



ESTUDI DEL METABOLISME DEL NITROGEN I DEL CARBONI DE LES FANERÒGAMES MARINES

Cymodocea nodosa I *Posidonia
oceanica* **PER A AVALUAR LA
SEUA RESPOSTA DAVANT
FUTURS VESSAMENTS DE
PLANTES DESSALADORES**

ORDENACIÓ, GESTIÓ I RESTAURACIÓ DE CONQUES

Autor:

BALLESTER PUIGCERVER, ISABEL

Directors:

Dr. GARCIA ORTOLÀ, ANNA

Dr. MARTÍNEZ CAPEL, FRANCISCO

SETEMBRE, 2011

ÍNDEX

RESUMS	5
ANNEXES	9
I. INTRODUCCIÓ	
1. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS.....	14
2. RECURSOS HÍDRICS I DESSALACIÓ D'AIGUA.....	14
3. IMPACTES DE LA DESSALACIÓ D'AIGUA EN EL MEDI MARÍ.....	16
3.1. EFECTE DE LA SALMORRA EN LA FLORA MARINA.....	18
3.1.1 Canvis metabòlics associats a la salinitat.....	18
3.1.2 Canvis fisiològics associats a la salinitat del medi marí.	19
4. CARACTERISTIQUES DE LES ESPÈCIES ESTUDIADAES	
4.1 <i>Posidonia oceanica</i>	19
4.2 <i>Cimodocea nodosa</i>	11
5. EL METABOLISME EN LES ESPÈCIES VEGETALS.....	26
5.1 METABOLISME DEL CARBONI.....	26
5.2 METABOLISME DEL NITROGEN.....	27
II. MATERIALS I MÈTODES	
1. MATERIAL VEGETAL.....	30
2. MOSTREIG I TRACTAMENT EN EL LABORATORI.....	30
3. PROCEDIMENTS ANALÍTICS	
3.1 DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE CARBOHIDRATS	
3.1.1 Sucres totals, sacarosa i midó.....	30
3.2 DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE COMPOSTOS NITROGENATS	

3.2.1	Proteïna soluble total.....	33
3.2.2	Aminoàcids lliures.....	34
3.3	DETERMINACIONS I QUANTIFICACIONS ENZIMÀTIQUES	
3.3.1	Extracció i dessalació de mostres.....	41
3.3.2	Determinació de l'activitat d'enzims del metabolisme dels carbohidrats.....	43
3.3.3	Determinació de l'activitat d'enzims del metabolisme del nitrogen.....	46
3.4	DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS PIGMENTS FOTOSINTÈTICS: CLOROFIL·LES I CAROTENOIDES.....	48
3.5	DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS INORGÀNICS: IONS Cl ⁻ I Na ⁺	
3.5.1	Determinació del ió Na ⁺	49
3.5.2	Determinació del ió Cl ⁻	49
3.6	ANÀLISI ESTADÍSTIC.....	50

III. RESULTATS

1.	CONTINGUT EN CARBOHIDRATS	
1.1	QUANTIFICACIÓ DE SUCRES TOTALS.....	52
1.2	QUANTIFICACIÓ DEL MIDÓ.....	53
1.3	QUANTIFICACIÓ DE LA SACAROSA.....	55
2.	QUANTIFICACIÓ DELS COMPOSTOS NITROGENATS	
2.2	PROTEÏNA TOTAL.....	56
2.3	AMINOÀCIDS LLIURES.....	58
3.	QUANTIFICACIÓ ENZIMÀTICA	

3.1 SACAROSA SINTASA (Sucrose synthase SS; EC 2.4.1.13, direcció de síntesi de la sacarosa).....	67
3.2 SACAROSA SINTASA (Sucrose synthase (SS; EC 2.4.1.13), direcció d'hidròlisi de sacarosa).....	69
3.3 SACAROSA FOSFAT SINTASA (Sucrose phosphate synthase (SPS; EC 2.4.1.14), direcció de síntesi).....	70
3.4 GLUTAMAT SINTETASA (Glutamine synthetase GS; EC 6.3.61.2).....	71
3.5 GLUTAMAT SINTASA (Glutamate synthase GOGAT; EC, 1.4.1.14).....	72
4. QUANTIFICACIÓ DELS PIGMENTS FOTOSINTÈTICS: CLOROFIL·LES I CAROTENOIDES.....	74
5. QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS INORGÀNICS: IONS Cl^- I Na^+	
5.1 Ió Cl^-	75
5.2 Ió Na^+	76
IV. DISCUSSIÓ.....	79
V. CONCLUSIONS	82
VI. BIBLIOGRAFIA	84



**ESTUDI DEL METABOLISME DEL NITROGEN I DEL CARBONI
DE LES FANERÒGAMES MARINES *Cymodocea nodosa* I
Posidonia oceanica PER A AVALUAR LA SEUA RESPOSTA
DAVANT FUTURS VESSAMENTS DE PLANTES
DESSALADORES**

Autor: BALLESTER PUIGCERVER, ISABEL

TIPUS	B	Lloc de realització	VALÈNCIA
DIRECTOR	ANNA GARCÍA ORTOLÀ	Data de lectura	SETEMBRE, 2011
CODIRECTOR 1	FRANCISCO MARTÍNEZ CAPEL		

RESUM:

La deficiència hídrica és un problema creixent en àrees de la costa mediterrània. La dessalació d'aigua de mar és una alternativa a eixes deficiències, però l'abocament de les seues aigües de rebuig o salmorra genera un gran impacte ambiental sobre les praderes de fanerògames marines, localitzades en àrees superficials i poc distants de la costa.

Posidonia oceanica, fanerògama marina endèmica del mar Mediterrani, és una espècie altament sensible als augments de la salinitat, sent substituïda en praderes degradades per la fanerògama *Cymodocea nodosa*, espècie considerada més resistent i halotolerant.

L'objectiu d'aquest treball és comparar el metabolisme del carboni i del nitrogen entre *Posidonia oceanica* (L.) Delile i *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, per a poder comprendre des d'un punt de vista metabòlic el seu diferent grau de tolerància als ambients salins.

L'estudi es porta a terme amb plantes mostrejades en una pradera mixta d'ambdues



espècies en el litoral de Dènia (Marina Alta, Alacant).

La major concentració de carbohidrats es localitza en el rizoma, on l'activitat dels enzims Sacarosa Fosfat Sintasa (SPS) i Sacarosa Sintetasa (SS) és més elevada. *Cimodocea* acumula sacarosa, el sucre de transport pel floema, mentre que *Posidònia* midó.

L'activitat Glutamat Sintasa (GOGAT) i Glutamina Sintetasa (GS), enzims implicats en el metabolisme del glutamat, aminoàcid que intervé en la formació de molts aminoàcids, és major en *Cimodocea*, que presenta una menor concentració d'aminoàcids lliures, indicant la seva incorporació als teixits.

La concentració de pigments clorofil·lics i d'ions Cl^- i Na^+ és major en *Cimodocea*. Aquests últims contribueixen a augmentar la tolerància a la salinitat participant en la osmoregulació cel·lular.

Dels resultats obtinguts es dedueix que la major tolerància observada als canvis ambientals per *Cymodocea nodosa* resideix en una millor adequació del seu metabolisme per a fer front a l'estrès.

RESUMEN:

La deficiencia hídrica es un problema creciente en áreas de la costa mediterránea. La desalación de agua de mar es una alternativa a tales deficiencias, pero el vertido de sus aguas de rechazo o salmuera genera un gran impacto ambiental sobre las praderas de fanerógamas marinas, localizadas en áreas superficiales y poco distantes de la costa.

Posidonia oceanica, fanerógama marina endémica del mar Mediterráneo, es una especie altamente sensible a los aumentos de salinidad, siendo sustituida en praderas degradadas por la fanerógama *Cymodocea nodosa*, especie considerada más resistente y halotolerante.

El objetivo de este trabajo es comparar el metabolismo del carbono y del nitrógeno entre *Posidonia oceanica* (L.) Delile y *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson, para poder comprender desde un punto de vista metabólico su diferente grado de tolerancia a los ambientes salinos.

El estudio se lleva a cabo con plantas muestreadas en una pradera mixta de ambas



especies en el litoral de Dènia (Marina Alta, Alacant).

La mayor concentración de carbohidratos se localiza en el rizoma, en donde la actividad de los enzimas Sacarosa Fosfato Sintasa (SPS) y Sacarosa Sintetasa (SS) es más elevada. *Cymodocea* acumula sacarosa, el azúcar de transporte por el floema, mientras que *Posidonia* almidón.

La actividad Glutamato Sintasa (GOGAT) y Glutamina sintetasa (GS), enzimas implicados en el metabolismo del glutamato, aminoácido que interviene en la formación de muchos aminoácidos, es mayor en *Cymodocea*, que presenta una menor concentración de aminoácidos libres, indicando su incorporación a los tejidos.

La concentración de pigmentos clorofílicos y de iones Cl^- i Na^+ es mayor en *Cymodocea*. Estos últimos contribuyen a aumentar la tolerancia a la salinidad participando en la osmorregulación celular.

De los resultados obtenidos se deduce que la mayor tolerancia observada a los cambios ambientales por *Cymodocea nodosa* reside en una mejor adecuación de su metabolismo para hacer frente al estrés.

ABSTRACT:

Water deficiency is a prevalent problem in many areas of the Mediterranean coast. Desalination of seawater is an alternative to such deficiencies but brine discharge has a large impact on seagrass beds, located in coastly shallow areas. *Posidonia oceanica*, a seagrass endemic to the Mediterranean Sea, is highly sensitive to salinity and in degraded grassland areas is replaced by *Cymodocea nodosa*, a more halotolerant seagrass species.

The aim of this work is to compare the carbon and nitrogen metabolism of *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson to improve our understanding of their different tolerance to saline environments.

The study was carried out with mixed samples of both seagrass species, *Posidonia* and *Cymodocea*, from the coast of Denia (Marina Alta, Alicante).

The highest concentration of carbohydrates is located in the rhizome, where the activity of enzymes involved in metabolism, Sucrose Phosphate Synthase (SPS) and Sucrose Synthase (SS) is the highest. *Cymodocea* accumulates sucrose, the transport



sugar through the phloem, while *Posidonia* accumulates starch.

The activity of the enzymes Glutamate Synthase (GOGAT) and Glutamine Synthetase (GS), responsible for the metabolism of glutamate, an amino acid involved in the formation of many other amino acids, is higher in *Cymodocea*, which has a lower concentration of free amino acids, indicating a higher incorporation into the plant tissues.

The concentration of chlorophyll pigments and Cl^- and Na^+ is higher in the leaves of *Cymodocea*. The latter contribute to increased salt tolerance by participating in cellular osmoregulation.

These results suggest that the greater tolerance of *Cymodocea nodosa* to salt concentration relative to *Posidonia oceanica* resides in a better adequacy of its metabolism to the stress.

PARAULES CLAU:

Fanerògames marines, ambients salins, tolerància, metabolisme, enzims, carboni, nitrogen

ANNEXES

ANNEX 1. APARELLS I REACTIUS UTILITZATS

1. APARELLS

- Centrifuga: (Beckman Coulter, Allegra™64R)
- Rotavapor: Büchi Rotavapor R-200
- Bany :VWR digital Heatblock
- Bany: J.P.Selecta multiplaces
- Espectrofotometre: Spectronic Genesis 5 de Milton Roy
- Espectrofòtometre: Jenway 6100
- Fotometre de flama: Flame Photometer de Scharlau Science).

2. REACTIUS

- Reactiu de Bradford: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent de Bio-Rad Laboratories GmbH
- Aminoàcids estàndards: Amino Acid Standard H, referència 20088 de Pierce
- (L-Arginine (s)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid reagent grade, $\geq 98\%$ (TLC), powder de Sigma-Aldrich)
- Hidroxiprolina: cis-4-Hidroxy-D-proline de Sigma
- Patró Intern: DL- α -amino-n-Butyric subministrat per Sigma
- MeOH: Methanol per a HPLC en gradient, de Scharlau.
- Trethylamina (TEA): Trethylamine de Sigma
- Fenilisotianat PITC de Sigma
- Acetronitril grau HPLC "supergradient de Schralau
- Inhibidor de proteïnes: Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts de Sigma
- Hepes (N-(2-hidroxyethyl)piperazine- N'-(2-ethanesulfonic acid) de Duchefa)
- Potassi hidròxid 85% dentilles per a anàlisis de Panreac
- MgCl₂: Magnesium Chloride anhydrous de Sigma
- PEG: Polyethyleneglycol Bisphenol A Epichlorohydrin Copolymer 15.000-20.000 Da de Sigma
- Triton: Triton® X-100 Solution de Fluka analytical
- DTT: DL- Dithiothreitol, minimum 99% titration de Sigma-Aldrich

- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, ACS reagent, 99,4-100,06% de Sigma-Aldrich
- BSA: Albumin fraction V (from bovine serum) for biochemistry de Merck
- Ascorbat: (+)-sodium L-ascorbate, $\geq 98\%$ de Sigma
- PVPP: Polyvinylpoly-pyrrolidone de Sigma
- Fructosa: D(-)- Fructosa para fines bioquimicos de Merck
- UDPG: Uridine-5' diphosphoglucose Disodium salt de Fluka analytical
- Resorcinol: Resorcinol (1,3 Benzenediol) de Sigma
- NAD: β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, from yeast de Sigma-Aldrich
- ATP: Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate de Sigma
- Sacarosa: D(+)-Sacarosa, purísima, Ph Eur. BP.NF. DAB. De Scharlau
- Fructosa 6-P: D-Fructose 6-Phosphate disodium salt hydrate de Sigma
- Àcid L-Glutamic: L-Glutamic acid, minimum 99% (TLC)
- Hidroxilamina clorhidrat, per a síntesis de Fluka BioChemika
- Clorur fèrric: Hierro III Cloruro 6-hidrato trozos, purísimo de Panreac
- TCA: Trichloroacetic Acid (Reag. Ph. Eur.) PA-ACS de Panreac
- KH_2PO_4 : Potasio di-Hidrógeno Fosfato para anàlisis –ACS-ISO de Panreac
- L-glutamina: L-Glutamine BioUltra, $\geq 99,5\%$ (NT) de Sigma
- A-cetoglutarat: α -Ketoglutaric acid sodium salt $\geq 98\%$ (enzymatic) de Sigma
- NADH: β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt de Sigma

ANNEX 2. ABREVIATURES UTILITZADES

- MeOH: Metanol
- TEA: Tretilamina
- PITC: Fenilisotianat
- $MgCl_2$: Clorur Magnesi Anidric
- PEG: Polyethyleneglycol Bisphenol A Epichlorohydrin Copolymer
- DTT: DL- Dithiothreitol
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid,
- BSA: Albumin fraction V (from bovine serum)
- PVPP: Polyvinylpoly-pyrrolidone
- UDPG: Uridine-5' diphosphoglucose Disodium salt
- NAD: β -Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate, from yeast
- ATP: Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate
- TCA: Trichloroacetic Acid KH_2PO_4 : Potasio di-Hidrógeno Fosfato
- NADH: β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium

I. INTRODUCCIÓ

1. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

En el mar mediterrani conviuen moltes espècies animals i vegetals. Algunes són rares o endèmiques, i altres generen un medi molt ric ecològicament. Algunes fanerògames marines, com la *Posidonia oceanica*, s'engloben dins d'aquest últim grup, i són protegides per diverses lleis. Moltes d'aquestes espècies són molt sensibles als canvis que es produeixen en el seu medi, mentre que altres són més tolerants.

El litoral mediterrani concentra gran tipus d'activitats que alteren i modifiquen els medis litorals. Una d'aquestes activitats són les plantes dessaladores, que a part de produir soroll, consum d'energia i ocupar un sòl en primera línia de costa, descarrega al mar una salmorra amb elements químics. Aquesta salmorra modifica el medi marí on es dipositada.

L'objectiu general d'aquest estudi és contribuir al coneixement general dels mecanismes de les fanerògames marines per suportar un medi salí. Aquests temes són d'actual importància davant la creixent creació de plantes dessaladores. Aquest estudi ajudaria a entendre millor la fisiologia d'aquestes espècies, i seria d'interès a l'hora de planificar futures actuacions mediambientals per a la seva supervivència i conservació front a agressions com l'abocament de la salmorra.

L'objectiu específic d'aquest treball és l'anàlisi comparatiu dels diferents components del metabolisme del nitrogen i del carboni, els pigments fotosintètics, els metabòlits inorgànics, carbohidrats i compostos nitrogenats entre les fanerògames marines, *Cymodocea nodosa* i *Posidonia oceanica*, per augmentar el grau de coneixement sobre els mecanismes de la seva supervivència en el medi marí. Mentre *Posidonia* és una espècie molt sensible als canvis ambientals, *Cymodocea* és molt tolerant, el que permetrà realitzar la comparació entre una espècie molt sensible a qualsevol canvi, entre els quals pot trobar-se el vessament de la salmorra, i un altra més resistent.

L'estudi es porta a terme en litoral de Dènia (Marina Alta) on trobem praderies mixtes de *Cymodocea nodosa* i *Posidonia oceanica*.

2. RECURSOS HÍDRICS I DESSALACIÓ D'AIGUA

L'aigua és un recurs limitat, encara que la quantitat d'aquesta en el planeta siga molt gran. S'estima que la hidrosfera conté uns 1.386 milions de Km³, dels quals, el 97,5 % és aigua salada de mars i oceans i per tant inservible per a qualsevol ús

agrícola, industrial o humà. La resta de l'aigua, el 4,5 %, és aigua dolça (Valero et al., 2001).

Actualment, 26 països sofreixen problemes d'escassetat d'aigua (300 milions de persones), i les projeccions per a l'any 2050 són molt més pessimistes, amb 66 països afectats que concentren les 2/3 parts de la població mundial (Valero et al., 2001). Davant l'escassetat dels recursos hídrics, junt amb la creixent demanda a causa de l'augment de la població i els canvis anticipats dels patrons de precipitació a causa del canvi climàtic, s'han plantejat diverses alternatives per a solucionar aquests problemes. Una opció és la transferència de volums de les zones excedentàries a les zones deficitàries. Altres solucions recorren a l'aportació d'aigua a partir de recursos externs que no provenen de fonts naturals. Uns dels processos que permeten eixa aportació externa és la dessalació (Valero et al., 2001).

La dessalació de l'aigua marina és una estratègia emergent per a satisfer la demanda d'aigua en les regions costaneres (Pagès et al., 2010). S'estima que més de 25 milions de m³ d'aigua dessalada son produïts diàriament en tot el món. Les millores tecnològiques en els requeriments energètics d'aquest procés han provocat que moltes nacions amb recursos marginals d'aigua opten per la dessalació com a un recurs addicional d'aigua potable (Roberts et al., 2010). A Espanya el nombre de dessaladores projectades i construïdes s'ha incrementat en els últims anys, col·locant-se en cinquè lloc pel que fa a la capacitat total instal·lada, i en quart lloc si es considera solament la dessalació de l'aigua del mar (Ruiz Mateo, 2007).

La dessalació és el procés de separació de sals d'una dissolució, però que pot ampliar-se al procés de separació de l'aigua de les sals, és a dir el procés mitjançant el qual es disminueix el contingut salí de les aigües per al seu posterior ús (Valero et al., 2001).

El procés de dessalació més eficient és el d'osmosis inversa, fet que ha provocat que siga el procés preferit arreu del món (Einav et al., 2002).

L'osmosi és un procés natural que ocorre en plantes i animals. De forma esquemàtica podem dir que quan dos solucions amb diferents concentracions s'uneixen a través d'una membrana semipermeable (és a dir, que permet el pas d'aigua però no de sals), existeix una circulació natural d'aigua des de la solució menys concentrada a la solució més concentrada per a igualar les concentracions

finals, amb què la diferencia d'altura obtinguda es tradueix en una diferencia de pressió, anomenada pressió osmòtica (Valero et al., 2001).

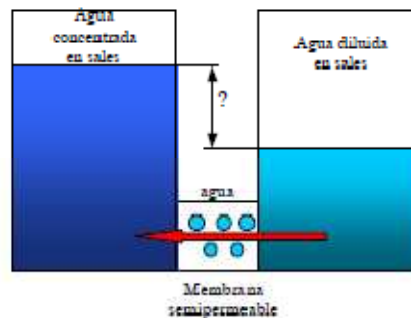


Figura 1. Procés natural d'osmosi (Valero et al., 2001).

Però si s'aplica una pressió externa que siga major a la pressió osmòtica d'una dissolució respecte a un altra, el procés és pot invertir, fent circular aigua de la dissolució més concentrada a la de menor concentració (Valero et al., 2001).

El resultat d'aquest procés és un flux d'aigua neta, apta per al consum, i un flux d'aigua salobre, la concentració de sals de la qual és més elevada que la de l'aigua del mar natural. Aquesta salmorra es retornada al mar junt amb un sèrie de substàncies químiques, utilitzades en la fase de pretractament (Einav et al., 2002) i postractament (Valero et al., 2001) per aconseguir les condicions de potabilitat requerides.

Aquestes plantes dessaladores provoquen una sèrie d'impactes ambientals que afecten tant al medi terrestre com al medi marí i als organismes que viuen en ells. Nosaltres ens centrarem en els efectes en el medi marí.

3. IMPACTES DE LA DESSALACIÓ D'AIGUA EN EL MEDI MARÍ

Els impactes de les dessaladores en el medi marí poden ser de tipus físic i de tipus químic.

La majoria dels impactes físics en els ecosistemes marins són a causa del posicionament de les canonades d'alimentació i de les canonades de descarrega de la salmorra. L'impacte inicial durant la instal·lació de les canonades és temporal i és concentra en la zona de treballs, però inclús aquest impacte podria ser significat, especialment en hàbitats rocosos i esculls de coral (Morton et al., 1996).

Durant el funcionament de la planta, l'impacte en els ecosistemes marins té lloc en les zones properes a la zona de descarrega de la salmorra a causa del seu vessament (Einav et al., 2002). Aquesta salmorra té una salinitat on es vessada de 40-90 psu ("Practical Salinity Unit"), superior a l'aigua del mar que és de 35 psu. A més a més, conté altres materials com residus químics, tals com NaOCl, FeCl₃ o AlCl₃, H₂SO₄ o HCl, NaHSO₃, utilitzats durant el pretractament i postractament per a millorar la floculació i prevenir la formació d'escuma, per a evitar la deterioració de les membranes a causa del creixement biològic i la deposició mineral. A pesar que molts dels materials que conté la salmorra s'originen al mar, el seu elevat pes específic i la presència potencial d'aquests elements químics podrien danyar la població marina de la zona de descarrega de la salmorra.

La magnitud de l'impacte en el medi marí depèn de les característiques del procés de dessalació, de la composició química de la salmorra, i dels factors ambientals i hidrogeològics característics del mar: batimetria, ones, corrents, profunditat de la columna d'aigua, etc. Aquests factors determinarien la extensió de la zona de barreja de la salmorra i per tant, el rang geogràfic de l'impacte (Einav et al., 2002). A nivell biològic, la importància d'aquests impactes depèn de la vulnerabilitat de les espècies i de l'ecosistema receptor de la descarrega (Pagès et al., 2010).

El vessament de la salmorra, a causa de la diferència de densitat entre aquesta i l'aigua del mar, forma una capa en el fons que afecta a les comunitats bèniques, entre les quals es troben les praderes de fanerògames marines, les quals depenen d'ecosistemes amb salinitat estable (Fernández-Torquemada i Sánchez-Lizaso, 2005).

A més, aquest vessament produeix en la zona de descarrega desertificació marina a causa de l'estrès osmòtic, eutrofització, variació dels valors de pH, acumulació de metalls pesats i propietats esterilitzants dels desinfectants (Meerganz von Medeazza, 2005). La fauna marina no queda afectada significativament per la existència d'emissaris en l'aigua gràcies a la seua mobilitat, però afecta de manera especial a la flora marina, especialment a l'espècie de fanerògama marina *Posidonia oceanica*, a equinoderms, a bivalves i a macro algues (Fernández-Torquemada et al., 2005).

Els organismes marins existeixen amb un balanç osmòtic amb el seu medi i un increment de la concentració de sals podria resultar en la deshidratació de les cèl·lules, disminució de la turgència i mort (principalment de les larves i individus joves) (Einav et al., 2002).

En Espanya, el major efecte en el medi marí, és la pèrdua de *Posidonia oceanica* i l'ecosistema associat a aquesta. Aquesta preocupació és especialment vàlida en la província d'Alacant, on existeixen moltes dessaladores i a més existeixen nombroses praderes de posidònia (Meerganz von Medeazza, 2005).

3.1. EFECTE DE LA SALMORRA EN LA FLORA MARINA

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, la salmorra resultant de la dessalació d'aigua marina és, essencialment, aigua de mar concentrada, a un factor que depèn de l'eficiència de les membranes de la planta dessaladora (entre el 55-60%, amb una concentració màxima del 90%) (Fariñas, 2001). Davant un augment de la salinitat, les plantes presenten una sèrie de canvis a nivell fisiològic i bioquímic que es tradueixen en alteracions en la taxa fotosintètica, en variacions en el metabolisme, en la reproducció, en el creixement i, fins i tot, en la supervivència.

A continuació s'expliquen els diferents canvis metabòlics i fisiològics soferts per les plantes marines a causa de l'augment de salinitat en el seu medi.

3.1.1. Canvis metabòlics associats a la salinitat del medi marí

L'abocament de la salmorra en el medi marí afecta principalment a aquells organismes que es troben al voltant de l'emissari on vessa (Gacia et al., 2006). Aquest abocament provoca principalment un augment de la salinitat que provoca sobre els organismes allí presents una reducció en l'assimilació de nitrogen inorgànic i estrés salí. També provoca un augment de nutrients.

Una de les espècies més afectada, per viure en aquestes zones, és la fanerògama marina *Posidonia oceanica*. En aquesta, la descarrega de la salmorra pareix incrementar el nitrogen en les fulles, i reduir l'activitat de la glutamina sintetasa associat. Paral·lelament es produeix un deteriorament de la planta (Gacia et al., 2006).

Pel que fa a la fotosíntesis, aquest procés governa la productivitat de la planta. Davant condicions hipersalines, la seua taxa es redueix en moltes macro algues i fanerògames marines. En aquestes, l'augment de salinitat provoca una disminució del contingut de pigments, canvi en el nombre i en l'estructura dels cloroplastos, inhibició

de l'activitat d'assimilació del carboni i dels enzims reductors... La taxa de respiració també disminueix davant altes concentracions de salinitat (Marín-Guirao et al., 2010).

En *Posidonia oceanica* la fotosíntesis és molt sensible a l'estrès salí. Davant situacions d'estrès, el creixement de la fulla i la supervivència dels plantons es redueixen (Marín-Guirao et al., 2010). A més a més, la reserva de carbohidrats és una característica crucial en el balanç de carboni, i permet la seua supervivència a l'hivern. El descens dels carbohidrats degut a una menor taxa fotosintètica pot inclús comprometre el creixement de la planta afectada. Això es tradueix en unes fulles més curtes i en una menor abundància d'aquestes (Gacia et al. 2006)

3.1.2. Canvis fisiològics associats a la salinitat del medi marí

La salmorra abocada al mar també afecta fisiològicament als organismes. Els principals canvis que produeix són els següents:

- Reducció de l'extensió de la pradera, i per tant reducció en el nombre d'organismes (Gacia et al., 2006).
- Reducció del creixement. Aquest canvi està considerat com una mesura adaptativa per a la supervivència de la planta sota condicions d'estrès. Aquesta reducció és a causa de la disminució de la fotosíntesis i de la disminució de la divisió cel·lular.
- Reducció del creixement de la fulla (Fernández-Torquemada i Sánchez-Lizaso, 2005).
- Augment de l'epifitació de les fulles i de la necrosi.

4. CARACTERISTIQUES DE LES ESPÈCIES ESTUDIADAES

4.1. *Posidonia oceanica*

El gènere *Posidonia* pertany, segons la majoria dels botànics, a la família de les *Posidoniaceae*, encara que altres autors la atribueixen a la família de les *Potamogetonaceae* i altres a les *Najadaceae*.

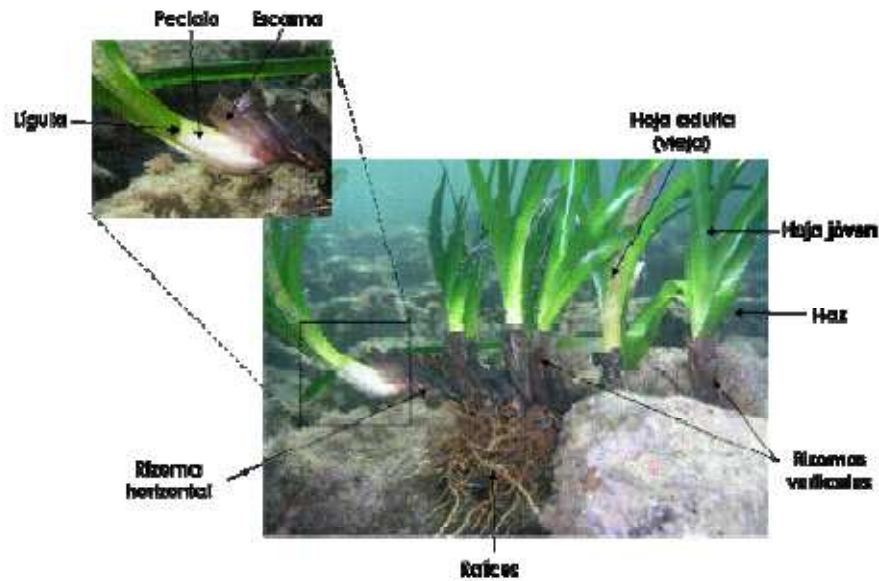


Foto 1. Plantes de *Posidonia oceanica*

Posidonia oceanica (L.) Delile és una fanerògama marina endèmica del mar mediterrani, és a dir, una planta superior amb fulles, flors i fruits, que viu permanentment submergida en el mediterrani (Foto 1).

La tija és curta, d'uns centímetres de llargària, i està recoberta per restes endurides de les bases de les fulles velles (Foto 2). Les fulles són llargues, en forma de cinta i de color verd intens, arrodonides en el seu extrem, de poc més d'un centímetre d'amplària màxima i la seua llargària no sol superar el metre. Aquestes s'agrupen en feixos de 6 ó 8 fulles que naixen de la tija i que es renoven periòdicament. Les fulles centrals del feix són més curtes i joves que les dels extrems. Aquestes ultimes, al morir, es trenquen en la seua base, i deixen en l'exterior les, fins eixe moment, fulles centrals (Ruiz Fernández et al., 2006).

El rizoma és el suport de les tiges i les fulles. Posseeix un doble creixement, horitzontal i vertical, que permet adaptar-se a les condicions ambientals imposades pel medi. A més, formen un entramat de sostén i creixement de les praderies de posidònia.

Foto 2. Parts de *Posidonia oceanica*

Posidònia oceànica es troba entre la superfície i els 50 metres de profunditat, on encara arriba suficientment llum per a realitzar la fotosíntesi, tant en substrats blans de granulometria variable (arenas fines, arenas grosses, arenas fangoses, etc.) com en superfícies rocoses. Tan sols necessita un autèntic sòl amb una certa quantitat de matèria orgànica. La temperatura òptima per al seu desenvolupament és la compresa entre 15 i 20 graus (Ambrosio i Segovia, 2000, Ambrosio et al., 2002). És molt sensible a les variacions de salinitat (Marín-Guirao et al., 2011; Fernández-Torquemada i Sánchez-Lisazo, 2005; Sánchez-Lisazo et al., 2008; Meerganz von Medeazza, 2005; Gacia et al., 2006).

Té un cicle de creixement anual, caracteritzat pel desenvolupament, creixement i pèrdua de fulles. Aquests processos depenen de les condicions ambientals i climàtiques de cada zona. A finals de l'hivern es produeix el naixement de les fulles, que arriben al seu tamany i nombre màxim a l'estiu. Les altes temperatures d'aquesta estació permeten el desenvolupament i creixement de nombrosos organismes, tant animals com vegetals, que colonitzen i viuen en la superfície de les fulles. Aquest recobriment impedeix el seu creixement normal i fa que les fulles deixen de ser funcionals a causa de la incapacitat per a realitzar la fotosíntesi. En aquest procés, que té lloc en l'estiu, les fulles van morint-se, fins que, finalment, en la tardor són arrancades de la planta pels temporals (Ambrosio i Segovia, 2000).

Les seues praderes tenen un paper ecològic molt important, amb efectes beneficiosos per a tota la mediterrània. Aquestes praderes són uns dels ecosistemes més productius del Mar Mediterrani, són font d'alimentació de crustacis, equinoderms i peixos, contribueixen a diversificar i estructurar el fons, són l'hàbitat de moltes espècies i manté l'equilibri sedimentari del litoral i protegeix la costa de l'erosió, ja que les llargues fulles redueixen l'hidrodinamisme, els rizomes retenen els sediments i les fulles mortes sobre les platges disminueixen l'impacte de les ones.

Està classificada com a hàbitat prioritari per la directiva de la Comunitat Europea 92/43/CEE (Gacia et al., 2006) i protegida sota diferents legislacions. A nivell europeu ha sigut inclosa en l'Annex I de la Convenció de Berna com a espècie de flora estrictament protegida. A Espanya, el Reial Decret de 7 de desembre de 1995 (BOE núm. 310, de 28 de desembre de 1995) recull l'adaptació de la Directiva Hàbitat a l'Estat Espanyol. En aquest es considera a les praderes com a sistemes a conservar. A nivell autonòmic, la Comunitat Valenciana mitjançant l'ordre de 23 de Gener de 1992, de la Conselleria d'Agricultura i Pesca, regula les activitats sobre les praderes de fanerògames marines.

En el litoral espanyol, el 78 % de les praderes de Posidònia oceànica presenten una disminució de la densitat dels feixos, indicant que es troben en recessió a causa de la turbulència de les aigües produïda pels col·lectors d'aigües residuals, els vaixells d'arrossegament i les actuacions en la costa.

En la Comunitat Valenciana, l'estat de conservació de les praderes de posidònia és molt variable (Figura 2). Les praderes d'Altea, Calp, La Vila i Campello es troben en un estat òptim. En contra, les praderes del Postiguet, Moncofar, Cullera i El Puig, es troben clarament alterades. La resta de praderes presents en la Comunitat (Torrevieja, Carabassí, Tabarca Escull Negre i La Nao, Cap Huertas, Benidorm, L'Alfàs del Pi, Moraira i Dènia) es troben en un estat intermedi, entre un bon estat i amb símptomes d'alteració. En general, les praderes de la Comunitat Valenciana es troben en bon estat de conservació, sobretot en la província d'Alacant, on sols algunes zones presenten signes clars de degradació a causa possiblement de les restes que deixaren la pràctica de la pesca d'arrossegament, el fondeig de grans vaixells, regeneracions de platges, influència del nucli urbà i dels ports propers (Voluntariat litoral, 2006).



Figura 2. Estat de conservació de les praderes de *Posidonia oceanica*

4.2. *Cymodocea nodosa*

Cymodocea nodosa (Ucria) Ascherson, 1869, pertanyent a la família *Zannichelliaceae*, és la segona fanerògama més important en el Mediterrani tant per la seua envergadura com per la seua extensió. Es troba àmpliament distribuïda pel Mar Mediterrani, NW d'Àfrica i sud –Atlàntic Europeu.



Foto 3. Plantes de *Cymodocea nodosa*

És tracta d'una planta herbàcia formada per tiges, arrels, fulles i flors. (Calvín, 20109. La tija és tipus rizoma i es troba enterrada en els sediments. Les arrels parteixen del rizoma i entren cap al sediment amb una funció de captació de nutrients i de fixació de la planta. Les fulles, agrupades en feixos, parteixen del rizoma en sentit vertical. Són encintades, d'apix vertical arrodonit i robust, de fins 60 cm de longitud i 0,4 cm d'amplària i amb 7-9 nerviacions paral·leles. Les fulles, amb una vida mitjana d'un mes, rodegen el rizoma i cauen deixant una cicatriu visible que es coneix per nus. Els feixos de fulles presenten un nombre variable d'aquestes segons l'època de l'any. Durant la primavera i l'estiu poden arribar a contenir 7 fulles, mentre que en la tardor i a l'hivern sols 2. *Cymodocea nodosa* és una planta dioica amb flors xicotetes i solitàries masculines i femenines. A diferència de *Posidonia oceanica* no forma rizomes llenyosos i les fulles són més estretes.



Foto 4. Detall de *Cymodocea nodosa*. En la imatge podem veure les arrels, el rizoma horitzontal i les fulles

És una espècie perenne que presenta un marcat cicle de creixement. Durant la primavera i l'estiu, la planta entra en la seua època més activa, presentant la major taxa de creixement de fulles, arribant a formar feixos de 4-7 fulles, i adquirint les majors dimensions de longitud i amplària. En aquest període anual es produeix un creixement ràpid dels rizomes, principalment horitzontal, un desenvolupament de entrenusos llargs i un desenvolupament de les arrels. Durant els mesos d'octubre a març, la planta entra en un període de creixement lent, en què els rizomes creixen poc i sols en horitzontal, els entrenusos són curts, no es produeixen arrels i les fulles creixen poc i són menys nombroses (feixos de 2-3 fulles). La floració es produeix entre finals de la primavera fins a la tardor.

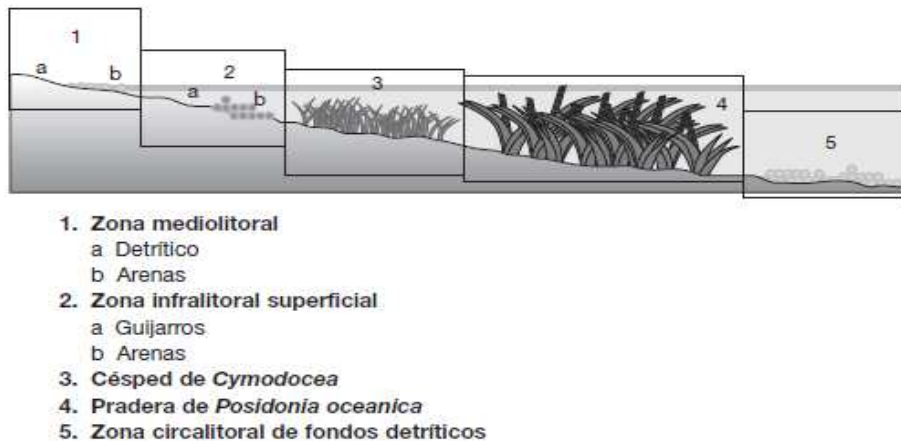


Figura 3. Distribució del Bentos litoral

Cymodocea nodosa és una planta colonitzadora amb una elevada tolerància ambiental. És una espècie pròpia del infralitoral, on apareix en fons arenosos o fangosos, amb hidrodinamismes dèbils o moderats. Pot arribar a formar praderes més o menys denses, que cobreixen tant els fons de llacunes costeres, badies someres i zones protegides com fons de la franja litoral compreses entre els 6 i els 20 metres de profunditat, on sol formar una banda continua prèvia a les formacions de *Posidonia* (Figura 3, Foto 5). També pot formar praderes mixtes amb l'alga verda *Caulerpa prolifera* o amb altres fanerògames marines. Pot colonitzar les clarícies de les praderes de *Posidonia oceanica* o les zones de mata morta. Té un capacitat colonitzadora més potent que aquesta, i es pot estendre bastant més ràpid.



Foto 5. *Cymodocea* en primer pla, i *posidonia* al fons

Es troba considerada com una espècie rara que deu ser protegida. Els hàbitats típics d'aquesta espècie estan inclosos en l'Annex I del Reial Decret 1997/1995, de 7

de desembre, pel qual s'estableixen mesures per a contribuir i garantir la biodiversitat mitjançant la conservació dels hàbitats naturals i de la fauna i flora silvestres; i en la directiva 92/43/CEE del Consell, de 21 de maig de 1992, relativa a la conservació dels hàbitats naturals i de la fauna i flora silvestres. També està inclosa en el Conveni de Berna per a la conservació de la vida salvatge i hàbitats naturals d'Europa.

Actualment es troba amenaçada per les obres costeres com els ports esportius, la regeneració de platges, emissaris, etc. i per la contaminació associada al desenvolupament urbanístic del litoral.

5. EL METABOLISME EN LES ESPÈCIES VEGETALS

El metabolisme és el conjunt de reaccions bioquímiques i processos fisicoquímics que es produeixen a escala molecular en les cèl·lules i en els organismes per a l'alliberació i captació d'energia per a dur endavant els diferents processos necessaris per a créixer, reproduir-se, mantenir estructures, respondre a estímuls... Les reaccions metabòliques que desprenen energia, és a dir processos en els que es degraden molècules i s'allibera energia, s'anomenen catabolisme. Aquesta energia alliberada és aprofitada per les reaccions anabòliques per a recompondre enllaços químics i construir components cel·lulars com les proteïnes i els àcids nucleics.

Aquests processos estan regits per enzims. Aquests s'encarreguen de transformar un compost químic, o substrat, en un altre, i aquest a la vegada, pugui ser transformat en un altre compost.

Del gran conjunt de reaccions metabòliques, ens centrarem en les relacionades en el metabolisme del carboni, i en les del metabolisme del nitrogen.

5.1 METABOLISME DEL CARBONI

El metabolisme del carboni s'encarrega de la formació i destrucció de la sacarosa. Aquesta és molt important per al creixement i desenvolupament de la planta, ja que s'encarrega del transport de nutrients, i fa funcions de reserva i regulador del metabolisme cel·lular (Huber i Huber, 1996).

En plantes superiors, la sacarosa pot ser catalitzada per dos enzims diferents: la sacarosa fosfat sintasa (SPS; EC, 2.4.1.14) i la Sacarosa sintasa (SuSy; EC 2.4.1.13). Mentre que la Sacarosa Fosfat Sintasa és un enzim clau en la formació de la sacarosa, la Sacarosa Sintasa està involucrada en els processos de degradació de la

sacarosa, per a deixar-la disponible per a altres processos relacionats amb el metabolisme, el desenvolupament i l'emmagatzematge (Touchette i Burkholder, 2007).

5.2 METABOLISME DEL NITROGEN

En el metabolisme del nitrogen estan involucrats una sèrie d'enzims que s'encarreguen de la formació i destrucció del glutamat. Entre els enzims més importants implicats en el metabolisme del nitrogen estan la Glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) i el glutamat sintasa (GOGAT.)

El ió amoni es la forma final del nitrogen inorgànic i del nitrogen present en tots els compostos orgànics nitrogenats, com els aminoàcids i els àcids nucleics. El pas més important en el metabolisme del nitrogen és la assimilació de l'amoni i la seua conversió a glutamina o glutamat. L'amoni pot ser assimilat directament dels nitrats o com a subproducte de la fotorespiració. La Glutamina Sintetasa sintetitza el pas de incorporar l'amoni i convertir-lo a glutamina utilitzant ATP, a partir del glutamat (Suzuki i Knaff, 2005).

El Glutamat sintasa és l'enzim encarregat de la síntesi del glutamat. Aquest enzim, a partir de glutamina i de 2-oxoglutarat, forma dos molècules de glutamat. L'enzim està present en dos formes diferents, una que utilitza com a electró donador la Ferredoxina reduïda (Fd) (EC 1.4.7.1) i una altra que utilitza el NADH (EC 1.4.14).

El nitrogen necessari per a la reacció del Glutamat Sintasa es troba en forma de glutamina.

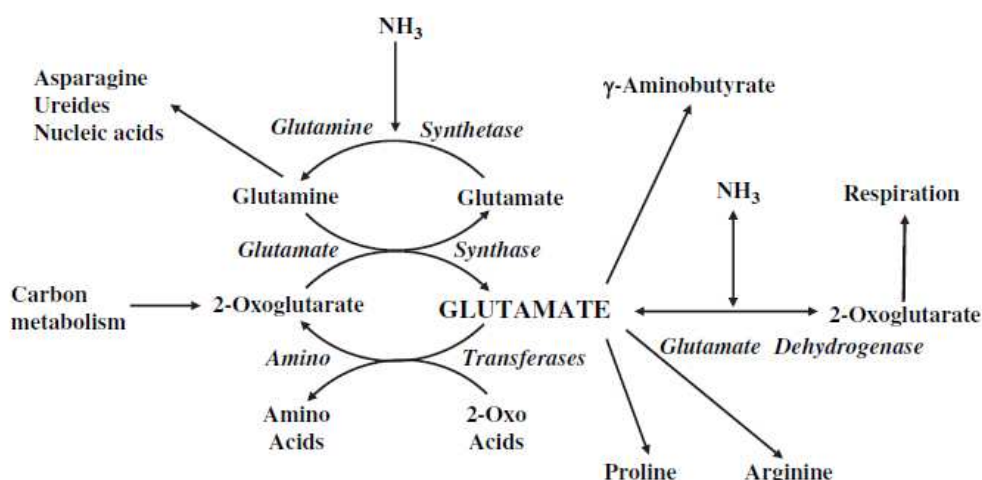


Figura 4. Síntesi del glutamat i metabolisme en plantes (Forde i Lea, 2007)

El glutamat és una molècula central molt important en el metabolisme dels aminoàcids en les plantes superiors. El grup α -amino del glutamat està involucrat en els mecanismes d'assimilació i dissimilació de l'amoni, i aquest es transferit a altres aminoàcids. A més, l'esquelet carbonatat i el grup α -amino formen la base per a la síntesi de l'àcid γ -aminobutíric (GABA), arginina i prolina. El glutamat és el precursor de la síntesi de la clorofil·la en les fulles (Forde i Lea, 2007)

El glutamat originat, l'aspartat i l'alanina funcionen com font de nitrogen per a formar altres aminoàcids.

II. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIAL VEGETAL

Les dues espècies utilitzades en aquets estudi són la *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson i la *Posidonia oceanica* (L.) Delile, espècies presents en els ecosistemes del litoral de la Comunitat Valenciana. Les plantes emprades procedeixen de les praderes submarines més superficials, a 1-3 metres de profunditat, localitzades en la badia de Dènia, ciutat costanera situada en la comarca de la Marina Alta, al nord de la província d'Alacant.

2. MOSTREIG I TRACTAMENT DEL MATERIAL EN EL LABORATORI

El mostreig es va realitzar en el mes de juliol, quan les plantes presentaven un bon desenvolupament vegetatiu i el grau d'epifitació no era elevat. Durant el mostreig, s'arreglaren plantes de les espècies a estudiar que contenien fulles, rizoma i arrel i es ficaren dins de bosses amb aigua de mar. Aquestes bosses foren emmagatzemades en una nevera amb gel fins que arribaren al laboratori. Una vegada allí, es seleccionaren les plantes a processar i es netejaren, eliminant la sorra del rizoma i de les arrels, i netejant les fulles amb aigua destil·lada. Es separaren les fulles, l'arrel i el rizoma.

Cadascuna de les mostres aconseguides fou congelada amb N₂ líquid i s'emmagatzemà a -20 °C fins a la seua anàlisi.

Part d'aquestes mostres foren liofilitzades, triturades en un molí i emmagatzemades a -20 °C, fins a ser analitzades.

3. PROCEDIMENTS ANALITICS

3.1. DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE CARBOHIDRATS

3.1.1. Sucre total, sacarosa i midó

- *Obtenció de l'extracte per als sucres totals i sacarosa*

L'extracte vegetal per a la determinació dels sucres totals i la sacarosa s'obté a partir de 25 mg de teixit liofilitzat. A aquestos s'afegeix 15 ml d'etanol del 80% calent (75-80 °C) i es manté durant 10 minuts en un bany a 100 °C, agitant-se ocasionalment. Seguidament, es centrifuga l'extracte durant 10 minuts a 10.000 g en centrifuga

refrigerada a 15 °C, i es recull el sobrenedant. Aq uest procés es repeteix tres vegades. L'extracte alcohòlic finalment obtingut, un total de 60 ml, s'evapora en un rotavapor, acoblat a una bomba de buit d'aigua en circulació i amb un bany a 50 °C. Després es resuspen amb aigua destil·lada i s'afora a 25 ml. Finalment l'extracte aquos es filtra a través de paper Whatman nº 2.



Foto 6. Rotavapor Büchi R-200 utilitzat per a l'obtenció de les mostres

- *Obtenció de l'extracte per a la determinació del midó*

Per a l'anàlisi del midó s'afegeix al precipitat obtingut en l'extracció dels sucres totals i la sacarosa, 20 ml d'àcid perclòric al 35%. Es deixa reposar 24 hores a temperatura ambient, i s'afora a 25 ml amb aigua destil·lada. Posteriorment es filtra a través de paper Whatman nº 2.

- *Determinació dels sucres totals i del midó.*

Els sucres totals i el midó es determinen mitjançant el mètode del fenol-sulfúric (Dubois et al., 1956). Es col·loca un volum final de 0,4 ml de la mostra aquosa en tubs de vidre. S'afegeix 0,4 ml de fenol al 5% en aigua i 2 ml d'àcid sulfúric concentrat. S'agita vigorosament i es deixa refredar durant 30 minuts, i es llegeix l'absorbància a 490 nm.

Paral·lelament es prepara un corba patró de glucosa amb 10, 20, 30 i 40 µg de glucosa a partir de l'estoc de 100 µg/ml de glucosa.

La quantitat de sucres totals i de midó presents en l'extracte es quantifiquen aplicant la fórmula:

$$\% = \frac{\mu\text{g glucosa} \times V \times 100}{V' \times 10^3 \times PS}$$

On:

$\mu\text{g glucosa}$ = valor obtingut a l'interpolar en la recta patró

V = volum aforat del rotavapor (ml)

V' = volum de l'extracte analitzat en els 0,4 ml (ml)

PS = pes sec analitzat (mg)

Per al càlcul de la quantitat de midó, el resultat obtingut es multiplica per 0,9 per a compensar la molècula addicional d'aigua que té la glucosa.

○ Determinació de la sacarosa

Per a la determinació de la sacarosa partim de l'extracte aconseguit amb etanol 80%, descrit en l'apartat anterior.

S'evapora 1 ml de l'extracte inicial en un bany a 100 °C. Després es deixen els tubs en una estufa d'aire a 70 °C durant una nit per a que se sequen. Una vegada assecats, es resuspenen amb 0,3 ml d'aigua destil·lada i 0,3 ml de 2 N NaOH. S'agita enèrgicament i es mantenen els tubs tapats en un bany a 100 °C durant 10 minuts. Es refreda ràpidament amb gel. Aquestes etapes tenen la finalitat d'eliminar la fructosa lliure.

Seguidament s'afegeixen 0,4 ml d'aigua destil·lada, 1,2 ml de resorcina en etanol 96° i 3,6 ml de HCl 30%. Es tapen els tubs i es mantenen 10 minuts en un bany a 80 °C. Transcorreguts els 10 minuts, es refreden ràpidament amb gel i es llegeix l'absorbància a 490 nm.

Paral·lelament, es prepara una corba patró de sacarosa entre 0 i 120 μg a partir d'un estoc de sacarosa de 400 $\mu\text{g/ml}$ i es preparen tubs blancs d'una mostra a l'atzar i d'una concentració de la corba patró amb sols etanol, sense resorcina.

La quantitat de sacarosa present en l'extracte es calcula aplicant la fórmula següent:

$$\% = \frac{\mu\text{g sacarosa} \times V \times 100}{V' \times 10^3 \times PS}$$

On:

$\mu\text{g sacarosa}$ = valor obtingut a l'interpolar en la corba patró

V = volum aforat del rotavapor (ml)

V' = volum de l'extracte analitzat (ml)

PS = pes sec analitzat (mg)



Foto 7. Espectrofotòmetre Jenway 6100 amb el que es van mesurar els carbohidrats

3.2. DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE COMPOSTOS NITROGENATS

3.2.1. Proteïna soluble total

La determinació i quantificació de la proteïna present en els extractes dessalats (veure apartat 3.3) es va realitzar mitjançant el mètode de Bradford (1976).

○ *Mètode de Bradford*

Es posen 50 μ l de la mostra problema, degudament diluïda, en cubetes o tubs de plàstics. Paral·lelament, es preparen tubs blancs amb aigua o tampó, i una corba patró, compresa entre 200 i 1400 μ g proteïna BSA/ml, a partir d'un estoc de BSA de 2 mg/ml.

S'afegeix a cada cubeta 2,5 ml del reactiu de Bradford, que es prepara diluint 1:4 (v/v) el colorant concentrat (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) amb aigua destil·lada i filtrant-ho. Es barreja i es llegeix l'absorbància a 595 nm després de 2-3 minuts i abans de 20-30 minuts, temps en què les proteïnes comencen a precipitar.

En aquelles mostres, la quantitat de proteïna de les quals va ser baixa (inferior a 25 μ g proteïna/ml), es va utilitzar una modificació del mètode anterior, conegut com a "microassay procedure".

La quantitat de proteïna present s'expressa en μ g de proteïna per mg pes fresc.

○ *Mètode de Bradford "microassay procedure"*

Es posen 0,8 ml de la mostra problema, en cubetes o tubs de plàstics. Paral·lelament, es preparen tubs blancs a partir de 0,8 ml de tampó de la mostra o aigua destil·lada, i, a més, una corba patró de BSA entre 1,25 i 25 µg proteïna BSA/ml a partir d'un estoc de 0,1 mg proteïna/ml de BSA.

A cada cubeta s'afegeixen 0,2 ml del reactiu de Bradford concentrat (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent). Es barreja mitjançant inversió de la cubeta i es llegeix l'absorbància a 595 nm després de 5 minuts i abans de 60 minuts, ja que a partir d'aquest temps comencen a precipitar les proteïnes.

La quantitat de proteïna s'expressa en µg de proteïna per mg de pes fresc.

3.2.2. Aminoàcids lliures

L'anàlisi dels aminoàcids lliures es duu a terme mitjançant Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC).

○ *Aminoàcids patró d'estàndards comercials*

S'utilitzen una sèrie d'aminoàcids patró d'estàndards comercials per a l'obtenció d'un cromatograma patró amb tots els aminoàcids que poden aparèixer en les mostres vegetals a analitzar.

Aquests aminoàcids s'obtenen a partir d'un *kit* d'aminoàcids estàndards comercials subministrats per Pierce (Amino Acid Standard H, referència 20088), emmagatzemat a -20 °C en atmosfera de nitrogen. Aquí esta barreja, originada a partir de proteïnes estàndards hidrolitzades, es compon per una sèrie d'aminoàcids presents a una concentració de 2,5 µmols/ml, dissolts en 0,1 N àcid clorhídric (HCl). Els aminoàcids que incorpora són: L-Alanina (Ala), L-Arginina (Arg), L-Cystina (Cys) (concentració 1,25 µmols/ml), àcid L-Glutàmic (Glu), Glicina (Gly), L-Histidina (His), L-Isoleucina (Ile), L-Leucina (Leu), L-Lisina (Lys), L-Methionina (Met), L-Phenilalanina (Phe), L-Prolina (Pro), L-Serina (Ser), L-Threonina (Thr), L-Tyrosina (Tyr) i L-Valina (Val).

A aquests aminoàcids se'ls afegeixen els aminoàcids àcid L-Aspartic (Asp), L-Asparagina (Asn), L-Glutamina (Gln) i Cys-4-Hidroxyprolina (OH-Pro) a una concentració de 2,5 µmol/ml. A més, també s'incorpora l'aminoàcid DL-α-amino-n-Butyric a una concentració de 2,5 µmol/ml en 0,1 N HCl, com a patró intern (P.I.). Aquest és elegit com a P.I. per no trobar-se present en les proteïnes naturals, a què és

estable en medi àcid i àlcali, a què reacciona de forma quantitativa amb el fenilisotiocianat (PITC) i a què no elueix amb els altres aminoàcids patró.

La barreja es homogeneïtzada, i el volum s'ajusta amb aigua MilliQ a 25 µl, de manera que al final de l'estudi cromatogràfic s'obtingui una concentració de 0,5 nmol/µl de cada aminoàcid.

- *Aminoàcids lliures de mostres vegetals*

Per a l'obtenció dels aminoàcids lliures es segueix el mètode indicat per Ballester (2009). Aquest mètode es divideix en quatre etapes:

- 1- Homogeneïtzació
- 2- Centrifugació
- 3- Dessecació al buit
- 4- Extracció en fase sòlida

- *Homogeneïtzació*

L'extracció dels aminoàcids lliures s'efectua a partir de 0,1 g de teixit liofilitzat, als quals s'afegeix 5 ml de 0,05 M tampó acetat pH 5,0 amb DL- α -amino-n-Butyric, com a Patró Intern, inclòs (2.5 nmol/µl). A continuació s'homogeneïtza en fred amb un politrón durant 20 segons. Al homogeneïtzat s'afegeix 15 ml de etanol 96% en fred i es manté a -20 °C durant un mínim de 6 hores, per a que precipiten les proteïnes.

- *Centrifugació*

Transcorregut el temps assenyalat a -20 °C, i amb la finalitat d'eliminar les proteïnes precipitades i les restes de les parets cel·lulars, les mostres es centrifuguen a 10.000 r.p.m. (8.736 g) en centrifuga refrigerada a 4 °C. Finalment es recull el sobrenedant, que conté els aminoàcids lliures en solució.



Foto 8. Centrifuga (Beckman Coulter, Allegra™64R) utilitzada en la preparació de les mostres

- *Desseccació al buit*

El sobrenedant recuperat es desseca al buit en un bany a 35 °C amb un rotavapor, acoblat a una bomba de buit d'aigua en circulació, fins que queden aproximadament 1 ml.

- *Extracció en fase sòlida*

Per a eliminar les proteïnes i els pigments que pogueren quedar després de la precipitació es realitza una extracció en fase sòlida amb columnes C₁₈ de 100 mg de farciment (cartutxos C₁₈ Sep-PaK® Classic, C₁₈ Cartridges). Es segueixen els passos següents per a cada mostra:

- 1- S'activa la columna amb 10 ml de metanol.
- 2- Les restes de metanol s'eliminen fent passar 10 ml de tampó d'extracció (acetat 0,05 M pH 5,0).
- 3- El tampó s'elimina fent passar 10 ml d'aire.
- 4- Es passa 1 ml de l'extracte de la mostra vegetal recuperada després del seu pas pel rotavapor. Es recull la fracció eluïda.
- 5- Es passen 1,5 ml de tampó d'extracció a través de la columna, i es replega l'eluent amb la fracció anterior, constituint la fracció polar de la mostra (conjunt d'aminoàcids polars).
- 6- Els aminoàcids més apolars es recuperen fent passar per la columna 2,5 ml de tampó d'extracció més 40% metanol.
- 7- S'arreplega la fracció que elueix amb les fraccions de les etapes 4 i 5 recuperades. Aquest extracte obtingut constitueix la fracció d'aminoàcids lliures de la mostra (polars i apolars).

- *Aplicació del mètode Pico-Tag*

A partir de l'extracte obtingut i per a la determinació dels aminoàcids lliures d'aquest es segueix el mètode Pico-Tag (™Waters). Aquest mètode engloba tots aquells processos que tenen lloc després de l'obtenció dels aminoàcids lliures, tant de les mostres vegetals com dels estàndards, fins a la cromatografia. Es distingeixen tres etapes ben diferenciades:

1- Secat

Aquesta etapa inicial consisteix bàsicament en una dessecació al buit que elimina tot tipus de dissolvents orgànics i concentra la mostra. S'agafen 25 µl de l'extracte amb aminoàcids lliures que hem obtingut després de l'extracció en fase sòlida i es posen a dessecar al buit unes 4 hores a 45 °C fins que es queda totalment sec.

2- Neutralització

El segon pas consisteix en l'eliminació de qualsevol residu àcid que pot quedar apegat al tub i reaccionar amb el grup silans. Per a això s'afegeix, al tub eppendorf on s'ha secat la preparació d'aminoàcids lliures, 10 µl de la dissolució de secat composta per MeOH + 1 N tampó acetat sòdic trihidrat pH 8,2 + TEA (Triethylamine) en la proporció 2:2:1 (v/v/v), s'agita en un agitador o vòrtex durant 30 segons i es desseca al buit durant 3 hores a 40 °C.

3- Derivatització

L'objectiu d'aquesta etapa és addicionar un anell aromàtic que absorbeix llum en el rang UV (254 nm) als grupsamins (primaris i secundaris) i que a la vegada confereix a la molècula derivatitzada certa hidrofobicitat. Aquesta hidrofobicitat permet utilitzar l'HPLC de fase reversa per a la seua separació. Aquestes característiques les aporta l'agent derivatitzant, el fenilisotiocianat (PITC).

En aquesta etapa s'afegeix a cadascun dels tubs dessecats en les etapes anteriors, és a dir a cadascuna de les mostres secades i neutralitzades, 20 µl del reactiu de derivatització, que consisteix en una barreja 7:1:1:1 (v/v/v/v) de MeOH:H₂O:TEA:PITC. S'agita en un vòrtex i es deixa que reaccione durant 10 minuts a temperatura ambient. Seguidament, es desseca al buit igual que en les etapes anteriors però a 35 °C durant 3,5 hores per eliminar les restes de l'agent derivatitzant, ja que de quedar algun residu en la mostra pot interferir en la resolució dels cromatogrames i en l'aparició de pics no desitjables.

Les mostres una vegada derivatitzades i seques es conserven a -20 °C baix una atmosfera de nitrogen i en presència de dessecant. Es recomana analitzar-les abans de dos setmanes, encara que poden romandre estables en aquestes condicions durant 2 mesos.

L'estoc de PITC no utilitzat és emmagatzemat a -20 °C en atmosfera de nitrogen per tal de que no s'oxide amb la presència de l'oxigen.

Per a dur a terme aquestes etapes es necessari un sistema que permeti dessecar les mostres al buit ràpidament. Com que no es disposa d'un equip de Speed-Vac (buit ràpid) es va idear el sistema presentat en la fotografia. El mecanisme consta de tres matraços, dos dels quals, refredats en gel, s'utilitzen per arreplegar els vapors que es desprenen. El tercer, es troba dins d'un bany d'aigua i conté les mostres al seu interior, mitjançant tubs eppendorfs. La temperatura del bany varia en funció de si el que es pretén es concentrar la mostra (bany a 45 °C), o el eliminar els reactius volàtils presents en la mostra (bany a 35-40 °C).

El sistema es completa amb una bomba de buit de paletes rotatòries en bany d'oli que produeix 3 mbar de buit i un cabal de 8 m³/h. Amb aquest mecanisme s'aconsegueix la concentració de les mostres i l'eliminació dels reactius fins a residu per calor i buit.



Foto 9. Sistema de secat al buit dels aminoàcids lliures

○ *Cromatografia*

Abans de la cromatografia, les mostres derivatitzades són resuspeses amb 300 µl de 5 mM tampó fosfat dibàsic ajustat a pH 7,4 amb àcid fosfòric 10% + 5% acetonitril i són ultrasonicades durant 1 minut per assegurar-ne la completa dissolució. Tot seguit, es filtren a través de filtres de 0,45 µm (Syringe Filters PTFE 0,45 µm de Teknokroma). Per acabar, es mantenen un altre minut a l'ultrasons i s'injecten 25 µl de la mostra al *loop* de 10 µl del que disposa el cromatògraf, mitjançant una xeringa ITO CORPORATION amb capacitat de 100 µl.

Es realitzen tres injeccions de cada mostra.

La cromatografia es du a terme en un cromatògraf Hewlett Packard 1100, compost per una bomba quaternària G1311A, un termòstat G1316A de Agilent 1100, un

detector UV G1314A fixat per a $\lambda = 254$ nm, un injector equipat amb *loop* per a mostres de 10 μ l i el sistema d'adquisició i integració de dades ChemStation.



Foto 10. Equip utilitzat per a la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

La columna utilitzada és la Pico-Tag de Waters de 300 x 3.9 mm ID, específica per a la separació d'aminoàcids, precedida per una precolumna en línia de la casa Waters (WAT 035190).

Les condicions cromatogràfiques seguides són les indicades per Hagen et al. (1993):

- Eluent A: 70 mM acetat sòdic, pH 6,55 + 2,5% acetonitril
- Eluent B: 45% acetonitril + 40% H₂O (MilliQ) + 15 % MeOH.
- Temperatura de la columna: 46 °C.

Les fases mòbils (eluent A i B) són filtrades a través de filtres de 0,45 μ m de diàmetre de porus (Whatman) i desgassificades amb el ultrasons durant 5 minuts, abans de ser utilitzats. S'emmagatzemen refrigerades a 4 °C.



Foto 11. Sistema de filtratge per a les fases mòbils (eluent A i B)

El gradient utilitzat es presenta en la Taula 1. El temps total de la carrera cromatogràfica incloent la reequilibració de la columna va ser de 87 minuts.

Temps (min)	Flux (ml/min)	%A	%B
Inicial	1	100	0
13,5	1	97	3
24	1	94	6
30	1	91	9
50	1	66	34
62	1	66	34
62,5	1	0	100
66,5	1	0	100
67,0	1	100	0
87	1	100	0

Taula 1 .Gradient utilitzat en la cromatografia líquida

La concentració de cadascun dels aminoàcid en la mostra vegetal, expressats en $\mu\text{mol/g}$ Pes sec, es calcula mitjançant la equació

$$C_i = \left(\frac{A_i}{A_{PI}} \right) \cdot C_{PI} \cdot F_i$$

on:

C_i : concentració de l'aminoàcid i en la mostra vegetal

C_{PI} : concentració del Patró Intern afegit a la mostra vegetal

A_i : àrea de l'aminoàcid i en el cromatograma de la mostra vegetal

A_{PI} : àrea del Patró Intern en el cromatograma de la mostra vegetal

F_i : factor de resposta de l'aminoàcid i

3.3. DETERMINACIONS I QUANTIFICACIONS ENZIMÀTIQUES

3.3.1 Extracció i dessalació de les mostres

Es segueix el mètode de Kraemer et al. (1998) modificat i els comentaris personals de la Dra. Amparo Sanz (Departament de Biologia Vegetal, Universitat de València).

Tant l'extracció com el procés de dessalació tenen lloc dins la càmera a 4 °C.

L'extracció es realitza a partir de 250 mg de mostra fresca. Aquestos es trituren amb N₂ líquid fins que quede una pols fina. Tot seguit es col·loca la mostra triturada en un tub de centrifuga junt amb 3 ml del tampó d'extracció amb 90 µl de cocktail inhibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts de Sigma). El tampó d'extracció consisteix en 50 mM Hepes + 15 mM MgCl₂ + 2% (w/v) PEG (15.000-20.000 MW) + 0,02 % (w/v) Triton X-100 + 10 mM DTT + 0,5 mM EDTA + 1 % BSA + 20 mM Ascorbat + 1 % (w/v) de PVPP ajustat a pH 7,5 amb KOH.

A continuació es homogeneïtzen les mostres en fred amb el politrón durant 1 minut a màxima velocitat, mantenint el tub en gel i evitant que es calfe la mostra.

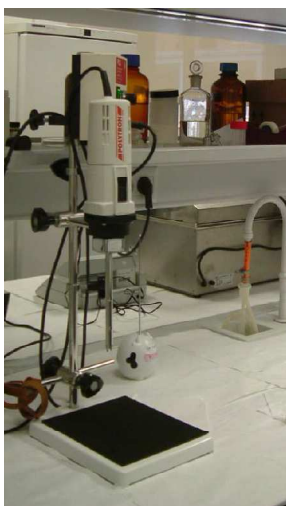


Foto 12. Sistema de homogeneïtzació (Politrón)

Les mostres es filtren en muselina, prèviament remullada amb tampó d'extracció. Es recupera el filtrat i es centrifuga durant 15 minuts a 10.000 g en centrifuga refrigerada a 4 °C. Finalment s'arregla el sobrenedant. Aquest és l'extracte vegetal

sense dessalar. El següent pas per a l'obtenció de l'extracte vegetal és la dessalació d'aquest.



Foto 13. Columna utilitzada en la dessalació de les mostres

Per a la dessalació s'utilitza una columna de Sephadex G-25. Aquesta es troba en un suport trípode dins la càmera. Per a la seua utilització es necessari obrir-la i condicionar-la mitjançant els següents passos:

1. Es llava la columna amb 25 ml d'aigua Milli-Q. Aquesta es injectada lentament amb una xeringa a un ritme de 5 ml/ minut.
2. Es passen a través de la columna, amb un flux de 5 ml/min, 25 ml de tampó de dessalació consistent en 50 mM Hepes + 15 mM $MgCl_2$ + 10 mM DTT + 0,5 mM EDTA ajustat a pH 7,5 amb KOH.

Una vegada condicionada la columna es fan passar lentament a través d'aquesta 1,5 ml de l'extracte vegetal. A continuació s'injecten 2 ml de tampó de dessalació i es recull tot el que vaja eixint de la columna. Aquesta fracció que es recull, uns 2 ml, conté l'extracte dessalat, que es fracciona en alíquotes de 100 μ l en tubs eppendorfs que són congelats amb nitrogen líquid i emmagatzemat a -20 °C. Posteriorment s'utilitzaran per als diferents assajos enzimàtics i per a la determinació de la proteïna total.

Entre el pas consecutiu de dos extractes, la columna es neteja amb 10 ml de tampó de dessalació.

Per a guardar la columna i emmagatzemar-la a 4 °C, es segueix el següent protocol:

- a. Es llava la columna amb 25 ml de tampó de dessalació, de la manera indicada en el punt 2.
- b. Es passen 25 ml d'aigua Milli-Q, com s'ha explicat en el punt 1.

- c. I finalment es fan passar 25 ml d'etanol al 20% (v/v), de la mateixa manera que en els punts anteriors.

La columna es tapa fins a un nou ús.

3.3.2 Determinació de l'activitat d'enzims del metabolisme dels carbohidrats

- *Sacarosa Sintasa (Sucrose synthase SS; EC 2.4.1.13, direcció de síntesi de la sacarosa)*

L'assaig enzimàtic de la sacarosa sintasa es basa en el protocol descrit per la Dra. A. Sanz (comunicació personal). A 90 µl del tampó d'assaig, consistent en 50 mM de HEPES + 15 mM MgCl₂ ajustat a pH 8,5 amb KOH, s'afegeixen els substrats de la reacció, 2 µmol de Fructosa i 1 µmol UDPG, i 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat. Els tubs s'agiten ràpidament i s'incuben a 30 °C du rant 15 minuts. La reacció s'atura afegint a cada tub 120 µl de 1 N NaOH.

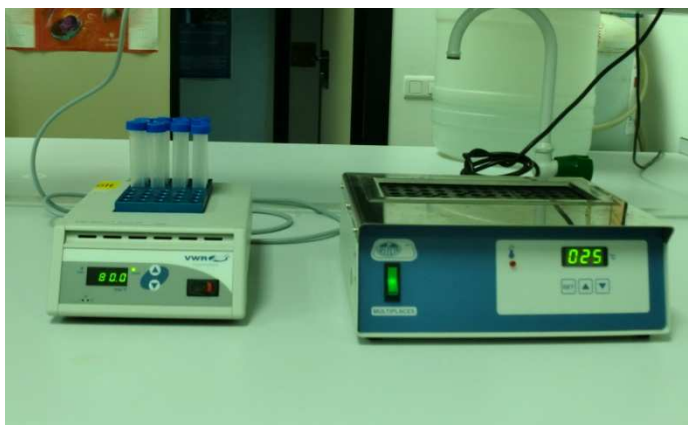


Foto 14. Calefactores (VWR digital Heatblock i J.P. Selecta multiplaces) on s'incubaren les diferents mostres

Es preparen tubs blancs amb 90 µl de tampó d'assaig (amb els substrats dissolts) + 120 µl de 1 N NaOH (que deté la reacció) + 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat. Aquestes seran les mostres a temps zero.

Paral·lelament, es prepara una corba patró entre 0 i 600 nmol a partir d'un estoc de sacarosa 5 mM.

Tots els tubs (mostres, blancs i patrons) es calfen en un bany a 100 °C durant 10 minuts, i es deixen refredar a temperatura ambient. Seguidament s'afegeix a cada tub 240 µl de 0,1% resorcinol (v/v) en etanol 96 % i 720 µl de HCl 30% i es calfen a 80 °C

durant 8 minuts. Es refreden ràpidament en un bany amb gel i es llegeix l'absorbància a 490 nm.

L'activitat de la sacarosa sintasa expressada en nmols de sacarosa per grams de pes fresc i per minut es calcula a partir de la següent fórmula:

$$\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{min}^{-1} = \frac{E \times V_e \times V_c}{V_t \times V_d \times \text{g PF} \times t}$$

On:

E: nmol Suc_s – nmol Suc_b, tras interpolar las absorbancias en la curva patrón

V_e: volum del tampó d'extracció utilitzat

V_c: volum de l'alíquota de l'extracte aplicat a la columna de dessalació

V_d: volum recuperat de la columna de dessalació

V_t: volum de l'extracte enzimàtic afegit al tub de l'assaig enzimàtic

g PF: grams de pes fresc de teixit homogeneïtzat

t: temps d'incubació

- *Sacarosa Sintasa (Sucrose synthase (SS; EC 2.4.1.13), direcció d'hidròlisi de sacarosa)*

Es segueix el mètode descrit per Verma et al. (2011), lleugerament modificat. A 90 µl del tampó d'assaig format per 50 mM Hepes + 15 mM MgCl₂ ajustat a pH 7,5 amb KOH, se li afegixen en el moment de realitzar la determinació els substrats 2 mM NAD, 1mM ATP i 320 mM de sacarosa; i 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat.

La reacció s'inicia afegint 10 µl de 1,5 mM UDP. S'agiten ràpidament els tubs i s'incuben a 30 °C durant 15 minuts. S'atura la reacció afegint 120 µl de 1N NaOH.

Paral·lelament es preparen tubs blancs amb 90 µl de tampó d'assaig amb els substrats dissolts, 120 µl de 1N NaOH, 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat i 10 µl de 1,5 mM de UDP. Aquestes seran les mostres a temps zero.

Els sucres reductors formats en la reacció es determinen amb el mètode de Park i Johnson (1949). A cada tub se li afegix 250 µl d'una solució de carbonat cianur i 250 µl d'una solució de ferricianur. Es calfen en un bany amb aigua bullint durant 15 minuts, i després es refreden en un bany amb aigua corrent. S'afegixen 1,25 ml de solució fèrrica i als 15 minuts es llegeix la densitat òptica a 690 nm.

Juntament amb les mostres, es prepara una corba patró de glucosa 5 mM entre 0 i 650 nmol de glucosa.

L'activitat de la sacarosa sintasa expressada en nmols de glucosa per grams de pes fresc i per minut, es calcula aplicant la següent fórmula:

$$\text{nmol Glu} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{min}^{-1} = \frac{E \times V_e \times V_c}{V_t \times V_d \times \text{g PF} \times t}$$

On:

E: nmol Glu_s – nmol Glu_b, després d'interpolar las absorbàncies en la corba patró

V_e: volum del tampó d'extracció utilitzat

V_c: volum de l'alíquota de l'extracte aplicat a la columna de dessalació

V_d: volum recuperat de la columna de dessalació

V_t: volum de l'extracte enzimàtic afegit al tub de l'assaig enzimàtic

g PF: grams de pes fresc de teixit homogeneïtzat

t: temps d'incubació

- *Sacarosa Fosfat Sintasa (Sucrose phosphate synthase (SPS; EC 2.4.1.14), direcció de síntesi)*

Es segueix el mètode descrit per Verma et al. (2011) modificat.

A 90 µl del tampó d'assaig, consistent en 50 mM de Hepes + 15 mM MgCl₂ ajustat a pH 7,4 amb KOH, se li afegeixen els substrats dissolts 2 µmol Fructosa-6-P, 1 µmol UDPG i 2 mM NaF; i 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat.

Conjuntament amb les mostres, es prepara una corba patró entre 0 i 600 nmol de sacarosa a partir d'un estoc de 5 mM de sacarosa.

Els tubs s'agiten i s'incuben a 30 °C durant 15 min uts. La reacció s'atura afegint 120 µl de 1 N NaOH.

Paral·lelament es preparen tubs blancs, que seran les mostres a temps zero, mitjançant 90µl de tampó d'assaig amb els substrats dissolts, 120 µl de 1 N NaOH i 30 µl de l'extracte enzimàtic dessalat.

Tots els tubs (blancs, mostres i patrons) es calfen en un bany a 100 °C durant 10 minuts, per a destruir la fructosa 6-P que no haguera reaccionat. Es deixen refredar a temperatura ambient i s'afegeix a cada tub 240 µl de 0,1% de resorcinol (v/v) en etanol

96% i 720 µl de 30% HCl. Es calfen durant 8 minuts a 80 °C, i es refreden ràpidament en un bany amb gel. Es llegeix l'absorbància a 490 nm.

L'activitat de la sacarosa fosfat sintasa es calcula a partir de la fórmula següent i s'expressa en nmols de sacarosa per grams de pes fresc i per minut.

$$\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{min}^{-1} = \frac{E \times V_e \times V_c}{V_t \times V_d \times \text{g PF} \times t}$$

On:

E: nmol Suc_s – nmol Suc_b, després d'interpol·lar les absorbàncies en la corba patró

V_e: volum del tampó d'extracció utilitzat

V_c: volum de l'alíquota de l'extracte aplicat a la columna de dessalació

V_d: volum recuperat de la columna de dessalació

V_t: volum de l'extracte enzimàtic afegit al tub de l'assaig enzimàtic

g PF: grams de pes fresc de teixit homogeneïtzat

t: temps d'incubació

3.3.3 Determinació de l'activitat d'enzims del metabolisme del nitrogen

o *Glutamina Sintetasa (Glutamine Synthetase GS; EC 6.3.1.2)*

Es segueix el mètode descrit per Pregnall et al. (1987). Es prepara per a cada mostra tres sèries idèntiques de tubs. El medi de reacció està format per 1,4 ml del tampó d'assaig compost per 50 mM Hepes + 30 mM MgSO₄ + 80 mM d'àcid L-Glutàmic + 10 mM ATP i 15 mM hidroxilamina. La reacció s'inicia quan s'afegeixen 100 µl de l'extracte enzimàtic dessalat. S'agiten els tubs ràpidament i s'incuben a 35 °C en un bany durant un temps variable segons la sèrie: 15 minuts la primera sèrie i 30 minuts la segona.

Paral·lelament, es preparen tubs blancs, que correspondran al temps 0. Aquests es preparen a partir de 100 µl de l'extracte enzimàtic dessalat i 1,4 ml del tampó d'assaig sense hidroxilamina.

La reacció s'atura al temps corresponent, afegint 1,5 ml d'una barreja de 10% clorur fèrric (w/v), 30% TCA (w/v), 12 N HCl i aigua, en la proporció 2:1:1:2. Es llegeix l'absorbància a 540 nm del complex format, el ferro-γ-glutamil monohidroxamat.

L'activitat de la glutamina sintetasa es calcula mitjançant la línia de regressió de la quantitat de producte format en el temps, i s'expressa en les unitats de nmol per gram de pes fresc i per minut.

○ *Glutamato Sintasa (Glutamate synthase GOGAT; EC, 1.4.1.14)*

La determinació de l'activitat de l'enzim glutamat sintasa es realitza segons el mètode indicat per Srivastava i Ormond (1984) i per Singh i Srivastava (1986). El medi de reacció està format per 2,5 ml del tampó d'assaig fosfat potàssic 20 mM KH_2PO_4 pH 7,5 ajustat amb KOH, al que se li afegeix en el moment de la reacció 1 mM L-Glutamina, 5 mM α -cetoglutarat, 2mM NADH i 0,1 ml de l'extracte enzimàtic dessalat.

Es preparen dos controls de la reacció, compostos per::

- Control 1: 2,5 ml del medi de reacció sense L-glutamina i 0,1 ml de l'extracte enzimàtic dessalat
- Control 2: 2,5 ml del medi de reacció sense α -cetoglutarato i 0,1 ml de l'extracte enzimàtic dessalat.

La reacció s'inicia quan s'incorpora l'extracte enzimàtic i es llegeix el descens de l'absorbància a 340 nm causat per l'oxidació del NADH a intervals de 15 segons durant els primers 5 minuts de la reacció.

Paral·lelament es prepara una corba patró entre 0 i 600 nmol NADH, a partir d'un estoc de 2 mM de NADH.

L'activitat de l'enzim glutamat sintasa s'expressa en nmols NADH oxidats per grams de pes fresc i per minut, mitjançant la següent fórmula:

$$\text{nmol NADH oxidados} \times g^{-1}PF \times \text{min}^{-1} = \frac{E \times V_e \times V_c}{V_t \times V_d \times g PF \times t}$$

On:

E: nmol NADH_{t₀} – nmol NADH_{t₁}, després d'interpol·lar les absorbàncies en la corba patró

V_e: volum del tampó d'extracció utilitzat

V_c: volum de l'alíquota de l'extracte aplicat a la columna de dessalació

V_d: volum recuperat de la columna de dessalació

V_t: volum de l'extracte enzimàtic afegit al tub de l'assaig enzimàtic

g PF: grams de pes fresc de teixit homogeneïtzat

t: temps d'incubació

3.4. DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DELS PIGMENTS FOTOSINTÈTICS: CLOROFIL·LES I CAROTENOIDES

L'extracte vegetal s'obté seguint el mètode descrit per Garrat et al. (2005). 50 mg de fulles fresques es trituren amb 1 ml d'acetona 80% (v/v) en un morter prerafredat en la nevera i col·locat en una safata rodejat de gel. L'extracte aconseguit es centrifuga a 10.000 g durant 2 minuts, a 4 °C.

Es recull el sobrenedant i es mesura l'absorbància a 470, 647 i 663 nm.

La quantitat de clorofil·les i carotenoides presents en l'extracte es calculen seguint les fórmules indicades per Lichtenthaler (1987) i els resultats s'expressen en micrograms de pigment per mil·lilitre de l'extracte obtingut.

$$C_a = 12,25 \cdot A_{663} - 2,79 \cdot A_{647}$$

On:

C_a : concentració de clorofil·la a

A_{663} : valors d'absorbància a 663 nm

A_{647} : valors d'absorbància a 647 nm

$$C_b = 21,50 \cdot A_{647} - 5,10 \cdot A_{663}$$

On:

C_b : concentració de clorofil·la b

A_{663} : valors d'absorbància a 663 nm

A_{647} : valors d'absorbància a 647 nm

$$C_{a+b} = 7,15 \cdot A_{663} + 18,71 \cdot A_{647}$$

On:

C_{a+b} : concentració total de clorofil·les

A_{663} : valors d'absorbància a 663 nm

A_{647} : valors d'absorbància a 647 nm

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1,82C_a - 85,02C_b}{198}$$

On:

C_{x+c} : concentració carotenoides

C_a : concentració clorofil·la a

C_b : concentració clorofil·la b

3.5. DETERMINACIÓ I QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS INORGÀNICS: IONS Cl^- I Na^+

L'obtenció de l'extracte amb els ions Cl^- i Na^+ presents en les mostres vegetals es realitza a partir de 25 mg de mostra liofilitzada. Es realitza una digestió àcida a temperatura ambient en tubs de vidre pyrex amb tap de rosca. El medi de reacció està compost per 1 ml de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) al 33% + 1 ml d'àcid nítric concentrat (70%) + 1 gota d'alcohol isoamilic. Transcorreguts 15 minuts s'aforen els extractes a 25 ml amb aigua destil·lada i es filtren amb paper de filtre Whatman nº 2. Es guarden en nevera fins a la seua anàlisi.

3.5.1 Determinació del ió Na^+

La quantitat del ió Na^+ present en les mostres de fulla, arrel i rizoma es mesura mitjançant fotometria de flama i la concentració, expressada en mg/l (ppm), es calcula interpolant les lectures en una corba patró preparada entre 0 i 10 ppm, a partir d'un estoc de Na^+ de 1.000 ppm.

3.5.2 Determinació del ió Cl^-

A 1 ml de l'extracte digerit se li afegeix 1 ml del reactiu de Merk (Spectroquant® 1.14755.0001 Clorurs), compost per 15 ml de solució de Tiocinat de mercuri (4,17 g/l

metanol), 15 ml de solució de nitrat de ferro (202 g de nitrat de ferro + 21 ml d'àcid nítric concentrat, aforat a 1 litre amb aigua destil·lada) i 50 µl de Brij[®] 35 (Polyethylene glycol dodecyl ether) al 4%. Després de barrejar-se es llegeix l'absorbància a 450 nm i els valors s'interpolen en una corba de calibrat compresa entre 10 i 250 mg/l de Cl⁻.

3.6. ANÁLISI ESTADÍSTIC

Els resultats s'expressen com la mitjà de les repeticions amb el seu respectiu error estàndard. El nombre de repeticions s'especifica en les llegendes de les figures o peu de taula. Les mitges dels resultats entre els diferents òrgans d'una mateixa espècie i entre ambdues espècies es van comparar mitjançant el test t- Student.

III. RESULTATS

1. CONTINGUT EN CARBOHIDRATS

1.1 QUANTIFICACIÓ DE SUCRES TOTALS

L'estudi es va portar a terme analitzant per separat els diferents òrgans de les plantes de les espècies analitzades, és a dir:

- Fulla, arrel i rizoma de *Cymodocea nodosa*
- Fulla, arrel i rizoma de *Posidonia oceanica*

A partir de l'equació de la recta de regressió de la corba patró (Figura 5) i de les absorbàncies aconseguides després d'analitzar els extractes vegetals, s'ha calculat la concentració de sucres totals de cadascuna de les mostres aplicant la fórmula indicada en la secció 3.1.1 de materials i mètodes.

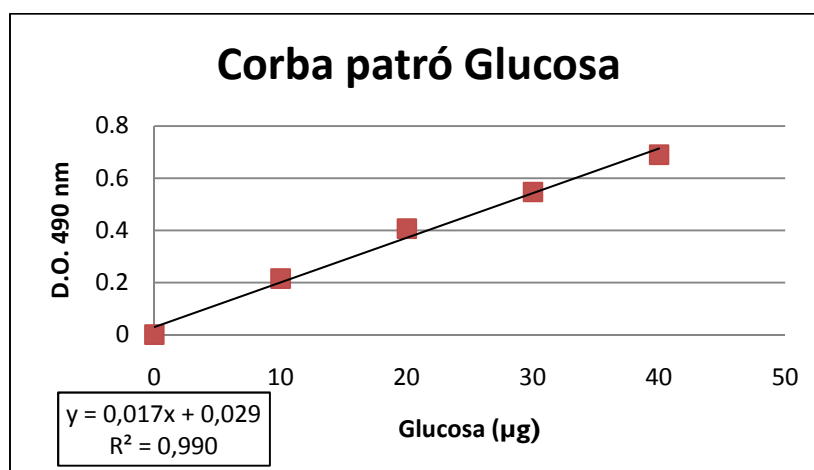


Figura 5. Corba patró entre 0 i 40 µg de glucosa a partir d'un estoc de 100 µg de glucosa.

En la Figura 6 es representa el contingut de sucres totals en percentatge i en la Taula 2 es mostren els resultats de les diferències estadísticament significatives entre mitges després d'aplicar el test t-Student.

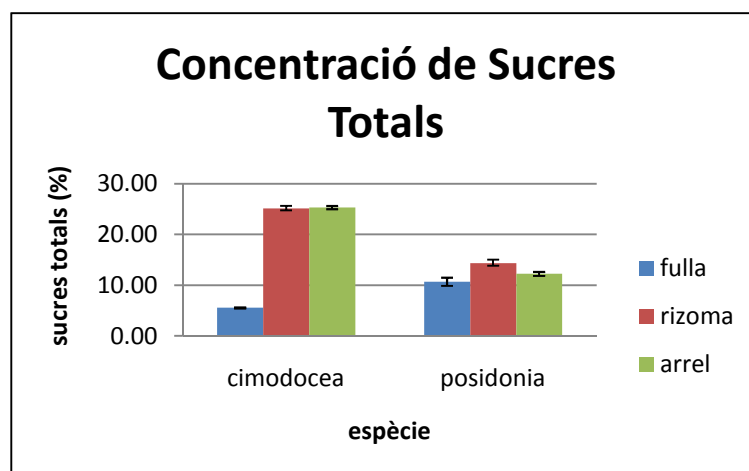


Figura 6. Contingut en sucres totals (%) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà (n=6) amb l'error estàndard (barra vertical)

Taula 2. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans del contingut en sucres totals en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Sucre Totals (%)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	5,5 ± 0,1 a	25,1 ± 0,6 b	25,3 ± 0,3 b
<i>Posidonia oceanica</i>	10,7 ± 0,8 c	14,3 ± 0,8 d	12,2 ± 0,4 c

Cimodocea presenta un major contingut de sucres totals com a planta sencera que posidònia. Això es deu fonamentalment a un major percentatge de sucres en el rizoma i en les arrels, que representen cadascun d'ells un 25% del pes sec de la planta, front al 12-14% que representen cadascun d'aquests òrgans en posidònia.

En fulles de cimodocea, el percentatge de sucres no supera el 5,5%, el que representa sols una cinquena part del present en els òrgans soterrats de la planta. En posidònia, el valor és major, un 10,7%, sent del mateix ordre, encara que un poc més baix, al contingut de sucres totals en els seus òrgans soterrats. És en el rizoma on s'emmagatzemen una major quantitat de sucres.

1.2. QUANTIFICACIÓ DEL MIDÓ

A partir de l'equació de regressió de la corba patró de la glucosa (Figura 5), es calcula la concentració de midó per a cadascuna de les absorbàncies aconseguides en

els òrgans de les dues espècies, després de l'anàlisi mitjançant l'aplicació de la fórmula indicada en l'apartat 3.1.1 de materials i mètodes.

En la Taula 3 es mostren els resultats de les diferències estadísticament significatives entre mitges després d'aplicar el test t-Student. Aquests resultats es mostren gràficament en la Figura 7.

Taula 3. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans del contingut en midó en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Midó (%)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	12,3 ± 0,4 a	10,4 ± 0,3 b	7,9 ± 0,5 c
<i>Posidonia oceanica</i>	11,3 ± 0,1d	40,0 ± 0,3 e	21,5 ± 0,4 f

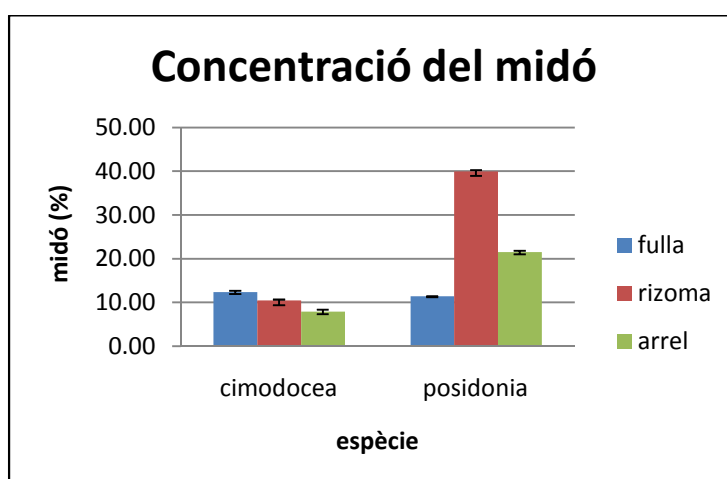


Figura 7. Contingut en midó (%) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà (n=6) amb el error estàndard (barra vertical)

A nivell de planta sencera, posidònia presenta un major contingut de midó que cimodocea.

En posidònia el midó es concentra generalment en els òrgans soterrats, arribant a quadruplicar els valor de les fulles, 0,0 % front a 11,3%.

L'òrgan amb major concentració de midó en les plantes de cimodocea són les fulles. La diferència de concentració entre aquest òrgan i els altres no és molt elevada, havent-hi una diferència màxima del 5%.

1.3. QUANTIFICACIÓ DE LA SACAROSA

Amb l'equació de regressió de la corba patró analitzada (Figura 8) i els valors d'absorbància obtinguts durant l'anàlisi dels extractes vegetals, es calcula la concentració de la sacarosa de cadascuna de les mostres aplicant la fórmula expressada en la secció 3.1.1 de materials i mètodes.

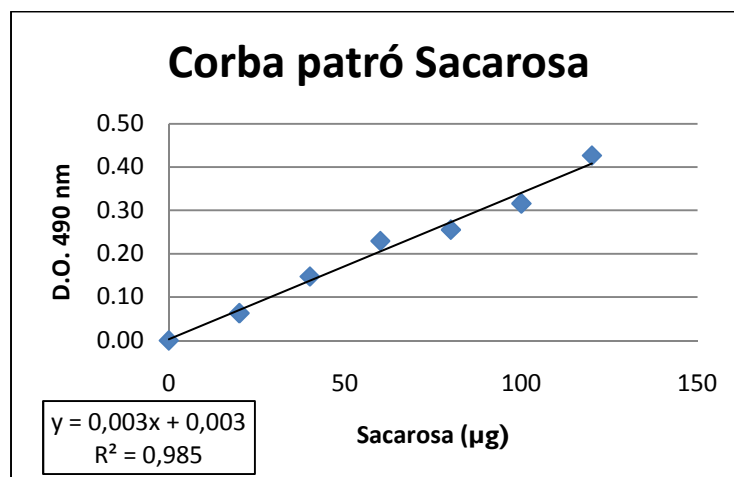


Figura 8. Corba patró entre 0 i 120 µg de sacarosa d'un estoc de 400 µg/ml

En la figura 9 es representen els valors de sacarosa en percentatge i en la Taula 4, es mostren els resultats de les diferències estadísticament significatives entre mitges després d'aplicar el test t-Student.

Taula 4. Estudi comparatiu entre els valors mitjans del continguts en sacarosa en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Sacarosa (%)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	2,7 ± 0,2 a	16,5 ± 0,6 b	12,3 ± 0,6 c
<i>Posidonia oceanica</i>	4,4 ± 0,6 d	2,4 ± 0,3 a	4,9 ± 0,6 d

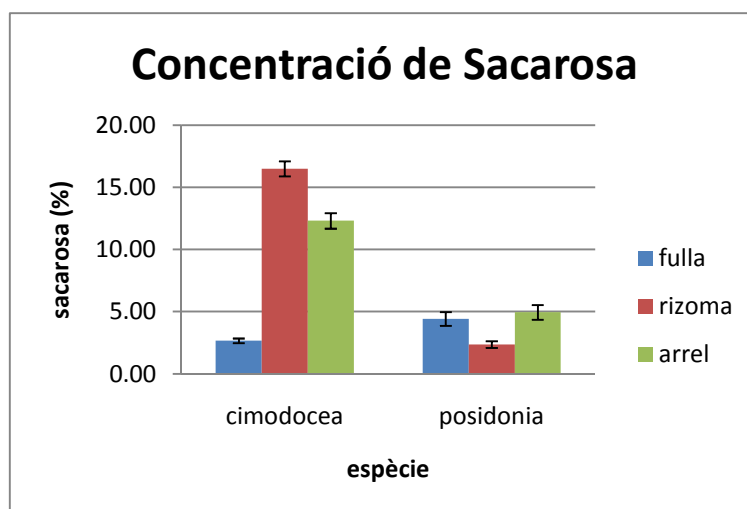


Figura 9. Contingut en sacarosa (%) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es presenta el valor mitjà (n=6) amb l'error estàndard

Cimodocea conté més sacarosa en els seus teixits que posidònia. La major concentració està en el rizoma i l'arrel presentant-ne un valor molt baix en fulles, 2,7%. En posidònia, les concentracions de sacarosa presents en els seus teixits són d'aquest mateix ordre, encara que en fulles i arrel es troben valors de 4,4-4,9, respectivament.

2. QUANTIFICACIÓ DELS COMPOSTOS NITROGENATS

2.1 PROTEÏNA SOLUBLE TOTAL

A partir de les equacions de les rectes de regressió de les corbes patró resultants de l'aplicació del mètode de Bradford (Figura 10) i del mètode de Bradford "*microassay procedure*" (Figura 11) i els valors d'absorbància dels diferents extractes vegetals analitzats, es calcula la concentració de proteïna soluble total.

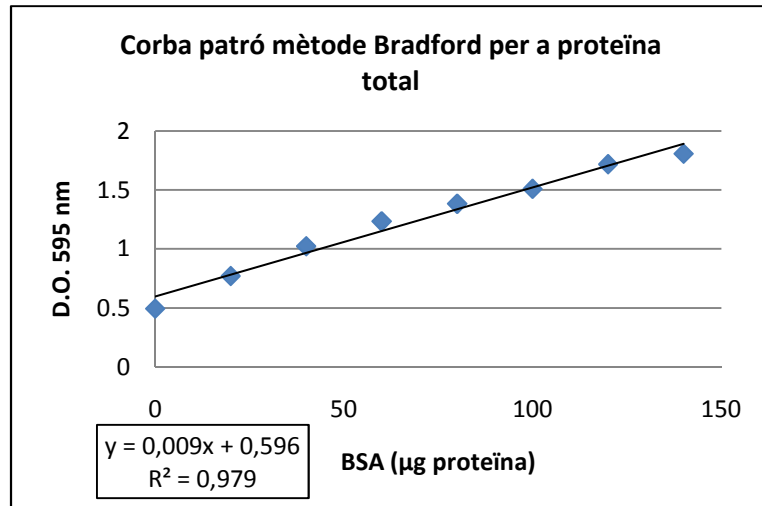


Figura 10. Corba patró entre 0 i 140 µg de proteïna a partir d'un estoc de 2 mg proteïna/ml de BSA, mitjançant el mètode de quantificació de proteïnes (Mètode Bradford)

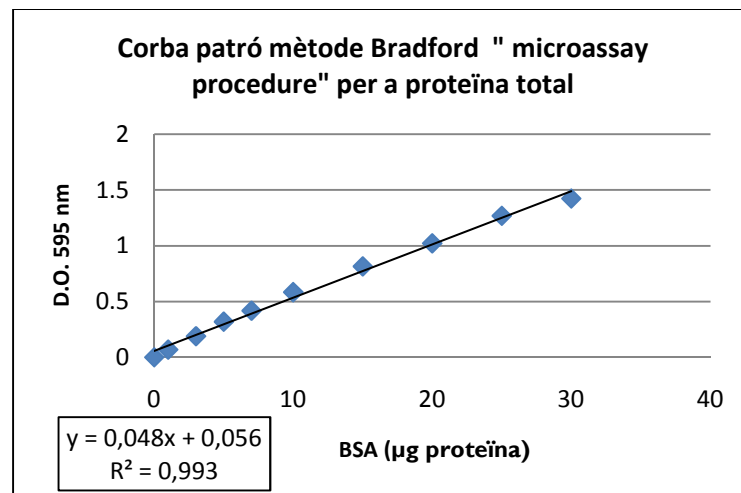


Figura 11. Corba patró entre 1 i 30 µg de proteïna a partir d'un estoc de 0,1 mg proteïna/ml de BSA, mitjançant el mètode per a la quantificació de baixes quantitats de proteïnes (mètode Bradford "microassay procedure").

En la Taula 5, es presenten els resultats de les diferències estadísticament significatives entre mitges després d'aplicar el test t-Student. Aquestos resultats són expressats gràficament en la Figura 12.

Taula 5. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans del continguts en proteïna soluble total en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	µg proteïna/mg Pes Fresc		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	0,838 ± 0,006 a	1,00 ± 0,019 b	0,963 ± 0,001 c
<i>Posidonia oceanica</i>	0,919 ± 0,031 c	0,967 ± 0,06 c	0,937 ± 0,014 c

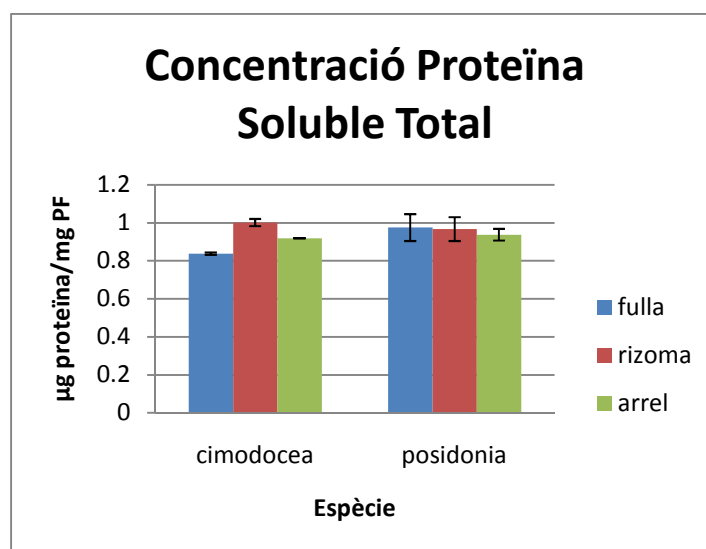


Figura 12. Contingut en proteïna soluble total (µg proteïna/ mg pes fresc) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà (n=3) amb el error estàndard (barra vertical)

La proteïna total present en les dos plantes senceres és similar. L'òrgan que concentra una major concentració és el rizoma

El contingut en proteïna soluble total no presenta grans variacions en els teixits estudiats. Les diferències, encara que algunes d'aquestes a nivell significatiu estadísticament, són menudes. Cal destacar el menor contingut de proteïna soluble en fulles de cimodocea, i la tendència a haver-hi nivells lleugerament majors de proteïna en els òrgans soterrats, no fotosintètics, front al de les fulles.

2.2 AMINOÀCIDS LLIURES

En la Figura 13 es presenta el cromatograma dels aminoàcids estàndards comercials resolt per HPLC.

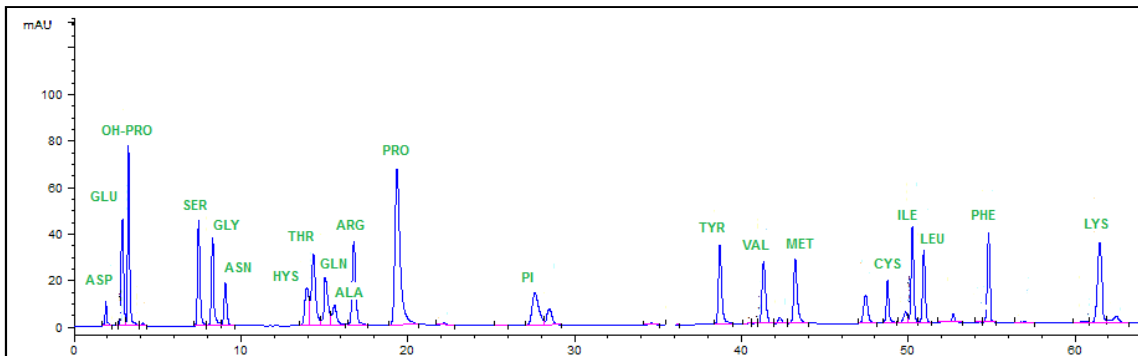


Figura 13. Cromatograma dels aminoàcids lliures patró identificats. Cada pic correspon a 0,5 nmol/ μ l d'aminoàcid (n=6).

El cromatograma presenta un total de 21 pics ben separats en l'interval de temps comprès aproximadament entre els 2 i 64 minuts de carrera cromatogràfica, i que identifiquem amb cadascun dels aminoàcids presents en la barreja preparada. A partir d'aquest temps els pics es solapen dificultant una bona resolució. Aquests pics corresponen a restes dels reactius utilitzats durant el procés de secat i derivatització de la mostra.

En la Taula 6 s'exposen els factors de resposta obtinguts per a cada aminoàcid.

Taula 6. Factor resposta (F_i) dels diferents aminoàcids de les mostres patrons. El F_i es determina mitjançant la relació entre l'àrea corresponent al patró intern i l'àrea de cada aminoàcid utilitzant l'expressió $F_i = A_P/A_i$

AMINOÀCID	F_i	ES
Àcid aspàrtic	5,74	0,23
Àcid glutàmic	0,87	0,02
Hidroxiprolina	0,69	0,01
Serina	0,92	0,01
Glicina	0,92	0,02
Asparagina	2,27	0,07
Hystidina	1,31	0,03
Threonina	0,88	0,07
Glutamina	0,98	0,01
Alanina	2,54	0,34
Arginina	0,63	0,02
Prolina	0,21	0,00
Tyrosina	0,89	0,02
Valina	0,87	0,02
Methionina	1,02	0,02
Cystina	1,86	0,09
Isoleucina	0,72	0,02
Leucina	0,89	0,04
Phenilalanina	0,94	0,01
Lysina	0,59	0,01

- *Quantificació aminoàcids lliures en l'espècie Cymodocea nodosa*

Per a la quantificació dels aminoàcids lliures en cimodocea s'analitzaren per separat els diferents òrgans de la planta, és a dir, fulla, rizoma i arrel.

A continuació es mostren els cromatogrames obtinguts en cadascun dels casos:

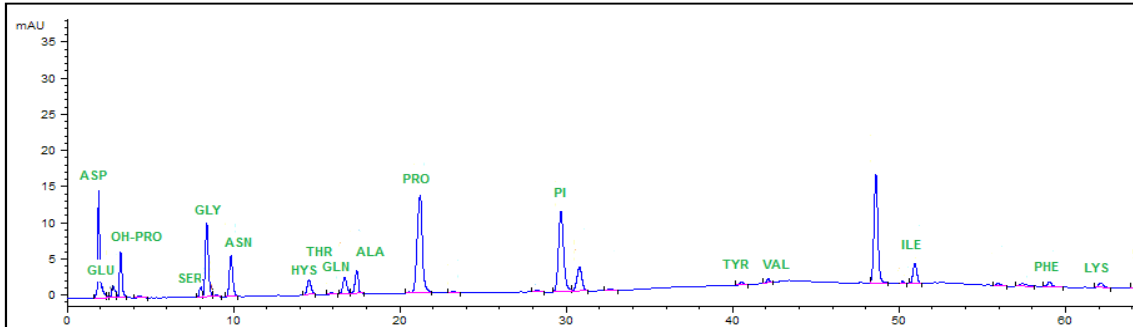


Figura 14. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra de fulla de cimodocea (n=6)

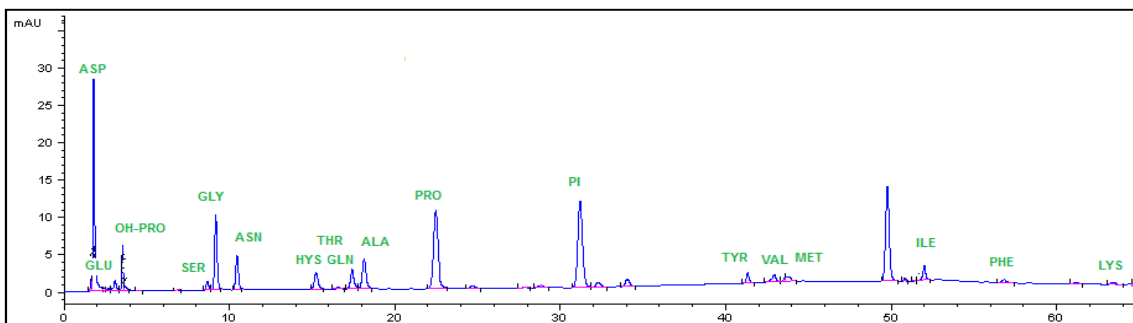


Figura 15. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra de rizoma de cimodocea (n=6)

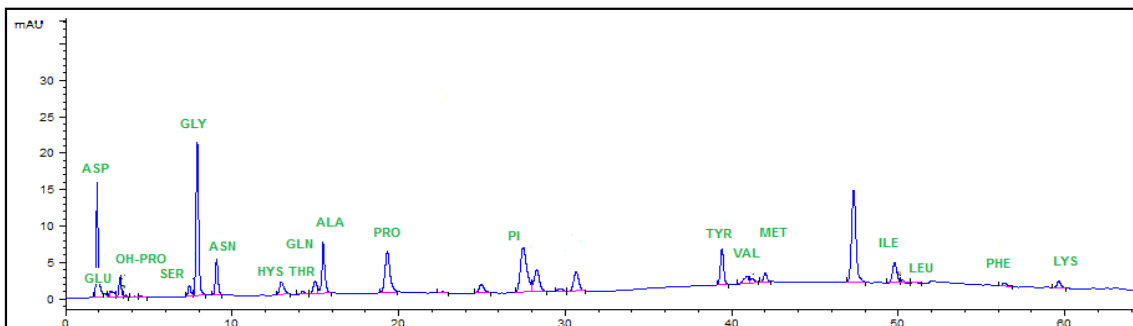


Figura 16. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra d'arrel de cimodocea (n=6)

A partir del factor F_i i les àrees dels aminoàcids es calcula la concentració dels diferents aminoàcids mitjançant la fórmula explicada en l'apartat 3.2.2 de la secció de materials i mètodes.

La Taula 7, mostra les concentracions individuals dels aminoàcids de les mostres vegetals de cimodocea analitzades.

Taula 7. Concentracions d'aminoàcids lliures en les mostres de cimodocea. La concentració s'expressa en $\mu\text{mol/g}$ PS (n=6).

AMINOÀCID	CONCENTRACIÓ ($\mu\text{mol/gPS}$)					
	FULLA		RIZOMA		ARREL	
	C	ES	C	ES	C	ES
Àcid aspàrtic	2,110	0,251	1,821	0,043	2,864	0,035
Àcid glutàmic	0,055	0,003	0,030	0,002	0,030	0,003
Hidroxiprolina	0,106	0,004	0,041	0,006	0,064	0,001
Serina	0,040	0,002	0,032	0,006	0,026	0,000
Glicina	0,219	0,038	0,417	0,090	0,209	0,000
Asparagina	0,406	0,019	0,300	0,037	0,256	0,000
Hystidina	0,138	0,014	0,093	0,016	0,102	0,001
Threonina	0,008	0,000	0,009	0,002	0,010	0,000
Glutamina	0,088	0,003	0,058	0,014	0,108	0,001
Alanina	0,228	0,045	0,576	0,098	0,362	0,002
Arginina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Prolina	0,176	0,015	0,053	0,011	0,099	0,000
Tyrosina	0,019	0,002	0,103	0,031	0,043	0,001
Valina	0,033	0,012	0,034	0,007	0,028	0,004
Methionina	0,012	0,002	0,041	0,009	0,014	0,003
Cystina	0,021	0,001	0,004	0,004	0,000	0,000
Isoleucina	0,122	0,024	0,083	0,001	0,050	0,001
Leucina	0,007	0,002	0,001	0,001	0,003	0,003
Phenilalanina	0,022	0,001	0,024	0,001	0,020	0,000
Lysina	0,014	0,002	0,014	0,001	0,009	0,000

C: concentració ES: error estàndard

Els aminoàcids que presenten major concentració en els tres òrgans són l'Àcid Aspàrtic, la Glicina, l'Asparagina i l'Alanina. En les fulles, l'Àcid Aspàrtic apareix com l'aminoàcid majoritari, seguit per l'Asparagina. Aquest primer, també és l'aminoàcid que presenta una major concentració en rizoma i arrel. El segon aminoàcid més abundant en aquests òrgans és l'Alanina.

La concentració total d'aminoàcids lliures en la planta de *Cymodocea* es mostra en la Figura 17.

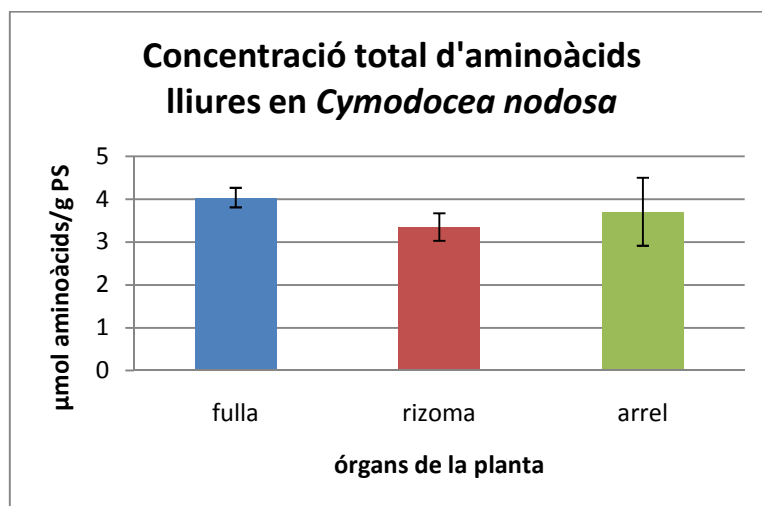


Figura 17. Concentració total d'aminoàcids lliures (µmol/g PS) en els diferents òrgans de *Cymodocea nodosa*. Es presenta el valor mitjà (n=6) amb l'error estàndard

Els valors dels aminoàcids totals en *cymodocea* en els diferents òrgans és molt semblant. L'òrgan amb major concentració és la fulla.

En la Taula 8 es recullen els valors numèrics de la Figura 17 i la seva significació estadística.

Taula 8. Concentracions totals d'aminoàcids lliures en plantes de *cymodocea*. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Fulla	Rizoma	Arrel
Concentració aa (µmol/g PS)	4,0± 0,2a	3,3 ±0,3b	3,7 ± 0,8ab

Encara que les diferències existents entre els tres òrgans no són molt grans, les fulles contenen major quantitat d'aminoàcids. L'òrgan que concentra la menor concentració d'aminoàcids és el rizoma.

- *Quantificació dels aminoàcids lliures en mostres de Posidonia oceanica.*

L'anàlisi de les plantes de posidònia va incloure 3 mostres, una per cada òrgan de la planta, és a dir, fulla, rizoma i arrel.

Els cromatogrames obtinguts es mostren a continuació:

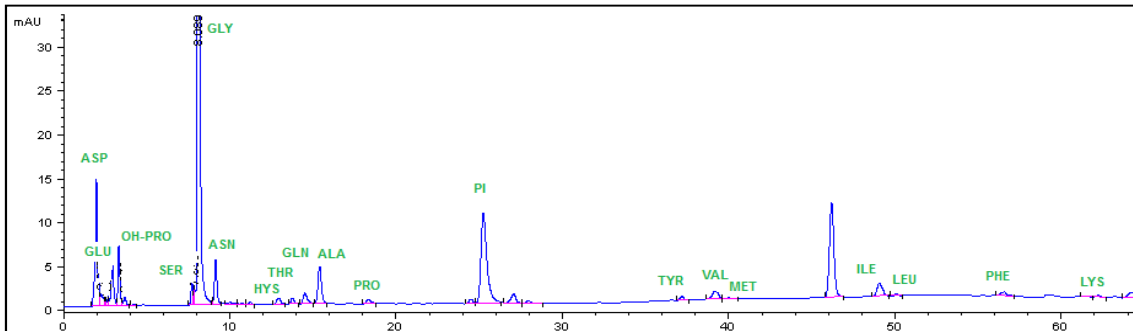


Figura 18. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra de fulla de posidònia (n=6)

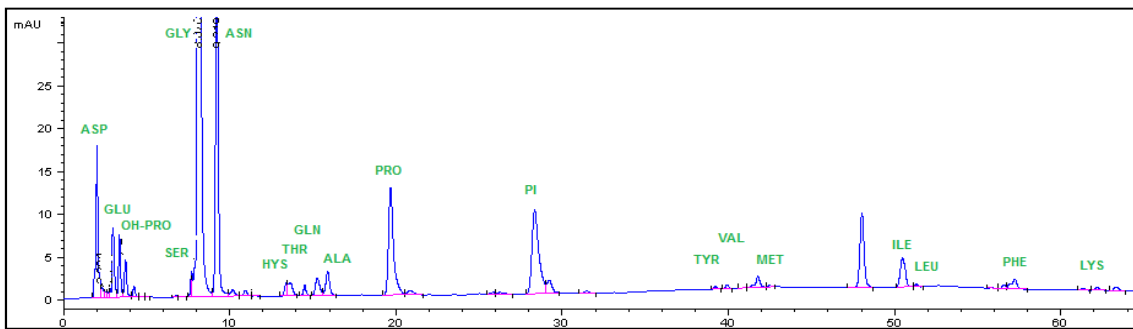


Figura 19. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra de rizoma de posidònia (n=6)

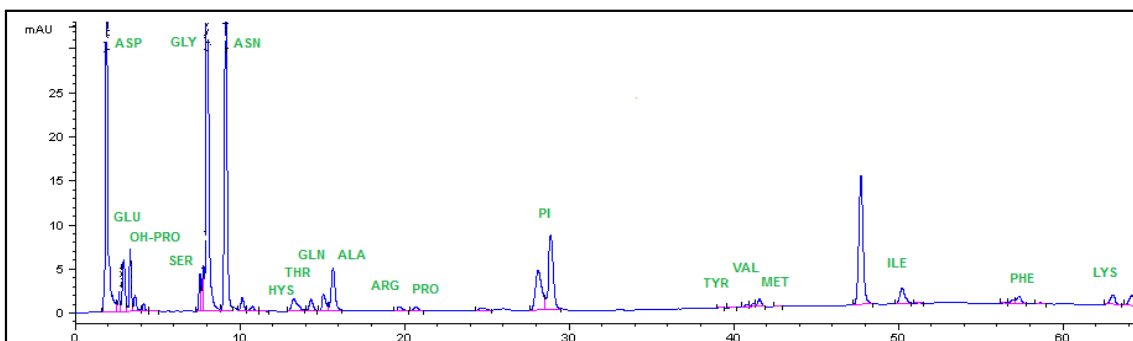


Figura 20. Cromatograma dels aminoàcids lliures separats per HPLC de la mostra d'arrel de posidònia (n=6)

La concentració d'aquestos es calcula a partir de l'equació expressada en l'apartat 3.2.2 de materials i mètodes, i es mostren en la taula següent:

Taula 9. Concentracions d'aminoàcids lliures en les mostres de posidònia. La concentració s'expressa en $\mu\text{mol/g PS}$.**C:** concentració **ES:** error estàndard

AMINOÀCID	CONCENTRACIÓ ($\mu\text{mol/g PS}$)					
	FULLA		RIZOMA		ARREL	
	C	ES	C	ES	C	ES
Àcid aspàrtic	1,775	0,108	1,330	0,140	4,277	0,516
Àcid glutàmic	0,101	0,008	0,130	0,008	0,113	0,026
Hidroxi prolina	0,090	0,009	0,067	0,003	0,084	0,013
Serina	0,054	0,010	0,067	0,006	0,091	0,001
Glicina	3,080	0,241	4,353	0,185	2,826	0,044
Asparagina	0,277	0,026	2,205	0,174	2,430	0,083
Histidina	0,039	0,003	0,092	0,009	0,109	0,010
Threonina	0,021	0,002	0,036	0,003	0,049	0,000
Glutamina	0,050	0,005	0,094	0,008	0,112	0,010
Alanina	0,661	0,171	0,307	0,057	0,519	0,012
Arginina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,007
Prolina	0,004	0,000	0,143	0,024	0,006	0,001
Tirosina	0,018	0,005	0,009	0,001	0,005	0,000
Valina	0,043	0,004	0,011	0,003	0,013	0,001
Methionina	0,023	0,009	0,050	0,004	0,054	0,008
Cistina	0,020	0,008	0,012	0,002	0,009	0,000
Isoleucina	0,072	0,022	0,068	0,011	9,256	0,001
Leucina	0,013	0,007	0,008	0,002	0,010	0,004
Phenilalanina	0,022	0,006	0,040	0,005	0,053	0,004
Lysina	0,008	0,002	0,009	0,001	0,039	0,003

Els aminoàcids més abundants en les fulles i el rizoma són l'Alanina, l'Asparagina, la Glicina i l'àcid Aspàrtic. D'aquestos el que presenta una major concentració és la Glicina. En les arrels, l'aminoàcid més abundant és la Isoleucina. La resta d'aminoàcids amb major concentració coincideixen amb fulles i rizoma.

La concentració total d'aminoàcids lliures en la planta de posidònia es mostra en la Figura 21.

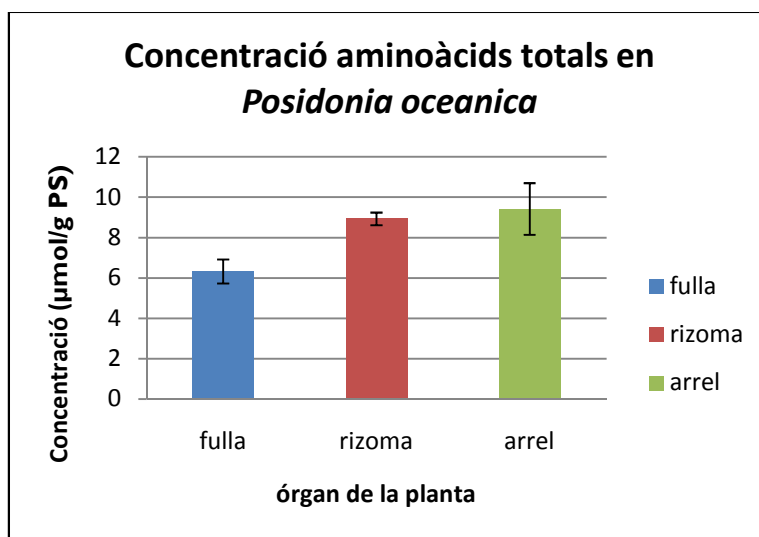


Figura 21. Concentració total d'aminoàcids lliures (µmol/g PS) en els diferents òrgans de posidònia. Es presenta el valor mitjà (n=6) amb l'error estàndard

En la Taula 10 es recullen els valors numerics de la Figura 21 i la seva significació estadística.

Taula 10. Concentració total d'aminoàcids lliures en plantes de posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Fulla	Rizoma	Arrel
Concentració aa (µmol/g PS)	6,3 ± 0,6 a	8,9 ± 0,3 b	9,4 ± 1,3 b

La concentració total d'aminoàcids lliures és major en els òrgans soterrats, rizoma i arrel, que en les fulles. El contingut en aquestos dos representa el 74% de la disponibilitat total d'aminoàcids lliures en la planta.

3. QUANTIFICACIÓ ENZIMÀTICA

3.1. SACAROSA SINTASA (Sucrose synthase SS; EC 2.4.1.13, direcció de síntesi de la sacarosa)

L'estudi de l'activitat enzimàtica de la sacarosa sintasa es va realitzar en les fulles, arrel i rizoma de les dos espècies.

A partir de l'equació de la línia de regressió de la corba patró (Figura 22) i de les absorbàncies obtingudes en l'anàlisi dels extractes vegetals, es calcula l'activitat de l'enzim sacarosa sintasa aplicant la fórmula indicada en la secció 3.3.2 de l'apartat de materials i mètodes.

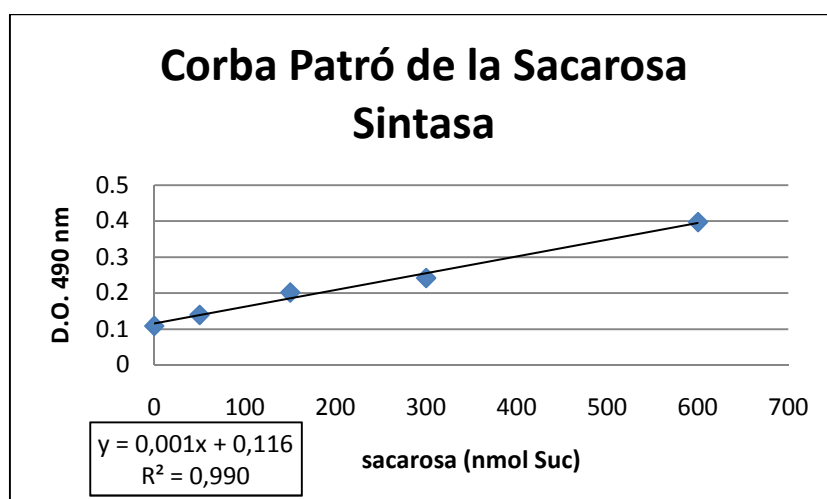


Figura 22. Corba patró entre 0 i 600 nmol de sacarosa a partir d'un estoc de 5 mM de sacarosa.

En la Figura 23, es representa l'activitat de la sacarosa sintasa en nmol de sacarosa per grams i per minut i en la Taula 11, es mostren els resultats de les diferències estadísticament significatives entre mitges després d'aplicar el test t-Student.

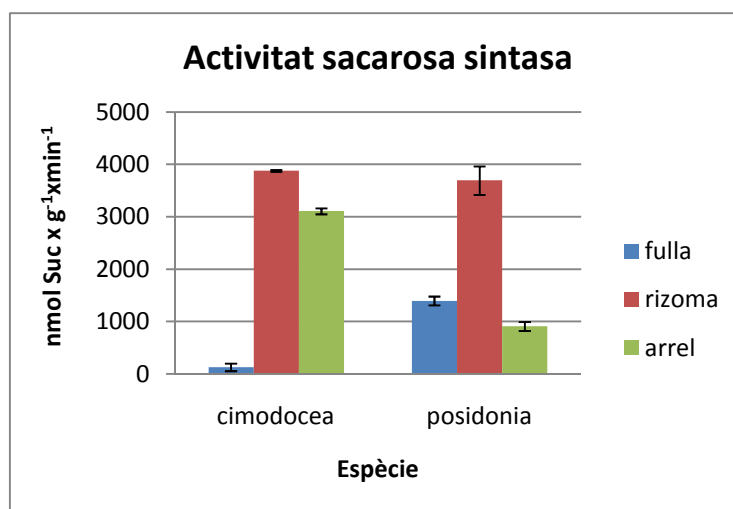


Figura 23. Activitat enzimàtica de la sacarosa sintasa ($\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà ($n=6$) amb el error estàndard (barra vertical)

Taula 11. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans de l'activitat enzimàtica en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Activitat Sacarosa Sintasa ($\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	180 ± 40 a	3881 ± 16 b	3108 ± 57 c
<i>Posidonia oceanica</i>	1395 ± 85 d	3695 ± 272 b	908,0 ± 86 e

La major activitat es localitza en el rizoma d'ambdós plantes.

En l'arrel de cimodocea, l'activitat és del mateix ordre que rizoma però un 20% més baixa, mentre que l'activitat sacarosa sintasa en les fulles representa sols el 2,5% de l'activitat detectada en la planta.

En posidònia, l'òrgan que presenta una menor activitat és l'arrel amb un 15% del total de l'activitat de la planta, li segueixen les fulles, amb un 23% de l'activitat total i, finalment, el rizoma amb un 62% de l'activitat. Comparant amb cimodocea, es destaca la major activitat enzimàtica en les fulles de posidònia, un 10% superior.

3.2. SACAROSA SINTASA (Sucrose synthase (SS; EC 2.4.1.13), direcció d'hidròlisi de sacarosa)

L'estudi de l'activitat sacarosa sintasa, en direcció d'hidròlisi, es va portar a terme en les fulles, rizomes i arrels de les plantes de les dues espècies de l'estudi.

El càlcul de l'activitat enzimàtica es va realitzar mitjançant l'aplicació de la fórmula descrita en l'apartat 3.2.2 de materials i mètodes. Els resultats es representen en la Figura 24 i en la Taula 12.

Taula 12. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans de l'activitat enzimàtica en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Activitat Sacarosa Sintasa hidròlisi ($\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	1396 ± 98 a	1051 ± 38 b	969 ± 70 c
<i>Posidonia oceanica</i>	1733 ± 9 d	1324 ± 46 e	1069 ± 164 f

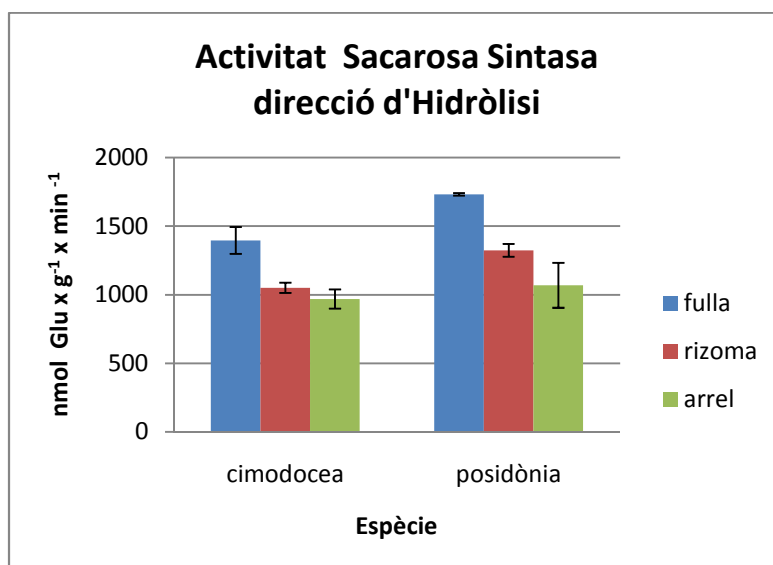


Figura 24. Activitat enzimàtica de la sacarosa sintasa en direcció d'hidròlisi ($\text{nmol Glu} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà ($n=3$) amb el error estàndard (barra vertical)

L'activitat enzimàtica a nivell de planta sencera és superior en posidònia i en les dos espècies s'obté una major activitat en les fulles que en els òrgans soterrats.

3.3. SACAROSA FOSFAT SINTASA (Sucrose phosphate synthase (SPS; EC 2.4.1.14), direcció de síntesi)

Mitjançant l'equació de la recta de regressió de la corba patró (Figura 25) i les absorbàncies obtingudes durant l'anàlisi, es calcula l'activitat de l'enzim sacarosa fosfat sintasa aplicant la fórmula expressada en l'apartat 3.2.2 de materials i mètodes.

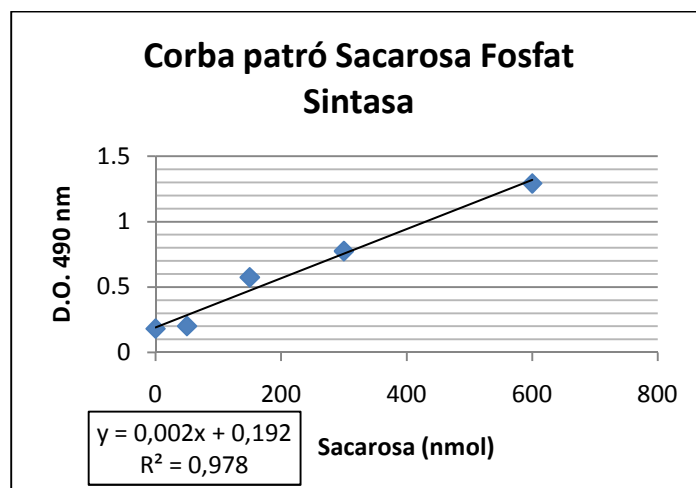


Figura 25. Corba patró entre 0 i 600 nmol de sacarosa a partir d'un estoc de 5 mM de sacarosa.

Els resultats es mostren en la figura 25 i en la Taula 13.

Taula 13. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans de l'activitat enzimàtica en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P \leq 0,05$

	Activitat Sacarosa Fosfat Sintasa ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	105 ± 7 a	5582 ± 469 b	2091 ± 135 c
<i>Posidonia oceanica</i>	142 ± 5 d	832 ± 29 e	526 ± 32 f

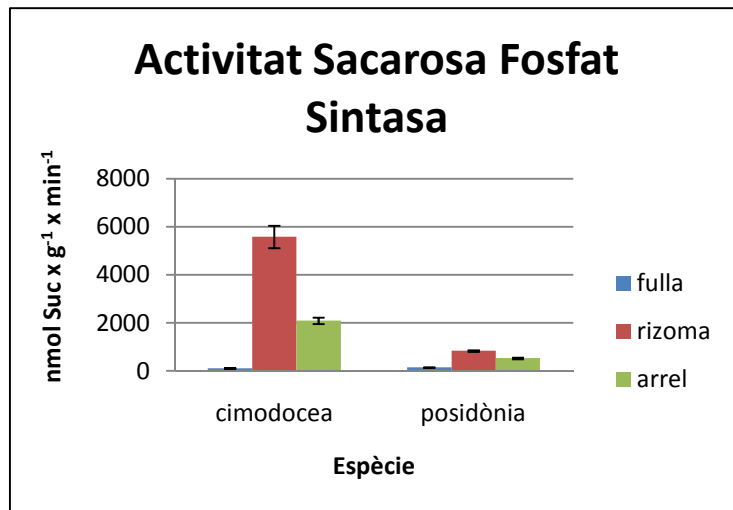


Figura 28. Activitat enzimàtica de la sacarosa fosfat sintasa ($\text{nmol Suc} \times \text{g}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà ($n=3$) amb el error estàndard (barra vertical)

De les dues espècies estudiades, cimodocea presenta globalment major activitat SPS, concentrant-se fonamentalment en el rizoma, 72% de l'activitat, i en l'arrel, 27%.

3.4. GLUTAMINA SINTETASA (Glutamine synthetase GS; EC 6.3.1.2)

L'activitat de la glutamina sintetasa es determina de la manera descrita en l'apartat 3.3.3 de materials i mètodes. En les Figures 26 i 27 es mostren les rectes de regressió que s'obtenen per a les fulles de les dues espècies estudiades, ja que són els teixits en els que es detecta l'activitat enzimàtica.

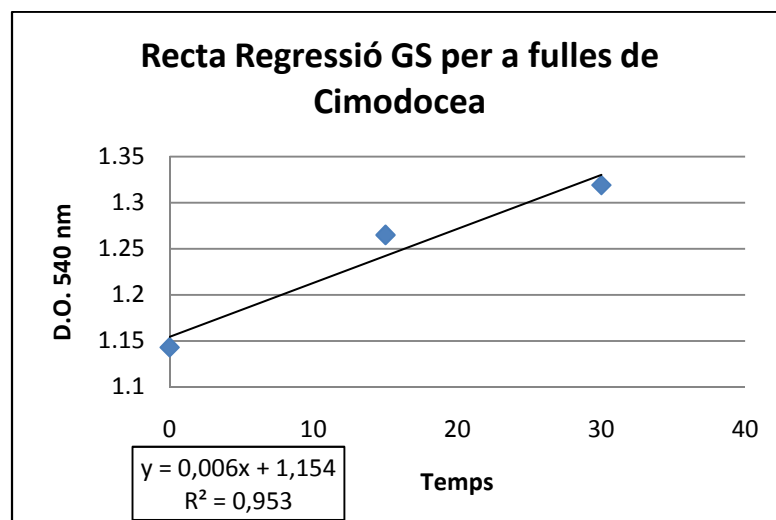


Figura 26. Recta de regressió per a fulles de cimodocea

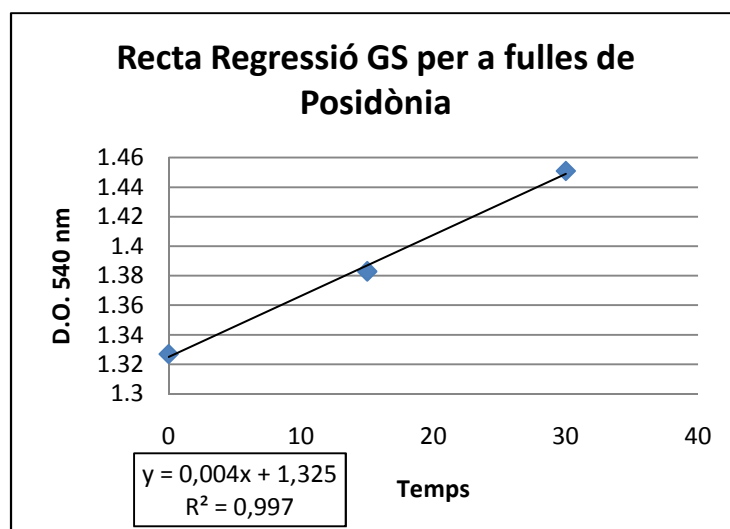


Figura 27. Recta de regressió per a fulles de posidònia

L'activitat calculada es presenta en la Taula 14.

Taula 14. Activitat enzimàtica de la glutamina sintetasa expressada en $\text{nmol} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{min}^{-1}$.

	Activitat Glutamina Sintetasa ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1} \text{PF} \times \text{min}^{-1}$)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	23,5	0,00	0,00
<i>Posidonia oceanica</i>	16,5	0,00	0,00

L'activitat glutamina sintetasa sols es detecta en fulles, i és cimodocea que presenta un activitat major.

4.2. GLUTAMAT SINTASA (Glutamate synthase GOGAT; EC, 1.4.1.14)

A partir de l'equació de la recta de regressió de la corba patró de NADH (Figura 28) i els valors d'absorbància obtinguts durant l'anàlisi de les mostres, es calcula l'activitat del Glutamat Sintasa mitjançant l'aplicació de la fórmula descrita en l'apartat 3.3.3 de materials i mètodes.

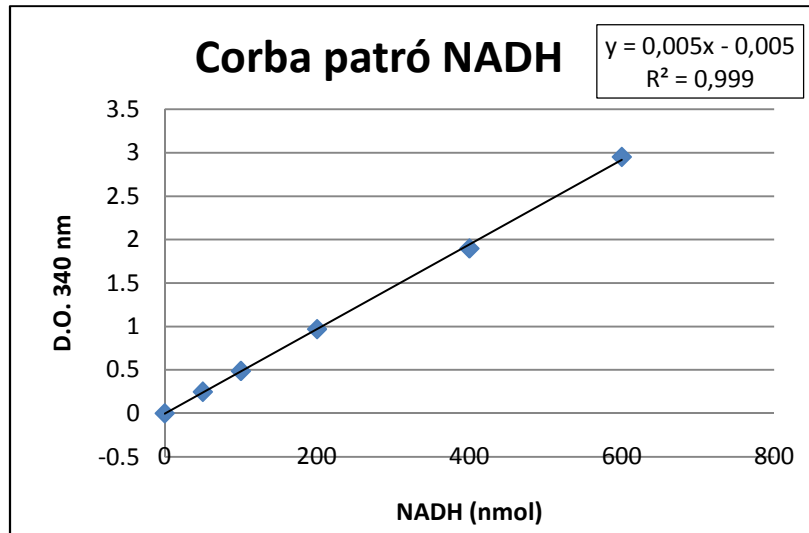


Figura 28. Corba patró de NADH entre 0 i 600 nmol a partir d'un estoc de 2 mM de NADH.

La Figura 29 i Taula 15 es mostra l'activitat enzimàtica del glutamat sintasa trobada en els teixits dels òrgans analitzats.

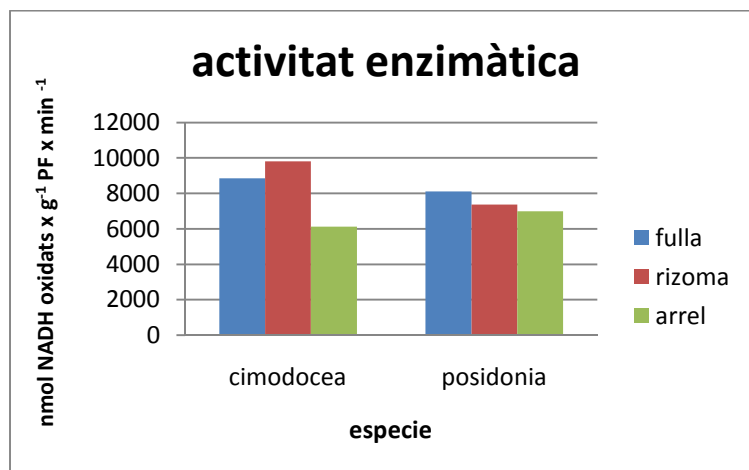


Figura 29. Activitat enzimàtica de la glutamat sintasa (nmol NADH oxidats x g⁻¹x min⁻¹) en les plantes de cimodocea i posidònia.

L'activitat glutamat sintasa en planta de cimodocea es superior a l'activitat en planta de posidònia.

En cimodocea l'òrgan amb major activitat és el rizoma mentre que en posidònia són les fulles. Així i tot, l'activitat glutamat sintasa en conjunt és major en els òrgans no fotosintètics que en les fulles, per a les dues espècies.

Taula 15. Activitat enzimàtica del Glutamat sintasa

Èspecies	Activitat enzimàtica (nmol NADH oxidats x g ⁻¹ x min ⁻¹)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	8846	9806	6132
<i>Posidonia oceanica</i>	8111	7376	6994

4. QUANTIFICACIÓ DELS PIGMENTS FOTOSINTÈTICS: CLOROFIL·LES I CAROTENOIDES

En la Figura 30 es presenten les concentracions dels diferents pigments fotosintètics analitzats. En la Taula 16, es mostren els resultats i les diferències estadísticament significatives entre les mitges després d'aplicar el test t-Student.

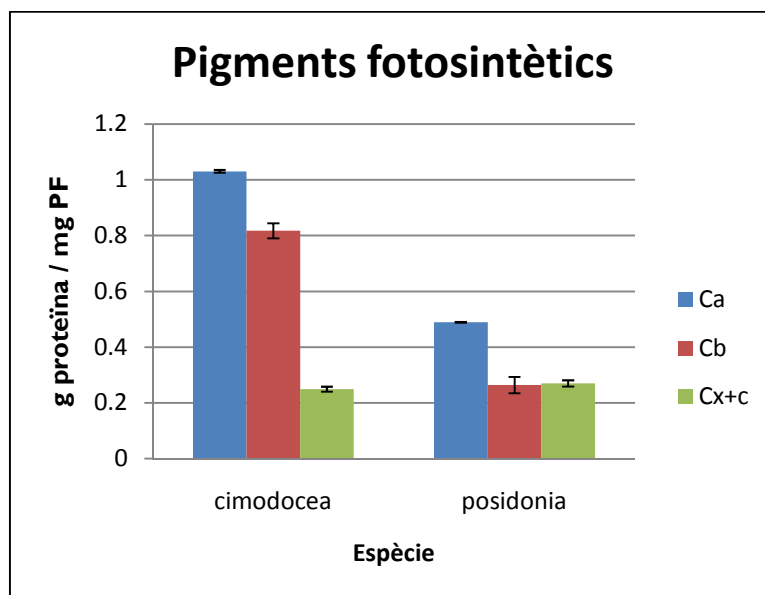


Figura 30. Concentració dels pigments fotosintètics en les plantes de cimodocea i posidònia. Es representa el valor mitjà (n=6) amb el error estàndard (barra vertical)

Podem observar que la concentració de clorofil·les és major en cimodocea que en posidònia, però en ambdós casos els valors de clorofil·les és major que el valors de carotenoides. El valor de la clorofil·la *a* és major que el de la clorofil·la *b* i el de

carotenoides. El contingut de clorofil·les en cimodocea és més del doble que els presents en posidònia, a causa de la gran concentració de clorofil·la a en la primera. Per contra, la concentració de carotenoides en posidònia és un poc superior a la present en les plantes de cimodocea.

Les diferències de concentracions en cimodocea són més accentuades que en posidònia, on encara que existeixen diferències entre les concentracions dels diferents pigments, aquestes no són molt grans.

Taula 16. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans dels pigments fotosintètics en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell $P < 0,05$.

	Pigments fotosintètics (μg proteïna/ mg PF)		
	C_a	C_b	C_{x+c}
<i>Cymodocea nodosa</i>	1,030 \pm 0,005 a	0,817 \pm 0,027 b	0,249 \pm 0,009 c
<i>Posidonia oceanica</i>	0,489 \pm 0,001d	0,264 \pm 0,029 e	0,270 \pm 0,011 f

5. QUANTIFICACIÓ DE METABÒLITS INORGÀNICS: IÓ Cl^- I IÓ Na^+

Per a estudiar els metabòlits inorgànics s'analitzaren per separat els diferents òrgans (fulla, rizoma i arrel) de les plantes de *Cymodocea nodosa* y *Posidonia oceanica*.

A continuació s'exposen els resultats obtinguts per a cada ió.

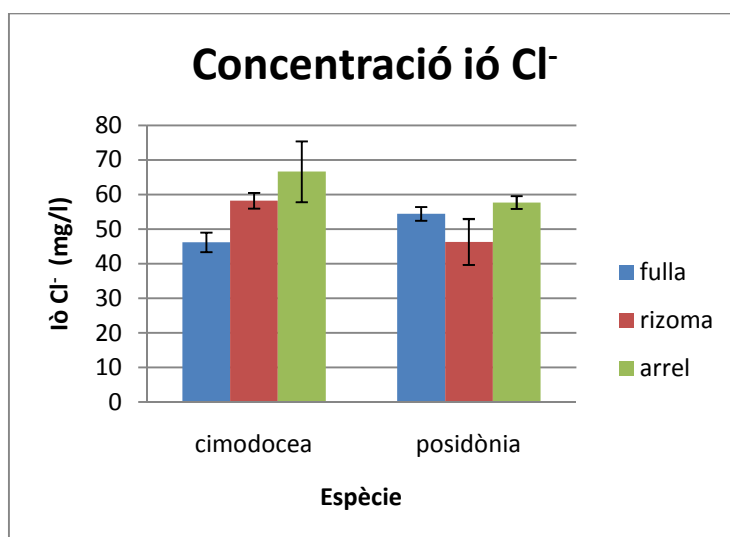
a. Ió Cl^-

A partir dels valors d'absorbància obtinguts durant l'anàlisi de les mostres i la recta de calibrat, es calcula la concentració de Cl^- . En la Figura 31 es mostren les concentracions del ió en les diferents mostres, i en la Taula 17, es recullen aquests valors numèricament.

La concentració de clor és major en les plantes de cimodocea. L'òrgan que presenta una major concentració és l'arrel, tant en plantes de cimodocea com en plantes de posidònia. L'òrgan que presenta menys quantitats de clor és diferent segon

la planta que tractem. En cimodocea, són les fulles les que presenten una menor quantitat, mentre que en posidònia, és el rizoma.

Si es passa a comparar els diferents òrgans d'una mateixa planta, en cimodocea, s'observa una concentració major en el òrgans subterranis.



Gràfica 31. Concentració del ió Cl⁻ en mg/l en els diferents òrgans de posidònia i cimodocea. Es representa el valor mitjà (n=2) amb el error estàndard (barra vertical)

Per que fa a la posidònia, els resultats no mostren ninguna relació en la fisonomia de la planta. En aquest cas, és el rizoma l'òrgan amb menor concentració de Cl⁻.

Taula 17. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans del ió Cl⁻ en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell P < 0,05.

	Concentració Cl ⁻ (mg/l)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	46,2 ± 2,8 a	58,2 ± 2,3 b	66,6 ± 8,8 b
<i>Posidonia oceanica</i>	54,4 ± 2,0 b	46,3 ± 6,6 ab	57,7 ± 1,8 b

b. Ió Na⁺

Mitjançant l'equació de regressió de la corba patró (Figura 32) i els valors d'absorbància obtinguts, es calcula la concentració del ió Na⁺.

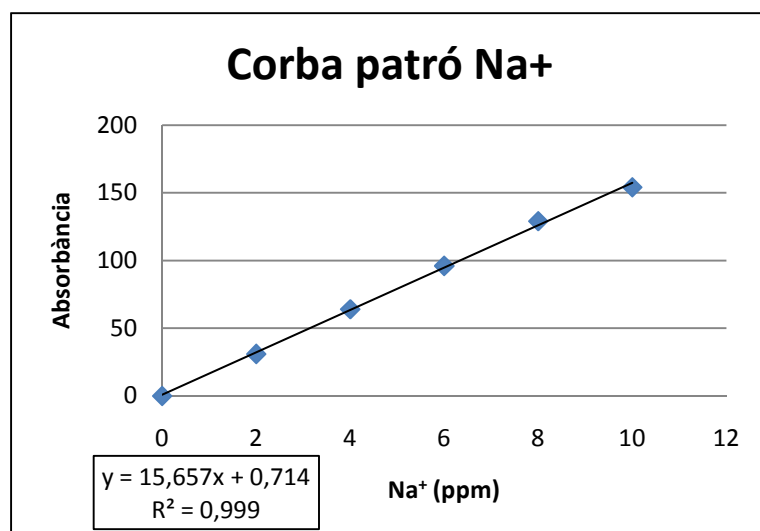


Figura 32. Corba patró de Na⁺ entre 0 i 10 ppm a partir d'un estoc de 1000 ppm de Na⁺

Els valors de concentració es presenten en la Taula 18, i en la figura 33:

Taula 18. Estudi estadístic comparatiu entre els valors mitjans del ió Na⁺ en plantes de cimodocea i posidònia. S'aplica el test t-Student. Lletres diferents indiquen diferències estadísticament significatives a nivell P < 0,05.

	Concentració Na ⁺ (mg/l)		
	Fulla	Rizoma	Arrel
<i>Cymodocea nodosa</i>	39,9 ± 5,9 a	28,7 ± 2,7b	37,7 ± 2,3 a
<i>Posidonia oceanica</i>	29,6 ± 0,4 b	8,0 ± 1,1 c	16,8 ± 2,2 d

S'observa una major acumulació del ió Na⁺ en les plantes de cimodocea. En ambdós espècies l'òrgan que registra una major concentració són les fulles, seguides per les arrels. L'òrgan amb una concentració més xicoteta és el rizoma.

En cimodocea, la concentració trobada en les fulles arriba quasi als 40 ppm. La diferència d'aquesta concentració amb la resta dels òrgans de cimodocea no és molt elevada, arribant a una diferenciació màxima de 10 ppm.

En posidònia la concentració màxima arriba als 30 ppm, 10 menys que en cimodocea. En aquets cas la diferència de concentració entre els diferents òrgans és rellevant. La diferència màxima, entre les fulles i el rizoma, arriba fins a 20 ppm.

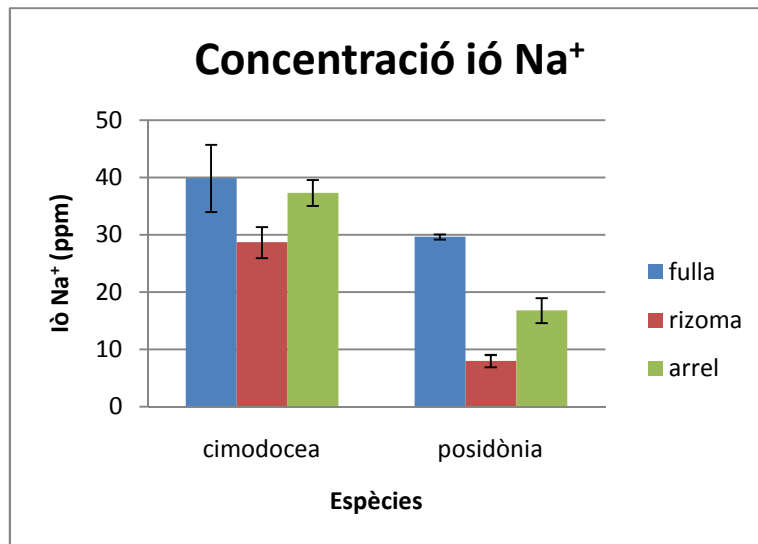


Figura 33. Concentració del ió Na⁺ en mg/l en els diferents òrgans de posidònia i cimodocea. Es representa el valor mitjà (n=2) amb el error estàndard (barra vertical)

IV. DISCUSSIÓ

Cymodocea oceanica és una espècie de fanerògama marina molt tolerant als canvis en el medi. En la majoria de les anàlisis realitzades en aquest treball, aquesta espècie presenta valors més elevats, el que explica aquesta major tolerància. L'espècie *Posidonia oceanica*, en canvi, com a espècie més sensible, es troba per sota dels valors de cimodocea en tots els casos, excepte en el cas de l'anàlisi del midó i dels carotenoides. Les diferències entre ambdues són més accentuades en les anàlisis de carbohidrats, del pigment fotosintètic clorofil·la i del ió inorgànic Na⁺.

La major concentració de carbohidrats i aminoàcids per part de cimodocea, permeten que aquesta pugui viure en ambients més salins que posidònia, ja que aquests poden actuar com a osmoprotectors (Touchette, 2007).

La major concentració de carbohidrats es localitza en el rizoma, i conseqüentment l'activitat dels enzims encarregats del metabolisme del carboni també és major en aquest òrgan. Això ens indica que el rizoma és un òrgan de reserva del carboni per a les fanerògames. Els carbohidrats, com la sacarosa, són catalitzats per SPS i SS. Per tant, i com també indiquen Touchette i Burkholder (2007), l'elevada concentració de sacarosa, indica també una elevada concentració de l'enzim Sacarosa Fosfat Sintasa i Sacarosa Sintasa. La Sacarosa Fosfat Sintasa normalment es troba localitzada en els teixits fotosintètics, però com expliquen Huber i Huber (1996), també es poden trobar en altres teixits no fotosintètics, com en el nostre cas, que en les fulles l'activitat és menor.

Touchette i Burkholder (2007) suggereixen que la sacarosa és metabolitzada per a donar l'esquelet carbonat i l'energia necessària per a la formació d'aminoàcids. En aquest estudi, els resultats obtinguts, no pareixen concordar del tot amb aquest fet. En posidònia, la concentració d'aminoàcids lliures en el rizoma es supera per la concentració en les arrels. En cimodocea, els aminoàcids lliures en fulles i en arrel superen a la concentració del rizoma.

Les mostres de posidònia i de cimodocea presenten valors similars de proteïna soluble total. De la mateixa manera, no existeixen grans diferències entre els diferents òrgans. Per tant les diferències d'activitats dels enzims del metabolisme del nitrogen estudiats no es deuen a la concentració de proteïnes solubles en la planta.

Mentre que l'activitat de la Glutamina Sintetasa és major en el rizoma, l'activitat del Glutamat Sintasa en la síntesi del glutamat a partir de L- Glutamina és major en les

fulles, on aquest enzim podria representar l'1% de la proteïna total de la fulla (Lea i Miflin, 2003).

El glutamat generat per l'enzim Glutamat Sintasa cedeix el seu grup α -amino i proporciona l'esquelet carbonatat per a la síntesi de l'àcid γ -aminobutíric, l'arginina i la prolina (Lea i Miflin, 2007). També transfereix el grup α -amino per a formar l'aspartat. Aquest aminoàcid és el precursor de l'asparagina i de la família de la Lisina, la Threonina, la Metionina i la Isoleucina. Per tant, el glutamat format per l'acció de l'enzim Glutamat Sintasa intervé en la formació de molts aminoàcids i és de suposar que en l'òrgan on l'activitat és major, la concentració d'aminoàcids també deu ser-ho.

En cimodocea la concentració d'aminoàcids en les fulles és la més elevada, i concordant amb això, l'activitat del Glutamat Sintasa en les fulles, és elevada. En Posidònia la major concentració d'aminoàcids es dona en les arrels, i en aquestes es registra un activitat que a pesar de no ser la màxima, és prou elevada.

La concentració del pigment fotosintètic clorofil·la és major en l'espècie cimodocea, on l'activitat de l'enzim Glutamat Sintasa és major, cosa que ens indica que la quantitat de glutamat serà més elevada, i per tant la formació de clorofil·la també, ja que el glutamat és el precursor de la síntesi de la clorofil·la.

Els valors aconseguits durant l'anàlisi del Na^+ per a cimodocea són més elevats que els que exposa Touchette (2007). Per a Posidònia, els nostres valors són inferiors. Aquests poden intervenir de manera negativa en el metabolisme.

La concentració de metabòlits inorgànics és major també en cimodocea, el que explica la major tolerància a la salinitat. Aquests ajuden a mantenir l'equilibri osmòtic.

Davant d'aquestes evidències, cal pensar que el vessament de les salmorres de les plantes dessaladores, afectaran més a les praderes de Posidònia que a les de cimodocea. Aquests vessament podrien tindre un impacte molt gran sobre Posidònia, arribant a causar la seua mort. Per això, al realitzar un projecte de dessaladora hi ha que tindre en conte el posicionament correcte de l'emissari mitjançant la realització d'un bon estudi de la zona d'abocament i l'avaluació dels possibles impactes que aquest podria causar sobre les praderes, i elegir aquella ubicació on l'impacte fora menor.

V. CONCLUSIONS

- L'espècie *Cymodocea nodosa* presenta major concentracions de carbohidrats, clorofil·les i metabòlits inorgànics, el que explica la seua major tolerància al medi.
- El rizoma, registra les majors concentracions de carbohidrats jugant un important paper de reserva de carboni i nitrogen.
- Les activitats enzimàtiques també són majors en el rizoma, el que indica la relació existent entre la concentració de carbohidrats i aquests.
- Els valors de proteïna total no influeixen en els resultats enzimàtics.
- Posidònia presenta un major valor de la concentració total d'aminoàcids. Aquesta concentració és major en l'arrel, el que indica que és un òrgan de reserva de nitrogen i carboni per a la planta.
- L'activitat del Glutamat Sintasa depèn de la concentració d'aminoàcids, donant majors concentracions en els òrgans no fotosintètics on la concentració és major.
- *Cimodocea* tolera més la salinitat, ja que presenta valors de metabòlits inorgànics superiors a *posidònia*.
- Els clorurs es troben en major proporció en arrels, mentre que el Na⁺ en les fulles.
- En *cimodocea* la concentració de clorofil·la i l'activitat de l'enzim precursor d'aquesta, el Glutamat Sintasa, són elevades.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ❖ **Ambrosio, L.; Segovia, E.** 2000. Las praderas de Posidonia: importancia y conservación. Propuesta de WWF/Adena. <http://www.wwf.es>.
- ❖ **Ambrosio, L.; Requena S.; Rodríguez, R.; Segovia E.** 2002. El litoral mediterráneo: importancia, diagnóstico y conservación. Propuesta de WWF/Adena. <http://www.wwf.es>.
- ❖ **Ballester, I.** 2009. Disseny i posta a punt per Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC) d'un mètode per a quantificar aminoàcids de resposta a l'estrès ambiental en plantes de la zona litoral de Dènia (Marina Alta, Alacant). Pojecte final de carrera. Universitat Politècnica de València.
- ❖ **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of salt protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- ❖ **Calvín, J.C.** 2011. *Cymodocea nodosa*. Región de Murcia Digital. <http://www.regmurcia.com>.
- ❖ **Dubois M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers; P.A.; Smith; F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- ❖ **Einav, R.; Harussi, K.; Perry, D.** 2002. The footprint of the desalination processes on the environment. *Desalination* 152: 141-154.
- ❖ **Fariñas, M.** 2001. Novedades introducidas en la desalación de agua de mar por Ósmosis Inversa. *Publicaciones Asociación Española de Desalación y Reutilización* 3, 13-16.
- ❖ **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.

- ❖ **Fernández-Torquemada, Y.; Sánchez-Lizaso, J.L.; González-Correa, J.M.** 2005. Preliminary results of the monitoring of the brine discharge produced by the SWRO desalination plant of Alicante (SE Spain). *Desalination* 182: 395-402.
- ❖ **Gacia, E.; Invers, O.; Manzanera, M.; Ballesteros, E.; Romero, J.** 2006. Impact of the brine from a desalination plant on a shallow seagrass (*Posidonia oceanica*) meadow. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 72: 579-590.
- ❖ **Garrat, L. C.; Linforth, R.; Taylor, A. J.; Lowe, KC.; Power, J.B.; Davey, M.R.** 2005. Metabolite fingerprint in transgenic lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 3: 165-174.
- ❖ **Hagen, S. R.; Augustin, J.; Grings, E.; Tassinari, P.** 1993. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of free amino acids in biological samples. *Food Chemistry* 46: 319-323.
- ❖ **Huber S. C.; Huber J. L.** 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Revision Plant Physiology Plant Molecular Biology* 47: 431-444.
- ❖ **Kraemer, G.P.; Kohrs, D.; Alberte, R.S.** 1998. Developmental changes of sucrose synthase activity and abundance in root and leaf tissues of *Zostera marina*. *Aquatic Botany* 62: 189-198.
- ❖ **Lea, P. J.; Miflin, B. J.** 2003. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 555-564.
- ❖ **Lichtenthaler, H. K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- ❖ **Marín-Guirao, L.; Sandoval-Gil, J.M.; Ruíz, J.M.; Sánchez-Lizaso, J.L.** 2010. Photosynthesis, growth and survival of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica* in response to simulated salinity increases

- in a laboratory mesocosm system. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92: 286-296.
- ❖ **Meerganz von Medeazza, G.L.** 2005. "Direct" and socially-induced environmental impacts of desalination. *Desalination* 185: 57-70.
 - ❖ **Memoria Voluntariado Litoral.** 2006. Red de control de las praderas de *Posidonia oceanica* en la Comunidad Valenciana. Institut, d'Ecologia Litoral.
 - ❖ **Morton, A.J.; Callister, I.K.; Wade, N.M.** 1996. Environmental impacts of seawater distillation and reverse osmosis processes. *Desalination* 108: 1-10.
 - ❖ **Pagès, J. F.; Pérez, M.; Romero, J.** 2010. Sensitivity of seagrass *Cymodocea nodosa* to hypersaline conditions: A microcosm approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 386: 34-38.
 - ❖ **Park, J.T.; Johnson, M.J.** 1949. A submicrodetermination of glucose. *Journal Biological Chemistry* 181: 149-151.
 - ❖ **Pregnall A. M.; Smith R. D.; Alberte R. S.** 1986. Glutamine synthetase activity and free amino acid pools of eelgrass (*Zostera marina* L.) roots. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 106: 211-228.
 - ❖ **Roberts, D. A.; Johnston, E. L.; Knott, N. A.** 2010. Impacts of desalination plant discharges on the marine environment: A critical review of published studies. *Water Research* 44: 5117-5128.
 - ❖ **Ruiz Fernández, J.M.; Ramos Segura, A.; García Muñoz R.; Sandoval Gil, J.M.** 2006. Informe anual de resultados del tercer año de seguimiento (2006) de la red de *Posidonia oceanica* de la Región de Murcia. Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Murcia, 108 pp. <http://www.carm.es/cagric/>.
 - ❖ **Ruiz Mateo, A.** 2007. Los vertidos al mar de las plantas desalinizadoras. Centro de Estudios de Puertos y Costas CEDEX,

- Ministerio de Fomento y Ministerio de Medio Ambiente. *Ambienta*: 51-57.
- ❖ **Sánchez-Lizaso, J.L.; Romero, J.; Ruiz, J.; Gacia, E.; Buceta, J.L.; Invers, O.; Fernández-Torquemada, Y.; Mas, J.; Ruiz-Mateo, A.; Manzanera, M.** 2008. Salinity tolerance of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*: recommendations to minimize the impact of brine discharges from desalination plants. *Desalination* 221: 602-607.
 - ❖ **Singh, R.P.; Srivastava, H.S.** 1986. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedling in response to nitrate and ammonium nitrogen. *Physiologia Plantarum* 66: 413-416.
 - ❖ **Srivastava, H.S.; Ormond, D.P.** 1984. Effects of nitrogen dioxide and nitrate nutrition on growth and nitrate assimilation in bean leaves. *Plant Physiology* 76: 418-423.
 - ❖ **Touchette, B. W.** 2007. Seagrass-salinity interactions: Physiological mechanisms used by submersed marine angiosperms for a life at sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 350: 194-215.
 - ❖ **Touchette, B.W.; Burkholder, J. M.** 2007. Carbon and nitrogen metabolism in the seagrass, *Zostera marina* L.: Environmental control of enzymes involved in carbon allocation and nitrogen assimilation. *Journal of Experimental, Marine Biology and Ecology* 350: 216-233.
 - ❖ **Valero, A.; Uche, J.; Serra L.** 2001. La desalación como alternativa al PHN. CIRCE y Universidad de Zaragoza. Presidencia del Gobierno de Aragón.
 - ❖ **Verma, A.K.; Upadhyay, S.K.; Verma, P.C.; Solomon, S.; Singh, S.B.** 2011. Functional analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SS) in sugarcane (*Saccharum*) cultivars. *Plant Biology* 13: 325-332.