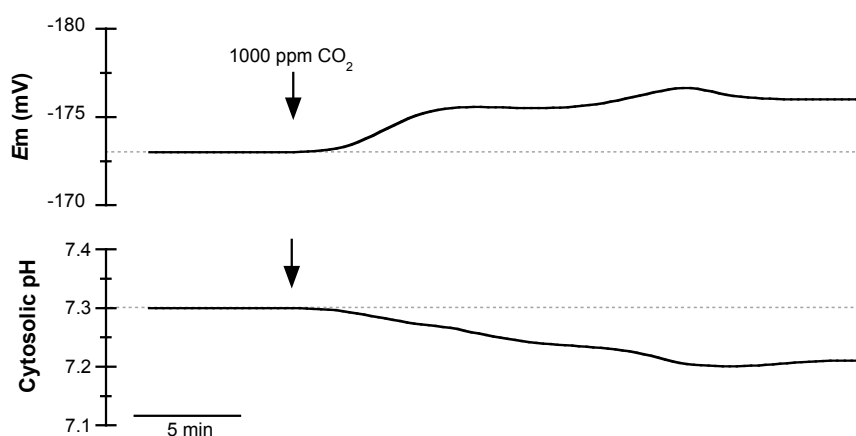
La adición de 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  al NSW, provocó inicialmente una rápida y transitoria disminución del  $\text{Na}^+$  presente en el citosol seguida de una segunda disminución del mismo, esta vez más lenta, hasta llegar a un valor de  $16 \pm 1$  mM ( $n=3$ ) (Fig. 19c). No obstante tales variaciones de la concentración de  $\text{Na}^+$  no fueron significativas ( $p=0.48$ ). En cambio, el incremento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el medio, sí produjo una clara disminución de la concentración citosólica de  $\text{Cl}^-$  (Fig. 19c). Cabe destacar que, en comparación con la respuesta del  $\text{pH}_c$ , la disminución de la concentración de  $\text{Cl}^-$  fue posterior en el tiempo. La adición de 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  al NSW, inicialmente indujo una rápida y transitoria disminución del  $\text{Cl}^-$  citosólico (no significativa), tras lo cual éste se mantuvo constante ( $9.5 \pm 1$  mM  $\text{Cl}^-$ ,  $n=3$ ). Sin embargo, transcurridos 4 minutos, cuando el  $E_m$  comenzaba a despolarizarse, se observó una lenta disminución del  $\text{Cl}^-$  en el citosol. Finalmente, al cabo de 15 minutos, de manera simultánea a la estabilización del  $E_m$ , el valor de la concentración citosólica de  $\text{Cl}^-$  se mantuvo constante en el tiempo en torno a  $6.3 \pm 1$  mM ( $n=3$ ;  $p=0.017$ ). Este resultado sugiere la existencia de un flujo de salida de  $\text{Cl}^-$  que podría compensar la acumulación de cargas negativas resultantes de la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  y/o los  $\text{OH}^-$  generados por la deshidratación interna del bicarbonato.



**Figure 19.** Effect of the addition of 3 mM NaHCO<sub>3</sub> on membrane potential ( $E_m$ , mV) and cytosolic pH, cytosolic Na<sup>+</sup> (Na<sub>c</sub><sup>+</sup>, mM), or cytosolic Cl<sup>-</sup> (Cl<sub>c</sub><sup>-</sup>, mM) measured in mesophyll leaf cells of *Posidonia oceanica*. **(a)** Membrane potentials in natural seawater (NSW; blue trace, control conditions) or NSW containing 0.1 mM ethoxzolamide (EZ; red trace). **(b)** Cytosolic pH measured in NSW (blue record) or in the presence of 0.1 mM EZ (red record). **(c)** Cytosolic Na<sup>+</sup> (dark trace) or cytosolic Cl<sup>-</sup> (green trace) measured in NSW. Traces are a representative record of a minimum of three independent experiments for each treatment, and mean values and statistics are indicated in the text. Auxiliary (dotted grey) lines show the normal value of each variable before HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> addition.

### 3.1 Efecto del incremento de $\text{CO}_2$ sobre el $E_m$ y el pH citosólico

Para analizar si el origen de las variaciones de  $\text{pH}_c$  se debía a la formación de  $\text{CO}_2$  proveniente de la deshidratación externa del  $\text{HCO}_3^-$ , se probó el efecto del incremento de la concentración del mismo en el NSW burbujando el medio con 1000 ppm de  $\text{CO}_2$ . Como se observa en la Figura 20, la adición de 1000 ppm  $\text{CO}_2$  produjo una pequeña hiperpolarización del  $E_m$ , de unos 5 mV, a la vez que una lenta acidificación del  $\text{pH}_c$  de 0.1 unidades. Esta respuesta sugiere que la acidificación inicial y transitoria encontrada al añadir 3 mM de  $\text{HCO}_3^-$  al NSW no está relacionada con un aumento de la concentración externa de  $\text{CO}_2$ .



**Figure 20.** Effect of the addition of 1000 ppm  $\text{CO}_2$  to natural seawater on the membrane potential ( $E_m$ , mV) and cytosolic pH measured in *Posidonia oceanica* leaf cells. Traces are a representative example of three equivalent simultaneous measurements. Auxiliary (dotted grey) lines show the control values before  $\text{CO}_2$  treatment.

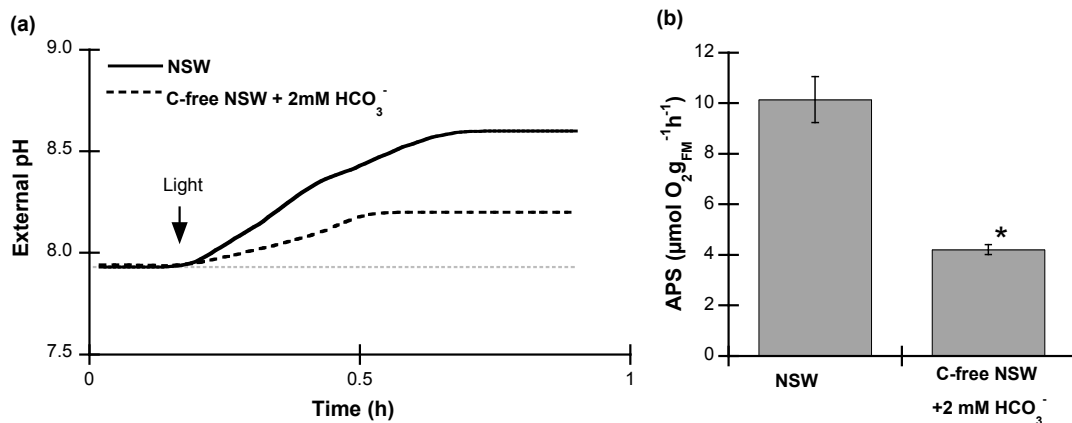
### 3.2 Transporte de bicarbonato y fotosíntesis

Para determinar el uso del bicarbonato como fuente de carbono para la fotosíntesis en hojas de *P. oceanica* se probó el efecto de la presencia de 2 mM  $\text{HCO}_3^-$  como única fuente de carbono inorgánico sobre la variación de pH externo ( $\text{pH}_e$ ) durante la transición oscuridad-luz, respecto a condiciones control. Al incubar una sección de hoja en agua de mar natural, que contiene  $\text{CO}_2$  y 2 mM  $\text{HCO}_3^-$ , en condiciones de oscuridad se obtuvo un valor estable del pH del medio ( $\text{pH}_e$ ) de  $7.93 \pm 0.15$ . Tras la aplicación de luz ( $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) se observó una alcalinización del  $\text{pH}_e$  hasta un valor de  $8.56 \pm 0.05$  ( $n=5$ ;  $p=0.001$ ) al cabo de 20 minutos, consecuente con la actividad fotosintética (Fig. 21). En cambio, en NSW sin  $\text{CO}_2$



suplementada con 2 mM  $\text{HCO}_3^-$ , el incremento de  $\text{pH}_e$  observado tras la aplicación de luz fue menor, de  $7.92 \pm 0.03$  a  $8.25 \pm 0.07$ , aunque igualmente significativo ( $n=5$ ;  $p=0.001$ ). Esto supone que el uso de  $\text{HCO}_3^-$  como fuente de carbono para la fotosíntesis representaría aproximadamente un 40% de la alcalinización del medio externo.

Por otro lado, se determinó el efecto del  $\text{HCO}_3^-$  sobre la tasa de fotosíntesis aparente (APS - *Apparent photosynthesis*), medida como producción de  $\text{O}_2$  en secciones de hoja de *P. oceanica* incubadas a pH 8.5 y  $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . En NSW sin  $\text{CO}_2$  y suplementada con 2 mM  $\text{HCO}_3^-$ , el valor de APS obtenido fue de un 40% del observado en condiciones control (NSW) (Fig. 21), porcentaje similar al observado en el caso de la alcalinización del pH externo.



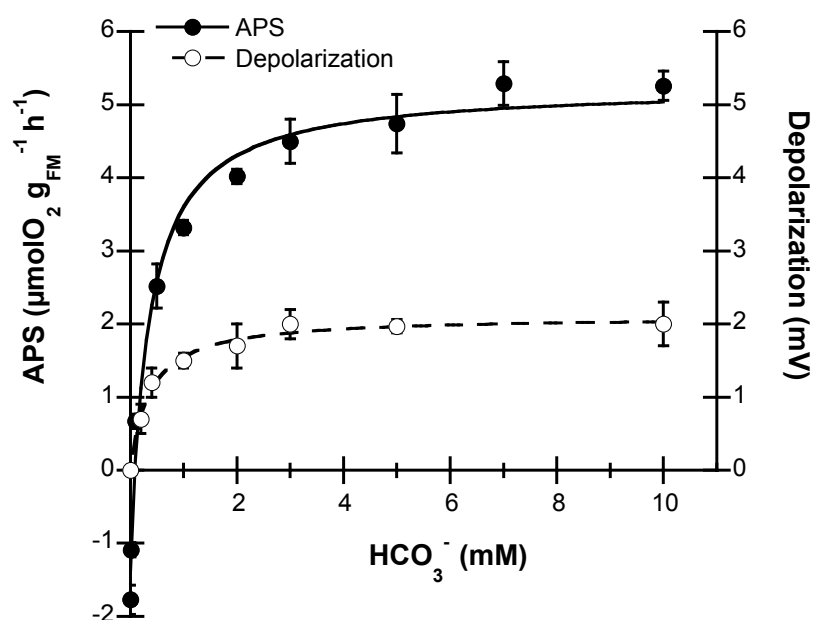
**Figure 21.** Effect of  $\text{HCO}_3^-$  on the photosynthetic activity of *Posidonia oceanica* leaves. **(a)** External pH variation induced by dark–light ( $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) transitions in *P. oceanica* leaf pieces incubated in natural seawater (NSW; black line) or in C-free NSW supplemented with 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  (dashed line). Auxiliary dotted grey line shows the external pH in the dark. Traces are a representative measurement of five similar experiments. **(b)** Apparent photosynthesis (APS) rates of *P. oceanica* leaf pieces measured at  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in NSW ( $n=12$ ) or in C-free NSW supplemented with 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  ( $n=5$ ). Data are mean  $\pm$  SD and asterisk indicates significant differences (Student's *t*-test,  $p<0.0001$ ).

Al objeto de caracterizar el uso fotosintético del  $\text{HCO}_3^-$  se determinaron las tasas de fotosíntesis aparente a distintas concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  (de 0.01 a 10 mM) en NSW sin  $\text{CO}_2$  ajustada a pH 8.5 y condiciones de luz ( $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las tasas obtenidas incrementaron a medida que se aumentó la concentración de carbono inorgánico disponible en el medio de ensayo hasta llegar a saturarse a concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en torno a 3 mM (Fig. 22).

## Resultados

Por otra parte, se midió la variación del  $E_m$  de células del mesófilo foliar de *P. oceanica* en respuesta a la adición de las mismas concentraciones de  $\text{NaHCO}_3$  (de 0.01 a 10 mM) en NSW sin  $\text{CO}_2$  ajustada a pH 8.5. Al igual que en el caso de las tasas de fotosíntesis aparente, los valores de despolarización inicial en respuesta a la adición de concentraciones crecientes de  $\text{HCO}_3^-$  aumentaron, hasta llegar a saturarse en torno a 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 22).

Mediante ambas aproximaciones metodológicas, se obtuvieron sendas curvas de saturación que se ajustaron a los modelos de Edwards & Walker (1983) y Michaelis & Menten respectivamente (Fig. 22), obteniéndose los correspondientes parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 5.



**Figure 22.** Apparent photosynthesis (APS) rates at  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (black points,  $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}_{\text{FM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and membrane induced depolarizations (open circles, mV) at different external  $\text{HCO}_3^-$  concentrations. Assay medium consisted of C-free natural seawater adjusted to pH 8.5 with NaOH supplemented with different  $\text{NaHCO}_3$  concentrations. Values showed saturations kinetics and were fitted to the Edwards & Walker (1983;  $R^2 = 0.987$ ) and Michaelis & Mentel ( $R^2 = 0.990$ ) models, respectively. Data are mean  $\pm$  SD of three independent measurements.

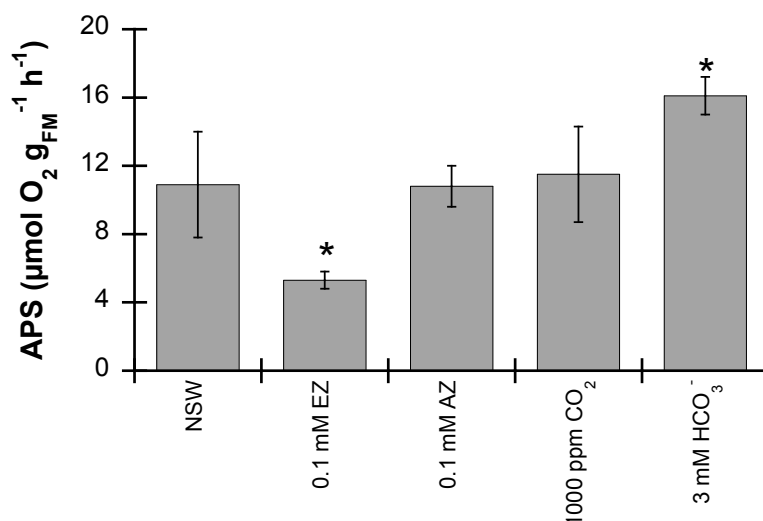
Tanto el valor del punto de compensación para el bicarbonato ( $CP_{HCO_3^-}$ ),  $0.09 \pm 0.01$  mM (n=3), como de la constante de semisaturación ( $S_{0.5}$ ),  $0.35 \pm 0.07$  mM (n=3), estimador de la afinidad por el  $HCO_3^-$ , cuyo valor es similar al de la constante de semisaturación obtenida mediante electrofisiología ( $K_M$ ),  $0.36 \pm 0.04$  mM (n = 3), indican la presencia de un sistema de incorporación de  $HCO_3^-$  en *P. oceanica* con una afinidad mucho menor que la concentración de  $HCO_3^-$  del agua de mar, lo que sugiere que la incorporación de este ión sería mediada a través de un mecanismo eficiente.

**Table 5.** Photosynthetic and kinetics parameters for the use of bicarbonate as an inorganic C source in *P. oceanica* mesophyll leaf cells. Values were obtained by curve fitting of the apparent photosynthesis or membrane depolarizations showed in Figure 22. Data are mean  $\pm$  SD (n=3).  $APS_{max}$  and  $D_{max}$  are the maximum apparent photosynthesis and the maximum depolarization, respectively;  $S_{0.5}$  is the half saturation constant for the apparent photosynthesis (APS); CP is the compensation point for  $HCO_3^-$ ; and  $K_M$  is the Michaelis constant for  $HCO_3^-$  uptake kinetics.

<i>Photosynthetic parameters</i>	<i>Kinetics parameters</i>
$APS_{max} = 5.27 \pm 0.28 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}_{FM}^{-1} \text{ h}^{-1}$	$D_{max} = 2.1 \pm 0.1 \text{ mV}$
$S_{0.5} = 0.35 \pm 0.07 \text{ mM}$	$K_M = 0.36 \pm 0.04 \text{ mM}$
$CP_{HCO_3^-} = 0.09 \pm 0.01 \text{ mM}$	

Para una mayor caracterización del uso fotosintético del  $HCO_3^-$  en hojas de *P. oceanica*, se probó el efecto de diferentes inhibidores de la anhidrasa carbónica así como el suplemento con 1000 ppm de  $CO_2$  ó con 3 mM  $HCO_3^-$  del NSW sobre la tasa de fotosíntesis aparente medida a  $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Tal como muestra la Figura 23, en presencia de 100  $\mu\text{M}$  del inhibidor de la anhidrasa carbónica permeable a membranas, etoxiazolamida (EZ), la tasa de APS obtenida fue de tan sólo el 50% respecto al valor observado en condiciones control (NSW) (n=3;  $p=0.006$ ). En cambio, cuando se añadió la misma concentración de acetazolamida (AZ), inhibidor de la anhidrasa carbónica que no atraviesa la membrana plasmática, la disminución de la tasa de fotosíntesis aparente fue en torno a un 5%, lo cual no resultó significativamente diferente respecto al control (n=3;  $p=0.97$ ). A diferencia de ello, la tasa de APS medida en NSW suplementada con 1000 ppm  $CO_2$ , fue similar a la de condiciones control (n=5;  $p=0.68$ ), mientras que la adición de 3 mM  $HCO_3^-$  al NSW provocó un aumento significativo de la tasa de fotosíntesis (n=3;  $p=0.01$ ).

## Resultados

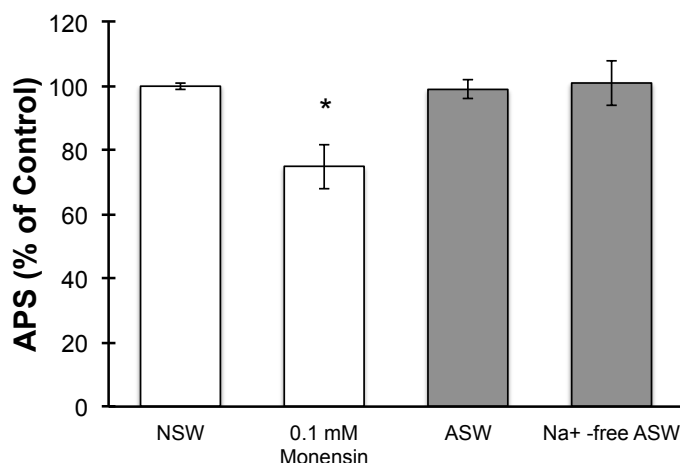


**Figure 23.** Apparent photosynthesis (APS) of *Posidonia oceanica* leaf pieces measured in different conditions. For each treatment, photosynthesis was measured at 150 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> first in control conditions (NSW) and then after the addition of 0.1 mM ethoxzolamide (EZ), 0.1 mM acetazolamide (AZ), CO<sub>2</sub>, and 3 mM NaHCO<sub>3</sub>. Data are mean ± SD of at least three independent measurements. Asterisk indicates significant differences with respect to control conditions (Student's *t*-test, *p*<0.01).

Por último, para estudiar la relación del Na<sup>+</sup> y el Cl<sup>-</sup> con el uso fotosintético del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se realizó la misma medida en presencia de diferentes inhibidores del transporte de estos iones en la membrana plasmática.

En primer lugar, se determinó el efecto de 0.1 mM de monensina, iónoforo para el ión Na<sup>+</sup> (Fig. 24). Además, se probó el efecto de la ausencia de Na<sup>+</sup> en el medio de ensayo. Para ello se utilizó ASW (control) y ASW sin Na<sup>+</sup> (con 800 mM sorbitol). El resultado fue un 25% de reducción de la tasa de APS en presencia del ionóforo. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre la tasa de fotosíntesis en NSW, ASW y ASW sin Na<sup>+</sup> (*p*=0.308). Estos resultados sugieren que la disminución de la tasa de fotosíntesis en presencia de monensina parece ser un efecto inespecífico.

Por otra parte, la presencia de 0.1 mM de DIDS, inhibidor del transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en intercambio con aniones, fundamentalmente Cl<sup>-</sup>, así como de 0.1 mM de NPPB, inhibidor de canales aniónicos de tipo S, tampoco produjo una reducción de la tasa de fotosíntesis respecto al control (datos no mostrados). Ambos resultados sugieren que los canales aniónicos no mediarían la incorporación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en esta especie.



**Figure 24.** Apparent photosynthesis (APS) of *Posidonia oceanica* leaf pieces measured in different conditions. For each treatment, photosynthesis was measured at  $150 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  first in control conditions (NSW) and then after the addition of the inhibitor monensin (white columns). Grey columns show APS measured in artificial seawater (ASW; 500mM NaCl) and artificial seawater without  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ -free ASW). Data are mean  $\pm$  SD of at least three independent measurements. Asterisks indicate significant differences with respect to control conditions (Student *t*-test, \* $p < 0.05$ ).

## 4 Estudio de la incorporación de nitrato, fósforo inorgánico y aminoácidos

### 4.1 Incorporación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )

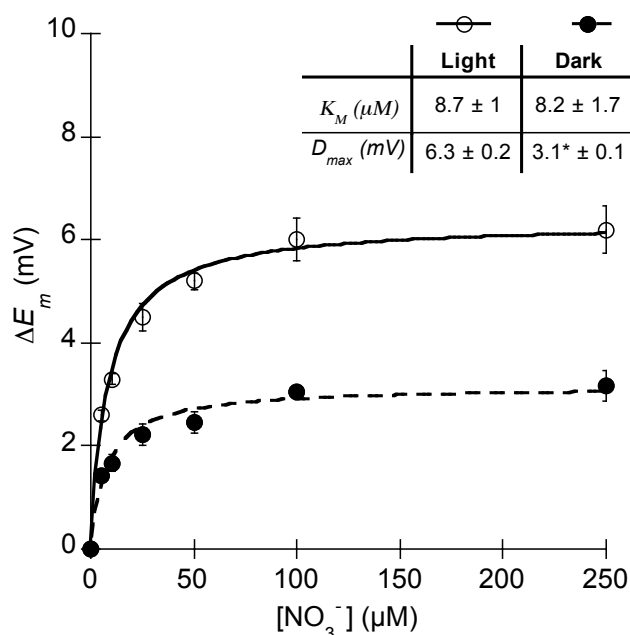
En agua de mar artificial sin N, la adición de concentraciones micromolares de  $\text{NO}_3^-$  provocó la despolarización de la membrana de células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Previamente, las plantas fueron incubadas en ausencia de N durante al menos 14 días. La adición de concentraciones de  $\text{NaNO}_3$  en el rango 5-250  $\mu\text{M}$ , provocó despolarizaciones crecientes. No obstante, en experimentos preliminares se observó que pulsos consecutivos de concentraciones crecientes provocaban una disminución de la magnitud de la respuesta, por lo que cada concentración y réplica se ensayó en hojas independientes. La adición de concentraciones similares de NaCl no produjo ningún efecto sobre el  $E_m$  (datos no mostrados).

Tras la adición de la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , la variación o incremento del  $E_m$  alcanzó un valor máximo estable después de aproximadamente 1 min. Este valor de  $E_m$ , más positivo, se mantuvo hasta que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  añadida se retiró del medio, restableciéndose el valor inicial.

## Resultados

La magnitud de las despolarizaciones de la membrana inducidas por la adición de  $\text{NO}_3^-$  se saturó a partir de  $100 \mu\text{M NO}_3^-$ , permitiendo el ajuste al modelo cinético de Michaelis & Menten (Fig. 25). De este modo se obtuvo la constante de semisaturación ( $K_M = 8.7 \pm 1 \mu\text{M}$ ) y el valor de despolarización máxima ( $D_{max} = 6.3 \pm 0.2 \text{ mV}$ ), que puede considerarse un estimador de la velocidad máxima del transporte.

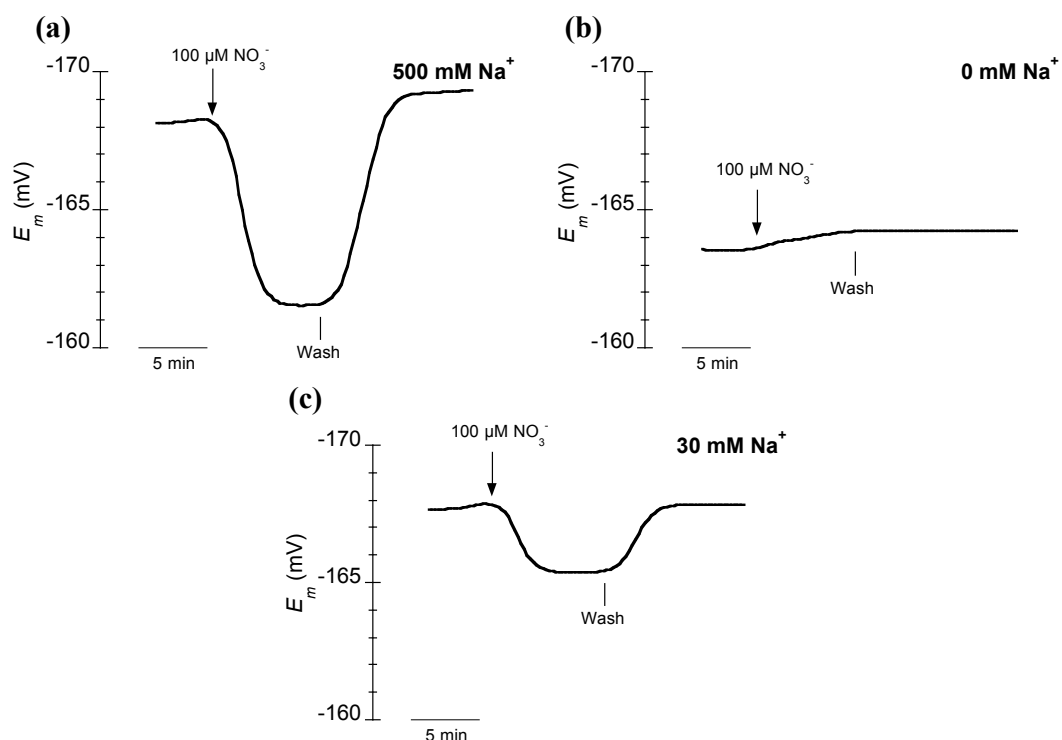
Al igual que en condiciones de luz, en oscuridad se obtuvieron despolarizaciones crecientes del  $E_m$  inducidas por  $\text{NO}_3^-$ , pero de menor magnitud. De igual modo, las despolarizaciones obtenidas para cada concentración se ajustaron al modelo de saturación de Michaelis & Menten (Fig. 25). En este caso, el valor de  $D_{max}$  fue de  $3.1 \pm 0.1 \text{ mV}$  ( $n=3$ ), lo cual supone una reducción del 50% respecto a condiciones de luz. En cambio, el valor de  $K_M$  obtenido ( $8.2 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ), no fue significativamente diferente ( $p=0.717$ ). Este resultado sugiere una menor actividad de los sistemas de transporte de nitrato en ausencia de luz.



**Figure 25.** Membrane depolarizations ( $\Delta E_m$ ) induced by increasing  $\text{NaNO}_3$  concentrations in artificial seawater (ASW) without N (containing  $500 \text{ mM Na}^+$  and  $2 \text{ mM NaHCO}_3$ ). Measurements were performed in mesophyll leaf cells of plants previously maintained in ASW without N during 14-17 days. Open and closed symbols indicate light and dark conditions, respectively. Data were fitted to the Michaelis & Menten equation ( $R^2 = 0.993$  in light,  $R^2 = 0.975$  in dark) and kinetics parameters are shown in the table. Values are means  $\pm$  SD of five independent replicates and asterisk indicates significant differences (Student's  $t$ -test,  $p < 0.001$ ).

#### 4.1.1 Efecto del $\text{Na}^+$ sobre la incorporación de $\text{NO}_3^-$

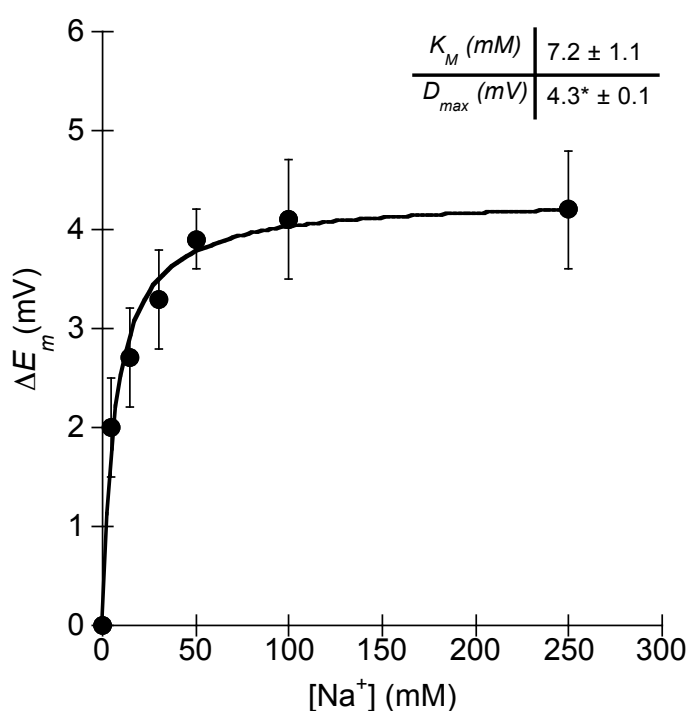
Para determinar el papel del  $\text{Na}^+$  en el modelo de transporte de nitrato en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*, se probó el efecto de la ausencia de tal ión en el medio de ensayo sobre la variación del  $E_m$  inducida por la adición de la concentración saturante del transporte de  $\text{NO}_3^-$  (100  $\mu\text{M}$ ). Para ello, se utilizó ASW sin  $\text{Na}^+$  en la que la fuerza osmótica se compensó con 800 mM de sorbitol. En presencia de 500 mM de NaCl (control), la adición de  $\text{NO}_3^-$  provocó una despolarización de la membrana en torno a 6 mV, valor similar a la despolarización máxima descrita en el apartado anterior. Al retirar el  $\text{Na}^+$  del medio, se observó la despolarización de la membrana, estabilizándose en -164 mV al cabo de 2h. En esta nueva condición, al añadir el pulso de 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  no se observó variación del  $E_m$ . Por último, tras restaurar parcialmente la concentración de NaCl en el medio de ensayo (30 mM), la adición de 100  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  provocó una despolarización de la membrana en torno a 3mV, siendo menor que la observada en condiciones control (500 mM NaCl). La Figura 26 muestra un registro representativo de dicho experimento. Además, en condiciones control, la adición de 100  $\mu\text{M}$  KCl no provocó variación alguna del  $E_m$  (datos no mostrados).



**Figure 26.** Membrane potential ( $E_m$ ) changes after the addition of 100  $\mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  (downward arrow) in (a) ASW containing 500 mM NaCl, (b)  $\text{Na}^+$ -free ASW (with 800 mM sorbitol), and (c) ASW containing 30 mM NaCl. Vertical lines indicate onset of the  $\text{NO}_3^-$  wash. Traces are a representative measurement of five similar experiments.

## Resultados

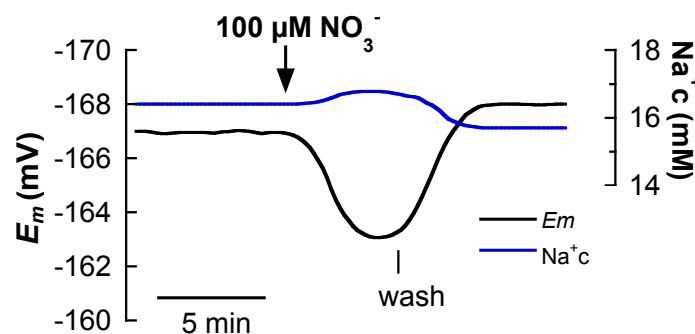
Este resultado sugiere que la incorporación de nitrato en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* es dependiente de la presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio de ensayo. No obstante, dada la recuperación parcial del  $E_m$  al restablecer parte de la concentración externa de  $\text{Na}^+$ , se procedió a la medida de la variación del  $E_m$  inducida por  $100 \mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  en agua de mar artificial en la que se varió la concentración de  $\text{Na}^+$  en el rango 5 - 250 mM. El aumento de la concentración de NaCl en el medio de ensayo produjo despolarizaciones crecientes de la membrana al añadir  $100 \mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ . La magnitud de tales despolarizaciones se saturó respecto a la concentración de  $\text{Na}^+$  en el medio, siendo de similar valor a partir de 50 mM de NaCl (Fig. 27). El ajuste de los valores al modelo de Michaelis & Menten, permitió calcular un valor de constante de semisaturación ( $K_M$ ) para  $\text{Na}^+$  de  $7.2 \pm 1.1$  mM. Sin embargo, el valor de  $D_{max}$  encontrado en estas condiciones fue de  $4.3 \pm 0.1$  mM, significativamente menor que en condiciones control ( $p=0.035$ ). Esta disminución podría deberse a un efecto inhibitorio inespecífico del sorbitol.



**Figure 27.** Membrane potential depolarizations induced by the addition of  $100 \mu\text{M}$   $\text{KNO}_3$  in ASW containing increasing  $\text{Na}^+$  concentrations. Plants were starved from N during 14-17 days and maintained in ASW without  $\text{Na}^+$  (sorbitol - ASW) at least 2 hours before the experiment. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Values were fitted to the Michaelis & Menten model ( $R^2 = 0.989$ ) and kinetics parameters are shown in the table.



Además de la dependencia de la presencia de  $\text{Na}^+$ , la saturación del transporte de  $\text{NO}_3^-$  respecto a  $\text{Na}^+$  sugiere el acoplamiento entre la entrada de nitrato y de  $\text{Na}^+$ , el cual funcionaría como ión motriz de un mecanismo de simporte  $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$ . En este sentido la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  debería estar asociada a un incremento de la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$ . Así, se procedió a determinar el efecto de la adición de  $\text{NO}_3^-$  sobre la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  medida de manera simultánea al  $E_m$  mediante microelectrodos selectivos para  $\text{Na}^+$ . El experimento reveló un incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol de  $0.4 \pm 0.2 \text{ mM}$  (sobre un valor de  $17 \pm 2 \text{ mM Na}^+$ ) al añadir  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$ . Este aumento se mantuvo estable hasta que el pulso de  $\text{NO}_3^-$  era retirado del medio de ensayo. Al mismo tiempo se registró la correspondiente despolarización del  $E_m$  por la adición de la concentración saturante de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 28).

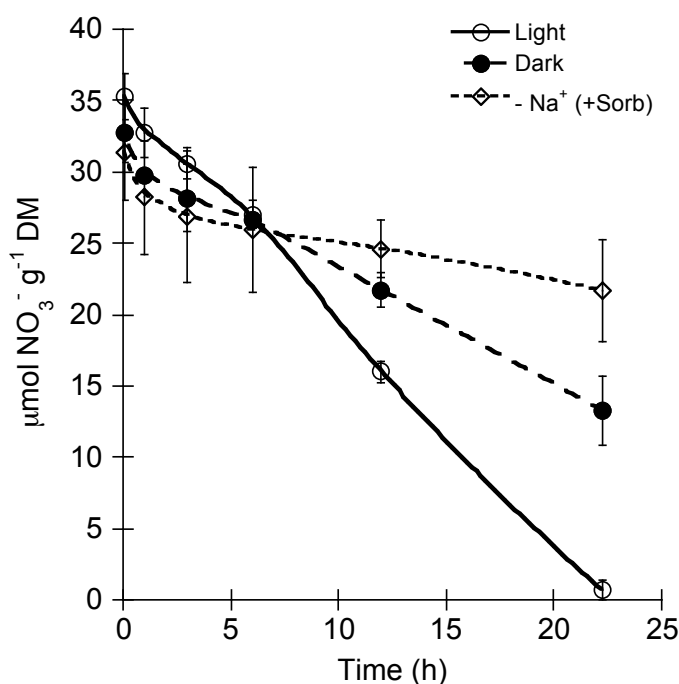


**Figure 28.** Effect of the addition of  $100 \mu\text{M KNO}_3$  on membrane potential ( $E_m$ ; black trace) and cytosolic  $\text{Na}^+$  concentration (blue trace) simultaneously measured in *P. oceanica* mesophyll leaf cells. The downward arrow indicates the addition of nitrate and the vertical line the onset of the wash. Traces are a representative example of 3 equivalent measurements.

Además de la medida directa en células del mesófilo foliar, se determinó la tasa neta de incorporación de nitrato en hojas incubadas en  $100 \mu\text{M NO}_3^-$  en presencia y ausencia de  $\text{Na}^+$  así como en condiciones de luz y oscuridad ( $500 \text{ mM NaCl}$  - luz,  $0 \text{ mM NaCl}$  - luz, y  $500 \text{ mM NaCl}$  - oscuridad). Al igual que en los experimentos anteriores, las plantas fueron preincubadas en ausencia de N durante 14 días previos a la realización del experimento. Tal como muestra la Figura 29 en presencia de  $500 \text{ mM NaCl}$  y luz (control) el contenido inicial de  $\text{NO}_3^-$  del medio disminuyó de forma prácticamente lineal a lo largo del tiempo, agotándose a las 22 horas de incubación. En condiciones de oscuridad ( $500 \text{ mM NaCl}$  - oscuridad), se observó igualmente una disminución lineal en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  al inicio del experimento, si bien a partir de las dos horas se observó un descenso del contenido de  $\text{NO}_3^-$  en el medio de ensayo

## Resultados

más paulatino. Por su parte, en ausencia de  $\text{Na}^+$  (0 mM NaCl - luz) el contenido inicial de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó también linealmente durante las primeras 2 horas. Sin embargo, a partir de ese momento, el contenido de  $\text{NO}_3^-$  del medio se redujo en menor grado (Fig. 29). Estos resultados son consistentes con los descritos anteriormente en relación a las despolarizaciones inducidas por concentraciones micromolares de  $\text{NO}_3^-$  y sugieren el funcionamiento de un transportador de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*.



**Figure 29.** Nitrate uptake of *P. oceanica* leaves incubated in light (500 mM NaCl, open symbols), dark conditions (500 mM NaCl, close symbols) and in the absence of  $\text{Na}^+$  (0 mM NaCl + 800 mM Sorbitol – light, diamonds). Plants were starved from N during 14-17 days. At time 0, 100 μM  $\text{NaNO}_3$  or 100 μM  $\text{KNO}_3$  was added to ASW or ASW ( $\text{Na}^+$ -free), respectively. Samples of the assay media were taken at different times for  $\text{NO}_3^-$  analysis. Data are mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

Las tasas de incorporación se calcularon a partir de la pendiente de la recta obtenida por el ajuste lineal de los valores de concentración de  $\text{NO}_3^-$  observados en el medio y se expresaron en función de la biomasa seca (DM). Los valores obtenidos, reflejados en la Tabla 6, mostraron diferencias significativas para cada uno de los tratamientos respecto al control ( $p < 0.001$ ). En presencia de 500 mM NaCl - luz, el valor calculado fue el mayor de los observados en los tres tratamientos. En condiciones de oscuridad, la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó en un 50 % con respecto al valor obtenido en ASW en luz, mientras que en ausencia de  $\text{Na}^+$  la tasa de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó en un 80 % con respecto al control (Tab. 6).

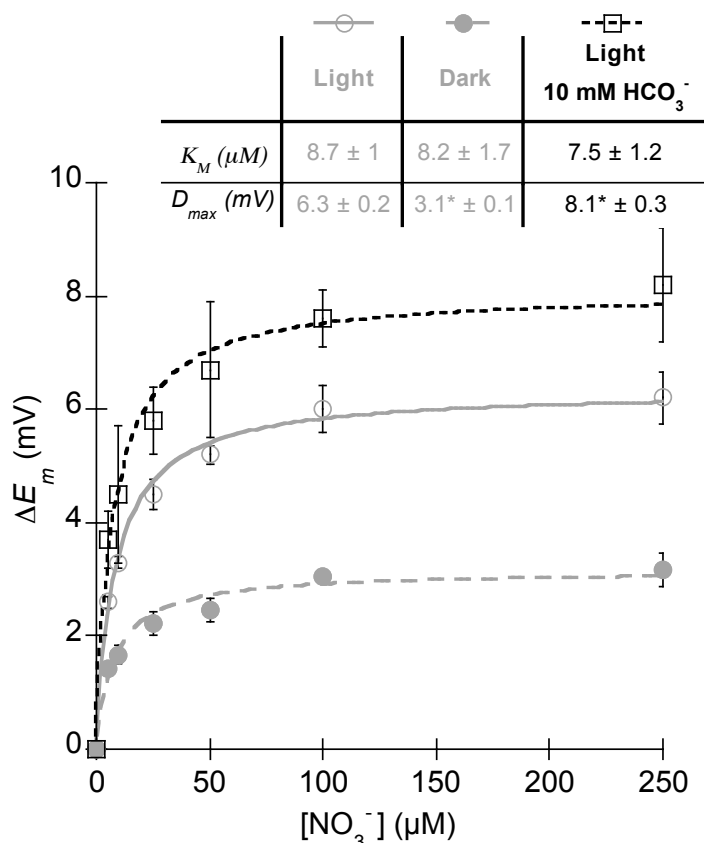
**Table 6.** Nitrate net uptake rates of *P. oceanica* leaves. N-starved plants were incubated in artificial seawater (ASW) containing 500 mM NaCl and Na<sup>+</sup>-free ASW in which NaCl was substituted by 0.8 M sorbitol. Net uptake rates were calculated as the slope of the linear phase of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> depletion curve within the 1 - 22h after the addition of 100 μM NaNO<sub>3</sub> or 100 μM KNO<sub>3</sub>. Data are mean ± SD (n=3). Asterisks indicate significant differences with respect to the control (Student's *t*-test; *p*<0.01).

	500 mM Na <sup>+</sup>		0 mM Na <sup>+</sup>
	Light (CONTROL)	Dark	Light
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Net Uptake Rate (μmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> )	1.54 ± 0.1	0.73* ± 0.23	0.29* ± 0.03

#### 4.1.2 Efecto del incremento de la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre la cinética de incorporación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

Para una mayor caracterización del transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se probó el efecto del aumento de la concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el ASW hasta 10 mM sobre las despolarizaciones inducidas por concentraciones crecientes de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en condiciones de luz. En presencia de 10 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> el valor de  $E_m$  fue de  $-164 \text{ mV} \pm 7 \text{ mV}$  (n=11), similar (*p*=0.189) al observado en los experimentos descritos anteriormente en NSW suplementada con 3 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $E_m = -162 \text{ mV} \pm 2 \text{ mV}$ ; Fig. 19). No obstante, en ASW con 10 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> la magnitud de las despolarizaciones inducidas por la adición de concentraciones crecientes de nitrato, en rango micromolar, fue mayor que los valores registrados en ASW con 2 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig. 30). Así mismo, los valores de dichas despolarizaciones también se saturaron respecto a la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> añadida. El ajuste al modelo de Michaelis & Menten mostró un valor de  $D_{max} = 8.1 \pm 0.3 \text{ mV}$  (n= 3) mayor que el obtenido en condiciones control (*p*<0.001) y un valor similar para la constante de semisaturación ( $K_M = 7.5 \pm 1.2 \text{ μM}$ , n = 3, *p*=0.445).

## Resultados



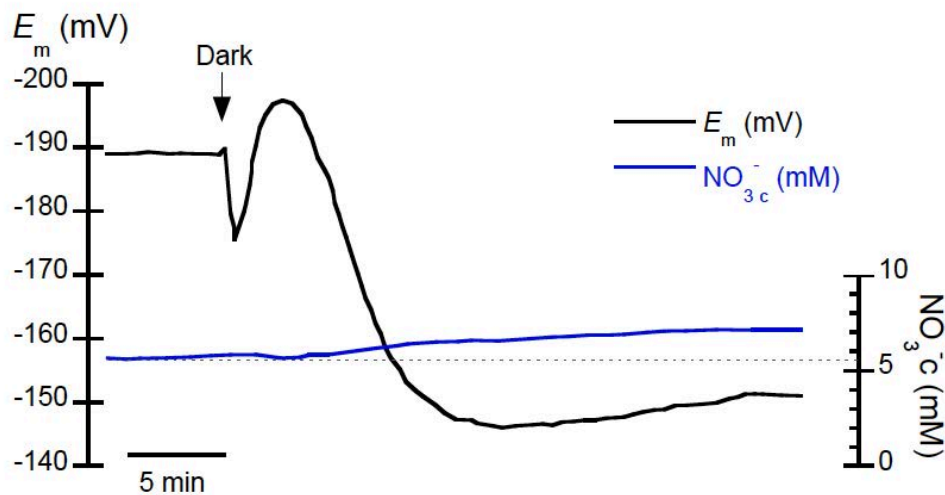
**Figure 30.** Membrane depolarizations ( $\Delta E_m$ ) induced by increasing  $\text{NaNO}_3$  concentrations in mesophyll leaf cells of *P. oceanica*. Assays were performed in artificial seawater ASW containing 2 mM  $\text{NaHCO}_3$  under light (control condition, grey continuous line) or dark conditions (grey discontinuous line) and in ASW containing 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  under light conditions (dotted line). Plants were N-starved for 14-17 days before the experiments. Data are mean  $\pm$  SD of 3 independent replicates. Kinetics parameters, shown in the table, were obtained by curve fitting to the Michaelis & Menten model ( $R^2 = 0.993$  light,  $R^2 = 0.975$  dark and  $R^2 = 0.986$  light-10 mM  $\text{HCO}_3^-$ ). Asterisks indicate significantly different values with respect to the control (Student's *t*-test;  $p = 0.005$ ).

### 4.1.3 Medida de la concentración citosólica de $\text{NO}_3^-$

Dado el efecto de la presencia-ausencia de luz, así como del incremento de  $\text{HCO}_3^-$  sobre el transporte de  $\text{NO}_3^-$ , se procedió a analizar el impacto de ambas variables sobre la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*.

En primer lugar se analizó el efecto de la transición luz-oscuridad. En este caso, dicha transición provoca el incremento transitorio del  $\text{CO}_2$  (y  $\text{HCO}_3^-$ ) dada la interrupción de la asimilación fotosintética de  $\text{CO}_2$  en oscuridad. Las medidas se realizaron en células del mesófilo foliar de plantas incubadas en NSW con microelectrodos selectivos para  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 31).

En estas condiciones (NSW), la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^-]_c$ ) resultó ser de  $5.7 \pm 0.2$  mM ( $n=10$ ). Al apagar la luz se observó la rápida despolarización inicial seguida de la hiperpolarización y posterior despolarización lenta, descrita anteriormente y característica de las células fotosintéticas. Por su parte, la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  comenzó a aumentar de manera simultánea a la despolarización lenta de la membrana, hasta llegar a un valor estable de  $8.5 \pm 1.1$  mM ( $n=5$ ) (Fig. 31).



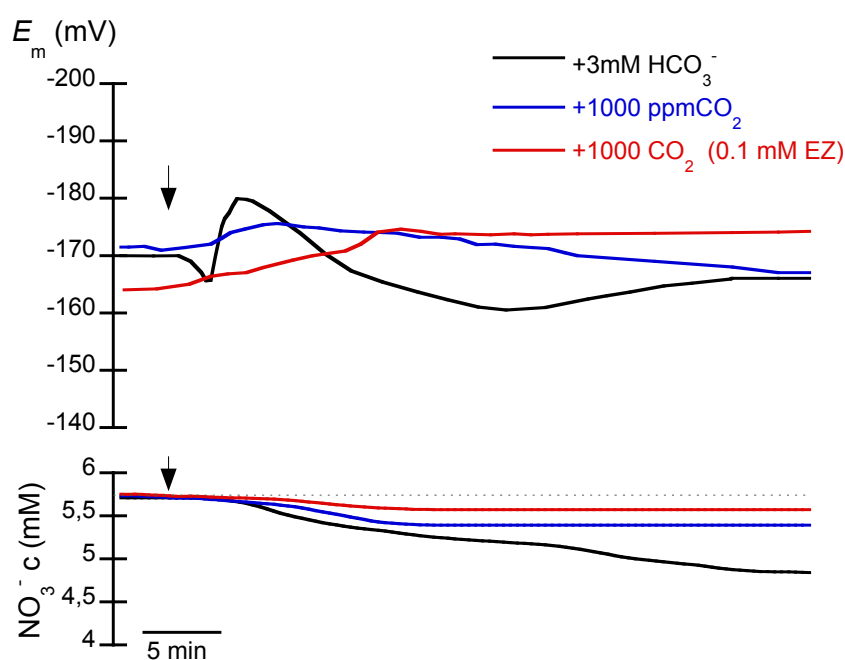
**Figure 31.** Effect of light - dark transition on membrane potential ( $E_m$ ) and  $\text{NO}_3^-$  cytosolic concentration of *P. oceanica* mesophyll leaf cells measured simultaneously in NSW. Traces are representative record of 5 similar experiments.

Este resultado sugiere que el incremento transitorio de la concentración de C inorgánico ( $C_i$ ) en el citosol, debido a la ausencia de fotosíntesis en oscuridad, podría tener un efecto sobre la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Así, se procedió al análisis del efecto del incremento de  $C_i$  en NSW sobre la concentración de citosólica de  $\text{NO}_3^-$ .

En primer lugar se analizó el efecto de la adición de 3 mM de  $\text{HCO}_3^-$  al medio de ensayo (NSW), dando lugar a una concentración final de 5 mM de  $\text{HCO}_3^-$ . Según se observa en la Figura 32, el incremento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el medio provocó una disminución paulatina de la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  ( $5.7 \pm 0.2$  mM) de manera simultánea a la despolarización lenta de la membrana descrita anteriormente, alcanzándose un valor de  $[\text{NO}_3^-]_c$  de  $4.8 \pm 0.7$  mM al cabo de 40 minutos en presencia de 5 mM de  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 32).

## Resultados

Por otra parte, el aumento de la concentración de  $C_i$  también se realizó mediante el burbujeo del medio de ensayo (NSW) con aire con 1000 ppm  $\text{CO}_2$ . En este caso, el incremento de la concentración de  $C_i$  del medio también provocó la disminución paulatina de la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$ . Sin embargo, en estas condiciones la disminución fue menor que en el caso del incremento del  $C_i$  en forma de  $\text{HCO}_3^-$ , manteniendo una  $[\text{NO}_3^-]_c$  en torno a 5.5 mM tras 40 min de tratamiento con 1000 ppm de  $\text{CO}_2$  (Fig. 32). En el caso del  $E_m$ , tal como se ha descrito en la Figura 20, tras la adición de 1000 ppm  $\text{CO}_2$  se observó una pequeña hiperpolarización seguida de una pequeña despolarización (Fig. 32). Finalmente, se repitió el experimento añadiendo 1000 ppm de  $\text{CO}_2$  al medio en presencia de EZ, inhibidor de la CA permeable a membranas. En este caso, la respuesta del  $E_m$  fue una hiperpolarización más lenta, aunque de mayor duración, que la observada en ausencia de EZ, obteniéndose un valor de  $E_m$  en torno a -175 mV al cabo de 15 minutos en presencia de 1000 ppm de  $\text{CO}_2$ , valor que se mantuvo constante hasta el final del ensayo. Por su parte, la adición de 1000 ppm  $\text{CO}_2$  en presencia de EZ provocó una ligera disminución de la  $[\text{NO}_3^-]_c$ , hasta un valor en torno a 5.6 mM, que se mantuvo hasta el final del experimento (Fig. 32).



**Figure 32.** Membrane potential ( $E_m$ ) and cytosolic  $\text{NO}_3^-$  concentration of *P. oceanica* mesophyll leaf cells measured simultaneously in NSW. Effect of addition (downward arrows) of 3 mM  $\text{NaHCO}_3$  (black line), 1000 ppm  $\text{CO}_2$  (blue line) or 1000 ppm  $\text{CO}_2$  to the assay media (NSW) containing 0.1 mM of the membrane permeable CA inhibitor EZ (red line). Traces are representative records of 3 similar experiments for each condition.

Estos resultados parecen indicar que la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  podría estar regulada por el  $C_i$ , principalmente en forma de  $\text{HCO}_3^-$ , lo que sugiere la actividad de canales aniónicos de tipo S (*Slow*). Tales canales se abren en respuesta a alto  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{pH}_c$  alcalino, cuando la membrana se despolariza (Roberts, 2006; Roelfsema *et al.*, 2012). Dichas condiciones parecen ser similares a las observadas en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* en respuesta al incremento de  $\text{HCO}_3^-$  en NSW, de manera que la disminución de la concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  se debería a la activación de tales canales aniónicos de tipo S.

## 4.2 Incorporación de fósforo inorgánico ( $P_i$ )

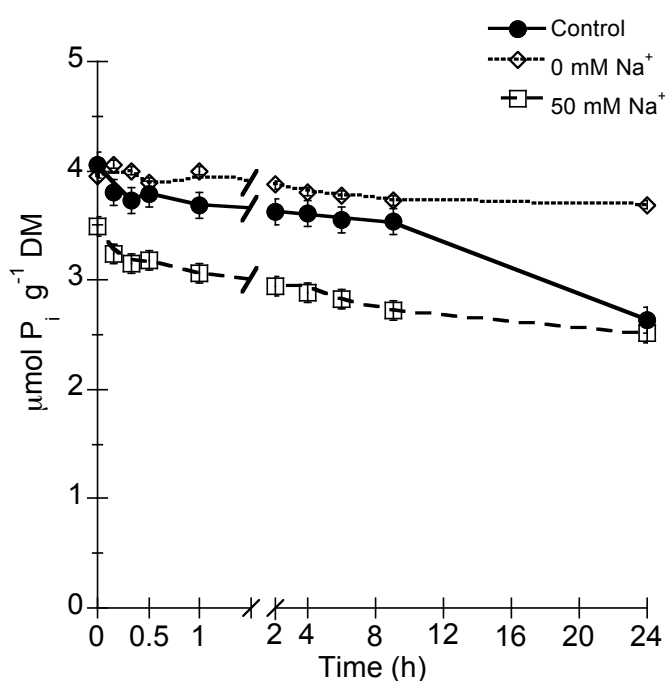
Al igual que en el caso del  $\text{NO}_3^-$ , el estudio del transporte de  $P_i$  en hojas de *P. oceanica*, comenzó analizando el efecto de la adición de concentraciones micromolares de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  sobre el potencial de membrana de células del mesófilo foliar de plantas preincubadas en ASW sin  $P_i$  durante al menos 5 días. Una vez alcanzada una medida de  $E_m$  estable en ASW, la adición de concentraciones micromolares de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en el rango 5-250  $\mu\text{M}$ , no originó variación observable de dicho potencial de membrana. La prolongación del tiempo de mantenimiento en ausencia de  $P_i$  hasta un máximo de 18 días no tuvo ningún efecto. La ausencia de despolarizaciones inducidas por  $P_i$  sugiere que este ión podría ser incorporado a través de un sistema eléctricamente silencioso.

### 4.2.1 Determinación de la tasa de incorporación de $P_i$ . Efecto del $\text{Na}^+$

Puesto que la adición de concentraciones micromolares de  $P_i$  al agua de mar no dio lugar a despolarizaciones de la membrana de células del mesófilo foliar de *P. oceanica*, se procedió a estudiar su incorporación mediante experimentos de depleción de  $P_i$  del medio de incubación. Así, se analizó la variación de  $P_i$  en el medio de ensayo (ASW) a lo largo del tiempo tras la adición de 10  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El experimento se realizó en hojas mantenidas en deficiencia de  $P_i$  durante 7 días. Además, se determinó si la incorporación de este nutriente era dependiente de la presencia de  $\text{Na}^+$  realizando el mismo ensayo en ASW en la que se sustituía el  $\text{NaCl}$  (500 mM) por 500 mM cloruro de colina, así como en presencia de 50 mM de  $\text{NaCl}$  y 450 mM cloruro de colina.

## Resultados

En condiciones control (ASW - 500 mM Na<sup>+</sup>), la concentración inicial de P<sub>i</sub> en el medio disminuyó significativamente ( $p = 0.002$ ) a lo largo del tiempo de incubación, si bien no llegó a agotarse aún transcurridas 24h. En estas condiciones, la disminución del P<sub>i</sub> del medio de ensayo fue más rápida durante la primera hora, observándose seguidamente una menor pendiente en la curva de depleción. En las últimas 12h del experimento se registró de nuevo un aumento de la pendiente, llegando a disminuir al final del ensayo un 34% del contenido inicial de P<sub>i</sub> en el medio (Fig. 33). En ausencia de Na<sup>+</sup> (ASW + colina), el contenido de P<sub>i</sub> apenas varió en las 24h que duró el experimento, disminuyendo tan sólo un 7% del contenido inicial de P<sub>i</sub>. Por su parte, en las hojas incubadas con ASW en la que se restauró parcialmente la concentración de NaCl (50 mM), se observó nuevamente la disminución del contenido de P<sub>i</sub> (Fig. 33). Este decremento fue menos acusado que en condiciones control y se mantuvo prácticamente lineal a lo largo de las 24h de duración del experimento, hasta llegar a disminuir un 21% del contenido inicial de P<sub>i</sub> en el medio de ensayo (Fig. 33).



**Figure 33.** P<sub>i</sub> depletion from different assay media in which 5 days P-starved *P. oceanica* leaves were incubated. Assay media consisted of ASW containing 500 mM NaCl (control, black circles), 500 mM choline chloride (0 mM Na<sup>+</sup>, open diamonds) or 450 mM choline chloride plus 50 mM NaCl (white squares). At initial time 10 µM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> was added to each medium and then samples of the assay media were taken at different times to further P<sub>i</sub> concentration analysis. Data are mean ± SD (n=3).



Las tasas de incorporación se determinaron como la pendiente de la recta tangente a la curva de depleción de  $P_i$  en la primera hora de ensayo (Tabla 7). En condiciones control se observó la mayor tasa de incorporación de los tres tratamientos, mientras que en ausencia de  $Na^+$  la incorporación de  $P_i$  se redujo significativamente hasta un valor próximo a cero ( $p < 0.001$ ). En presencia de 50 mM de  $Na^+$  el valor de la tasa de incorporación de  $P_i$  fue similar al observado en condiciones control ( $p = 0.386$ ).

**Table 7.**  $P_i$  net uptake rates in leaves of *P. oceanica* starved of  $P_i$  during 7 days in ASW. Values were calculated as the slope of the linear phase of  $P_i$  depletion curve within the first 24h after the addition of 10  $\mu M$   $KH_2PO_4$ . Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Asterisk indicates significant differences with respect to the control conditions (Student's *t*-test;  $p < 0.001$ ).

	500 mM $Na^+$ (Control)	0 mM $Na^+$	50 mM $Na^+$
$P_i$ Net Uptake Rate ( $\mu mol P_i g^{-1} DM h^{-1}$ )	$0.45 \pm 0.08$	$0.09^* \pm 0.04$	$0.39 \pm 0.03$

Al igual que se ha descrito en el caso de la incorporación de  $NO_3^-$ , la ausencia de variación de la concentración de  $P_i$  en el medio de ensayo sin  $Na^+$  sugiere que el sistema que media la incorporación de  $P_i$  en hojas de *P. oceanica* también dependería de  $Na^+$ .

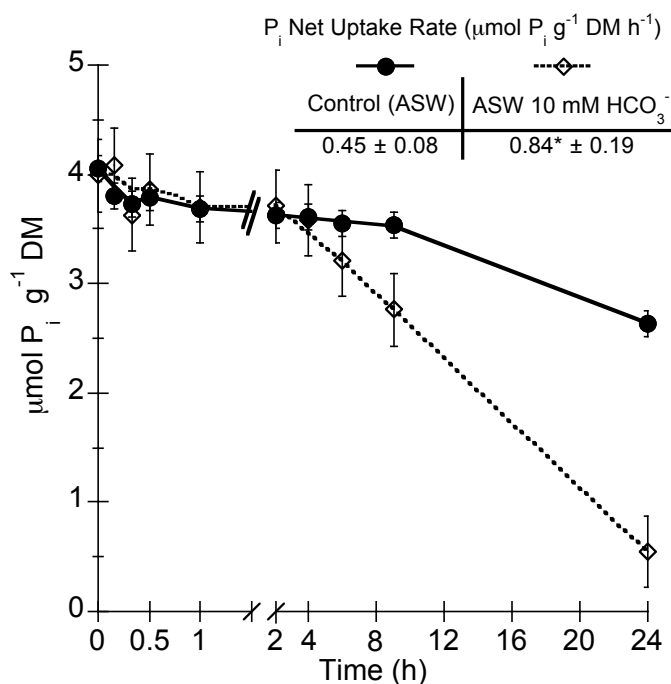
#### 4.2.2 Efecto del incremento de la concentración de $HCO_3^-$ sobre la incorporación de $P_i$

Al objeto de estudiar el efecto del incremento de  $HCO_3^-$  en el medio sobre la incorporación neta de  $P_i$  se midió dicha tasa mediante experimentos de depleción. Así, se analizó la variación de  $P_i$  a lo largo del tiempo en ASW, que se consideró como control, y en ASW con 10 mM  $HCO_3^-$  tras la adición de 10  $\mu M$   $P_i$ . El experimento se realizó en hojas mantenidas en deficiencia de  $P_i$  durante 7 días.

Tal como se describe el apartado anterior, en condiciones control (ASW), el contenido inicial de  $P_i$  en el medio disminuyó en la primera hora de ensayo, siendo durante las últimas 12h del experimento cuando se registró la mayor pendiente de la curva de depleción, disminuyendo hasta un 34% del contenido inicial de  $P_i$ . (Fig. 34). En ASW con 10 mM  $HCO_3^-$  la concentración de  $P_i$  en el medio durante la primera hora de ensayo siguió un patrón similar al observado en condiciones control. Sin embargo, a partir de la segunda hora de experimento se observó un incremento en la incorporación de  $P_i$  en presencia de 10 mM  $HCO_3^-$  respecto a las condiciones control, incorporándose un 86% del contenido inicial de  $P_i$  transcurridas 24h.

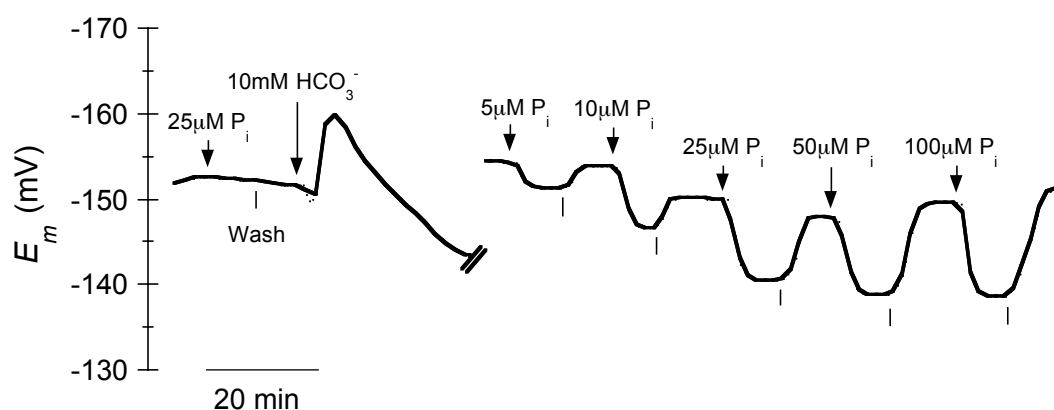
## Resultados

Estos resultados indican que tras la exposición de unas dos horas a una elevada concentración de  $\text{HCO}_3^-$  la tasa de incorporación de  $\text{P}_i$  en hojas de *P. oceanica*, calculada como la pendiente de la recta tangente a la curva de depleción, aumenta. En condiciones control, el valor de dicha tasa de incorporación resultó de  $0.45 \pm 0.08 \mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ , mientras que en alto bicarbonato fue casi el doble,  $0.84 \pm 0.19 \mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$  (Fig. 34).



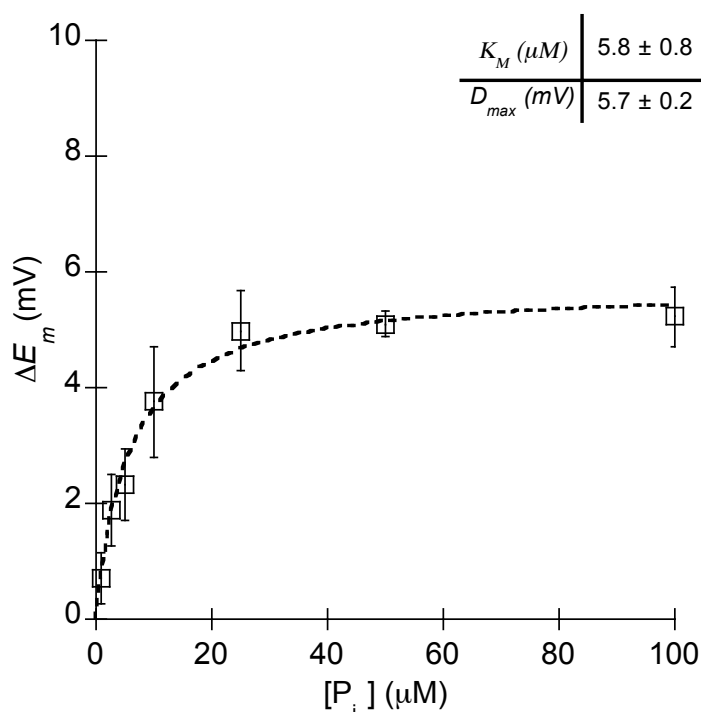
**Figure 34.**  $\text{P}_i$  uptake in *P. oceanica* leaves maintained in ASW (control) and ASW containing 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Plants were starved of  $\text{P}_i$  during 7 days before the experiment in ASW  $\text{P}_i$ -free. Leaves were incubated in  $10 \mu\text{M NaH}_2\text{PO}_4$ -ASW, and samples of the assay media were taken at different times. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).  $\text{P}_i$  net uptake rates calculated as the slope of the linear phase of  $\text{P}_i$  depletion curves are shown in the table. Asterisk indicates significant difference at  $p < 0.001$  (Student's  $t$  - test).

Dada la mayor incorporación de  $\text{P}_i$  detectada en presencia de altas concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  se decidió analizar el efecto del incremento de  $\text{C}_i$  (hasta una concentración de 10 mM  $\text{HCO}_3^-$ ) sobre la variación del  $E_m$  de células del mesófilo foliar de plantas preincubadas en ausencia de  $\text{P}_i$  en respuesta a la adición de  $\text{P}_i$  al medio de ensayo. Una vez obtenido un  $E_m$  estable en ASW con 10 mM  $\text{HCO}_3^-$  ( $-164 \pm 7 \text{ mV}$ ), la adición de pulsos de concentraciones crecientes de  $\text{P}_i$  al medio de ensayo, en el rango 1-100  $\mu\text{M}$ , provocó la despolarización creciente de la membrana en función de la concentración añadida. Dichas variaciones del  $E_m$  oscilaron entre 1 y 6 mV, incrementando su magnitud con el aumento de la concentración ensayada hasta saturarse en torno a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$  (Fig. 35).



**Figure 35.** Membrane potential ( $E_m$ ) changes induced by the addition of  $P_i$  micromolar concentrations in ASW (control) and in ASW containing 10 mM  $HCO_3^-$ . Plants were starved of  $P_i$  during 5 - 9 days before the experiments. Downward arrows indicate the addition of  $P_i$  or  $HCO_3^-$  and vertical lines the onset of the washes. Representative record of 3 similar experiments is shown.

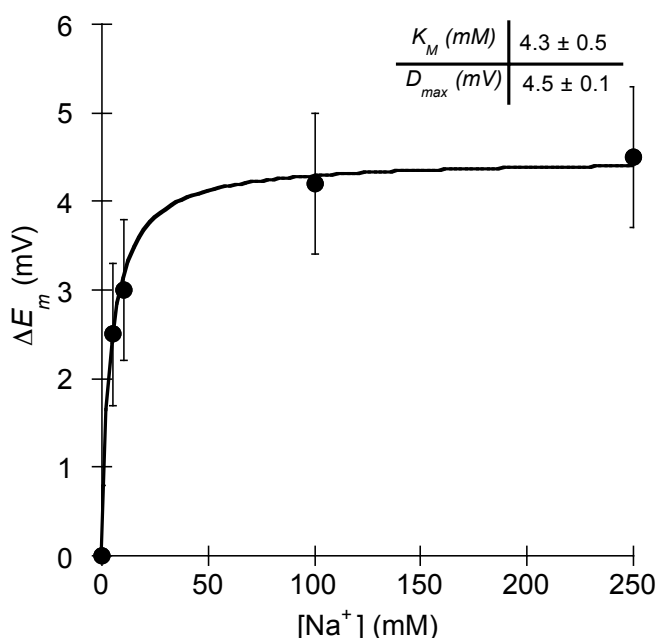
El ajuste de los valores al modelo de Michaelis & Menten (Fig. 36) permitió el cálculo de los parámetros cinéticos,  $K_M = 5.8 \pm 0.8 \mu M$  y  $D_{max} = 5.7 \pm 0.2 mV$ . Este bajo valor de la constante de semisaturación indica que la incorporación de  $P_i$  en *P. oceanica* en presencia de 10 mM  $HCO_3^-$  ocurre a través de un transportador de alta afinidad.



**Figure 36.** Membrane depolarizations of *P. oceanica* mesophyll leaf cells induced by the addition of micromolar concentrations of  $NaH_2PO_4$  (range 1 - 100  $\mu M$ ) in ASW containing 10 mM  $NaHCO_3$ . Plants were maintained in  $P_i$ -free ASW during 5 - 9 days before experiments. Data are mean  $\pm$  SD (n=3). Values were fitted to the Michaelis & Menten model ( $R^2 = 0.984$ ) and kinetics parameters are shown in the table.

### 4.2.3 Efecto del $\text{Na}^+$ sobre la cinética de incorporación de $\text{P}_i$ en alto $\text{HCO}_3^-$

Al objeto de estudiar la dependencia de  $\text{Na}^+$  del transporte de  $\text{P}_i$ , se analizó el efecto de la ausencia de  $\text{Na}^+$  sobre las despolarizaciones observadas. Para ello se sustituyó el NaCl (500 mM) por 800 mM sorbitol en el ASW con 10 mM de  $\text{KHCO}_3$ . El  $E_m$  observado en ASW sin  $\text{Na}^+$  (+ Sorbitol) y con 10 mM  $\text{HCO}_3^-$  fue de  $-144 \pm 9$  mV ( $n=13$ ), significativamente menor que en el mismo medio con 500 mM de  $\text{Na}^+$  ( $-164 \pm 7$  mV;  $p < 0.001$ ). En ausencia de  $\text{Na}^+$ , la adición de 25  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ , concentración saturante del transporte, no indujo la despolarización previamente registrada en condiciones de alto  $\text{HCO}_3^-$  y en presencia de  $\text{Na}^+$  en el medio. El aumento de la concentración externa de NaCl en el rango 5 - 250 mM, provocó la restauración de las despolarizaciones inducidas tras la adición de 25  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ . Tales despolarizaciones fueron mayores cuanto mayor fue la presencia de NaCl en el ASW-10 mM  $\text{HCO}_3^-$ , llegando a saturarse a una concentración próxima a 50 mM de  $\text{Na}^+$ . Ajustando las despolarizaciones observadas al modelo de Michaelis & Menten (Fig. 37) se obtuvieron los parámetros  $K_M = 4.3 \pm 0.5$  mM y  $D_{max} = 4.5 \pm 0.1$  mV para el ión  $\text{Na}^+$ . Estos resultados sugieren que la incorporación alta afinidad de  $\text{P}_i$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* estaría mediado por un simporte  $\text{Na}^+/\text{P}_i$ .

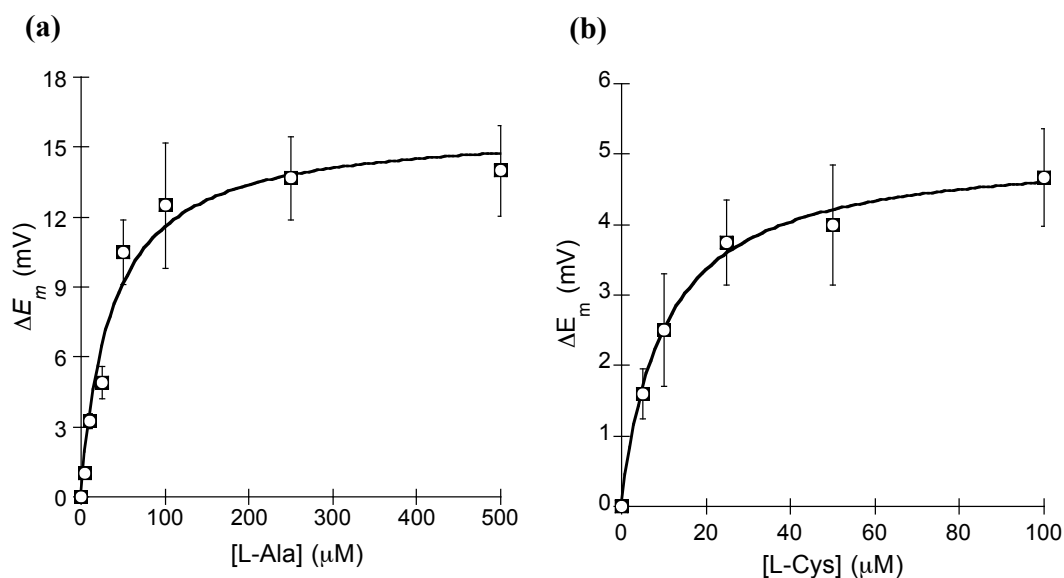


**Figure 37.** Effect of increasing external  $\text{Na}^+$  concentrations on membrane depolarizations induced by the addition of 25  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  to ASW containing 10 mM  $\text{KHCO}_3$ . Data are mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Values were fitted to the Michaelis & Menten model ( $R^2 = 0.997$ ) and kinetics parameters are shown in the table. Plants were starved of  $\text{P}_i$  during 5-9 days before experiments. Leaf sections were maintained in the assay medium under continuous flow ( $2 \text{ ml min}^{-1}$ ) for 2h before the beginning of each experiment.

### 4.3 Incorporación de aminoácidos (L-Ala & L-Cys). Efecto del $\text{Na}^+$

Para determinar la existencia de otros sistemas de transporte impulsados por  $\text{Na}^+$  en *P. oceanica*, se estudió la incorporación de aminoácidos. Para ello, inicialmente se probó el efecto de la adición de concentraciones micromolares de los 20 aminoácidos sobre el  $E_m$ , detectándose una variación del mismo (despolarización) únicamente para los aminoácidos alanina (L-Ala) y cisteína (L-Cys). Previamente las hojas se mantuvieron en deficiencia de N durante 7-10 días.

Al igual que en el caso del  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{P}_i$ , la adición de concentraciones crecientes de L-Ala y L-Cys provocó despolarizaciones de la membrana de las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* de magnitud creciente en función de la concentración añadida. En ambos casos, la magnitud de las despolarizaciones se saturó, si bien para la L-Ala la concentración de saturación fue mayor que para la L-Cys (100  $\mu\text{M}$  L-Ala y 40  $\mu\text{M}$  L-Cys, respectivamente). Los valores de despolarización respecto a la concentración de cada aminoácido se ajustaron al modelo de Michaelis & Menten (Fig. 38).



**Figure 38.** Membrane potential changes of *P. oceanica* mesophyll leaf cells induced by the addition of increasing L-Ala (a) or L-Cys (b) micromolar concentrations to the assay medium (ASW). Plants were N-starved during at least 7 days before experiments. Data are mean  $\pm$  SD ( $n=5$ ). Values were fitted to the Michaelis & Menten model (L-Ala:  $R^2 = 0.973$ ; L-Cys:  $R^2 = 0.995$ ).

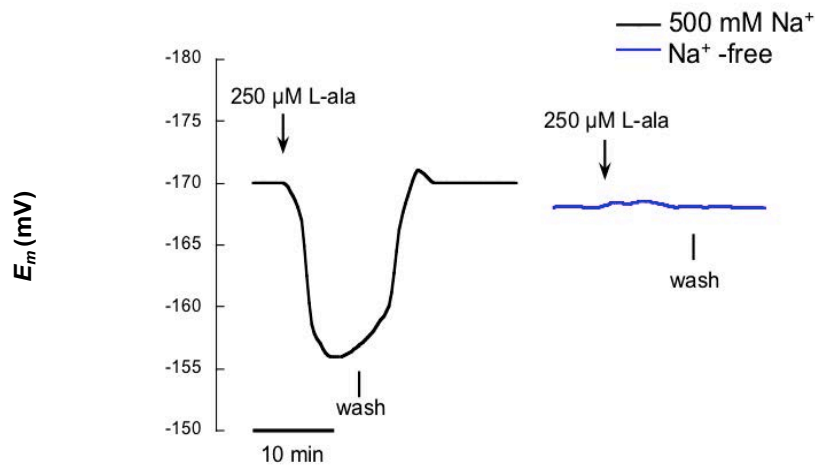
## Resultados

Los parámetros del ajuste al modelo de Michaelis & Menten (Tab. 8) revelaron una mayor constante de semisaturación ( $K_M$ ) para L-Ala ( $37 \pm 11 \mu\text{M}$ ) que para L-Cys ( $10 \pm 1 \mu\text{M}$ ), si bien ambos valores sugieren la existencia de un sistema de transporte de alta afinidad. Por otra parte, el valor de despolarización máxima ( $D_{max}$ ) también fue menor en el caso del aminoácido L-Cys ( $5 \pm 0.2 \text{ mV}$ ), respecto al obtenido en el caso de L-Ala, con una  $D_{max} = 16 \pm 1.2 \text{ mV}$ . En este sentido, la menor afinidad encontrada para la incorporación de este aminoácido, podría estar compensada con un mayor número de transportadores.

**Table 8.** Kinetics parameters for L-Ala and L-Cys membrane potential induced depolarization in N-starved mesohyll leaf cells of *P. oceanica*. Data are mean  $\pm$  SD of five independent experiments.

	L-Ala	L-Cys
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$37 \pm 11$	$10 \pm 11$
$D_{max}$ (mV)	$16 \pm 1.2$	$5 \pm 0.2$

Por otro lado, la carga eléctrica que presentan ambos aminoácidos al pH del agua de mar (8.2) dado sus puntos isoeléctricos ( $pI_{\text{L-Ala}} = 6.02$ ,  $pI_{\text{L-Cys}} = 5.02$ ), es negativa. Por tanto, para que pueda ser registrada una despolarización de la membrana, es necesario que su entrada se vea acoplada a un flujo de carga neta positiva. Así, al estudiar el efecto del  $\text{Na}^+$  sobre la incorporación de estos aminoácidos retirando el NaCl del medio de ensayo (ASW en la que se sustituye el NaCl, 500 mM, por sorbitol, 800 mM), se observó la ausencia de las despolarizaciones anteriormente registradas por la adición de la concentración saturante de cada aminoácido, 250  $\mu\text{M}$  en el caso de la L-Ala y 100  $\mu\text{M}$  en el caso de la L-Cys (Fig. 39).



**Figure 39.** Membrane potential ( $E_m$ ) changes in *P. oceanica* mesophyll leaf cells induced by the addition of L-Ala measured in ASW (control; black line) and  $\text{Na}^+$ -free ASW (+800 mM Sorbitol) (blue line). Plants were N-starved during 7 - 11 days before experiments. Traces are representative record of 5 equivalent experiments.

Este resultado sugiere que, al igual que en el caso del  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{P}_i$ , la incorporación de los aminoácidos L-Ala y L-Cys en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* también estaría mediada por un sistema de cotransporte con  $\text{Na}^+$ .



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



## DISCUSIÓN



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## 1 Energética del plasmalema y permeabilidad relativa $P_{Na^+}/P_{K^+}$

El potencial de membrana ( $E_m$ ) medido en células del mesófilo foliar de *Posidonia oceanica* en NSW es  $-174 \pm 4$  mV ( $n = 26$ ), un valor que es más negativo que el observado en las angiospermas marinas *Zostera marina* ( $-156 \pm 10$  mV; Fernández *et al.*, 1999) y *Cymodocea nodosa* ( $-160$  mV; resultados del grupo no publicados). Además, es más negativo que el descrito para la mayoría de las algas marinas ( $E_m \approx -140$  mV, Gutknecht & Dainty, 1968; Gradmann & Boyd, 1995), aunque es similar al observado en el alga verde *Acetabularia mediterranea* L. ( $E_m = -170$  mV; Gradmann & Bentrup, 1970).

Por su parte, el  $E_m$  de la raíz de plántulas de *P. oceanica* ( $-140 \pm 6$  mV), es similar al encontrado en las células de la epidermis radicular de *Z. marina* ( $-150 \pm 11$  mV; Rubio *et al.*, 2005), y que el observado en otras halófitas como *Atriplex lentiformis* y *Chenopodium quinoa*, con valores de  $-144 \pm 3.3$  mV y  $-138 \pm 5.4$  mV respectivamente (Bose *et al.*, 2015) o como *Halimione (=Atriplex) portulacoides* ( $E_m = -140$  mV; Ait-Hammou, 2014).

Las plantas marinas están sometidas a un elevado gradiente de potencial electroquímico para el  $Na^+$  dirigido hacia el interior celular, lo que podría resultar en una acumulación de  $Na^+$  en el citosol potencialmente dañina, y en valores de potenciales de membrana poco negativos. Por el contrario, la concentración de iones presente en plantas de agua dulce favorece voltajes muy negativos. Así, potenciales de membrana tan negativos o incluso más son habituales en plantas de agua dulce como la hepática *Riccia fluitans* L. ( $E_m = -230$  mV Felle & Bentrup, 1976; Felle, 1981) o el alga *Chara corallina* ( $E_m = -230$  mV; Mimura *et al.*, 1998).

Por otro lado, el valor de  $E_m$  de las células de las hojas de *P. oceanica* es similar al típicamente descrito para las plantas vasculares de agua dulce como es el caso de *Lemna gibba* ( $E_m = -175$  mV; Novacky *et al.*, 1978), o *Elodea densa* ( $E_m = -160$  mV; Miedema *et al.*, 1992).

### 1.1 *P. oceanica* conserva una $H^+$ -ATPasa como bomba primaria

Teniendo en cuenta que las fanerógamas marinas son angiospermas, la bomba primaria de la membrana plasmática debiera ser una  $H^+$ -ATPasa, que energizaría la membrana y la actividad de co-transportadores con  $H^+$ . Sin embargo, ya que el agua de mar tiene un pH entre 7.9 y 8.2 y una concentración de NaCl en torno a 0.5 M, el  $Na^+$  podría ser mejor ión que el  $H^+$  para energizar el transporte de nutrientes, como se ha observado en *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). No obstante, dada la toxicidad del  $Na^+$ , sería necesario la actividad de sistemas que eviten una excesiva acumulación interna del ión. Sin embargo, aún no se ha descrito ninguna bomba de  $Na^+$  en plantas vasculares (Pedersen *et al.*, 2012). Sólo en la microalga marina *Heterosigma akashivo* se ha descrito una bomba primaria, que utiliza la energía del ATP para la extrusión de  $Na^+$  en contra de gradiente (Shono *et al.*, 1995). En el alga marina *Acetabularia mediterranea* ha sido descrito otro tipo de bomba primaria la cual incorpora  $Cl^-$  en contra de gradiente de potencial electroquímico (Gradmann, 1989).

El estudio de la energización de la membrana plasmática en *P. oceanica* comenzó con la observación de la variación del  $E_m$  en respuesta a pulsos de luz - oscuridad (Figura 15). En ausencia de luz, cesa la actividad fotosintética y se acumula el  $CO_2$  en el citosol, lo que provoca la acidificación del mismo y la hiperpolarización inicial transitoria de la membrana debido a la salida del exceso de  $H^+$ . Rápidamente, la energía disponible en forma de ATP para la extrusión de  $H^+$  disminuye y cesa la actividad de la bomba primaria, lo que resulta en una lenta despolarización de la membrana. Este resultado, similar al descrito para *Z. marina* (Fernández *et al.*, 1999), estaría relacionado con la respuesta de la bomba primaria al cambio en la concentración de  $H^+$  ya que es el ión que transporta (Sanders *et al.*, 1981), pero también podría deberse a la acumulación de  $CO_2$  en el citosol o a la actividad de otro tipo de transportadores como los KEA ( $K^+$ -Efflux Antiporter) (Zhu *et al.*, 2018).

La Figura 16 muestra que la FC hiperpolariza la membrana plasmática de *P. oceanica*. Este resultado por sí solo no puede probar la activación de una  $H^+$ -ATPasa, ya que la FC activa las ATPasas de tipo P en general, lo que también incluye a la  $Na^+$ -ATPasa (Pedersen *et al.*, 2012). No obstante, la observación de la fuerte disminución de pH externo resulta ser una evidencia muy potente de que esta especie tiene una bomba de  $H^+$  que energiza la membrana plasmática.

## 1.2 *La permeabilidad a Na<sup>+</sup> respecto a K<sup>+</sup> del plasmalema es muy restringida*

Ya que *P. oceanica* es una angiosperma que se ha adaptado a la vida en el mar, es importante comprender cómo esta planta resuelve el problema del Na<sup>+</sup>, como ya ha sido estudiado en otras fanerógamas marinas (Fernández *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2005).

La magnitud de la despolarización de la membrana causada por el conjunto de inhibidores de la respiración NaCN/SHAM representa el componente metabólico o activo del  $E_m$ , mientras que el potencial residual que queda se denomina potencial de difusión ( $E_D$ ) y refleja la asimetría de los iones K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, y Cl<sup>-</sup> entre el citosol y el exterior de la célula (Nobel, 2009). En las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* el  $E_D$  observado es  $-77 \text{ mV} \pm 7 \text{ mV}$ . Por tanto, la variación del  $E_m$  que corresponde al componente metabólico del mismo es próxima a  $-100 \text{ mV}$ . Así, la H<sup>+</sup>-ATPasa, generaría la mayor proporción del  $E_m$  medido. Además, el valor de  $E_D$  observado en *P. oceanica*, es similar al descrito previamente en células del mesófilo foliar de *Z. marina* ( $E_D = -64 \pm 11 \text{ mV}$ ; Fernández *et al.*, 1999) y *C. nodosa* ( $E_D = -86 \text{ mV}$ ; resultados del grupo no publicados). Sin embargo, es menos negativo que el observado en el caso de la hepática de agua dulce *R. fluitans* ( $E_D = -111 \text{ mV}$ ; Felle, 1981). Las pequeñas variaciones observadas en los valores de  $E_D$  en fanerógamas marinas, podrían explicarse por una diferente restricción de la membrana a la entrada tanto de Na<sup>+</sup> como de Cl<sup>-</sup>, ambos iones presentes en el medio externo a una elevada concentración ( $[\text{NaCl}]_{\text{NSW}} = 500 \text{ mM}$ ). De hecho, uno de los mecanismos utilizados para evitar la toxicidad del Na<sup>+</sup> en el interior celular es restringir su permeabilidad a la membrana al objeto de mantener una elevada relación K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en el citosol (Maathuis & Amtmann, 1999; Shabala & Mackay, 2011). La relación  $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$  en *P. oceanica* es  $0.0046 \pm 0.0012$ , un valor particularmente bajo en comparación con las plantas vasculares terrestres incluidas halófitas (Tab. 9) y que indica una permeabilidad extraordinariamente pequeña para Na<sup>+</sup> respecto a la permeabilidad para K<sup>+</sup>. Dicho valor de permeabilidad relativa es similar al encontrado en *Z. marina* ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0.0033$ ; Fernández *et al.*, 1999) y *Cymodocea nodosa* ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+} = 0.015$ ; Rubio & Fernández, 2019), si bien dentro de las fanerógamas marinas esta última especie parece tener una mayor permeabilidad al Na<sup>+</sup> respecto a K<sup>+</sup> (Tab. 9).

## Discusión

**Table 9.** Plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  permeability ratios ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$ ) in seagrasses and terrestrial plants.

Species	$P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$	Reference
<i>Zostera marina</i> (Mesophyll leaf cells)	0.003	Fernández <i>et al.</i> , 1999
<i>Cymodocea nodosa</i> (Mesophyll leaf cells)	0.015	Rubio & Fernández, 2019
<i>Thellungiella halophylla</i> (Root protoplast)	0.12	Demidchik & Tester, 2002 Volkov <i>et al.</i> , 2003
<i>Halimione portulacoides</i> (Epidermal root cells)	0.19	Rubio <i>et al.</i> , 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Root protoplast)	0.67	Demidchik & Tester, 2002 Volkov <i>et al.</i> , 2003
<i>Posidonia oceanica</i> (Mesophyll leaf cells)	0.005	This work

Por otra parte, el valor de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol ( $[\text{Na}^+]_c$ ) en *P. oceanica* es de  $17 \pm 2$  mM, valor que se encuentra en el rango descrito para plantas vasculares terrestres que han crecido en concentraciones inferiores a 200 mM NaCl (Carden *et al.*, 2003; Tester & Davenport, 2003). Este bajo valor de actividad citosólica de  $\text{Na}^+$  (similar al de glicófitos) aún viviendo en un medio mucho más salino puede explicarse por una entrada restringida de  $\text{Na}^+$  hacia el citosol de las células de *P. oceanica*, como demuestra el bajo valor de permeabilidad relativa de  $\text{Na}^+$  respecto a  $\text{K}^+$  ( $P_{\text{Na}^+}/P_{\text{K}^+}$ ) descrito anteriormente.

Además de la restricción de la entrada de  $\text{Na}^+$ , también se ha descrito el papel de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática tipo *SOS1* para la extrusión de  $\text{Na}^+$  como mecanismo de tolerancia a la salinidad en los tejidos (Apse & Blumwald, 2007; Munns & Tester, 2008). La Figura 18 muestra el aumento de la  $[\text{Na}^+]_c$  hasta un valor de 20 mM por efecto de los inhibidores de la respiración NaCN/SHAM. Considerando un  $E_m = -174$  mV, en el caso de *P. oceanica* la entrada de  $\text{Na}^+$  hacia el citosol se produce a favor de gradiente de potencial electroquímico, con un valor de potencial de Nernst para  $\text{Na}^+$  ( $E_{\text{Na}^+}^N$ ) de 85 mV, si bien la entrada de  $\text{Na}^+$  en *P. oceanica* queda restringida a los canales no selectivos dependientes de voltaje (Carpaneto *et al.*, 2004).

Estos resultados sugieren que la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  estaría regulada por mecanismos activos, los cuales se inactivarían en presencia de los inhibidores de la respiración. Dado que no se han encontrado bombas de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ -ATPasas) en plantas vasculares (Garcia-deblás *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2012) el posible mecanismo activo que mantendría la concentración de sodio en *P. oceanica* podría ser un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , tal como se ha demostrado para *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2011) y se ha sugerido para *C. nodosa* (Piro *et al.*, 2015), si bien en esta última el antiportador estaría localizado en el tonoplasto. En el caso de *P. oceanica*, el incremento de la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  en presencia de inhibidores de la respiración (CN/SHAM) sugiere la implicación de mecanismos activos, que podrían operar tanto a nivel de plasmalema como de tonoplasto y que contribuirían a retirar  $\text{Na}^+$  del citosol, tal como se ha descrito en el caso del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática en *Z. marina* (Fernández *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2011).

## **2 Incorporación de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en *P. oceanica***

Las fanerógamas marinas pueden tener un crecimiento limitado por carbono (Beer *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos estudios muestran que el incremento de  $\text{CO}_2$  desde la época preindustrial a la concentración prevista para el año 2100 puede tener consecuencias sobre la fotosíntesis de las especies de fanerógamas marinas de aguas templadas (Borum *et al.*, 2016). Así, el aumento en la  $\text{pCO}_2$  puede afectar a la forma de incorporación del propio carbono inorgánico lo que podría implicar importantes cambios en la competencia por los recursos entre las diferentes especies de plantas marinas (Hughes *et al.*, 2017).

### 2.1 Incorporación directa de $\text{HCO}_3^-$ mediante un simporte $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ en células del mesófilo foliar

La mayoría de fanerógamas marinas parecen tener la capacidad de utilizar  $\text{HCO}_3^-$  para la fotosíntesis (Koch *et al.*, 2013). En *P. oceanica*, el estudio de la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  comenzó con la observación de que su adición al NSW no resultó en una acidificación del  $\text{pH}_c$  a medio plazo como era de esperar a raíz de la deshidratación externa de dicho ión y posterior transporte de  $\text{CO}_2$  por difusión al citosol (Raven & Beardall, 2016; Poschenreider *et al.*, 2018), sino en una acidificación transitoria seguida de una alcalinización que permaneció durante el tiempo en que se mantuvo el incremento de  $\text{HCO}_3^-$ . Esto conlleva consecuencias relevantes para explicar cómo el  $\text{HCO}_3^-$  es utilizado y transportado en esta especie.

En este sentido, varias evidencias sugieren la actividad de un simportador  $n\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$  en la membrana plasmática de las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Este modelo de simporte con  $\text{H}^+$  como mecanismo para la incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  ha sido revisado por Larkum *et al.* (2017) y Poschenreider *et al.* (2018) y propuesto para *Zostera marina* (Beer & Rehnberg, 1997; Hellblom *et al.*, 2001), *Zostera noltii* (Mercado *et al.*, 2003), *Posidonia oceanica* y *Cymodocea nodosa* (Invers *et al.*, 1999), *Halophila stipulacea* y *Ruppia maritima* (Beer *et al.*, 2002), *Ruppia cirrhosa* (Hellblom & Axelsson, 2003), y *Halophila ovalis* (Uku *et al.*, 2005).

La Figura 19a muestra una despolarización inicial del  $E_m$  por adición del  $\text{HCO}_3^-$ , indicando la entrada de una carga neta positiva. Esto probablemente es debido a un flujo de entrada de  $\text{H}^+$ , al igual que ocurre en el simporte  $\text{H}^+/\text{Cl}^-$  de la membrana plasmática descrito en *Sinapis alba* (Felle, 1994). En efecto, la Figura 19b pone de manifiesto la disminución simultánea del  $\text{pH}_c$ . Este descenso de  $\text{pH}$  da paso a la observación de una hiperpolarización transitoria del  $E_m$  debido a la estimulación de la bomba de  $\text{H}^+$  y/o a la generación de  $\text{OH}^-$  en el citosol.

Esta respuesta también concuerda con un aumento de la concentración de  $\text{CO}_2$  debido a la deshidratación espontánea del  $\text{HCO}_3^-$  en el apoplasto. En *Z. marina*, el aumento del  $\text{CO}_2$  provoca la acidificación del citoplasma por activación de la bomba, provocando la hiperpolarización del  $E_m$ . (Fernández *et al.*, 1999). De este modo, el  $\text{CO}_2$  tendría el mismo efecto que un ácido débil sobre el  $E_m$  y el  $\text{pH}_c$ , tal y como se ha visto en los pelos radiculares de *Sinapis alba* (Felle, 1987). Sin embargo, el lento y pequeño



efecto sobre el  $E_m$  y la acidificación del  $pH_c$  provocada por la adición de 1000 ppm  $CO_2$  al NSW (Fig. 20) indican que la acidificación inicial del citosol no es causada por la entrada de  $CO_2$  sino por los  $H^+$  que están siendo incorporados como ión motriz para impulsar el transporte de  $HCO_3^-$ . De forma similar, el largo y continuado aumento en el  $pH_c$  da lugar a una lenta despolarización. La medida del pH externo, cuasi apoplástico, en experimentos de flujo continuo ha sido previamente utilizada proporcionando evidencias de un simporte  $H^+/HCO_3^-$  en el alga *Chara corallina* en la que el gradiente electroquímico de protones generado por la  $H^+$ -ATPasa es utilizado de forma secundaria para el transporte activo de  $HCO_3^-$  (Lucas & Nuccitelli, 1980; Fisahn & Lucas, 1992).

La inhibición, a largo plazo, de la respuesta del  $pH_c$  a la EZ (Fig. 19b) también indica que el  $HCO_3^-$ , tras ser incorporado en simporte con  $nH^+$ , es deshidratado en el interior celular en una reacción catalizada por la CA. Así, los  $OH^-$  generados por la deshidratación podrían contribuir al aumento de pH observado a largo plazo, antes de ser exportados de la célula. Este transporte podría tener lugar a través de un posible canal  $H^+/OH^-$  (Al Khazaaly & Beilby, 2012; Taylor *et al.*, 2012). La presencia de EZ no afecta al transporte ya que no inhibe ni la despolarización inicial ni la acidificación del citosol, pero sí afecta a la alcalinización citosólica y a la fotosíntesis, ya que inhibe la deshidratación interna del  $HCO_3^-$  y en consecuencia la formación de  $CO_2$  y  $OH^-$  (Fig. 23). Un efecto similar ha sido descrito en especies de fitoplancton que utilizan  $HCO_3^-$  (Tortell *et al.*, 1997) en las que la EZ no afecta a la acumulación interna de carbono inorgánico disuelto (DIC) pero inhibe la fotosíntesis.

Finalmente, la ausencia de una respuesta rápida del  $Na^+$  o del  $Cl^-$  (Fig. 19c) citosólico parece descartar la implicación de estos iones en el transporte de  $HCO_3^-$ . No obstante, la Figura 24, muestra una notable disminución de la fotosíntesis neta en presencia del ionóforo monensina, lo cual podría involucrar al ión  $Na^+$  en la incorporación de  $HCO_3^-$ . Sin embargo, la ausencia de  $Na^+$  en el medio de ensayo no resulta en un efecto significativo sobre la fotosíntesis de *P. oceanica* (Fig. 24), sugiriendo que el efecto de la monensina sería independiente al transporte de  $HCO_3^-$ . En este sentido, hay que considerar que las técnicas electrofisiológicas suponen una medida directa de lo que sucede en la célula en tiempo real, por lo que el resultado de la monensina observado sobre la fotosíntesis debe ser causado por un efecto inespecífico sobre el funcionamiento de la célula en general y no por un efecto directo sobre el transporte de  $HCO_3^-$ .

## 2.2 Utilización de $\text{HCO}_3^-$ para la fotosíntesis en *P. oceanica*

En *P. oceanica*, la tasa de fotosíntesis aparente (APS) en función de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  añadido muestra curvas de saturación típicas con una  $S_{0.5}$  de  $0.35 \pm 0.07$  mM. Este valor concuerda con la constante de afinidad ( $0.36 \pm 0.04$  mM) obtenida para la magnitud de la despolarización de la membrana en función del  $\text{HCO}_3^-$  añadido (Fig. 22, Tab. 5). Esta coincidencia sugiere que la afinidad del transportador por  $\text{HCO}_3^-$  determina la  $S_{0.5}$  para la fotosíntesis. Estos valores se asemejan con los obtenidos por Invers *et al.* (2001), utilizando una aproximación experimental similar (curvas APS vs DIC) en varias especies de fanerógamas marinas. Estos autores obtuvieron un valor de  $S_{0.5}$  de  $0.44 \pm 0.17$  mM para *P. oceanica*,  $0.56 \pm 0.18$  mM para *Z. marina*,  $0.80 \pm 0.26$  mM para *Phyllospadix torreyi*, y  $0.26 \pm 0.06$  mM para *C. nodosa*. Sin embargo, Hellblom *et al.* (2001) obtuvieron un mayor valor para  $S_{0.5}$  ( $1.6 \pm 0.66$  mM) que Invers *et al.* (2001) para *Z. marina*. No obstante, estos valores no son tan bajos como los descritos para la fotosíntesis de las fanerógamas tropicales *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii* y *Syringodium filiforme* ( $K_S \text{ CO}_2 = 0.025, 0.012, 0.009$  mM respectivamente), lo cual refleja un uso menos eficiente del  $\text{HCO}_3^-$  en comparación con el  $\text{CO}_2$  (Campbell & Fourqurean, 2013). En cualquier caso, los valores de  $S_{0.5}$  de  $\text{HCO}_3^-$  se encuentran por debajo de la concentración presente en el agua de mar. Esto significa que la fotosíntesis de las fanerógamas marinas y en concreto en *P. oceanica*, no está limitada por la disponibilidad de  $\text{HCO}_3^-$  como ocurre con las macroalgas con las que compiten (Beer *et al.*, 2002), al contrario de lo que indicaban los primeros estudios (Beer & Koch, 1996; Beardall *et al.*, 1998; Short & Neckles, 1999). De hecho, las fanerógamas marinas de aguas tropicales *Cymodocea serrulata* y *Halophila ovalis* muestran tasas de fotosíntesis similares a las macroalgas a elevados valores de pH en los que la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  es baja, si bien en este caso la utilización del  $\text{HCO}_3^-$  se da mediante la deshidratación externa del mismo (Schwarz *et al.*, 2000; Beer *et al.*, 2002).

La fotosíntesis de muchas fanerógamas marinas es sensible a la acción del inhibidor de la anhidrasa carbónica externa ( $\text{CA}_{\text{ext}}$ ) acetazolamida (AZ). Esto indica que, al igual que en numerosas macroalgas, la conversión del  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$  en la capa límite de difusión catalizada por la  $\text{CA}_{\text{ext}}$  precede la entrada de la forma de  $\text{C}_i$  incorporado en última instancia. Este sistema se encuentra en especies del género *Posidonia* como *Posidonia australis* (James & Larkum, 1996). Sin embargo, en

*Posidonia oceanica* no se ha observado que la presencia de 100  $\mu\text{M}$  de AZ tenga un efecto significativo sobre la tasa de fotosíntesis (Fig. 23), indicando la ausencia de incorporación de  $C_i$  por dicho mecanismo. Esta falta de respuesta de la fotosíntesis por efecto de la AZ es similar a la descrita en las fanerógamas *Halodule wrightii* y en *Syringodium filiforme* (Campbell & Fourqurean, 2013).

Hay que tener en cuenta que las CAs son ubicuas en células fotosintéticas cualquiera que sea el mecanismo de incorporación de  $C_i$  (DiMario *et al.*, 2017) y que la AZ no es capaz de actuar sobre la CA intracelular (Palmqvist *et al.*, 1990), por lo que se requiere el uso adicional del inhibidor de la CA permeable a la membrana EZ, el cual actúa tanto sobre la CA extracelular como la intracelular (Mercado *et al.*, 2003) para discriminar la existencia de una deshidratación catalizada del  $\text{HCO}_3^-$  externa o interna. Los valores en este estudio muestran que la fotosíntesis en *P. oceanica* disminuye en presencia de este último inhibidor (Fig. 23). La ausencia de efecto de la AZ en combinación con la inhibición observada por la EZ permite determinar la CA inhibida. Así, este resultado apunta a una inhibición de la CA intracelular y una menor conversión citosólica del  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_2$ , limitando el suministro de  $\text{CO}_2$  al cloroplasto.

Por otro lado, la APS de *P. oceanica* muestra un mayor incremento en NSW suplementada con 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  (en torno al 50%) que el incremento observado en NSW enriquecida con 1000 ppm  $\text{CO}_2$  (Fig. 23). Este resultado apoya el modelo en el que la incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  contribuye a la actividad fotosintética en esta especie. La ausencia de un aumento en la fotosíntesis a un nivel similar de  $\text{CO}_2$ , cercano al nivel de  $\text{CO}_2$  previsto en la atmósfera para el año 2100, ha sido recientemente descrito en 9 especies de fanerógamas marinas del sur-oeste de Australia (Borum *et al.*, 2016). No obstante, la adición de 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  supone la adición de mayor contenido de  $C_i$  que 1000 ppm  $\text{CO}_2$ , por lo que ambos efectos no serían comparables a la hora de concluir que la planta utilice preferentemente  $\text{HCO}_3^-$  frente a  $\text{CO}_2$ . Sin embargo, la comparación de la variación de  $\text{pH}_{\text{ext}}$  junto con la medida de la APS en NSW con y sin  $\text{CO}_2$  (Fig. 21) muestra que el  $\text{CO}_2$  sigue siendo la principal fuente de  $C_i$  para la fotosíntesis en esta especie (60%  $\text{CO}_2$  vs 40%  $\text{HCO}_3^-$ ). No obstante, la capacidad de utilizar el  $\text{HCO}_3^-$ , cuya concentración es mayor a la de  $\text{CO}_2$  en el agua de mar, sugiere un mecanismo concentrador de carbono inorgánico en esta especie.

### 2.3 Incorporación de $\text{HCO}_3^-$ y homeostasis aniónica

Según refleja la Figura 19, el inicio de la despolarización de la membrana debido a la incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  coincide con el inicio de la disminución de  $\text{Cl}^-$  en el citosol. Este resultado podría explicarse por la presencia de canales aniónicos de tipo lento (tipo S) de la membrana plasmática implicados en la salida de  $\text{Cl}^-$ , de manera que su activación tiene lugar cuando la célula se despolariza (Roberts, 2006; Roelfsema *et al.*, 2012). En las células oclusivas de angiospermas terrestres, estos canales se activan cuando la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  en el citosol aumenta, así como también lo hace la de  $\text{HCO}_3^-$  (no  $\text{CO}_2$ ) y el  $\text{pH}_c$  es alcalino (Xue *et al.*, 2011), siendo las dos últimas condiciones similares a las observadas en *P. oceanica* en respuesta al aumento de la concentración externa de  $\text{HCO}_3^-$ .

Por otro lado, en diferentes estudios se ha empleado el inhibidor de intercambiador aniónico DIDS para determinar la existencia de un mecanismo de incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  a través de un intercambiador aniónico como el de tipo  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Así, se ha descrito que la fotosíntesis es sensible a DIDS en especies de macroalgas como *Ulva sp.* (Drechsler *et al.*, 1993), microalgas como *Nannochloropsis oculata* y *N. gaditana* (Merret *et al.*, 1996; Huertas *et al.*, 2000, 2002) y diatomeas (Nakajima *et al.*, 2013). Sin embargo, también se ha descrito un mecanismo de incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  insensible a DIDS en la microalga *Dunaliella tertiolecta* (Young *et al.*, 2001). No obstante, no se ha descrito ningún efecto significativo de DIDS sobre la fotosíntesis de fanerógamas marinas como *Z. marina* (Beer *et al.*, 2002). En *P. oceanica* ocurre lo mismo, es decir, la ausencia de efecto significativo de 100  $\mu\text{M}$  de DIDS sobre la fotosíntesis, así como la ausencia de efecto en presencia del inhibidor de canales aniónicos de tipo lento NPPB, descartan que la entrada de  $\text{HCO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* ocurra a través de un intercambio aniónico, apoyando el modelo de simporte con  $\text{H}^+$  como mecanismo para la incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  en esta especie.

Además, una pequeña parte (en torno al 5%) de la señal generada por los electrodos sensibles a  $\text{Cl}^-$  es debida a  $\text{NO}_3^-$  (Felle, 1994; Miller & Zhen, 1991), lo que permite pensar que el aumento de  $\text{HCO}_3^-$  no sólo provocaría la extrusión de  $\text{Cl}^-$  sino también la salida de  $\text{NO}_3^-$ . Este efecto inesperado del aumento de la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  puede ser importante no sólo para la homeostasis aniónica sino también para la

nutrición mineral de organismos marinos en condiciones de alto CO<sub>2</sub>. Sin embargo, serían necesarios nuevos experimentos para entender correctamente tanto los mecanismos de extrusión de aniones como la importancia ecológica del proceso.

#### 2.4 *La incorporación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> acoplada a H<sup>+</sup> contribuye a los CCM en Posidonia oceanica*

Los mecanismos de concentración de carbono (CCM) contribuyen a la acumulación de CO<sub>2</sub> en el estroma de los cloroplastos en una amplia variedad de organismos fotosintéticos, desde cianobacterias a plantas vasculares. Las cinéticas de saturación de la enzima Rubisco son similares en fanerógamas marinas y plantas vasculares terrestres con CCM lo cual es consistente con la presencia de estos mecanismos en fanerógamas (Larkum *et al.*, 2017). Tales mecanismos pueden implicar el transporte activo y la acumulación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>2</sub> o un mecanismo bioquímico más complejo como ocurre en plantas C<sub>4</sub> y tipo CAM (Giordano *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2008; Raven & Beardall, 2016).

Los CCM basados en el transporte de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> han sido descritos en un gran número de organismos fotosintéticos acuáticos, incluyendo las fanerógamas marinas (Beer *et al.*, 2002; Raven *et al.*, 2008). En el caso del ambiente marino, dado el elevado pH, podría esperarse el transporte activo de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> como CCM, ya que la deshidratación espontánea de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>2</sub> y la posterior difusión es dependiente de un bajo valor de pH.

En el caso de *P. oceanica*, con un  $E_m = -174$  mV (y asumiendo  $RT/F = 59$  mV), si se considera una concentración externa de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (en NSW) de 2.2 mM, la concentración interna de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el equilibrio sería 2.2 μM. Por tanto, la acumulación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el citosol por encima de este valor requeriría energía. Además, considerando un pH en el NSW de 8.2 y un pH<sub>c</sub> de 7.3 (y los mismos valores de  $E_m$  y  $RT/F$  mencionados anteriormente), la fuerza H<sup>+</sup> motriz,  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}/F$ , disponible para la incorporación de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sería -121 mV (dirigida hacia el interior celular). Esto significa que bajo condiciones ideales, y considerando un mínimo estequiométrico de 1H<sup>+</sup>/1HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el mecanismo de simporte sería capaz de incorporar HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> al citosol hasta una concentración de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> de acuerdo con una fuerza electroquímica para el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $\Delta\tilde{\mu}_{HCO_3^-}/F$  igual a +121 mV (dirigida hacia el exterior celular). Es decir, con las

## Discusión

asunciones anteriores y una concentración externa de  $\text{HCO}_3^-$  de 2.2 mM, el simporte  $1\text{H}^+/1\text{HCO}_3^-$  sería capaz de concentrar hasta 0.22 mM de  $\text{HCO}_3^-$  en el citosol, 100 veces por encima de la concentración en el equilibrio. Dado que la relación entre el gradiente de potencial electroquímico y el ratio de concentración es logarítmico, un aumento en el número de  $\text{H}^+$  daría lugar a una mayor concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el citosol. Al aumentar el número de  $\text{H}^+$  implicados en el transporte, aumentaría la capacidad para una mayor acumulación de  $\text{HCO}_3^-$ . Así, 1.5  $\text{H}^+$  generarían una  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}/F = -174$  mV, capaz de acumular 2.2 mM  $\text{HCO}_3^-$  en el citosol, 1000 veces por encima de la concentración en el equilibrio.

Al igual que se ha propuesto para determinadas algas y fanerógamas marinas (Beer *et al.*, 2002; Giordano *et al.*, 2005; Raven & Hurd, 2012), la existencia de zonas ácidas en el apoplasto de *P. oceanica*, resultado de la extrusión activa de  $\text{H}^+$  mediante la  $\text{H}^+$ -ATPasa, incrementaría la energía asociada al transporte por cada  $\text{H}^+$  y, en consecuencia, la capacidad de bombeo del sistema concentrador de carbono. Este mecanismo podría actuar en conjunto con otros transportadores localizados en la membrana del cloroplasto que eventualmente podrían incrementar la concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el estroma (Giordano *et al.*, 2005; Raven *et al.*, 2008).

Esta capacidad de utilizar la elevada concentración de  $\text{HCO}_3^-$  en el agua de mar mejora la incorporación de carbono cuando la entrada por difusión de  $\text{CO}_2$  es limitada. Además, la posibilidad de cambiar el grado utilización de  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  para la fotosíntesis como ocurre en macroalgas, puede suponer una ventaja competitiva a elevadas concentraciones de  $\text{CO}_2$ , ya que reduce la proporción de energía gastada en la incorporación de carbono (Raven, 2011).

### 3 Energética y transporte de $\text{NO}_3^-$ , $\text{P}_i$ y aminoácidos en *Posidonia oceanica*

Dada la relación de C:N:P en fanerógamas marinas de 474:21:1 descrita por Duarte (1990), una posible limitación al crecimiento en un futuro ambiente enriquecido en  $\text{CO}_2$ , vendría determinada por la baja disponibilidad de N y P en el agua de mar en relación al  $\text{C}_i$ . Se sabe que las fanerógamas marinas son capaces de incorporar nitrógeno y fósforo inorgánico tanto a través de la raíz como de las hojas (Touchette & Burkholder, 2000; García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005; Rubio *et al.*, 2007), a pesar de que en el agua de mar se encuentran a concentraciones inferiores a  $10 \mu\text{M}$ . El mantenimiento de un potencial de membrana negativo en las células sometidas a altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  permite mantener una fuerza motriz elevada para la incorporación de nutrientes (Volkov & Amtmann, 2006). En el caso de las plantas vasculares terrestres, se considera que la  $\text{H}^+$ -ATPasa del plasmalema proporciona la energía para el transporte a nivel de membrana generando un gradiente de  $\text{H}^+$  que es posteriormente utilizado como ión motriz para la incorporación de nutrientes (Palmgren, 2001). Sin embargo, según los valores observados de  $E_m$  (-174 mV), concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol (17 mM), y pHc (7.3) en *P. oceanica*, el gradiente electroquímico para el  $\text{Na}^+$  (-260 mV) superaría el gradiente electroquímico dirigido hacia el interior celular del  $\text{H}^+$  en aproximadamente -140 mV.

Ejemplos de simporte con  $\text{Na}^+$  han sido anteriormente descritos en angiospermas de agua dulce como *Egeria densa*, *Elodea* y *Vallisneria* donde se da un simporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Walker, 1994; Maathuis & Sanders, 1996). En el caso del medio marino, varios estudios demuestran sistemas de transporte dependientes de  $\text{Na}^+$  para la adquisición de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , glucosa,  $\text{SO}_4^{2-}$  e incluso sílice en algas (Hellebust, 1978; Bhattacharyya & Volcani, 1980; Boyd & Gradmann, 1999; Chan *et al.*, 2012) en vez de un transporte impulsado por  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática. Sin embargo, transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  en angiospermas marinas sólo se han descrito en la especie *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005).



## Discusión

Por tanto la caracterización de los sistemas de transporte en *P. oceanica* incluyendo qué ión utiliza para impulsar el transporte en el plasmalema es importante, especialmente en el contexto de la adaptación de las angiospermas a un medio alcalino, con una alta concentración de  $\text{Na}^+$  y poca disponibilidad de nutrientes esenciales como nitrato o fosfato.

### **3.1 Transporte de $\text{NO}_3^-$ en *P. oceanica***

El transporte de iones a través de membranas deja un rastro eléctrico como despolarizaciones de la misma cuando la carga eléctrica neta que entra es positiva. Estas despolarizaciones de la membrana han sido utilizadas como evidencias de la actividad de sistemas de transporte en diferentes especies (Sanders *et al.*, 1984; Fernández *et al.*, 1999; García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005; Ait-Hammou *et al.*, 2014; Planes *et al.*, 2015 ). Ya que la magnitud de las despolarizaciones refleja la entrada de una carga neta positiva que atraviesa la membrana, en el caso de aniones como  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{P}_i$ , la despolarización de la membrana revela la actividad de un mecanismo de transporte en simporte con un ión positivo que proporciona la fuerza motriz.

Las medidas mediante electrofisiología muestran que el  $\text{NO}_3^-$  es incorporado mediante un sistema de transporte de alta afinidad en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* (Fig. 25). Además, al igual que en otras fanerógamas marinas el valor de la constante de semisaturación para el  $\text{NO}_3^-$  se encuentra por debajo de  $10 \mu\text{M}$  (Tab. 10), si bien es mayor que los valores obtenidos en células del mesófilo foliar de las fanerógamas marinas *Z. marina* (García-Sánchez *et al.*, 2000) y *Thalasia testudinum* (Lee & Dunton, 1999) o en el alga roja *Gracilaria gracilis* ( $K_M = 6.9 \pm 2.3 \mu\text{M NO}_3^-$ ; Smit, 2002) pero similar a la encontrada *Phyllospadix torreyi* (Terrados & Williams, 1997) o en células radiculares de *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2005). Sin embargo, es mucho menor que las publicadas para la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  de alta afinidad en plantas terrestres, con valores próximos a  $60 \mu\text{M NO}_3^-$  en cebada (Glass *et al.*, 1992) o *Arabidopsis* (Okamoto *et al.*, 2006; revisado en Wang *et al.*, 2012).



**Table 10.** NO<sub>3</sub><sup>-</sup> half-saturation constants ( $K_M$ ,  $\mu\text{M}$ ) for high affinity transport systems reported in seagrasses.

Species	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	Reference
<i>Zostera marina</i>	2.3 ± 0.78 (leaf cells)	García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000
	8.9 ± 3.9 (root cells)	Rubio <i>et al.</i> , 2005
<i>Thalassia testudinum</i>	2.2 ± 1.3 (leaf cells)	Lee & Dunton, 1999
<i>Phyllospadix torreyi</i>	8.7 ± 0.2 (leaf cells)	Terrados & Williams, 1997
<i>Posidonia oceanica</i>	8.7 ± 1 (leaf cells)	This work

Dada la variación del potencial de membrana ( $\Delta E_m$ ) observada en respuesta a la adición de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, la estequiometría del transporte debe ser >1. No obstante, la magnitud de las despolarizaciones observadas fue de tan sólo unos pocos milivoltios (entre 1 y 10 mV), lo cual sugiere un transporte de nitrato poco electrogénico, con un bajo nivel de expresión del transportador o con algún grado de inhibición en las condiciones de experimentación acometidas.

Por otro lado, el patrón de incorporación observado en hojas de *P. oceanica*, con una velocidad mayor al inicio de la incubación con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Fig. 29), es consistente con lo previamente observado en otras fanerógamas marinas como *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2005) y *Z. noltii* (Alexandre *et al.*, 2011). Además, los valores obtenidos para las tasas de incorporación se encuentran en el rango descrito a concentraciones saturantes de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> tanto para estas como para otras especies de fanerógamas marinas (Tab. 11).

## Discusión

**Table 11.**  $\text{NO}_3^-$  net uptake rates, measured in the presence of 500mM  $\text{Na}^+$  and light conditions, reported for different seagrass leaves ( $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ).

Specie	$\text{NO}_3^-$ net uptake rate ( $\text{mmol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ )	Reference
<i>Zostera noltii</i>	0.19 – 0.26	Alexandre <i>et al.</i> , 2011
<i>Zostera marina</i>	$2.33 \pm 0.34$	Modified from García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000 (personal communication)
<i>Posidonia angustifolia</i>	0.05 – 0.55	Nayar <i>et al.</i> , 2010
<i>Phyllospadix iwatensis</i>	1.0 – 2.1	Hasegawa <i>et al.</i> , 2005
<i>Thalassia testudinum</i>	3.7 – 6.5	Lee & Dunton, 1999
<i>Phyllospadix torreyi</i>	24.9 – 75.4	Terrados & Williams, 1997
<i>Posidonia oceanica</i>	$1.54 \pm 0.1$	This work

### 3.1.1 La incorporación de $\text{NO}_3^-$ disminuye en oscuridad

La energía y el carbono necesarios para la metabolización de N durante el día son directamente aportados por la fotosíntesis, mientras que en oscuridad la metabolización del N implica el uso de carbohidratos de reserva (Turpin, 1991; Huppe & Turpin, 1994). Este hecho es particularmente importante cuando el N es incorporado en forma de nitrato, cuya asimilación es energéticamente más costosa que en forma de amonio, ya que el  $\text{NO}_3^-$  ha de ser primero reducido a nitrito y posteriormente a amonio en reacciones catalizadas por la nitrato y nitrito reductasa respectivamente (Bloom *et al.*, 1992; Wiencke & Bischof, 2012). Así, en presencia de luz se da una rápida metabolización del  $\text{NO}_3^-$  incorporado, lo que hace descender la  $[\text{NO}_3^-]$  en el citosol y, en consecuencia, el transportador podría mover  $\text{NO}_3^-$  hacia el interior a mayor velocidad.

En este sentido, el valor de  $D_{max}$  para la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* en condiciones de oscuridad fue la mitad del valor observado en condiciones de luz (Fig. 25) indicando un menor número de transportadores de  $\text{NO}_3^-$  activos. No obstante, la afinidad del transportador es independiente de las condiciones de luz, por lo que el valor de  $K_m$  permanece constante. Estos resultados se ven igualmente reflejados en las tasas de incorporación obtenidas mediante curvas de depleción, en las que se observa una menor tasa de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  (Fig. 29; Tab. 6).

Estos cambios en las tasas de incorporación de nitrógeno en relación a la presencia o ausencia de luz han sido descritos en angiospermas terrestres y algunas especies de algas. Por ejemplo, la tasa de incorporación de nitrato (y de amonio) en oscuridad disminuye entre un tercio y un medio respecto a la medida en luz en algas pardas y rojas (Haines & Wheeler, 1978; Harrison *et al.*, 1986; Gordillo *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2008). De igual forma, en presencia de luz se ha observado una mayor tasa de incorporación de nitrato en comparación con la oscuridad en gramíneas (Macduff *et al.*, 1997). Sorprendentemente, en fanerógamas marinas la incorporación de nitrógeno en condiciones de luz respecto a oscuridad ha sido determinada en tan sólo tres especies, *Zostera marina*, *Thalassia testudinum* y *Zostera. noltii* (García-Sánchez *et al.*, 2000; Lee & Dunton, 1999; Alexandre *et al.*, 2016). En estas dos últimas, no se ha observado variación a lo largo del ciclo diario en la incorporación de nitrato a través de las hojas. No obstante, en *Z. marina* sí se han detectado diferencias entre la incorporación en presencia y ausencia de luz (García-Sánchez *et al.*, 2000; Tab. 12). Sin embargo, las tasas obtenidas en *P. oceanica* fueron aproximadamente un 45% menores que en *Z. marina*. Aún así, la disminución en la incorporación de nitrato en oscuridad respecto al control fue similar en ambas especies.

**Table 12.** NO<sub>3</sub><sup>-</sup> net uptake rates of *Z. marina* leaves compared with *P. oceanica* leaves (μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup>) in light and dark conditions.

Specie	Light (500 mM Na <sup>+</sup> )	Dark (500 mM Na <sup>+</sup> )	Reference
<i>Z. marina</i>	2.33 ± 0.34	1.28 ± 0.03	Modified from García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000 (personal communication)
<i>P. oceanica</i>	1.54 ± 0.1	0.73 ± 0.23	This work

### 3.1.2 El transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> es dependiente de Na<sup>+</sup>

Las plantas vasculares terrestres normalmente utilizan el gradiente de H<sup>+</sup> generado por la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática para impulsar los procesos de transporte secundario del plasmalema (Palmgren, 2001). Así, los sistemas de transporte en simporte con H<sup>+</sup> que median la incorporación de nutrientes, incluyendo glucosa y aminoácidos, han sido ampliamente descritos (Falhof *et al.*, 2016). Sin embargo, el medio marino es un ambiente alcalino (pH en torno a 8.2) donde la concentración de Na<sup>+</sup> en el medio externo es elevada (500 mM) y por tanto el gradiente electroquímico de los H<sup>+</sup> resulta menor que para el Na<sup>+</sup>.

## Discusión

En el caso de *P. oceanica*, la ausencia de despolarización en respuesta a la adición de la concentración saturante de  $\text{NO}_3^-$  en hojas en ASW sin  $\text{Na}^+$ , sugiere la actividad de un mecanismo dependiente de  $\text{Na}^+$  para la incorporación de dicho nutriente (Fig. 26). Mecanismos de incorporación de nitrato de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  han sido encontrados en organismos marinos como cianobacterias (Hellebust, 1978; Lara *et al.*, 1993), diatomeas y numerosas algas (Rees *et al.*, 1980; Raven, 1984), pero sólo en el estudio anterior del grupo en *Z. marina* ha sido demostrada su actividad en fanerógamas marinas (García-Sánchez *et al.*, 2000; Rubio *et al.*, 2005). Dicho mecanismo de incorporación dependiente de  $\text{Na}^+$ , es acorde con el aumento del metabolismo del nitrógeno, particularmente de la asimilación de nitrato, en presencia de 400 mM de  $\text{Na}^+$  respecto a la ausencia de  $\text{Na}^+$  recientemente descrito en la misma especie (Lv *et al.*, 2018).

En este sentido, tanto el aumento de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol hasta un valor estable al añadir un pulso de la concentración saturante de  $\text{NO}_3^-$  al medio de ensayo (Fig. 28), como la caracterización cinética para el  $\text{Na}^+$  como ión motriz del sistema de transporte (Fig. 27), con un valor de  $K_M$  para el  $\text{Na}^+$  de  $7.2 \pm 1.1$  mM, apoyan la actividad de un transportador de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$  dependiente de  $\text{Na}^+$  (simporte de  $\text{NO}_3^- / \text{Na}^+$ ) en células del mesófilo foliar en *P. oceanica*, si bien para el mantenimiento del gradiente de potencial electroquímico para  $\text{Na}^+$  resultaría esencial la actividad del antiportador  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  propuesto anteriormente (Fig. 18). Dicho valor de constante de semisaturación para  $\text{Na}^+$  es ligeramente mayor en el caso de *P. oceanica* respecto a los valores descritos en *Z. marina*, así como en la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* y en la cianobacteria *Anacystis nidulans* o incluso que la  $K_M$  para el  $\text{Na}^+$  de los transportadores de alta afinidad de  $\text{HCO}_3^-$  encontrados en cianobacterias (Tab. 13). Sin embargo, sigue siendo un valor mucho menor en comparación con la concentración de  $\text{Na}^+$  en el agua de mar (500 mM), lo que implica que el transportador de  $\text{NO}_3^-$  de *P. oceanica*, así como en otros organismos, funciona bajo concentraciones saturantes de  $\text{Na}^+$  en el medio marino.

**Table 13.** Half-saturation constants ( $K_M$ ) for  $\text{Na}^+$  (mM) as the driving ion of the  $\text{Na}^+$ -dependent transport systems found in different species.

Specie	$K_M \text{Na}^+$ (mM)	Reference
<i>Zostera marina</i>	$0.72 \pm 0.18$	García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$2.58 \pm 0.56$	Rees <i>et al.</i> , 1980
<i>Anacystis nidulans</i>	$0.36 \pm 0.04$	Rodríguez <i>et al.</i> , 1994
<i>Synechococcus PCC7942</i> ( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ symporter)	$1.7 \pm 0.1$	Price <i>et al.</i> , 2004
<i>Posidonia oceanica</i>	$7.2 \pm 1.1$	This work

Por otra parte, además de las evidencias directas sobre la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  en células del mesófilo foliar descrita anteriormente, la disminución de las tasas netas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  observada en hojas de *P. oceanica* en ausencia de  $\text{Na}^+$  (Fig. 29) también apoya la incorporación acoplada a  $\text{Na}^+$ . Así, al igual que había sido descrito en *Z. marina*, en *P. oceanica* también se ha observado una disminución en torno al 80% de la tasa de incorporación de  $\text{NO}_3^-$  en ausencia de  $\text{Na}^+$  (Tab. 14).

**Table 14.**  $\text{NO}_3^-$  net uptake rates of *Z. marina* compared with *P. oceanica* leaves ( $\mu\text{mol NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{DM h}^{-1}$ ) in the presence and in the absence of  $\text{Na}^+$  in the assay medium.

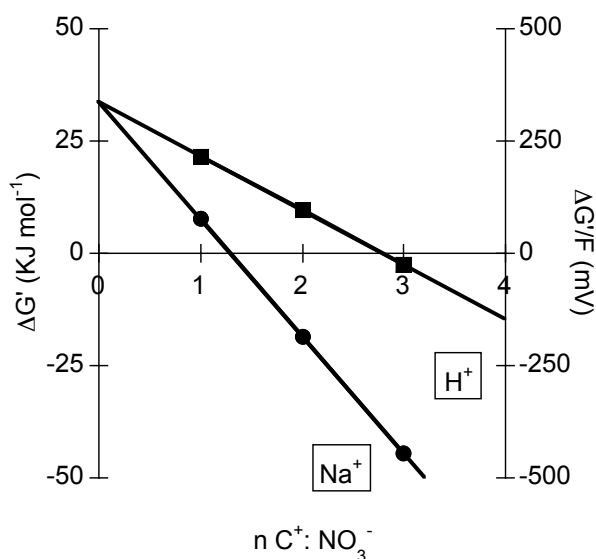
Specie	500 mM $\text{Na}^+$ (Light)	0 mM $\text{Na}^+$ (Light)	Reference
<i>Z. marina</i>	$2.33 \pm 0.34$	$0.45 \pm 0.0$	Modified from García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000 (personal communication)
<i>P. oceanica</i>	$1.54 \pm 0.1$	$0.29 \pm 0.03$	This work

Finalmente, la pequeña magnitud de las despolarizaciones inducidas por  $\text{NO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* es acorde al cálculo de la estequiometría del transporte a partir del análisis de la energía asociada al número de iones necesarios para impulsar el transporte, calculada a partir de la ecuación:

$$\Delta G'/F = (n - z_A)E_m + 59 \log \left( \frac{[C]_i^n [A]_i}{[C]_e^n [A]_e} \right)$$

(Equation 6)

donde  $n$  es el número de cationes transportados por cada anión;  $z_A$  es la carga eléctrica del anión;  $C$  es el catión acoplado al transporte;  $A$  es el anión transportado y los sufijos “i” y “e” se refieren al citosol (interior celular) y el medio externo, respectivamente. Como muestra la Figura 40, considerando unos valores de 500 mM  $\text{Na}^+$ , pH 8.2 y 10  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  en el NSW y los valores observados en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* ( $E_m = -174 \pm 4$  mV;  $\text{Na}^+_c$  17 mM,  $\text{pH}_c$  7.3 y  $\text{NO}_3^-_c$  6 mM), un transporte con  $\text{H}^+$  con una estequiometría  $2\text{H}^+ : 1\text{NO}_3^-$  no sería suficiente para impulsar la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  (energía libre,  $\Delta G' > 0$ ). Incluso una estequiometría de  $3\text{H}^+ : 1\text{NO}_3^-$  tendría asociada una fuerza  $\text{H}^+$ -motriz ( $\Delta G'/F_{\text{H}^+}$ ) de tan sólo -26 mV. Probablemente sería necesario incorporar aún más número de  $\text{H}^+$  por cada ión  $\text{NO}_3^-$  transportado, lo que implicaría un elevado gasto de energía. En cambio, una estequiometría de  $2\text{Na}^+$  tendría asociada una  $\Delta G'/F_{\text{Na}^+}$  de -185 mV, suficiente para impulsar el transporte de  $1\text{NO}_3^-$ .



**Figure 40.** Thermodynamic relationship of  $\text{NO}_3^-$  transporter employing either  $\text{H}^+$  or  $\text{Na}^+$  as the coupling ion. Calculations were performed using Equation 6, considering NSW conditions (500 mM  $\text{Na}^+$ , pH 8.2 and 10  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ ) and *P. oceanica* mesophyll leaf cells parameters ( $E_m = -174 \pm 4$  mV; cytosolic  $\text{Na}^+$  17 mM, cytosolic pH 7.3 and cytosolic  $\text{NO}_3^-$  6 mM).

### 3.1.3 La incorporación de $\text{NO}_3^-$ aumenta en alto $\text{HCO}_3^-$

Además de la estequiometría, el hecho de que el transporte de  $\text{NO}_3^-$  sea poco electroforético también podría deberse a una baja expresión del transportador. En este sentido, un aspecto interesante sobre la magnitud de las despolarizaciones y el transporte de nitrato en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* es la regulación del mismo observada en respuesta a alto  $\text{HCO}_3^-$ .

En presencia de 10 mM de  $\text{HCO}_3^-$ , las despolarizaciones observadas por adición de la concentración saturante de  $\text{NO}_3^-$  son mayores que a la concentración normal de  $C_i$  en el NSW (2mM  $\text{HCO}_3^-$ ; Fig. 30). Dados los resultados obtenidos en relación al transporte de  $\text{HCO}_3^-$  en células del mesófilo foliar de *P. oceanica*, este efecto podría deberse a la salida de  $\text{NO}_3^-$  de la célula a través de los canales de salida de aniones. De esta forma, el aumento del bicarbonato parece inducir la salida de  $\text{NO}_3^-$  desde el citosol, induciendo la deficiencia de  $\text{NO}_3^-$  y, muy probablemente, una mayor actividad del transportador de alta afinidad.

### 3.1.4 Regulación de la concentración citosólica de $\text{NO}_3^-$

La determinación de las concentraciones de iones en el interior de la célula es esencial para la comprensión de la energética de los procesos metabólicos y de transporte a nivel de membranas. En el caso del  $\text{NO}_3^-$ , los resultados discutidos anteriormente sugieren que su concentración citosólica podría estar regulada por los niveles de carbono inorgánico en forma de  $\text{HCO}_3^-$ .

La concentración citosólica de  $\text{NO}_3^-$  ( $[\text{NO}_3^-]_c$ ) ha sido estimada en algunas plantas, mostrando un amplio rango de valores, entre 0.01 y 160 mM de  $\text{NO}_3^-$ , si bien la mayoría se encuentran por debajo de 10 mM (revisado en Miller & Smith, 1996). Dicha variabilidad en las estimaciones sugiere que la metodología empleada no genera resultados precisos. En este sentido, parece ser que la medida mediante microelectrodos selectivos para nitrato es una de las mejores aproximaciones metodológicas para estudiar la homeostasis citosólica de dicho ión (Miller & Smith, 2008). Hasta el momento pocos son los valores de la  $[\text{NO}_3^-]_c$  descritos en la literatura científica estimados mediante esta técnica. Así, se ha determinado una  $[\text{NO}_3^-]_c$  de 1.6 mM en el alga *Chara corallina* (Miller & Zhen, 1991) y de 0.63 mM en células del tallo de la hepática *Conocephalum conicwn* (Trebacz *et al.*, 1994). En plantas vasculares, las

## Discusión

primeras medidas se realizaron en células epidérmicas de la raíz de maíz (*Zea mays*), con una  $[\text{NO}_3^-]_c$  de 3.1 mM, y cebada (*Hordeum vulgare*), con una  $[\text{NO}_3^-]_c$  de 4.9 mM (Miller & Smith, 1996) debido a su importancia respecto al uso de fertilizantes y rendimiento agrícola. *Arabidopsis thaliana*, como especie modelo, es la única en la que se ha determinado la  $[\text{NO}_3^-]_c$  tanto en células epidérmicas de la raíz como en células del mesófilo foliar, con valores de  $2.2 \pm 0.5$  mM y  $2.8 \pm 0.7$  mM respectivamente (Cookson *et al.*, 2005). En el caso de las fanerógamas marinas, este trabajo es el primero en determinar la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el citosol medida de manera directa. Así, en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*, el valor de la  $[\text{NO}_3^-]_c$  en condiciones de luz es  $5.7 \pm 0.2$  mM, concentración que se encuentra por encima de la determinada en hojas de *Arabidopsis* (Cookson *et al.*, 2005), si bien sigue estando en el rango de los valores observados en el resto de especies descritas.

Como se ha discutido anteriormente, en oscuridad se observa un menor transporte de  $\text{NO}_3^-$  en hojas de *P. oceanica*. A su vez, el cese de la actividad fotosintética implica una menor asimilación de N, lo cual explicaría el aumento de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en oscuridad hasta un valor de  $8.5 \pm 1.1$  mM (Fig. 31). Esta respuesta es similar a la encontrada en células del mesófilo foliar de *Arabidopsis*, en las que la concentración aumenta hasta un valor de 3.5 mM de  $\text{NO}_3^-$  en la transición de luz a oscuridad (Cookson *et al.*, 2005). No obstante, este aumento en *Arabidopsis* no supone una diferencia significativa en la  $[\text{NO}_3^-]_c$ , mientras que en el caso de *P. oceanica* el  $\text{NO}_3^-$  citosólico aumenta casi 1.5 veces.

En general, las fanerógamas marinas tienen una limitada capacidad de almacenar nitrato, incluso bajo condiciones de alta disponibilidad (Touchette & Burkholder, 2000; Invers *et al.*, 2004). Ya que *P. oceanica* es una especie que no almacena nitrógeno en forma inorgánica (Nayar *et al.*, 2010), la necesidad de este nutriente debe suplirse con su incorporación directa del medio. Así, es de esperar una mayor incorporación de N del medio ante una bajada de los valores de actividad de  $\text{NO}_3^-$  en el citosol. La Figura 32 muestra una disminución en el valor del  $\text{NO}_3^-$  citosólico ante la presencia de 1000 ppm de  $\text{CO}_2$  en el medio de ensayo menor que la observada cuando el  $\text{C}_i$  se incrementa en forma de  $\text{HCO}_3^-$ . Estos resultados apoyan la existencia de un flujo de salida de  $\text{NO}_3^-$  inducido principalmente por alto  $\text{HCO}_3^-$ , tal y como se había propuesto a raíz de la mayor incorporación de  $\text{NO}_3^-$  observada en presencia de 10 mM  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 30). De esta manera la entrada de bicarbonato a la célula y su deshidratación interna estaría



asociada no sólo a la salida de  $\text{Cl}^-$ , sino también de  $\text{NO}_3^-$  (y es probable que a la de otros aniones como  $\text{P}_i$ ), induciendo en la célula un estado de déficit de N que provoca la mayor actividad de los sistemas de incorporación de  $\text{NO}_3^-$ .

### 3.2 Transporte de $\text{P}_i$ en *P. oceanica*

La ausencia de rastro eléctrico en el  $E_m$  de células del mesófilo foliar de *P. oceanica* tras la adición de concentraciones micromolares de  $\text{P}_i$  al ASW con 2 mM de  $\text{HCO}_3^-$ , indica que en estas condiciones el transporte de  $\text{P}_i$  podría ser eléctricamente silencioso. Este resultado es similar al descrito para el transporte de  $\text{P}_i$  en las células del mesófilo foliar de *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2005). Sin embargo, en presencia de una elevada concentración de  $\text{HCO}_3^-$  (10 mM) sí se observaron despolarizaciones de la membrana por adición de concentraciones crecientes de  $\text{P}_i$ , lo que indica que en estas condiciones podrían inducirse sistemas de transporte de  $\text{P}_i$ , permitiendo la caracterización cinética de la incorporación de  $\text{P}_i$  mediante electrofisiología.

Así, al igual que en *Z. marina*, las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* también muestran incorporación de  $\text{P}_i$  de alta afinidad (Fig. 36). El valor de la constante de semisaturación obtenida es menor para el  $\text{P}_i$  ( $K_M = 5.8 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ) que para el  $\text{NO}_3^-$  ( $K_M = 8.7 \pm 1 \mu\text{M}$ ) indicando una mayor afinidad en la incorporación de  $\text{P}_i$  que de  $\text{NO}_3^-$  en esta especie. Además, la constante de semisaturación de la cinética de incorporación de  $\text{P}_i$  es mayor que la obtenida en las células de la epidermis de la raíz de *Z. marina* (1.5  $\mu\text{M}$ ; Rubio *et al.*, 2005), pero similar a los valores descritos en hojas de otras fanerógamas marinas como *Zostera noltii* (12.1  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ ; Pérez-Lloréns & Niell, 1995), *Thalassia hemprichii* (7.7  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ ; Stapel *et al.*, 1996) o *Thalasia testudinum* (11.9  $\mu\text{M}$   $\text{P}_i$ ; Gras *et al.*, 2003), y está en el rango de los valores de  $K_M$  de alta afinidad descritos para la familia de transportadores en simporte con  $\text{H}^+$  (PHS) de plantas vasculares terrestres (Rae *et al.*, 2003).

Sin embargo, el valor obtenido para la tasa de incorporación de  $\text{P}_i$  en hojas de *P. oceanica* en condiciones control (2mM  $\text{HCO}_3^-$ ;  $0.45 \pm 0.08 \mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ) es algo menor que para el  $\text{NO}_3^-$  ( $1.54 \pm 0.1 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ). Esta mayor incorporación de N respecto a P responde a la relación C:N:P descrita para fanerógamas marinas

## Discusión

(474:21:1; Duarte, 1990), por lo que en otras especies, al igual que en *P. oceanica*, también se han observado tasas de incorporación algo mayores para el  $\text{NO}_3^-$  ( $3.7 - 75 \mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ) que para el  $\text{P}_i$  ( $0.014 - 43 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ) (Touchette & Burkholder, 2000). Además, dicha tasa de incorporación a pesar de ser menor que la determinada en *Z. marina* y *Thalassia hemprichii*, se encuentra en el rango observado tanto para esta como para otras especies de fanerógamas marinas (Tab. 15).

**Table 15.**  $\text{P}_i$  net uptake rates reported in leaves of different seagrasses ( $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ).

Specie	$\text{P}_i$ net uptake rate ( $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ )	Reference
<i>Thalassia hemprichii</i>	3.63 - 4.7	Stapel <i>et al.</i> , 1996
<i>Zostera marina</i>	$2.03 \pm 0.34$	Modified from Rubio <i>et al.</i> , 2005 (personal communication)
<i>Zostera noltii</i>	0.9 - 3	Pérez-Lloréns & Niell, 1995
<i>Thalassia testudinum</i>	0.5 - 1.9	Gras <i>et al.</i> , 2003
<i>Amphibolis antarctica</i>	0.7 - 1.5	Nayar, 2015
<i>Posidonia angustifolia</i>	0.14 - 2.09	Nayar, 2015
<i>Posidonia oceanica</i>	$0.45 \pm 0.08$	This work

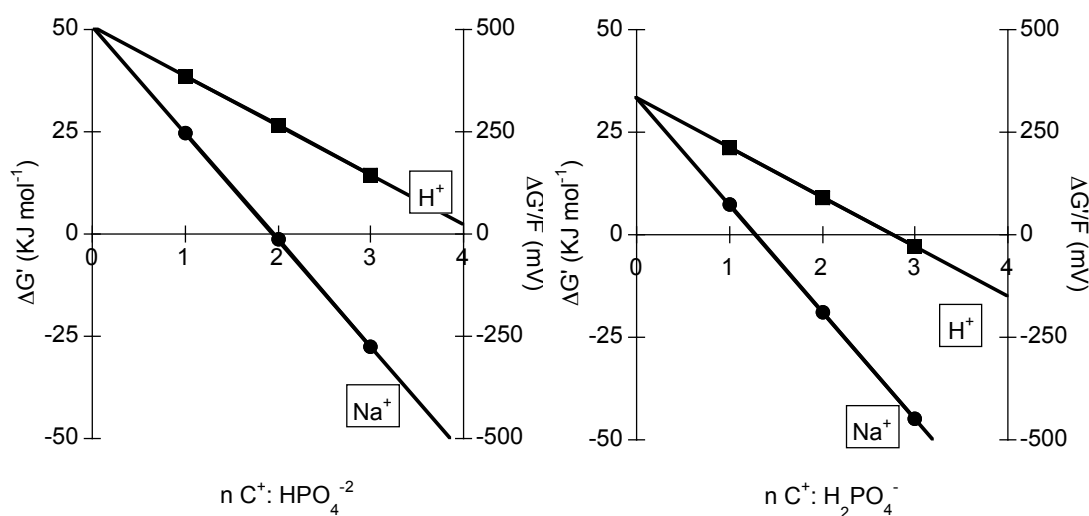
Por otro lado, la Figura 34 muestra una mayor incorporación de  $\text{P}_i$  en condiciones de alto  $\text{HCO}_3^-$  (10 mM;  $0.84 \pm 0.19 \mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ). A pesar de ello, dicho valor sigue estando en el rango descrito anteriormente para otras fanerógamas marinas. Además, esta mayor incorporación de  $\text{P}_i$  en alto  $\text{HCO}_3^-$  estaría en línea con el vaciado de aniones ( $\text{NO}_3^-$  y, en este caso,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) en respuesta a la incorporación directa de  $\text{HCO}_3^-$  según se ha propuesto y discutido anteriormente. Cabe destacar que las diferencias aparecen pasadas las dos primeras horas de incubación, lo que coincide con el tiempo de incubación mantenido antes de la caracterización cinética de la incorporación de  $\text{P}_i$  en alto  $\text{HCO}_3^-$  mediante electrofisiología. Por tanto, este resultado también parece apoyar la salida de aniones a través de canales aniónicos, los cuales se abrirían en respuesta al aumento de  $\text{HCO}_3^-$ .

### 3.2.1 El transporte de $P_i$ es dependiente de $Na^+$

Al igual que se ha discutido para el caso del  $NO_3^-$ , la ausencia de despolarización por adición de la concentración saturante de  $P_i$  en hojas en ASW con 10 mM  $HCO_3^-$  y sin  $Na^+$ , indica la dependencia de  $Na^+$  en el transportador para la incorporación de dicho nutriente.

Esta dependencia de  $Na^+$  es consistente con el análisis termodinámico del transporte reflejado en la Figura 41 considerando los valores de 500 mM  $Na^+$ , pH 8.2 y 10  $\mu$ M  $P_i$  en el NSW, los observados en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* de  $E_m = -174 \pm 4$  mV,  $Na^+_c = 17$  mM,  $pH_c = 7.3$  y un valor de  $P_i$  en el citosol estimado en 5 mM. Ya que el pH del medio de ensayo es 8.2, la forma mayoritaria de  $P_i$  a este pH es  $HPO_4^{2-}$  (86%), mientras que el 14% restante corresponde a  $H_2PO_4^-$ . En el caso del  $HPO_4^{2-}$ , un cotransporte con hasta  $4H^+$  no sería suficiente en términos de energía ( $\Delta G' > 0$ ). Sería necesario una estequiometría de al menos  $5H^+ : 1HPO_4^{2-}$ , lo que supone un gran gasto de energía por parte de la célula en la extrusión activa de  $H^+$  mediante la  $H^+$ -ATPasa. En cambio un transporte con entre 2 y 3 iones  $Na^+$  por cada  $HPO_4^{2-}$  es suficiente para ser termodinámicamente viable. Para el  $H_2PO_4^-$  sucede de forma similar: mientras que un simporte con  $H^+$  necesita de al menos 3 cationes para generar un  $\Delta G' / F_{H^+}$  de tan sólo -29 mV, un cotransporte con 2  $Na^+$  tendría asociada una  $\Delta G' / F_{Na^+}$  de -188 mV. Así, la estequiometría podría ser  $2Na^+ : 1HPO_4^{2-}$  y/o  $2Na^+ : 1H_2PO_4^-$ . No obstante, el simporte con  $2Na^+$  de  $H_2PO_4^-$  es termodinámicamente más favorable para la célula: el transporte de  $2Na^+ : 1HPO_4^{2-}$  tiene una energía asociada de tan sólo -14 mV frente a los -188 mV del simporte  $2Na^+ : 1H_2PO_4^-$ . Por tanto, es probable que el  $H_2PO_4^-$  sea la principal forma de  $P_i$  incorporado pese a que la mayoritariamente disponible sea  $HPO_4^{2-}$ .

## Discusión



**Figure 41.** Thermodynamic relationship of  $P_i$  transporter employing either  $H^+$  or  $Na^+$  as the coupling ion. Calculations were performed using Equation 6, considering NSW conditions (500 mM  $Na^+$ , pH 8.2 and 10  $\mu$ M  $P_i$ ) and *P. oceanica* mesophyll leaf cells parameters ( $E_m = -174 \pm 4$  mV; cytosolic  $Na^+$  17 mM, cytosolic pH 7.3 and cytosolic  $P_i$  5 mM).

Por otro lado, la caracterización cinética para el  $Na^+$  como ión motriz (Fig. 37), dio un valor de  $K_M = 4.3 \pm 0.5$  mM  $Na^+$ . Este valor es menor que el obtenido para la incorporación de  $NO_3^-$ , indicando una mayor afinidad por el  $Na^+$  del transportador de  $P_i$  que, claro está, funciona bajo concentraciones saturantes de  $Na^+$  en el medio marino. Cabe destacar, que en ambos casos los valores de  $D_{max}$  obtenidos en medios en los que el  $Na^+$  se añade progresivamente son similares y no llegan al máximo observado en ASW con la concentración de  $Na^+$  del agua de mar natural.

Finalmente en *P. oceanica*, al igual que en las hojas de *Z. marina*, en ausencia de  $Na^+$  la tasa de incorporación de  $P_i$  es muy próxima a cero ( $0.09 \pm 0.04$   $\mu$ mol  $P_i$  g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> y  $0.26 \pm 0.08$   $\mu$ mol  $P_i$  g<sup>-1</sup> DM h<sup>-1</sup> respectivamente; Fig. 33). Esta tasa de incorporación, incluso menor que para el  $NO_3^-$  en ausencia de  $Na^+$ , es acorde con la mayor afinidad para el  $Na^+$  observada en el transporte de  $P_i$ .

Por tanto, los resultados mostrados en este trabajo demuestran un sistema de transporte de  $P_i$  de alta afinidad acoplado a  $Na^+$  que opera a nivel de la membrana plasmática de células del mesófilo foliar de *P. oceanica*.

### 3.3 *El Na<sup>+</sup> también es el ión motriz para el transporte de los aminoácidos L-Ala y L-Cys*

Si bien el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> son las formas mayoritarias de incorporación de N en plantas, se ha descrito la existencia de sistemas de incorporación de aminoácidos en hojas de fanerógamas marinas (Van Engeland *et al.*, 2011). Numerosas pruebas mantienen que la utilización de nitrógeno orgánico disuelto parece estar presente en un amplio número de fanerógamas marinas, lo que les proporciona una ventaja competitiva sobre las macroalgas en ambientes oligotróficos (Van Engeland *et al.*, 2011; Nafie *et al.*, 2014). Resulta interesante que, además de la incorporación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* también muestran un transporte de alta afinidad de aminoácidos. Cinéticas de saturación de aminoácidos han sido previamente publicadas para las especies tropicales *Thalassia hemprichii*, *Halodule uninervis* y *Cymodocea rotundata*, con valores de  $K_M$  de entre 3.5 y 10.5 μM (Vonk *et al.*, 2008). Dichos valores son similares a los valores obtenidos en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* para el aminoácido cisteína (10 ± 1 μM; Fig. 38), pero son menores que la  $K_M$  obtenida para la alanina (37 ± 11 μM; Fig. 38). Sin embargo, al contrario que los resultados obtenidos en este trabajo (Fig. 39), hasta el momento no se han descrito previamente sistemas de incorporación de aminoácidos dependientes de Na<sup>+</sup> en fanerógamas marinas.

En el caso de *Arabidopsis*, 4 transportadores se han relacionado con la incorporación de aminoácidos en la raíz. Estos son las aminoácido-permeasas AtAAP1 (Lee *et al.*, 2007 B) y AtAAP5 (Svennerstam *et al.*, 2008, 2011), el transportador de tipo lisina/histidina AtLHT1 (Hirner *et al.*, 2006; Svennerstam *et al.*, 2007) y el transportador de prolina/soluto compatible AtProT2 (Lehmann *et al.*, 2011). De ellos LHT1 es probablemente el transportador más importante para la incorporación de L-Ala en la raíz (Svennerstam *et al.*, 2011). Este transportador de alta afinidad se encuentra también localizado en la membrana plasmática de las células del mesófilo y se ha demostrado que son responsables de la incorporación de aminoácidos de tipo ácido y neutro del apoplasto de la hoja (Hirner *et al.*, 2006). Resulta interesante que los valores de  $K_M$  para el transporte de alta afinidad de aminoácidos en las células del mesófilo foliar de *P. oceanica* son similares a los observados en el análisis de las cinéticas de la actividad transportadora de LHT1 (de 7.4 a 44.8 μM; Svennerstam *et al.*, 2011). En plantas vasculares terrestres este transportador funciona como un transportador de

## Discusión

aminoácidos en general, de forma similar a otras AAPs, las cuales, cuando se expresan en levadura o en oocitos, median la incorporación acoplada a  $H^+$  e independiente de  $Na^+$  de una amplia variedad de aminoácidos (revisado en Tegeder *et al.*, 2014).

Así, los mecanismos dependientes de  $Na^+$  para el transporte de alta afinidad de alanina y cisteína encontrados en células del mesófilo foliar de *P. oceanica* parecen respaldar la hipótesis de que la adaptación de las plantas vasculares al ambiente alcalino y de elevada concentración de  $Na^+$  como es el agua de mar, está basada, junto con otros procesos, en el aprovechamiento del elevado gradiente de potencial electroquímico del  $Na^+$  dirigido hacia el interior celular, a pesar de la energética basada en el ión  $H^+$  ampliamente distribuida entre las plantas vasculares (Palgrem, 2001). De este modo, la disponibilidad de  $Na^+$  en el medio puede haber sido una influencia principal en la evolución de los mecanismos de transporte a nivel de membrana plasmática emergida de forma independiente en angiospermas marinas y en algas.

## **4 Modelo general de energización del plasmalema e incorporación de nutrientes en *P. oceanica***

*P. oceanica* ha resultado ser un sistema útil para el estudio de la incorporación de nutrientes en angiospermas marinas. Ha sido posible determinar no sólo el potencial de la membrana plasmática y su variación en respuesta a los nutrientes en el medio de ensayo, sino también el pH, el  $Na^+$ , el  $Cl^-$  e incluso el  $NO_3^-$  citosólico en las células del mesófilo de esta especie. Con todo ello se ha elaborado un modelo de energización del plasmalema e incorporación de nutrientes (Fig. 42) que cuenta con ciertas particularidades.

Posee una  $H^+$ -ATPasa sensible a FC en la membrana plasmática como bomba electrogénica que extruye protones del citosol y, además, genera un gradiente electroquímico transmembrana de  $H^+$  que pueden utilizar los transportadores secundarios del plasmalema para impulsar el movimiento de iones (Falhof *et al.*, 2016). De hecho, dicho gradiente es utilizado en esta especie para impulsar la incorporación directa de  $HCO_3^-$  a través de un mecanismo de transporte activo. La deshidratación interna del  $HCO_3^-$  en el citosol o en el cloroplasto produce  $CO_2$ , que es asimilado en la

fotosíntesis, y  $\text{OH}^-$  que alcaliniza el citosol y es transportado al exterior celular. Este transporte puede tener lugar a través de canales  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  (Al Khazaaly & Beilby, 2012; Taylor *et al.*, 2012). Ya que el  $\text{HCO}_3^-$  se incorpora directamente, el exceso de este ión altera la homeostasis citosólica de aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  y posiblemente  $\text{P}_i$ . Este simporte  $n\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$  es capaz de concentrar  $\text{HCO}_3^-$  en el citosol cerca de 100 veces la concentración de equilibrio, contribuyendo como un importante CCM en esta especie.

Las células de las hojas de *P. oceanica*, poseen una baja concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  ( $17 \pm 2$  mM) respecto a la del medio (500 mM  $\text{Na}^+$ ). Este valor se encuentra en el rango de la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$  registrada en glicófitos terrestres, pero mucho menor que los valores propuestos para halófitas terrestres, de entre 70 y 200 mM  $\text{Na}^+$  en plantas que crecen en presencia de 50 y 400 mM de  $\text{Na}^+$ , respectivamente (Flowers *et al.*, 2015). A pesar de la ausencia de  $\text{Na}^+$ -ATPasa, las cuales no se encuentran en plantas vasculares (Pedersen *et al.*, 2012), el mantenimiento de la baja concentración de  $\text{Na}^+$  en el citosol encontrada en fanerógamas marinas parece ser resultado tanto de la baja tasa de permeabilidad relativa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (0.003 en *Z. marina*, Fernández *et al.*, 1999; 0.005 en *P. oceanica*, este trabajo), como de la acción de un mecanismo de extrusión activo de  $\text{Na}^+$  en la membrana plasmática cuya actividad se ha caracterizado en *Z. marina* (Rubio *et al.*, 2011) y se ha evidenciado en los resultados observados en el presente trabajo. De hecho, teniendo en cuenta la alta concentración de  $\text{Na}^+$  en el agua de mar (500 mM) y el potencial de membrana bastante negativo (-174 mV) medido en las células de las hojas de *P. oceanica*, el gradiente electroquímico para el  $\text{Na}^+$  dirigido hacia el interior celular es -260 mV, más de 2 veces mayor que el valor de la fuerza  $\text{H}^+$ -motriz (-121 mV) calculada en *P. oceanica*, considerando un pH en el citosol de las células del mesófilo foliar de 7.3 y un pH en el NSW de 8.2.

La incorporación de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  y aminoácidos tiene lugar mediante sistemas de transporte de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$ . La comparación entre el gradiente de potencial electroquímico para el  $\text{Na}^+$  y el calculado para el  $\text{NO}_3^-$  y el  $\text{P}_i$  proporcionan una estimación de la estequiometría para cada sistema de transporte. Teniendo en cuenta las bajas concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{P}_i$  en que éstos nutrientes se encuentran presentes en el Mar Mediterráneo y la concentración citosólica medida en el caso de  $\text{NO}_3^-$  (6 mM), o esperada en el caso de  $\text{P}_i$  (5 mM), se necesitarían alrededor de -350 mV para energizar el transporte de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{P}_i$  al interior de las células del mesófilo foliar de *P. oceanica*. Esto significa que una estequiometría de  $2\text{Na}^+/\text{1NO}_3^-$  y  $2\text{Na}^+/\text{1P}_i$  daría lugar a

## Discusión

suficiente energía para que el transporte fuera termodinámicamente viable (Fig. 42). La dependencia del  $\text{Na}^+$  de ambos sistemas de transporte de alta afinidad se encuentra semisaturada a concentraciones de  $\text{Na}^+$  milimolares bajas,  $7.2 \pm 1.1$  mM y  $4.3 \pm 0.5$  mM, para la incorporación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{P}_i$  respectivamente (Tab. 16). Estos valores son mayores que la  $K_M$  para el  $\text{Na}^+$  en relación al transporte de  $\text{NO}_3^-$  publicada en *Z. marina* (0.72 mM  $\text{Na}^+$ ; García-Sánchez *et al.*, 2000) y es también mayor que el valor publicado para el transporte de  $\text{Na}^+/\text{NO}_3^-$  en la diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* (2.58 mM  $\text{Na}^+$ ; Rees *et al.*, 1980) o la constante de semisaturación para el  $\text{Na}^+$  para los transportadores de alta afinidad de  $\text{HCO}_3^-$  encontrados en cianobacterias (1 and 1.7 mM; Price *et al.*, 2004). En cualquier caso, estos valores de  $K_M$  para el  $\text{Na}^+$  de rango milimolar bajo implican que los transportadores de alta afinidad de  $\text{NO}_3^-$  y de  $\text{P}_i$  de *P. oceanica*, al igual que los de *Z. marina*, se encuentran funcionando a concentraciones saturantes de  $\text{Na}^+$  en el agua de mar.

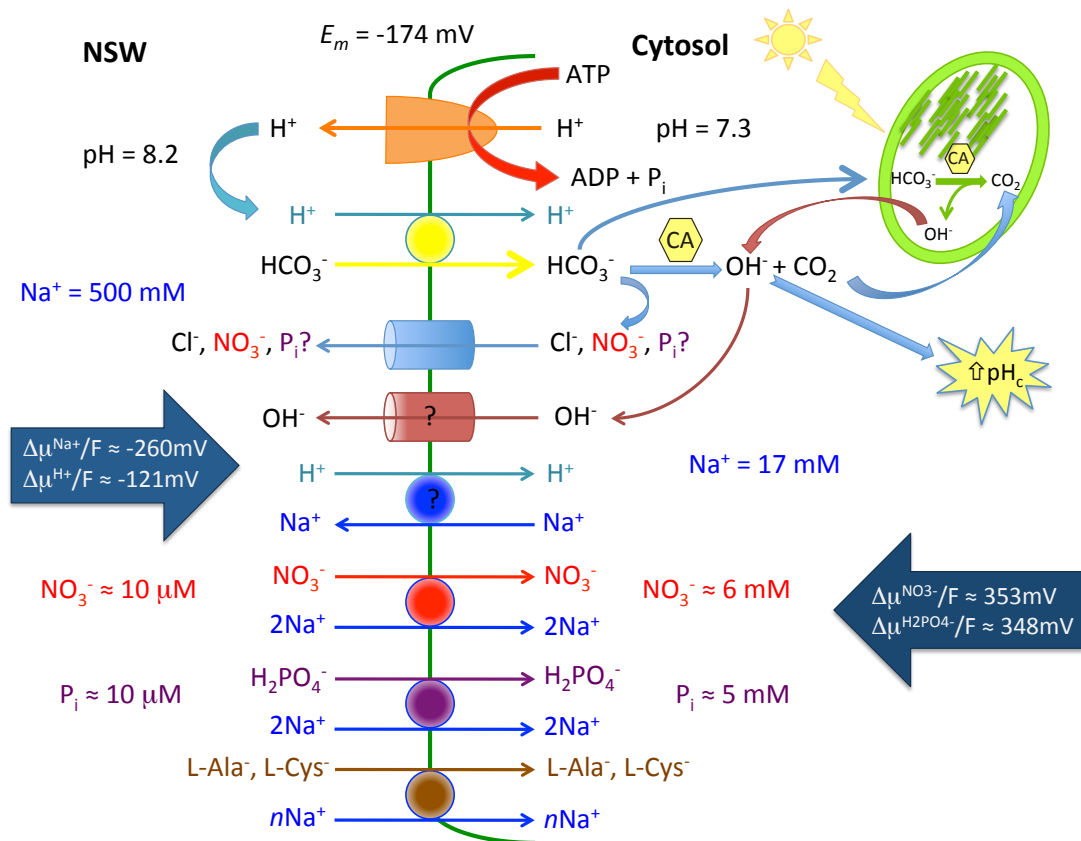
**Table 16.**  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{P}_i$  and amino acid kinetics parameters for high-affinity transport systems reported in seagrasses. Values in brackets show semisaturation constant for  $\text{Na}^+$  as transport driving ion.

Species	Nutrient	Organ	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	Reference
<i>Zostera marina</i>	$\text{NO}_3^-$	Leaves	2.3 (0.72 mM $\text{Na}^+$ )	García-Sánchez <i>et al.</i> , 2000
		Roots	8.9	Rubio <i>et al.</i> , 2005
	$\text{P}_i$	Roots	1.5	
<i>Thalasia testudinum</i>	$\text{NO}_3^-$	Leaves	2.2	Lee & Dunton, 1999
	$\text{P}_i$	Roots	11.9	Gras <i>et al.</i> , 2003
	$\text{P}_i$		3.7	
<i>Phyllospadix torreyi</i>	$\text{NO}_3^-$	Leaves	8.7	Terrados & Williams, 1997
<i>Zostera noltii</i>	$\text{P}_i$	Leaves	12.1	Pérez Llorens & Niell, 1995
<i>Thalassia hemprichii</i>	$\text{P}_i$	Leaves	7.7	Stapel <i>et al.</i> , 1996
<i>Posidonia oceanica</i>	$\text{NO}_3^-$ (Light)	Leaves	8.7	This work
			(7.2 mM $\text{Na}^+$ )	
	$\text{NO}_3^-$ (Dark)		8.2	
	L-Ala		37	
	L-Cys		10	
$\text{P}_i$	5.8 (4.3 mM $\text{Na}^+$ )			



Así, la aparición de transportadores de alta afinidad dependientes de  $\text{Na}^+$  podría ser un modelo de adaptación general para la incorporación de nutrientes en fanerógamas marinas y podría considerarse como una estrategia para vivir en un medio salino, alcalino y pobre en N y P como es el agua de mar.

La Figura 42 resume el modelo propuesto para el mecanismo de energización de la membrana, incorporación de  $\text{HCO}_3^-$  y flujo de salida de aniones en *P. oceanica*.



**Figure 42.** Model for energizing the plasma membrane,  $\text{HCO}_3^-$  incorporation and anion extrusion and stoichiometry of the  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{P}_i$  high-affinity transport in mesophyll leaf cells of the seagrass *P. oceanica*. A  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter is also indicated as a putative mechanism to maintain the  $\text{Na}^+$  gradient. The  $\text{HCO}_3^-$ , taken up by an  $\text{H}^+$ -symport, is dehydrated in the cytosol in a reaction catalysed by the enzyme carbonic anhydrase (CA) or transported to the chloroplast. In the light,  $\text{CO}_2$  is consumed by the chloroplast, and  $\text{OH}^-$  ions increase cytosolic pH. Excess of cytosolic  $\text{HCO}_3^-$  activates S-type anion channels (SLAC) through which  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  and possibly  $\text{P}_i$  leaves the cells. Cytosolic and seawater ion concentrations and the calculations of the electrochemical potential gradients, included on the big arrows ( $\Delta\mu/F$ ; mV), are discussed in the text.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CONCLUSIONES



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CONCLUSIONS

1. The marine angiosperm *P. oceanica* conserves a FC-sensitive H<sup>+</sup>-ATPase as the main plasma membrane energization system of the mesophyll leaf cells. These cells exhibit a Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> plasma membrane permeability of 0.0046, an extremely low value that allows the maintenance of a low cytosolic Na<sup>+</sup> concentration.
2. The electrochemical proton gradient is used in mesophyll leaf cells of *P. oceanica* to drive the direct active uptake of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> through an nH<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> symporter. The internal dehydration of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> produces CO<sub>2</sub>, which is consumed by photosynthesis, and OH<sup>-</sup>, which alkalizes the cytosol and is transported out of the cells. This nH<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> symport has the capacity to concentrate HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in the cytosol around 100 times the equilibrium concentration and could be an important component of a Carbon Concentration Mechanism in this species.
3. The mesophyll leaf cells of *P. oceanica* show Na<sup>+</sup>-dependent high affinity transport systems for NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, P<sub>i</sub> and amino acids, that distinguish this species from the H<sup>+</sup>-dependent general model of nutrient uptake described in terrestrial vascular plants.
4. The cytosolic NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration of mesophyll leaf cells of *P. oceanica* is similar to that found in the model plant *Arabidopsis thaliana* and is affected by the increase of C<sub>i</sub> (specially HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) in the medium, leading to a greater incorporation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as well as the decrease of cytosolic NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, suggesting the existence of a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> outflow induced by high HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## **BIBLIOGRAFÍA**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



- Aires, T., Marba, N., Cunha, R.L., Kendrick, G.A. & Walker, D.I. 2011.** Evolutionary history of the seagrass genus *Posidonia*. *Marine Ecology Progress Series*, 42: 117-130.
- Ait Hammou, K., Rubio, L., Fernández, J.A. & García-Sánchez M.J. 2014.** Potassium uptake in the halophyte *Halimione portulacoides* L. Aellen. *Environmental and Experimental Botany*, 107: 15-24.
- Alcoverro, T., Romero, J., Duarte, C.M. & López, N.I. 1997.** Spacial and temporal variations in limitation of seagrass *Posidonia oceanica* growth in the NW Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 146: 155-161.
- Alcoverro, T., Manzanera, M. & Romero, J. 1998.** Seasonal and age-dependent variability of *Posidonia oceanica* (L.) Delile photosynthetic parameters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 230 (1): 1-13.
- Alexandre, A., Silva, J., Bouma, T.J. & Santos, R. 2011.** Inorganic nitrogen uptake kinetics and whole-plant nitrogen budget in the seagrass *Zostera noltei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 401: 7-12.
- Alexandre, A., Silva, J. & Santos, R. 2016.** Nitrogen uptake in light versus darkness of the seagrass *Zostera noltei*: integration with carbon metabolism. *Marine Ecology*, 37: 1050-1056.
- Al Khazaaly, S. & Beilby, M.J. 2012.** Zinc ions block H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> channels in *Chara australis*. *Plant, Cell & Environment*, 35: 1380-1392.
- Ammann, D. 1986.** *Ion-selective microelectrodes. Principles, design and applications.* Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.
- Amtmann, A., Hammond, J.P., Armengaud, P. & White, P. 2006.** Nutrient sensing and signalling in plants: Potassium and phosphorus. *Advances in Botanical Research*, 43: 209-257.
- Anderson, W.P., Willcocks, D.A. & Wright, B.J. 1977.** Electrophysiological measurements on the root of *Atriplex hastata*. *Environmental and Experimental Botany*, 28: 894-901.
- Apse, M.P. & Blumwald, E. 2007.** Na<sup>+</sup> transport in plants. *FEBS Letters*, 581: 2247-2254.

## Bibliografía

- Arber, A. 1920.** *Water Plants: A Study of Aquatic Angiosperms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C.M., Diaz-Almela, E., Marbà, N., Sintès, T. & Serrão, E.A. 2012.** Implications of extreme life span in clonal organisms: millenary clones in meadows of the threatened seagrass *Posidonia oceanica*. *PLoS One*, 7 (2): e30454.
- Badger, M.R. & Price, G.D. 1994.** The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 369-392.
- Badger, M.R., Hanson, D.T. & Price, G.D. 2002.** Evolution and Diversity of CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria. *Functional Plant Biology*, 29: 407-416.
- Badger, M.R. & Price, G.D. 2003.** CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: Molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54: 609-622.
- Ballesteros, D., García-Sánchez, M.J., Heredia, M.A., Felle, H. & Fernández, J.A. 1998.** Inorganic carbon acquisition in *Riccia fluitans* L. *Journal of Experimental Botany*, 49: 1741-1747.
- Balestri, E., Piazzini, L. & Cinelli, F. 1998.** In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquatic Botany*, 60 (1): 83-93.
- Balestri, E. & Vallerini, F. 2003.** Interannual variability in flowering of *Posidonia oceanica* in the North-Western Mediterranean Sea, and relationships among age and flowering. *Botanica Marina*, 46: 525-530.
- Beardall, J., Beer, S. & Raven J. 1998.** Biodiversity of marine plants in an era of climate change: some predictions based on physiological performance. *Botanica Marina*, 41: 113-124.
- Beer, S., Shomer-Ilan, A. & Waisel, Y. 1980.** Carbon metabolism in seagrasses. II. Patterns of photosynthetic CO<sub>2</sub> incorporation. *Journal of Experimental Botany*, 31: 1019-1026.
- Beer, S. & Koch, E. 1996.** Photosynthesis of marine macroalgae and seagrasses in globally changing CO<sub>2</sub> environments. *Marine Ecology Progress Series*. *Oldendorf*, 141: 199-204.

- Beer, S. & Rehnberg, J. 1997.** The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *Zostera marina*. *Aquatic Botany*, 56: 277-283.
- Beer, S., Björk, M., Hellblom, F. & Axelsson, L. 2002.** Inorganic carbon utilization in marine angiosperms (seagrasses). *Functional Plant Biology*, 29: 349-354.
- Beilby, M.J. & Bisson, M.A. 2012.** pH banding in charophyte algae. In: A. Volkov (Ed.), *Plant electrophysiology: Methods and cell electrophysiology*. Heidelberg: Springer Verlag; 247-271.
- Bethoux, J.P., El Boukhary, M.S., Ruiz-Pino, D., Porin, P. & Copin-Montégut, C. 2005.** Nutrient, oxygen and carbon ratios, CO<sub>2</sub> sequestration and anthropogenic forcing in the Mediterranean Sea. In: Saliot, A. (Ed.). *The Mediterranean Sea. The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer: Belin/Heidelberg, Germany; 67-87.
- Bird, K.T., Johnson, J.R. & Jewett-Smith, J. 1998.** In vitro culture of the seagrass *Halophila decipiens*. *Aquatic Botany*, 60: 377-387.
- Bhattacharyya, P. & Volcani, B.E. 1980.** Sodium-dependent silicate transport in the apochlorotic marine diatom *Nitzschia alba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77: 6386-6390.
- Björk, M., Weil, A., Semesi, S., & Beer, S. 1997.** Photosynthetic utilisation of inorganic carbon by seagrasses from Zanzibar, East Africa. *Marine Biology*, 129: 363-366.
- Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S. & Warner, R.L. 1992.** Root respiration associated with ammonium and nitrate assimilation in barley. *Plant Physiology*, 99: 1294-1301.
- Borum, J., Pedersen, O., Kotula, L., Fraser, M.W., Statton, J., Colmer, T.D. & Kendrick, G.A. 2016.** Photosynthetic response to globally increasing CO<sub>2</sub> of co-occurring temperate seagrass species. *Plant, Cell & Environment*, 39: 1240-1250.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W. & Shabala, S. 2015.** Rapid regulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 115 (3): 481-494.

## Bibliografía

- Boudouresque, C.F., & Meinesz, A. 1982.** D'écouverte de l'herbier de *Posidonies*. *Cahier du Parc national de Port-Cros*, 4: 1-79.
- Boudouresque, C.F. & de Grissac, J. 1983.** Seagrass populations (*Posidonia oceanica*) in the Mediterranean: Interactions between plants and sediments. *Journal de Recherche Océanographique (Paris)*, 8: 99-122.
- Boudouresque, C.F., Bernard, G., Pergent, G., Shili, A. & Verlaque, M. 2009.** Regression of Mediterranean seagrasses caused by natural processes and anthropogenic disturbances and stress: a critical review. *Botanica Marina*, 52: 395-418.
- Boyd, C.M. & Gradmann, D. 1999.** Electrophysiology of the marine diatom *Coscinodiscus wailesii*. *Journal of Experimental Botany*, 50: 461-467.
- Bronk, D.A. 2002.** Dynamics of DON. In: Hansell, D.A. & Carlson, C.A. (Eds.). *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press; 153-249.
- Burkholder, J.M., Tomasko, D.A. & Touchette, B.W. 2007.** Seagrasses and eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350: 46-72.
- Caldeira, K. & Wickett, M.E. 2003.** Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature*, 425: 365-365.
- Campbell, J.E. & Fourqurean, J.W. 2013.** Mechanisms of bicarbonate use influence the photosynthetic carbon dioxide sensitivity of tropical seagrasses. *Limnology and Oceanography*, 58: 839-848.
- Carden, D.E., Diamond, D. & Miller, A.J. 2001.** An improved Na<sup>+</sup>-selective microelectrode for intracellular measurements in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1353-1359.
- Carden, D.E., Walker, D.J., Flowers, T.J. & Miller, A.J. 2003.** Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> to salt tolerance. *Plant Physiology*, 131: 676-683.
- Carpaneto, A., Naso, A., Paganetto, A., Cornara, L., Pesce, E.R. & Gambale, F. 2004.** Properties of ion channels in the protoplasts of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant, Cell & Environment*, 27 (3): 279-292.

- Chan, C.X., Zäuner, S., Wheeler, G., Grossman, A.R., Prochnik, S.E., Blouin, N.A., Zhuang, Y., Benning, C., Berg, G.M., Yarish, C., Eriksen, R.L., Klein, A.S., Lin, S., Levine, I., Brawley, S.H. & Bhattacharya, D. 2012.** Analysis of *Porphyra* Membrane Transporters Demonstrates Gene Transfer among Photosynthetic Eukaryotes and Numerous Sodium-Coupled Transport Systems. *Plant Physiology*, 158: 2001-2012.
- Cheeseman, J.M. 1988.** Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 87 (3): 547-550.
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni, R.B., Piao, S. & Thornton, P. 2013.** Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, P.M. (Eds.). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.-L., Fichetfet, T., Friedlingstein, P., Gao, X., Gutowski, W.J., Johns, T., Krinner, G., Shongwe, M., Tebaldi, C., Weaver, A.J. & Wehner, M. 2013.** Long-term Climate Change: Projections, Commitments and Irreversibility. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, P.M. (Eds.). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Cookson, S.J., Williams, L.E. & Miller, A.J. 2005.** Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiology*, 138: 1097-1105.
- Crawford, N.M. & Glass, D.M. 1998.** Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Sciences*, 3: 389-395.

## Bibliografía

- Dauby, P. & Poulicek, M. 1995.** Methods for removing epiphytes from seagrasses: SEM observations on treated leaves. *Aquatic Botany*, 52 (3): 217-228.
- De Boer, J.A. 1985.** Nutrients. In: Lobban, C.S., Harrison, P.J. & Duncan, J.J. (Eds.). *The Physiological Ecology of Seaweeds*. Cambridge University Press, Cambridge, UK; 356-392.
- Demidchik, V. & Tester, M. 2002.** Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of protoplast from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 128: 379-387.
- den Hartog, C. 1970.** *The Seagrasses of the World*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.
- den Hartog, C. & Kuo, J. 2006.** Taxonomy and Biogeography of Seagrass. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, Netherlands; 1-23.
- Díaz-Almela, E., Marbà, N., Álvarez, E., Balestri, E., Ruiz, J.M. & Duarte, C.M. 2005.** Patterns of seagrass (*Posidonia oceanica*) flowering in the Western Mediterranean. *Marine Biology*, 148 (4): 723-742.
- DiMario, R.J., Clayton, H., Mukherjee, A., Ludwig, M. & Moroney, J.V. 2017.** Plant carbonic anhydrases: structures, functions and physiological roles. *Molecular Plant*, 10: 30-46.
- Drechsler, Z., Sharkia, R., Cabantchik, Z.I. & Beer, S. 1993.** Bicarbonate uptake in the marine macroalga *Ulva* sp. is inhibited by classical probes of anion exchange by red blood cells. *Planta*, 191 (1): 34-40.
- Duarte, C.M. 1990.** Seagrass nutrient content. *Marine Ecology Progress Series*, 67: 201-207.
- Duarte, C.M. 1991.** Seagrass depth limits. *Aquatic Botany*, 40: 363-377.
- Durako, M.J. 1993.** Photosynthetic utilization of  $\text{CO}_{2(\text{Aq})}$  and  $\text{HCO}_3^-$  in *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae). *Marine Biology*, 115: 373-380.
- Edwards, G. & Walker, D.A. 1983.** *C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanisms, cellular and environmental regulation of photosynthesis*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

- Elkalay, K., Frangoulis, C., Skliris, N., Goffart, A., Gobert, S., Lepoint, G. & Hecq, J.H. 2003.** A model of seasonal dynamics of biomass and production of the seagrass *Posidonia oceanica* in the Bay of Calvi (Northwestern Mediterranean). *Ecological Modelling*, 167: 1-18.
- Falhof, J., Pedersen, J.T., Fuglsang, A.T. & Palmgren, M. 2016.** Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant*, 9: 323-337.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 2007.** *Aquatic photosynthesis*. Princeton: Princeton University Press.
- Felle, H. & Bentrup, F.W. 1976.** Effect of light upon membrane potential, conductance, and ion fluxes in *Riccia fluitans*. *Journal of Membrane Biology*, 27: 153-170.
- Felle, H. 1981.** A study of the current-voltage relationships of electrogenic and passive membrane elements in *Riccia fluitans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 646: 151-160.
- Felle, H. & Bertl, A. 1986.** The fabrication of H<sup>+</sup>-selective liquid membrane microelectrodes for use in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 37: 1416-1428.
- Felle, H. 1987.** Proton transport and pH control in *Sinapis alba* root hairs: a study carried out with double-barrelled pH micro-electrodes. *Journal of Experimental Botany*, 38: 340-354.
- Felle, H. 1994.** The H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter in root hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiology*, 106: 1131-1136.
- Fernández, J.A., Niell, F.X. & Lucena, J. 1985.** A rapid and sensitive automated determination of phosphate in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 30 (1): 227-230.
- Fernández, J.A., García-Sánchez, M.J. & Felle, H. 1999.** Physiological evidence from a proton pump at the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1763-1768.



## Bibliografía

- Fernández, P.A., Hurd, C.L. & Roleda, M.Y. 2014.** Bicarbonate uptake via an anion exchange protein is the main mechanism of inorganic carbon acquisition by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) under variable pH. *Journal of Phycology*, 50: 998-1008.
- Fernández-Torquemada, Y. & Sánchez-Lizaso, J.L. 2005.** Effects of salinity on leaf growth and survival of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320: 57-63.
- Ferrier, J.M. 1980.** Apparent bicarbonate use and possible plasmalemma proton efflux in *Chara corallina*. *Plant Physiology*, 66: 1198-1199.
- Fisahn, J. & Lucas, W.J. 1992.** Direct measurement of the reversal potential and current-voltage characteristics in the acid and alkaline regions of *Chara corallina*. *Planta*, 186: 241-248.
- Flowers, T.J., Munns, R. & Colmer, T.D. 2015.** Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany*, 115: 419-431.
- Forde, B.G. 2000.** Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 219-235.
- Fukuhara, T., Pak, J.Y., Ohwaki, Y., Tsujimura, H. & Nitta T. 1996.** Tissue-specific expression of the gene for a putative plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in a seagrass. *Plant Physiology*, 110: 35-42.
- Gacia, E. & Duarte, C.M. 2001.** Sediment retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* meadow: the balance between deposition and resuspension. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 52: 505-514.
- Garciadeblás, B., Benito, B. & Rodríguez-Navarro, A. 2001.** Plant cells express several calcium ATPases but apparently no sodium ATPase. *Plant and Soil*, 235: 181-192.
- Garciadeblás, B., Haro, R. & Benito, B. 2007.** Cloning of two SOS1 transporters from the seagrass *Cymodocea nodosa*. SOS1 transporters from *Cymodocea* and *Arabidopsis* mediate potassium uptake in bacteria. *Plant Molecular Biology*, 63 (4): 479-490.



- García-Robledo, E., Corzo, A. & Papaspyrou, S. 2014.** A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes. *Marine Chemistry*, 162: 30-36.
- García-Sánchez, M.J., Paz Jaime, M., Ramos, A., Sanders, D. & Fernández J.A. 2000.** Sodium dependent nitrate transport at the plasma membrane of leaf cells of the marine high plant *Zostera marina* L. *Plant Physiology*, 122: 879-885.
- Garrill, A., Tyerman, S.D. & Findlay, G.P. 1994.** Ion channels in the plasma membrane of protoplast from the halophytic angiosperm *Zostera muelleri*. *Journal of Membrane Biology*, 142: 381-393.
- Giordano, M., Beardall, J. & Raven, J.A. 2005.** CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 99-131.
- Glass, A.D.M., Shaff, J. & Kochian, L.V. 1992.** Studies of the uptake of nitrate in barley. IV Electrophysiology. *Plant Physiology*, 99: 456-463.
- Gobert, S., Cambridge, M.L., Velimirov, B., Pergent, G., Lepoint, G., Bouquegneau, J.M., Dauby, P., Pergent-Martini, C. & Walker, D.I. 2006.** Biology of *Posidonia*. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, Dordrecht, The Netherlands; 387-408.
- González-Correa, J.M., Bayle, J.T., Sánchez-Lizaso, J.L., Valle, C., Sánchez-Jerez, P. & Ruiz, J.M. 2005.** Recovery of deep *Posidonia oceanica* meadows degraded by trawling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320: 65-76.
- Gordillo, F.J.L., Dring, M.J. & Savidge G. 2002.** Nitrate and phosphate uptake characteristics of three species of brown algae cultured at low salinity. *Marine Ecology Progress Series*, 234: 111-118.
- Gradmann, D. 1989.** ATP-driven chloride pump in giant alga *Acetabularia*. *Methods in Enzymology*, 174: 490-504.
- Gradmann, D. & Bentrup, W.F. 1970.** Light-induced membrane potential changes and rectification in *Acetabularia*. *Naturwissenschaften*, 57: 46-47.

## Bibliografía

- Gradmann, D. & Boyd, C.M. 1995.** Membrane voltage of marine phytoplankton measured in the diatom *Coscinodiscus radiatus*. *Marine Biology*, 123: 645-650.
- Gras, A.F., Marguerite, S.K. & Madden, C.J. 2003.** Phosphorus uptake kinetics of a dominant tropical seagrass *Thalassia testudinum*. *Aquatic Botany*, 76: 299-315.
- Gutknecht, J. & Dainty, J. 1968.** Ionic relations of marine algae. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, 6: 163-200.
- Haines, K.C. & Wheeler, P.A. 1978.** Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *Journal of Phycology*, 14: 319-324.
- Harrison, P.J., Druehl, L.D., Lloyd, K.E. & Thompson, P.A. 1986.** Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales: Phaeophyta). *Marine Biology*, 93: 29-35.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J. 2000.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-99.
- Hasegawa, N., Iizumi, H. & Mukai, H., 2005.** Nitrogen dynamics of the surfgrass *Phyllospadix iwatensis*. *Marine Ecology Progress Series*, 293: 59-68.
- Hauser, P.C., Renner, N.D. & Hong, A.P.C. 1994.** Anion detection in capillary electrophoresis with ion-selective microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 295: 181-186.
- Hellblom, F., Beer, S., Björk, M. & Axelsson, L. 2001.** A buffer-sensitive inorganic carbon utilization system in *Zostera marina*. *Aquatic Botany*, 69: 55-62.
- Hellblom, F. & Axelsson, L. 2003.** External  $\text{HCO}_3^-$  dehydration maintained by acid zones in the plasma membrane is an important component of the photosynthetic carbon uptake in *Ruppia cirrhosa*. *Photosynthesis Research*, 77: 173-181.
- Hellebust, J.A. 1978.** Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effects of ions, ionophores and metabolic and transport inhibitors. *Journal of Phycology*, 14: 79-83.
- Hemminga, M.A. & Duarte, C.M. 2000.** *Seagrass ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Hirner, A., Ladwig, F., Stransky, H., Okumoto, S., Keinath, M., Harms, A., Frommer, W. & Koch, W. 2006.** *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell*, 18: 1931-1946.
- Hofmann, G.E., Barry, J.P., Edmunds, P.J., Gates, R.D., Hutchins, D.A., Klinger, T. & Sewell, M.A. 2010.** The effect of ocean acidification on calcifying organisms in marine ecosystems: an organism-to-ecosystem perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 41: 127-147.
- Huertas, I.E., Espie, G.S., Colman, B. & Lubián, L.M. 2000.** Light-dependent bicarbonate uptake and CO<sub>2</sub> efflux in the microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Planta*, 211: 43-49.
- Huertas, I.E., Lubián, L.M. & Espie, G.S. 2002.** Mitochondrial-driven bicarbonate transport supports photosynthesis in a marine microalga. *Plant Physiology*, 130: 284-291.
- Hughes, B.B., Lummis, S.C., Anderson, S.C. & Kroeker, K.J. 2017.** Unexpected resilience of a seagrass system exposed to global stressors. *Global Change Biology*, 24: 224-234.
- Huppe, H.C. & Turpin, D.H. 1994.** Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 577-607.
- Huser, M., Gehrig, P.M., Simon, W.E., Morf, W., Lindner, E., Jeney, J., Tóth, K. & Pungor, E. 1991.** Membrane Technology and Dynamic Response of Ion-Selective Liquid-Membrane Electrodes. *Analytical Chemistry*, 63: 1380-1386.
- Invers, O., Pérez, M. & Romero, J. 1997.** Effects of pH on seagrass photosynthesis: A laboratory and field assessment. *Aquatic Botany*, 59: 185-194.
- Invers, O., Pérez, M. & Romero, J. 1999.** Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: Role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235: 125-133.

## Bibliografía

- Invers, O., Zimmerman, R.C., Alberte, R.S., Pérez, M. & Romero, J. 2001.** Inorganic carbon sources for seagrass photosynthesis: An experimental evaluation of bicarbonate use in species inhabiting temperate waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 365: 203-217.
- Invers, O., Kraemer, G.P., Pérez, M. & Romero, J. 2004.** Effects of nitrogen addition on nitrogen metabolism and carbon reserves in the temperate seagrass *Posidonia oceanica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 303: 97-114.
- IPCC, 2013.** *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, P.M. (Eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- James, P.L. & Larkum, A.W.D. 1996.** Photosynthetic inorganic carbon acquisition in *Posidonia australis*. *Aquatic Botany*, 55: 149-157.
- Jensen, W.A. 1962.** *Botanical Histochemistry: Principles and practice*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Kaiser, W.M. & Huber, S.C. 2001.** Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1981-1989.
- King, B.J., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Warner, R.L. & Glass, A.D.M. 1993.** Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite and ammonium. *Plant Physiology*, 102: 1279-1286.
- Kirchman, D.L., Mazzella, L., Alberte, R.S. & Mitchell, R. 1984.** Epiphytic bacterial production on *Zostera marina* L. *Marine Ecology Progress Series*, 15: 117-123.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C. & Zhang, X.H. 2013.** Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology*, 19: 103-132.

- Komarova, N.Y., Thor, K., Gubler, A., Meier, S., Dietrich, D., Weichert, A., Suter Grotemeyer, M., Tegeder, M. & Rentsch, D. 2008.** AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides in planta. *Plant Physiology*, 148: 856-869.
- Kotur, Z., Mackenzie, N., Ramesh, S., Tyerman, S.D., Kaiser, B.N. & Glass, A.D. 2012.** Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *The New Phytologist*, 194: 724-731.
- Lara, C., Rodríguez, R. & Guerrero, M.G. 1993.** Sodium-dependent nitrate transport and energetics in cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 29: 389-395.
- Larkum, A.W.D., McComb, A.J. & Shepherd, S.A. 1989.** *Biology of seagrasses: a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region.* Amsterdam, Elsevier; 686-722.
- Larkum, W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M. 2006.** *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation.* Springer, Netherlands.
- Larkum, A.W.D., Davey, P.A., Kuo, J., Ralph, P.J. & Raven, J.A. 2017.** Carbon-concentrating mechanisms in seagrasses. *Journal of Experimental Botany*, 68: 3773-3784.
- Larsson, C. & Axelsson, L. 1999.** Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *European Journal of Phycology*, 34: 79-86.
- Laties, G.C. 1982.** The cyanide resistant, alternative path in higher plant respiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 519-555.
- Lee, K.S. & Dunton, K. 1999.** Inorganic nitrogen acquisition in the seagrass *Thalassia testudinum*: development of a whole plant nitrogen budget. *Limnology and Oceanography*, 44: 1204-1215.
- Lee, K.S., Park, S.R. & Kim, Y.K. 2007 (A).** Effects of irradiance, temperature, and nutrients on growth dynamics of seagrasses: A review. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350: 144-175.
- Lee, Y.H., Foster, J., Chen, J., Voll, L., Weber, A. & Tegeder, M. 2007 (B).** AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 50: 305-316.

## Bibliografía

- Lee, H., Golicz, A.A., Bayer, P.E., Jiao, Y., Tang, H., Paterson, A.H., Sablok, G., Krishnaraj, R.R., Chan, C.K.K., Batley, J., Kendrick, G.A., Larkum, A.W.D., Ralph, P.J. & Edwards, D. 2016.** The Genome of a southern hemisphere seagrass species (*Zostera muelleri*). *Plant Physiology*, 172: 272-283.
- Lehmann, S., Gumy, C., Blatter, E., Boeffel, S., Fricke, W. & Rentsch, D. 2011.** In planta function of compatible solute transporters of the *AtProT* family. *Journal of Experimental Botany*, 62: 787-796.
- Léran, S., Varala, K., Boyer, J.C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernández, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J.M., Halkier, B.A., Harris, J.M., Hedrich, R., Limami, A.M., Rentsch, D., Seo, M., Tsay, Y.F., Zhang, M., Coruzzi, G. & Lacombe, B. 2014.** A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plants. *Trends in Plant Science*, 19: 5-9.
- Les, D.H., Cleland, M.A. & Waycott, M. 1997.** Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Systematic Botany*, 22: 443-463.
- Les, D.H. & Tippery, N.P. 2013.** In time and with water...the systematics of alismatid monocotyledons. In: Wilkin, P. & Mayo, S.J. (Eds.). *Early Events in Monocot Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK; 118-164.
- Liu, K.H. & Tsay, Y.F. 2003.** Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22: 1005-1013.
- Lucas, W.J. & Nuccitelli, R. 1980.**  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{OH}^-$  transport across the plasmalemma of *Chara*. *Planta*, 150 (2): 120-131.
- Lucas, W.J., Keifer, D.W. & Sanders, D. 1983.** Bicarbonate transport in *Chara corallina*: Evidence for cotransport of  $\text{HCO}_3^-$  with  $\text{H}^+$ . *The Journal of Membrane Biology*, 73: 263-274.
- Lucas, W.J. & Berry, J.A. 1985.** Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms. American Society of Plant Physiologists, Rockville.

- Lupini, A., Mercati, F., Araniti, F., Miller, A.J., Sunseri, F. & Abenavoli, M.R. 2016.** NAR2.1/NRT2.1 functional interaction with  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{H}^+$  fluxes in high-affinity nitrate transport in maize root regions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 102: 107-114.
- Lv, X.F., Yu, P., Deng, W.H. & Li., Y. 2018.** Transcriptomic analysis reveals the molecular adaptation to NaCl stress in *Zostera marina* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130: 61-68.
- Maathuis, F.J.M. & Amtmann, A. 1999.**  $\text{K}^+$  Nutrition and  $\text{Na}^+$  Toxicity: The Basis of Cellular  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  Ratios. *Annals of Botany*, 84 (2): 123-133.
- Maathuis, F.J.M. & Sanders, D. 1996.** Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiologia Plantarum*, 96: 158-168.
- Macduff, J.H., Bakken, A.K. & Dhanoa, M.S. 1997.** An analysis of the physiological basis of commonality between diurnal patterns of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{K}^+$  uptake by *Phleum pratense* and *Festuca pratensis*. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1691-1701.
- Marbà, N., Cebrian, J., Enriquez, S. & Duarte, C.M. 1996.** Growth patterns of western Mediterranean seagrasses: Species-specific responses to seasonal forcing. *Marine Ecology Progress Series*, 133: 203-215.
- Marrè, E. 1979.** Fusicoccin: A tool in plant physiology. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 273-288.
- Matéo, M.A., Romero, J., Pérez, M., Littler, M.M. & Littler, D.S. 1997.** Dynamics of millenary organic deposits resulting from the growth of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Estuarine Coastal & Shelf Science*, 44: 103-110.
- Mercado, J.M., Niell, F.X., Silva, J. & Santos, R. 2003.** Use of light and inorganic carbon acquisition by two morphotypes of *Zostera noltii* Hornem. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297: 71-84.
- Merrett, M.J., Nimer, N.A. & Dong, L.F. 1996.** The utilization of bicarbonate ions by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* (Droop) Hibberd. *Plant, Cell & Environment*, 19: 478-484.



## Bibliografía

- Miedema, H., Felle, H., & Prins, H.B.A. 1992.** Effect of high pH on the plasma-membrane potential and conductance in *Elodea densa*. *Journal of Membrane Biology*, 128: 63-69.
- Miller, A.J. & Zhen, R.G. 1991.** Measurements of intracellular nitrate concentrations in *Chara* using nitrate-selective microelectrodes. *Planta*, 187: 47-52.
- Miller, A.J. & Smith, S.J. 1996.** Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. *Journal of Experimental Botany*, 47: 843-854.
- Miller, A.J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S.J. & Wells, D.M. 2007.** Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2297-2306.
- Miller, A.J. & Smith, S.J. 2008.** Cytosolic nitrate ion homeostasis: could it have a role in sensing nitrogen status? *Annals of Botany*, 101: 485-489.
- Miller, A.J. 2012.** Making Contact and Measuring Cellular Electrochemical Gradients. In: A. G. Volkov (Ed.), *Plant Electrophysiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; 6: 145-165.
- Millhouse, J. & Strother, S. 1986.** Salt-stimulated bicarbonate-dependent photosynthesis in the marine angiosperm *Zostera muelleri*. *Journal of Experimental Botany*, 37: 965-976.
- Millhouse, J. & Strother, S. 1987.** Further characteristics of saltdependent bicarbonate use by the seagrass *Zostera muelleri*. *Journal of Experimental Botany*, 38: 1055-1068.
- Millero, F.J., Graham, T.B., Huang, F., Bustos-Serrano, H. & Pierrot, D. 2006.** Dissociation constants of carbonic acid in seawater as a function of salinity and temperature. *Marine Chemistry*, 100: 80-94.
- Mimura T., Reid R.J. & Smith, F.A. 1998.** Control of phosphate transport across the plasma membrane of *Chara corallina*. *Journal of Experimental Botany*, 49: 13-19.
- Moreno, D., Luque, A.A. & Templado, J. 2004.** Las praderas de *Posidonia oceanica*. Distribución en Andalucía. En: Luque, A.A. & Templado, J. (Coords.). *Praderas y bosques marinos de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla; 60-63.



- Morère-Le Paven, M.C., Viau, L., Hamon, A., Vandecasteele, C., Pellizzaro, A., Bourdin, C., Laffont, C., Laped, B., Lepetit, M., Frugier, F., Legros, C. & Limami, A.M. 2011.** Characterization of a dual-affinity nitrate transporter MtNRT1.3 in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 62: 5595-5605.
- Muramatsu, Y., Harada, A., Ohwaki, Y., Kasahara, Y., Takagi, S. & Fukuhara, T. 2002.** Salt-tolerance ATPase activity in the plasma membrane of the marine angiosperm *Zostera marina* L. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1137-1145.
- Munns, R. & Tester, M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651-681.
- Nafie, Y.A., Van Engeland, T., Van Katwijk, M.M. & Bourma, T. 2014.** Uptake of nitrogen from compound pools by the seagrass *Zostera noltii*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 460: 47-52.
- Nakajima, K., Tanaka, A., Matsuda, Y. 2013.** SLC4 family transporters in a marine diatom directly pump bicarbonate from seawater. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 110: 1767-1772.
- Nayar, S., Collings, G.J., Miller, D.J., Bryars, S. & Cheshire, A.C. 2010.** Uptake and resource allocation of ammonium and nitrate in temperate seagrasses *Posidonia* and *Amphibolis*. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 1502-1511.
- Nayar, S. 2015.** Uptake of inorganic phosphorus by temperate seagrass beds of *Posidonia* and *Amphibolis* in Southern Australia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187: 512.
- NOAA-CCGG. 2019.** National Oceanographic and Atmospheric Administration - Carbon Cycle Greenhouse Gases Group, Dr. Pieter Tans, NOAA/ESRL ([www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)) & Dr. Ralph Keeling, Scripps Institution of Oceanography (<http://scrippsco2.ucsd.edu/>) (accessed January 2019).
- Nobel, P.S. 2009.** *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 4th Edn. Elsevier, Oxford, UK.
- Novacky, A., Ullrich-Eberius, C.I. & Lüttge, U. 1978.** Membrane potential changes during transport of hexoses in *Lemna gibba* G1. *Planta*, 138: 263-270.

## Bibliografía

- Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., Nakanishi, T.M. & Thibaud, M.C. 2011.** Phosphate import in plants: Focus on the PTH1 transporters. *Frontiers in Plant Science*, 2: 83.
- Okamoto, M., Kumar, A., Li, W., Wang, Y., Siddiqi, M.Y., Crawford, N.M. & Glass, A.D.M. 2006.** High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the *NAR2*-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiology*, 140: 1036-1046.
- Olsen, J.L., Rouzé, P., Verhelst, B., Lin, Y.C., Bayer, T., Collen, J., Dattolo, E., De Paoli, E., Dittami, S., Maumus, F., Michel, G., Kersting, A., Lauritano, C., Lohaus, R., Töpel, M., Tonon, T., Vanneste, K., Amirebrahimi, M., Brakel, J., Boström, C., Chovatia, M., Grimwood, J., Jenkins, J.W., Jueterbock, A., Mraz, A., Stam, W.T., Tice, H., Bornberg-Bauer, E., Green, P.J., Pearson, G.A., Procaccini, G., Duarte, C.M., Schmutz, J., Reusch, T.B.H. & Van de Peer, Y. 2016.** The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature*, 530: 331-335.
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.F., Yamanaka, Y. & Yool, A. 2005.** Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437: 681-686.
- Orsel, M., Krapp, A. & Daniel-Vedele, F. 2002.** Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiology*, 129: 886-896.
- Ott, J.A. 1980.** Growth and production of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Marine Ecology*, 1: 47-64.
- Palmgren, M.G. 1998.** Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Advances in Botanical Research*, 28: 1-70.
- Palmgren, M.G. 2001.** Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 817-845.

- Palmqvist, K., Ramazanov, Z. & Samuelsson, G. 1990.** Role of extracellular carbonic anhydrase for accumulation of inorganic carbon in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A comparison between wild-type and cellwall-less mutant cells. *Physiologia Plantarum*, 80: 267-276.
- Pedersen, C.N.S., Axelsen, K.B., Harper, J.F. & Palmgren, M.G. 2012.** Evolution of plant P-Type ATPases. *Frontiers in Plant Sciences*, 3: 1-19.
- Pereira, R., Kraemer, G., Yarish, C. & Sousa-Pinto, I. 2008.** Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. *European Journal of Phycology*, 43: 107-118.
- Péret, B., Clément, M., Nussaume, L. & Desnos, T. 2011.** Root developmental adaptation to phosphate starvation: Better safe than sorry. *Trends in Plant Science*, 16: 442-450.
- Péret, B., Desnos, T., Jost, R., Kanno, S., Berkowitz, O. & Nussaume, L. 2014.** Root Architecture Responses: In Search of Phosphate. *Plant Physiology*, 166: 1713-1723.
- Pérez, M., Romero, J., Duarte, C.M. & Sand-Jensen, K. 1991.** Phosphorus limitation of *Cymodocea nodosa* growth. *Marine Biology*, 109: 129-133.
- Pérez-Lloréns, J.L. & Niell, F.X. 1995.** Short-term phosphate uptake kinetics in *Zostera noltii* Hornem: A comparison between excised leaves and sediment-rooted plants. *Hydrobiologia*, 297: 17-27.
- Pérez, M., Díaz, E. & Ruiz, J.M. 2015.** Las praderas marinas en España. En: Ruiz, J.M., Guillén, J.E., Ramos Segura, A. & Otero, M.M. (Eds.). *Atlas de las praderas marinas de España*. IEO/IEL/UICN, Murcia-Alicante-Málaga; 121-177.
- Pergent, G., Pergent-Martini, C. & Boudouresque, C.F. 1995.** Utilisation de l'herbier à *Posidonia oceanica* comme indicateur biologique de la qualité du milieu marin littoral en Méditerranée: état des connaissances. *Mésogée*, 54: 3-27.

## Bibliografía

- Pergent, G., Bazairi, H., Bianchi, C.N., Boudouresque, C.F., Buia, M.C., Calvo, S., Clabaut, P., Harmelin-Vivien, M., Mateo, M.A., Montefalcone, M., Morri, C., Orfanidis, S., Pergent-Martini, C., Semroud, R., Serrano, O., Thibaut, T., Tomasello, A. & Verlaque, M. 2014.** Climate change and Mediterranean seagrass meadows: a synopsis for environmental managers. *Mediterranean Marine Science*, 15: 462-473.
- Piro, A., Marín-Guirao, L., Serra, I.A., Spadafora, A., Sandoval-Gil, J.M., Bernardeau-Esteller, J., Fernández, J.M.R. & Mazzuca, S. 2015.** The modulation of leaf metabolism plays a role in salt tolerance of *Cymodocea nodosa* exposed to hypersaline stress in mesocosms. *Frontiers in Plant Sciences*, 6: 464.
- Planes, M.D., Niñoles, R., Rubio, L., Bissoli, G., Bueso, E., García-Sánchez, M.J. & Serrano, R. 2015.** A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and decreased cytosolic pH, K<sup>+</sup>, and anions. *Journal of Experimental Botany*, 66: 813-825.
- Poirier, Y., & Bucher, M. 2002.** Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In: Somerville, C.R. & Meyerowitz, E.M. (Eds.). *The Arabidopsis Book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists; 1-35.
- Poschenrieder, C., Fernández, J.A., Rubio, L., Pérez, L., Terés, J. & Barceló, J. 2018.** Transport and Use of Bicarbonate in Plants: Current Knowledge and Challenges Ahead. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1352.
- POSIMED Andalucía. 2014.** Red de seguimiento para el estado de conservación de *Posidonia oceanica* mediante grupos de voluntariado en Andalucía. Informe de participación, Campaña 2014. Proyecto Life+Posidonia Andalucía.
- Pressman, B.C. 1976.** Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, 45: 501-530.
- Pressman, B.C. & Fahim, M. 1982.** Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 22: 465-490.

- Price, G.D., Woodger, F.J., Badger, M.R., Howitt, S.M. & Tucker, L. 2004.** Identification of a SulP-type bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA*, 101: 18228-18233.
- Rae, A.L., Cybinski, D.H., Jarmey, J.M. & Smith, F.W. 2003.** Characterization of two phosphate transporters from barley: Evidence for diverse function and kinetic properties among members of the Pht1 family. *Plant Molecular Biology*, 53: 27-36.
- Raghothama, K.G. 1999.** Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology*, 50: 665-693.
- Rausch, C. & Bucher, M. 2002.** Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 216: 23-37.
- Raven, J.A. 1984.** Energetics and transport in aquatic plants. MBL Lectures in Biology. Alan R. Liss, Inc., New York. Vol. 4.
- Raven, J.A. 1996.** Into the voids. The distribution, function, development and maintenance of gas spaces in plants. *Annals of Botany*, 78: 137-142.
- Raven, J.A., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., Riebesell, U., Shepherd, J., Turley, C. & Watson, A. 2005.** Ocean Acidification due to Increasing Atmospheric Carbon Dioxide. Policy Document 12/05. The Royal Society, London.
- Raven, J.A., Cockell, C.S. & La Rocha De, C.L. 2008.** The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 2641-2650.
- Raven, J.A. 2011.** Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO<sub>2</sub>. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 111B: 1-17.
- Raven, J.A. & Hurd, C.L. 2012.** Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynthesis Research*, 113: 105-125.
- Raven, J.A., Beardall, J. & Giordano, M. 2014.** Energy costs of carbon dioxide concentrating mechanisms in aquatic organisms. *Photosynthesis Research*, 121: 111-124.

## Bibliografía

- Raven, J.A. & Beardall, J. 2016.** The ins and outs of CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany*, 67: 1-13.
- Rees, T.A., Cresswell, R.C. & Syrett, P.J. 1980.** Sodium-dependent uptake of nitrate and urea by a marine diatom. *Biochimica et Biophysica Acta*, 596: 141-144.
- Reid, R.J., Mimura, T., Ohsumi, Y., Walker, N.A. & Smith, F.A. 2000.** Phosphate uptake in Chara: membrane transport via Na<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> cotransport. *Plant, Cell and Environment*, 23: 223-228.
- Riley, J.P. & Chester, R. 1971.** *Introduction to marine chemistry*. Academic Press, London and New York.
- Roberts, S.K. 2006.** Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*: 169, 647-666.
- Robertson, E.L. 1984.** Seagrasses. In: Womersley, H.B.S. (Ed.). *The marine benthic flora of Southern Australia*. Part I. Government Printer, South Australia; 57-122.
- Rodríguez, R., Guerrero, M.G. & Lara, C. 1994.** Mechanism of sodium/nitrate symport in *Anacystis nidulans* R2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1187: 250-254.
- Roelfsema, M.R.G., Hedrich, R. & Geiger, D. 2012.** Anion channels: Master switches of stress responses. *Trends in Plant Science*, 17: 221-229.
- Romero, J., Lee, K.S., Pérez, M.A. & Alcoverro, T. 2006.** Nutrients dynamics. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology and Conservation*. Springer, Netherlands; 227-254.
- Royal Society, 2005.** *Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide*. The Clyvedon Press Ltd, Cardiff, UK.
- Rubio, L., Linares-Rueda, A., García-Sánchez, M.J. & Fernández, J.A. 2005.** Physiological evidence for a sodium-dependent high-affinity phosphate and nitrate transport at the plasma membrane of leaf and root cells of *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Botany*, 56 (412): 613-622.

- Rubio, L., Hammou, K.A., Elena ,B., García-Sánchez, M.J. & Fernández, J.A. 2009.** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> permeability at different salt growth regimes and Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> uptake kinetics in the halophyte *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. In: *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(2), Supplement: 193.
- Rubio, L., Belver, A., Venema, K., García-Sánchez, M.J. & Fernández, J.A. 2011.** Evidence for a sodium efflux mechanism in the leaf cells of the seagrass *Zostera marina* L. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 402: 56-64.
- Rubio, L. & Fernández J.A. 2019.** Seagrasses, the Unique Adaptation of Angiosperms to the Marine Environment: Effect of High carbon and Ocean Acidification on Energetics and Ion Homeostasis. In: Hasanuzzaman, M., Shabala, S. & Fujita, M. (Eds.). *Halophytes and Climate Change: Adaptative Mechanisms and Potential Uses*. CAB International; 89-103.
- Ruiz, J.M., Guillén, J.E., Ramos Segura, A. & Otero, M.M. (Eds.). 2015.** *Atlas de las praderas marinas de España*. IEO/IEL/ UICN, Murcia-Alicante-Málaga.
- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.H., Kozyr, A., Ono, T. & Rios, A.F. 2004.** The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science*, 305: 367-371.
- Sabine, C.L. & Feely, R.A. 2007.** The oceanic sink for carbon dioxide. In: Reay, D., Hewitt, N., Grace, J. & Smith, K. (Eds.). *Greenhouse Gas Sinks*. CABI Publishing, Oxfordshire; 31-49.
- Salazar, C. 2009.** En: Blanca, G., Cabezudo, B., Cueto, M., Fernández López, C. & Morales Torres C. (Eds.). *Flora Vascular de Andalucía Oriental*. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla; (1): 127.
- Sanders, D., Hansen, U.P. & Slayman, C.L. 1981.** Role of the plasma membrane proton pump in pH regulation in non-animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 78: 5903-5907.



## Bibliografía

- Sanders, D., Hansen, U.P., Gradmann, D. & Slayman, C.L. 1984.** Generalized kinetic analysis of ion-dependent cotransport systems: A unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. *The Journal of Membrane Biology*, 77: 123-152.
- Sandoval-Gil, J.M., Marin-Guirao, L. & Ruiz, J.M. 2012.** Tolerance of Mediterranean seagrasses (*Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*) to hypersaline stress: water relations and osmolyte concentrations. *Marine Biology*, 159: 1129-1141.
- Schachtman, D.P., Reid, R.J. & Ayling, S.M. 1998.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, 116: 447-453.
- Schroeder, J.I., Schmidt, C. & Scheaffer, J. 1993.** Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell*, 5: 1831-1841.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwartz, M., Scheaffer, J., Assmann, S.M. & Schroeder, J.I. 1995.** Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiology*, 109: 651-658.
- Schwarz, A.M., Björk, M., Buluda, T., Mtolera, M. & Beer, S. 2000.** Photosynthetic utilization of carbon and light by two tropical seagrass species as measured in situ. *Marine Biology*, 137: 755-761.
- Siddiqi, M.Y. & Glass, A.D.M. 2002.** An evaluation of the evidence for, and implications of, cytoplasmic nitrate homeostasis. *Plant Cell and Environment*, 25: 1211-1217.
- Shabala, S. & Mackay, A. 2011.** Ion transport in halophytes. In: Turkan, I. (Ed.). *Plant Responses to Drought and Salinity Stress - Developments in a Post-Genomic Era. Advances in Botanical Research*. Academic Press, Amsterdam; 151-199.
- Shibata, M., Katoh, H., Sonoda, M., Ohkawa, H., Shimoyama, M., Fukuzawa, H., Kaplan, A. & Ogawa, T. 2002.** Genes essential to sodium-dependent bicarbonate transport in cyanobacteria: Function and phylogenetic analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 18658-18664.



- Shimmen, T., Yonemura, S., Negoro, M. & Lucas, W.J. 2003.** Studies on alkaline band formation in *Chara corallina*: ameliorating effect of  $\text{Ca}^{+2}$  on inhibition induced by osmotic shock. *Plant and Cell Physiology*, 44: 957-960.
- Shono, M., Wada, M. & Fujii, T. 1995.** Partial purification of a  $\text{Na}^+$ -ATPase from the plasma membrane of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. *Plant Physiology*, 108: 1615-1621.
- Short, F.T. & Neckles, H.A. 1999.** The effects of global climate change on seagrasses. *Aquatic Botany*, 63: 169-196.
- Short, F., Carruthers, T., Dennison, W. & Waycott M. 2007.** Global seagrass distribution and diversity: A bioregional model. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 350: 3-20.
- Smit, A.J. 2002.** Nitrogen Uptake by *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta): Adaptations to a temporally variable nitrogen environment. *Botanica Marina*, 45: 196-209.
- Spanswick, R.M. 1981.** Electrogenic ion pumps. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 32: 267-289.
- Stapel, J., Aarts, T.L., van Duynhoven, B.H.M., de Groot, J.D., van den Hoogen, P.H.W. & Hemminga, M.A. 1996.** Nutrient uptake by leaves and roots of the seagrass *Thalassia hemprichii* in the Spermonde Archipelago, Indonesia. *Marine Ecology Progress Series*, 134: 195-206.
- Sugiura, M., Georgescu, M.N. & Takahashi, M. 2007.** A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 48: 1022-1035.
- Svennerstam, H., Ganeteg, U., Bellini, C., & Näsholm, T. 2007.** Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiology*, 143: 1853-1860.
- Svennerstam, H., Ganeteg, U. & Näsholm, T. 2008.** Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease 5. *New Phytologist*, 180: 620-630.
- Svennerstam, H., Jämtgård, S., Ahmad, I., Huss-Danell, K., Näsholm, T. & Ganeteg, U. 2011.** Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *New Phytologist*, 191: 459-467.

## Bibliografía

- Talavera, S. & Gallego, M.J. 2010.** En: Castroviejo, S., Aedo, C., Lainz, M., Muñoz Garmendia, F., Nieto Feliner, G., Paiva, J. & Benedí, C. (Eds.). *Flora Ibérica*. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid; (17): 114-117.
- Taub, D.R. & Wang, X.Z. 2008.** Why are nitrogen concentrations in plant tissues lower under elevated CO<sub>2</sub>? A critical examination of the hypotheses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 5: 1365-1374
- Taylor, A.R., Brownlee, C. & Wheeler, G.L. 2012.** Proton channels in algae: Reasons to be excited. *Trends in Plant Science*, 17: 675-684.
- Tegeder, M. 2014.** Transporters involved in source to sink partitioning of amino acids and ureides: Opportunities for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1865-1878.
- Telesca, L., Belluscio, A., Criscoli, A., Ardizzone, G., Apostolaki, E.T., Frascetti S., Gristina, M., Knittweis, L., Martin, C.S., Pergent, G., Alagna, A., Badalamenti, F., Garofalo, G., Gerakaris, V., Pace, M.L., Pergent-Martini, C. & Salomidi, M. 2015.** Seagrass meadows (*Posidonia oceanica*) distribution and trajectories of change. *Scientific Reports*, 5: 12505.
- Terrados, J. & Williams, S.L. 1997.** Leaf versus root nitrogen uptake by the surfgrass *Phyllospadix torreyi*. *Marine Ecology Progress Series*, 149: 267-277.
- Tester, M. & Davenport, R. 2003.** Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91: 503-527.
- Tortell, P.D., Reinfelder, J.R. & Morel, F.M.M. 1997.** Active uptake of bicarbonate by diatoms. *Nature*, 390: 243-244.
- Touchette, B.W. & Burkholder, J.M. 2000.** Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 250: 133-167.
- Trebacz, K., Simonis, W. & Schonknecht, G. 1994.** Cytoplasmic Ca<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> activities in the liverwort *Conocephalum conicum* L. at rest and during action potentials. *Plant Physiology*, 106: 1073-84.
- Tsuzuki, M. & Miyachi, S. 1989.** The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquatic Botany*, 34: 85-104.

- Turpin, D.A. 1991.** Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *Journal of Phycology*, 27: 14-20.
- Uku, J., Beer, S. & Björk, S. 2005.** Buffer sensitivity of photosynthetic carbon utilization in eight tropical seagrasses. *Marine Biology*, 147: 1085-1090.
- Ullrich-Eberius, C.I., Novacky, A. & van Bel, A.J.E. 1984.** Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: Energetics and kinetics. *Planta*, 161: 46-52.
- Umezawa, Y., Bühlmann, P., Umezawa, K., Tohda, K. & Amemiya, S. 2000.** International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. *Pure Applied Chemistry*, 72 (10): 1851-2082.
- Van Engeland, T., Bouma, T.J., Morris, E.P., Brun, F.G., Peralta, G., Lara, M., Hendriks, I.E., Soetaert, K. & Middelburg, J.J. 2011.** Potential uptake of dissolved organic matter by seagrasses and macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 427: 71-81.
- Volkov, V., Wang, B., Dominy, P.J., Fricke, W. & Amtmann, A. 2003.** *Thellungiella halophila*, a salt tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell and Environment*, 27: 1-14.
- Volkov, V. & Amtmann, A. 2006.** *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, has specific root ion-channel features supporting  $K^+/Na^+$  homeostasis under salinity stress. *Plant Journal*, 48: 342-353.
- Vonk, J.A., Middelburg, J.J., Stapel, J. & Bouma, T.J. 2008.** Dissolved organic nitrogen uptake by seagrasses. *Limnology and Oceanography*, 53: 542-548.
- Walker, D.J. Smith, S.J. & Miller, A.J. 1995.** Simultaneous measurement of intracellular pH and  $K^+$  or  $NO_3^-$  in barley root cells using triple-barreled ion selective microelectrodes. *Plant Physiology*, 108:743-751.
- Walker, N.A., Smith, F.A. & Cathers, I.R. 1980.** Bicarbonate assimilation by fresh-water charophytes and higher plants: I. Membrane transport of bicarbonate ions is not proven. *The Journal of Membrane Biology*, 57: 51-58.

## Bibliografía

- Walker, N.A. 1994.** Sodium-coupled symports in the plasma membrane of plant cells. In: Blatt, M.R., Leigh, R.A. & Sanders, D. (Eds.). *Membrane Transport in Plants and Fungi: Molecular Mechanisms and Control*. Society for Experimental Biology Symposium XLVIII. The Company of Biologists, Cambridge, UK; 179-192.
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K. & Tsay, Y.F. 2012.** Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends in Plant Science*, 17: 458-467.
- Waycott, M. & Les, D.H. 2000.** Current perspectives on marine angiosperm evolution. *Biología Marina Mediterránea*, 7: 160-163.
- Waycott, M., Procaccini, G., Les, D.H. & Reusch, T.B.H. 2006.** Seagrass evolution, ecology and conservation: a genetic perspective. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J., Duarte, C. (Eds.). *Seagrasses: Biology, Ecology, and Conservation*. Springer, The Netherlands; 25-50.
- Wiencke, C. & Bischof, K. 2012.** *Seaweed Biology: Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization*. Springer, Heidelberg.
- Williams, S.L. 2016.** Genomics: From sea to sea. *Nature*, 530: 290-291.
- Xue, S., Hu, H., Ries, A., Merilo, E., Kollist, H. & Schroeder, J.I. 2011.** Central functions of bicarbonate in S-type anion channel activation and OST1 protein kinase in CO<sub>2</sub> signal transduction in guard cell. *The EMBO Journal*, 30: 1645-1658.
- Yeo, A.R. 1998.** Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49: 915-929.
- Young, E.B., Beardall, J. & Giordano, M. 2001.** Investigation of inorganic carbon acquisition by *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) using inhibitors of putative HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilization pathways. *European Journal of Phycology*, 36: 81-88.
- Zeebe, R.E. & Wolf-Gladrow, D. 2001.** *CO<sub>2</sub> in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*. 1st Edn. Elsevier, Amsterdam.
- Zhen, R.G., Koyro, H.W., Leigh, R.A., Tomos, A.D. & Miller, A.J. 1991.** Compartmental nitrate concentrations in barley root cells measured with nitrate-selective microelectrodes and by single-cell sap sampling. *Planta*, 185: 356.

- Zhou, J.J., Theodoulou, F.L., Muldin, I., Ingemarsson, B. & Miller, A.J. 1998.** Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 12017-12023.
- Zhou, J.J., Fernández, E., Galván, A. & Miller, A.J. 2000.** A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Letters*, 466: 225-227.
- Zhu, J.-K. 2002.** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 247-273.
- Zhu, X., Pan, T., Zhang, X., Fan, L., Quintero, F.J., Zhao, H., Su, X., Li, X., Villalta, I., Mendoza, I., Shen, J., Jiang, L., Pardo, J.M. & Qiu, Q.S. 2018.** K<sup>+</sup> Efflux Antiporters 4, 5 and 6 Mediate pH and K<sup>+</sup> Homeostasis in Endomembrane Compartments. *Plant Physiology*, 178 (4): 1657-1678.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ÍNDICE DE FIGURAS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



	<b>Página</b>
<b>Figure 1.</b> Summary of physiological and structural adaptations made by seagrasses in its colonization of the sea.	<b>4</b>
<b>Figure 2.</b> Model for $\text{HCO}_3^-$ utilization in seagrasses.	<b>11</b>
<b>Figure 3.</b> Distribution of <i>P. oceanica</i> meadows in the Mediterranean Sea.	<b>24</b>
<b>Figure 4.</b> <i>P. oceanica</i> stand showing part of the vertical or orthotropic rhizome, as well as the rocky sediment that sustains it.	<b>26</b>
<b>Figure 5.</b> Organs of sexual reproduction of <i>P. oceanica</i> .	<b>27</b>
<b>Figure 6.</b> Sampling zone and stand of <i>P. oceanica</i> in Punta de Calaburras (Mijas, Málaga).	<b>29</b>
<b>Figure 7.</b> Maintenance system of <i>P. oceanica</i> sheets in the laboratory.	<b>30</b>
<b>Figure 8.</b> <i>P. oceanica</i> fruits collected in the barrier reef in front of the coast of Roquetas de Mar (Almería).	<b>31</b>
<b>Figure 9.</b> Cross section of <i>P. oceanica</i> leaf showing the epidermis, the mesophyll (with the characteristic large parenchymal cells) and the vascular bundles.	<b>32</b>
<b>Figure 10.</b> Components of an electrophysiology rig.	<b>35</b>
<b>Figure 11.</b> Diagrammatic representation of the circuit required for double-barrelled ion-selective microelectrode measurements.	<b>37</b>
<b>Figure 12.</b> External pH measurement in <i>P. oceanica</i> leaves.	<b>43</b>
<b>Figure 13.</b> Experimental setup for the assay medium (NSW) bubbling with 1000 ppm $\text{CO}_2$ .	<b>46</b>
<b>Figure 14.</b> <i>Posidonia oceanica</i> seedlings.	<b>59</b>
<b>Figure 15.</b> Effect of light-dark transition on membrane potential ( $E_m$ ) of a <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cell.	<b>61</b>

	Página
<b>Figure 16.</b> Effect of fusicoccin (FC) on membrane potential of mesophyll cells ( $E_m$ ) and on external pH of leaves of <i>Posidonia oceanica</i> .	62
<b>Figure 17.</b> Effect of external $K^+$ concentration variation on diffusion potential of <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells.	63
<b>Figure 18.</b> Simultaneous measurements of membrane potential ( $E_m$ ) and cytosolic $Na^+$ concentration of mesophyll leaf cells of <i>P. oceanica</i> in NSW.	65
<b>Figure 19.</b> Effect of the addition of 3 mM $NaHCO_3$ on membrane potential ( $E_m$ , mV) and cytosolic pH, cytosolic $Na^+$ ( $Na^+_c$ , mM), or cytosolic $Cl^-$ ( $Cl^-_c$ , mM) measured in mesophyll leaf cells of <i>Posidonia oceanica</i> .	67
<b>Figure 20.</b> Effect of the addition of 1000 ppm $CO_2$ to natural seawater on the membrane potential ( $E_m$ ) and cytosolic pH measured in <i>Posidonia oceanica</i> leaf cells.	68
<b>Figure 21.</b> Effect of $HCO_3^-$ on the photosynthetic activity of <i>Posidonia oceanica</i> leaves.	69
<b>Figure 22.</b> Apparent photosynthesis (APS) rates at 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (black points, $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}_{FM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and membrane induced depolarizations (open circles, mV) at different external $HCO_3^-$ concentrations.	70
<b>Figure 23.</b> Apparent photosynthesis (APS) of <i>Posidonia oceanica</i> leaf pieces measured in NSW and after the addition of 0.1 mM ethoxzolamide (EZ), 0.1 mM acetazolamide (AZ), $CO_2$ , and 3 mM $NaHCO_3$ .	72
<b>Figure 24.</b> Apparent photosynthesis (APS) of <i>Posidonia oceanica</i> leaf pieces measured in NSW, ASW, $Na^+$ -free ASW and NSW after the addition of 0.1 mM monensin.	73
<b>Figure 25.</b> Membrane depolarizations ( $\Delta E_m$ ) induced by increasing $NaNO_3$ concentrations in artificial seawater (ASW) without N (containing 500 mM $Na^+$ and 2 mM $NaHCO_3$ ) under light or dark conditions.	74

	<b>Página</b>
<b>Figure 26.</b> Membrane potential ( $E_m$ ) changes after the addition of 100 $\mu\text{M}$ $\text{KNO}_3$ to ASW containing 500 mM NaCl, $\text{Na}^+$ -free ASW (with 800 mM sorbitol), and ASW containing 30 mM NaCl.	<b>75</b>
<b>Figure 27.</b> Membrane potential depolarizations induced by the addition of 100 $\mu\text{M}$ $\text{KNO}_3$ in ASW containing increasing $\text{Na}^+$ concentrations.	<b>76</b>
<b>Figure 28.</b> Effect of the addition of 100 $\mu\text{M}$ $\text{KNO}_3$ on membrane potential ( $E_m$ ) and cytosolic $\text{Na}^+$ concentration simultaneously measured in <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells.	<b>77</b>
<b>Figure 29.</b> Nitrate uptake of <i>P. oceanica</i> leaves in light (500 mM NaCl) and dark conditions (500 mM NaCl) and in the absence of $\text{Na}^+$ (0 mM NaCl +Sorbitol - light) in the medium.	<b>78</b>
<b>Figure 30.</b> Membrane depolarizations ( $\Delta E_m$ ) induced by increasing $\text{NaNO}_3$ concentrations measured in artificial seawater ASW containing 2 mM $\text{NaHCO}_3$ under light & dark conditions and in ASW containing 10 mM $\text{NaHCO}_3$ under light conditions.	<b>80</b>
<b>Figure 31.</b> Effect of light-dark transition on membrane potential ( $E_m$ ) and $\text{NO}_3^-$ cytosolic concentration measured simultaneously in mesophyll leaf cells of <i>P. oceanica</i> .	<b>81</b>
<b>Figure 32.</b> Effect of addition of 3 mM $\text{NaHCO}_3$ , 1000 ppm $\text{CO}_2$ and 1000 ppm $\text{CO}_2$ to NSW containing 0.1 mM of the membrane permeable CA inhibitor EZ on membrane potential ( $E_m$ ) and $\text{NO}_3^-$ cytosolic concentration measured simultaneously in <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells.	<b>82</b>
<b>Figure 33.</b> $\text{P}_i$ uptake in <i>P. oceanica</i> leaves maintained in ASW containing 500 mM NaCl (Control), 0 mM NaCl (without $\text{Na}^+$ + choline chloride) and 50 mM NaCl.	<b>84</b>
<b>Figure 34.</b> $\text{P}_i$ uptake in <i>P. oceanica</i> leaves maintained in ASW (Control) and ASW containing 10 mM $\text{NaHCO}_3$ .	<b>86</b>

	<b>Página</b>
<b>Figure 35.</b> Membrane potential ( $E_m$ ) changes induced by the addition of $P_i$ micromolar concentrations in ASW (control) and in ASW containing 10 mM $HCO_3^-$ .	<b>87</b>
<b>Figure 36.</b> Membrane depolarizations of <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells induced by the addition of $NaH_2PO_4$ micromolar concentrations in the range 1-100 $\mu M$ in ASW containing 10 mM $NaHCO_3$ .	<b>87</b>
<b>Figure 37.</b> Effect of increasing external $Na^+$ concentration on membrane depolarizations induced by the addition of 25 $\mu M$ $KH_2PO_4$ to ASW containing 10 mM $KHCO_3$ .	<b>88</b>
<b>Figure 38.</b> Membrane potential changes of <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells induced by the addition of increasing L-Ala and L-Cys micromolar concentrations to the assay medium (ASW).	<b>89</b>
<b>Figure 39.</b> Membrane potential ( $E_m$ ) changes in <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells induced by the addition of L-Ala measured in ASW and $Na^+$ -free ASW (+ Sorbitol).	<b>91</b>
<b>Figure 40.</b> Thermodynamic relationship of $NO_3^-$ transporter employing either $H^+$ or $Na^+$ as the coupling ion.	<b>114</b>
<b>Figure 41.</b> Thermodynamic relationship of $P_i$ transporter employing either $H^+$ or $Na^+$ as the coupling ion.	<b>120</b>
<b>Figure 42.</b> Model for energizing the plasma membrane, $HCO_3^-$ incorporation and anions extrusion and stoichiometry of the $NO_3^-$ and $P_i$ high-affinity transport in mesophyll leaf cells of the seagrass <i>P. oceanica</i> .	<b>125</b>

## ÍNDICE DE TABLAS



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

	Página
<b>Table 1.</b> Filling solutions of the ion-selective microelectrodes.	36
<b>Table 2.</b> Selectivity coefficients logarithms of the resins used for the ion-selective microelectrodes in relation with the main interfering ions present in the assay media.	38
<b>Table 3.</b> Calibration solutions used for the ion selective microelectrodes.	39
<b>Table 4.</b> Slopes calibration obtained for the ion selective microelectrodes.	40
<b>Table 5.</b> Photosynthetic and kinetics parameters for the use of bicarbonate as an inorganic C source in <i>P. oceanica</i> mesophyll leaf cells.	71
<b>Table 6.</b> Nitrate net uptake rates of <i>P. oceanica</i> leaves incubated in artificial seawater (ASW) containing 500 mM NaCl and Na <sup>+</sup> -free ASW in which NaCl was substituted by 0.8 M sorbitol.	79
<b>Table 7.</b> P <sub>i</sub> net uptake rates of <i>P. oceanica</i> leaves maintained in ASW containing 500 mM NaCl (Control), 0 mM NaCl (without Na <sup>+</sup> + choline chloride) and 50 mM NaCl.	85
<b>Table 8.</b> Kinetics parameters for L-Ala and L-Cys membrane potential induced depolarization in N-starved mesohyll leaf cells of <i>P. oceanica</i> .	90
<b>Table 9.</b> Plasma membrane Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> permeability ratios ( $P_{Na^+}/P_{K^+}$ ) in seagrasses and terrestrial plants.	98
<b>Table 10.</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> half-saturation constants ( $K_M$ , μM) for high affinity transport systems reported in seagrasses.	109
<b>Table 11.</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> net uptake rates, measured in the presence of 500mM Na <sup>+</sup> and light conditions, reported for different seagrass leaves (μmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> ).	110
<b>Table 12.</b> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> net uptake rates of <i>Z. marina</i> leaves compared with <i>P. oceanica</i> leaves (μmol NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> DM h <sup>-1</sup> ) in light and dark conditions.	111
<b>Table 13.</b> Half-saturation constants for Na <sup>+</sup> ( $K_M$ , mM) as the driving ion of the Na <sup>+</sup> -dependent transport systems found in different species.	113

	<b>Página</b>
<b>Table 14.</b> $\text{NO}_3^-$ net uptake rates of <i>Z. marina</i> leaves compared with <i>P. oceanica</i> leaves ( $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ) in the presence and the absence of $\text{Na}^+$ in the assay medium.	<b>113</b>
<b>Table 15.</b> $\text{P}_i$ net uptake rates reported in leaves of different seagrasses ( $\mu\text{mol P}_i \text{ g}^{-1} \text{ DM h}^{-1}$ ).	<b>118</b>
<b>Table 16.</b> $\text{NO}_3^-$ , $\text{P}_i$ and amino acids kinetics parameters for high-affinity transport systems reported in seagrasses.	<b>124</b>



**ANEXO:**  
**Publicaciones**



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## ORIGINAL ARTICLE

# Direct uptake of $\text{HCO}_3^-$ in the marine angiosperm *Posidonia oceanica* (L.) Delile driven by a plasma membrane $\text{H}^+$ economy

Lourdes Rubio<sup>1†</sup> | Delia García<sup>1†</sup> | María J. García-Sánchez<sup>1</sup> | F. Xavier Niell<sup>2</sup> |  
Hubert H. Felle<sup>1#</sup> | José A. Fernández<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos S/N, Málaga 29071, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Ecología y Geología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos S/N, Málaga 29071, Spain

## Correspondence

José A. Fernández, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos S/N, 29071 Málaga, Spain.

Email: ja\_fernandez@uma.es

## #Permanent Address

Am Kleinen Füllchen 4. D-35641 Schöffengrund, Germany.

## Funding information

Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación; Spanish Ministerio de Economía y Competitividad. Grant/Award Number: BES-2012-052685, BIO2014-56153-REDT, CTM 2008-04453/MAR and CTM2014-58055-P

## Abstract

Seagrasses access  $\text{HCO}_3^-$  for photosynthesis by 2 mechanisms, apoplasmic carbonic anhydrase-mediated dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  to  $\text{CO}_2$  and direct  $\text{HCO}_3^-$  uptake. Here, we have studied plasma membrane energization and the mechanism for  $\text{HCO}_3^-$  import in *Posidonia oceanica*. Classical electrophysiology and ion-selective microelectrodes were used to measure the membrane potential, cytosolic pH, and the cytosolic concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  upon the addition of  $\text{HCO}_3^-$ . The photosynthetic response to  $\text{HCO}_3^-$  and to inhibitors was also measured. Results indicate that the primary pump of *P. oceanica* plasma membrane is a fusicoccin-sensitive  $\text{H}^+$ -ATPase. Bicarbonate depolarizes the plasma membrane voltage and transiently acidifies the cytosol, indicating that  $\text{HCO}_3^-$  is transported into the cells by an  $\text{H}^+$ -symport. Initial cytosolic acidification is followed by an alkalization, suggesting an internal dehydration of  $\text{HCO}_3^-$ . The lack of cytosolic  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  responses rules out the contribution of these ions to  $\text{HCO}_3^-$  transport. The energetics of  $n\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$  symport allows, for  $n = 1$ , an estimate of cytosolic accumulation of 0.22 mM  $\text{HCO}_3^-$ . Because this transporter could permit accumulation of  $\text{HCO}_3^-$  up to 100 times above the equilibrium concentration, it would be a significant component of a carbon-concentrating mechanism in this species.

## KEYWORDS

carbon-concentrating mechanism (CCM), cytosolic  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , cytosolic pH,  $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$  symport

## 1 | INTRODUCTION

Seagrasses are unique plants, the only group of flowering plants to recolonize the sea; they occur on every continental margin, except Antarctica, and form keystone coastal ecosystems (den Hartog & Kou, 2006). Along the Mediterranean coast, *Posidonia oceanica* (L.) Delile is an endemic species of great ecological significance (Aires et al., 2011) that covers around 2% of the total Mediterranean surface (Duarte, 1999; Gobert et al., 2006). One of the major challenges that face angiosperms adapted to the marine environment is the acquisition of dissolved inorganic carbon for photosynthesis. The low diffusion rate of dissolved  $\text{CO}_2$  and also the low rate constant of the uncatalysed dehydration of  $\text{HCO}_3^-$  at the pH of natural seawater (NSW) may result in limitation of  $\text{CO}_2$  supply for photosynthesis (Falkowski & Raven, 2007; Raven, 1984). Photosynthetic use of  $\text{HCO}_3^-$  has been described

for a vast majority of marine macroalgae and seagrasses (Koch, Bowes, Ross, & Zhang, 2013 and references therein). Marine angiosperms are described as  $\text{HCO}_3^-$  users (Beer, Bjork, Hellblom, & Axelsson, 2002; Borum et al., 2016; Koch et al., 2013). The use of  $\text{HCO}_3^-$  for photosynthesis in seagrasses can be outlined in two basic models: (a) apoplasmic conversion of  $\text{HCO}_3^-$  to  $\text{CO}_2$  and  $\text{OH}^-$ , catalysed by an external carbonic anhydrase (CA), a process that should be sensitive to acetazolamide (AZ), a plasma membrane-impermeable inhibitor of CA (Beer et al., 2002; Björk, Weil, Semes, & Beer, 1997; Invers, Pérez, & Romero, 1997, 1999; James & Larkum, 1996). A subset of this category could be the conversion of  $\text{HCO}_3^-$  to  $\text{CO}_2$  in external acid regions, and this mechanism does not necessarily need external CA: acidification speeds up the  $\text{HCO}_3^-$  to  $\text{CO}_2$  conversion and establishes a higher  $\text{CO}_2 : \text{HCO}_3^-$  ratio than in seawater and in the rest of the boundary layer (Beer et al., 2002; Hellblom & Axelsson, 2003). When supplemented with acid regions, this model of external  $\text{HCO}_3^-$  dehydration can constitute a  $\text{CO}_2$  concentration mechanism (Ferrier,

<sup>†</sup>These authors made equal contributions to the work.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Article

# Na<sup>+</sup>-Dependent High-Affinity Nitrate, Phosphate and Amino Acids Transport in Leaf Cells of the Seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile

Lourdes Rubio , Delia García-Pérez, María Jesús García-Sánchez and José A. Fernández \*

Department of Biología Vegetal, Campus Teatinos, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain; lrubio@uma.es (L.R.); delia.garcia.perez@gmail.com (D.G.-P.); mjgs@uma.es (M.J.G.-S.)

\* Correspondence: ja\_fernandez@uma.es; Tel.: +(34)-952-13-1949

Received: 19 April 2018; Accepted: 22 May 2018; Published: 24 May 2018



**Abstract:** *Posidonia oceanica* (L.) Delile is a seagrass, the only group of vascular plants to colonize the marine environment. Seawater is an extreme yet stable environment characterized by high salinity, alkaline pH and low availability of essential nutrients, such as nitrate and phosphate. Classical depletion experiments, membrane potential and cytosolic sodium measurements were used to characterize the high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Pi and amino acids uptake mechanisms in this species. Net uptake rates of both NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Pi were reduced by more than 70% in the absence of Na<sup>+</sup>. Micromolar concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> depolarized mesophyll leaf cells plasma membrane. Depolarizations showed saturation kinetics ( $K_m = 8.7 \pm 1 \mu\text{M NO}_3^-$ ), which were not observed in the absence of Na<sup>+</sup>. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> induced depolarizations at increasing Na<sup>+</sup> also showed saturation kinetics ( $K_m = 7.2 \pm 2 \text{ mM Na}^+$ ). Cytosolic Na<sup>+</sup> measured in *P. oceanica* leaf cells ( $17 \pm 2 \text{ mM Na}^+$ ) increased by  $0.4 \pm 0.2 \text{ mM Na}^+$  upon the addition of  $100 \mu\text{M NO}_3^-$ . Na<sup>+</sup>-dependence was also observed for high-affinity L-ala and L-cys uptake and high-affinity Pi transport. All together, these results strongly suggest that NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, amino acids and Pi uptake in *P. oceanica* leaf cells are mediated by high-affinity Na<sup>+</sup>-dependent transport systems. This mechanism seems to be a key step in the process of adaptation of seagrasses to the marine environment.

**Keywords:** *Posidonia*; high-affinity transport; NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake; Pi uptake; Na<sup>+</sup>-dependent transport systems; Cytosolic Na<sup>+</sup>; amino acid transport

## 1. Introduction

Nitrogen and phosphorus are essential nutrients for plants, whose availability may limit biomass maintenance and growth. Seawater is a high salinity and alkaline medium with low concentrations of N and P, often below  $5 \mu\text{M}$  in the Mediterranean Sea [1]. The seagrass *Posidonia oceanica*, is a Mediterranean endemism limited by N and P [2], but able to grow under nutrient concentrations low enough (less than  $5 \mu\text{M}$  of dissolved inorganic nitrogen and  $1 \mu\text{M}$  Pi) to limit the proliferation of other species, as *Cymodocea nodosa* [2,3]. This raises the question of how seagrasses are able to extract nutrients at the low concentrations present in seawater to maintain primary production. To take up nutrients at low external concentrations, plants have to: (i) evolve transport systems with the capability to bind the free ion species with a very low  $K_m$  and (ii) a powerful system to energize the movement of the ions across the plasma membranes to compensate the high, outwardly directed, ion motive force. Seagrasses studied so far use the Na<sup>+</sup> electrochemical gradient to drive the high-affinity uptake of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Pi in both roots and leaves [4,5].

In terrestrial vascular plants, where the H<sup>+</sup>-ATPase energizes the plasma membrane [6], NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport depends on the cellular energy supply and is coupled to the proton electrochemical



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

