



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Respuestas a la salinidad en varias especies halófitas adaptadas a diferentes hábitats

Alumno: Elena Núñez Cuerda

Julio, 2020



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales



Trabajo Fin de Grado

Respuestas a la salinidad en varias especies halófitas adaptadas a diferentes hábitats

Alumno: Elena Núñez Cuerda

Firma:

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Plantas halófitas y glicófitas.....	3
1.2. Germinación de halófitas.....	4
1.2.1. Estrategias de adaptación de halófitas a diversos hábitats.....	5
1.3. Luz y temperatura.....	7
1.4. Iones y osmolitos.....	7
1.5. Fotosíntesis y energía metabólica.....	9
1.6. Sistemas antioxidantes.....	10
1.7. Fitohormonas en la germinación de halófitas.....	11
1.8. Especies halófitas objeto de estudio.....	12
1.8.1. <i>Plantago albicans</i>	12
1.8.2. <i>Plantago lanceolata</i>	12
1.8.3. <i>Juncus acutus</i>	13
1.8.4. <i>Juncus effusus</i>	13
1.8.5. <i>Limonium cossonianum</i>	14
1.8.6. <i>Limonium algarvense</i>	15
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Obtención y conservación de las semillas.....	16
3.2. Experimentos de germinación.....	16
3.3. Cuantificación de osmolitos.....	18
3.4. Análisis estadístico.....	20

4. RESULTADOS.....	20
4.1. Respuesta a la salinidad de <i>Plantago albicans</i>	20
4.2. Respuesta a la salinidad de <i>Plantago lanceolata</i>	22
4.3. Respuesta a la salinidad de <i>Juncus acutus</i>	24
4.4. Respuesta a la salinidad de <i>Juncus effusus</i>	25
4.5. Respuesta a la salinidad de <i>Limonium cossonianum</i>	27
4.6. Respuesta a la salinidad de <i>Limonium algarvense</i>	28
5. DISCUSIÓN.....	29
5.1. Estudio comparativo entre las dos especies de <i>Plantago</i>	30
5.2. Estudio comparativo entre las dos especies de <i>Juncus</i>	32
5.3. Estudio comparativo entre las dos especies de <i>Limonium</i>	34
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	38

RESUMEN

Las plantas halófitas poseen diversos mecanismos de adaptación que les permiten habitar multitud de ambientes, a pesar de un elevado nivel de salinidad y aridez en el medio donde crezcan, de manera que estas plantas desarrollan diferentes estrategias para tolerar mejor el estrés. Este estudio muestra las respuestas a la salinidad durante la etapa germinativa (la etapa más sensible al estrés salino) de varias especies de halófitas recogidas de diferentes hábitats. Las especies seleccionadas son dos especies del género *Plantago* (*P. albicans* y *P. lanceolata*), dos especies del género *Juncus* (*J. acutus* y *J. effusus*) y dos especies del género *Limonium* (*L. cossonianum* y *L. algarvense*), expuestas a diferentes concentraciones salinas (0, 100, 200 y 300 mM NaCl), llevando a cabo un estudio comparativo entre especies del mismo taxón, sobre la germinación, velocidad de germinación, y contenido de prolina y glicina betaína (osmolitos implicados en la adaptación al estrés). El estudio de estos mecanismos fisiológicos aporta información que permite comprobar las especies que presentan mayor capacidad germinativa, mayor producción de osmolitos y por tanto mayor tolerancia al estrés, y así poder investigar su utilización como alternativa a los cultivos tradicionales en sustratos salinos, sus aplicaciones medicinales, su capacidad fitorremediadora y la posible transferencia génica a cultivos sensibles.

Palabras clave: estrés salino, germinación, índice de Timson, osmolitos, *Plantago*, *Juncus*, *Limonium*

ABSTRACT

Halophyte plants have various adaptation mechanisms that allow them to inhabit many environments, despite a high level of salinity and aridity in the environment where they grow, so that these plants develop different strategies to better tolerate stress. This study shows the responses to salinity during the germination stage (the stage most sensitive to salt stress) of various species of halophytes collected from different habitats. The selected species are two species of the genus *Plantago* (*P. albicans* and *P. lanceolata*), two species of the genus *Juncus* (*J. acutus* and *J. effusus*) and two species of the genus *Limonium* (*L. cossonianum* and *L. algarvense*), exposed at different saline concentrations (0, 100, 200 and 300 mM NaCl), carrying out a comparative study between species of the same taxon, on germination, germination speed, and content of proline and glycine betaine (osmolytes involved in adaptation to the stress). The study of these physiological mechanisms provides information that allows verifying the species that have greater germination capacity, greater production of osmolytes and therefore greater tolerance to stress, and thus be able to investigate their use as an alternative to traditional crops in saline substrates, their medicinal applications, its phytoremediation capacity and possible gene transfer to sensitive crops.

Key words: saline stress, germination, Timson's index, osmolytes, *Plantago*, *Juncus*, *Limonium*

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles, es decir incapaces de moverse para buscar el medio ambiente más adecuado para su crecimiento, por tanto han desarrollado una serie de respuestas para adaptarse a vivir en diferentes condiciones adversas. El estrés medioambiental y el biótico han ejercido una gran presión, a lo largo de millones de años de evolución sobre las plantas, lo que ha permitido a éstas desarrollar unas estrategias a nivel genético, bioquímico, fisiológico, anatómico y morfológico que les permiten en mayor o menor medida evitar o tolerar el estrés (Tadeo y Gómez-Cadenas, 2008). Hoy en día los estreses que más afectan a la agricultura son el estrés hídrico y el salino, ya que producen la mayoría de pérdidas de cultivos agrícolas en todo el mundo. La salinidad y la sequía ejercen varios efectos negativos sobre la germinación, el crecimiento y desarrollo, incluyendo déficit hídrico, reducción en la actividad fotosintética, desequilibrio nutricional, toxicidad iónica, daños en las membranas y alteraciones metabólicas debido a la acumulación de los EROS (especies reactivas de oxígeno) (Gupta y Huang, 2014). Por tanto, estudiar plantas que presentan resistencia a estos estreses, y conocer sus mecanismos de tolerancia, así como sus aplicaciones prácticas puede servir para seleccionar aquellas especies útiles como alternativa a los cultivos tradicionales, con fines agrícolas, farmacéuticos, o industriales, y su genoma puede servir como base para la transferencia genética de aquellos genes que permiten la tolerancia al estrés en plantas sensibles (Gollmack et al., 2014; Panta et al., 2014; Zhou et al., 2015).

1.1. Plantas Halófitas y Glicófitas

Las plantas pueden dividirse en glicófitas y halófitas según su sensibilidad a la sal. Las glicófitas (la mayoría de cultivos agrícolas) son afectadas en su crecimiento, por bajas concentraciones de sal (≤ 100 mM NaCl), sin embargo, las halófitas muestran tolerancia incluso a elevados niveles de sal (1000 mM NaCl) (Flowers y Colmer, 2008). Dependiendo de su demanda de sal, pueden dividirse en halófitas obligadas y facultativas. Las obligadas necesitan sal para crecer y desarrollarse, mientras que las facultativas pueden crecer en ambientes moderadamente salinos y no salinos. Por otro lado, las halófitas han colonizado todo tipo de medios ambientes, así podemos distinguir las hidrohalófitas (manglares y especies de marismas salinas

costeras y del interior), las xerohalófitas que viven en suelos salinos secos, aunque con temporadas de precipitaciones (zonas tropicales y templadas), y las psamófitas (viven en zonas áridas como los desiertos), y por último tenemos a las plantas extremófilas que son aquellas que pueden germinar y reproducirse bajo condiciones extremas de alta salinidad en el medio en el que crecen (≥ 500 mM NaCl) (Gul et al., 2012; Yuan et al., 2019). Numerosos estudios se han llevado a cabo comparando los mecanismos de tolerancia de las halófitas respecto a las glicófitas, pero también puede ser interesante comparar halófitas del mismo taxón con diferencias en la tolerancia a la sal, recogidas en diferentes zonas y por tanto con condiciones ambientales diversas para así profundizar en las estrategias utilizadas por estas plantas frente al estrés hídrico y salino.

Kumari et al. (2015) han revisado una serie de publicaciones que se centran en la proteómica, metabolómica e ionómica de las plantas halófitas, las cuales conducen a la conclusión principal de que estas plantas presentan mecanismos bioquímicos de tolerancia más eficientes que las plantas sensibles. Por ejemplo, regulan y acumulan algunas de las proteínas implicadas en la protección y estabilización de la maquinaria fotosintética, también presentan mayor eficiencia a la hora de conservar bajos niveles de Na^+ en el citoplasma ya que la mayoría de estos iones son transportados a la vacuola, y presentan una mayor eficiencia en el uso del agua. Otro aspecto es la gran eficiencia de las halófitas para eliminar los EROS, debido a su alta capacidad antioxidante, de manera que pueden proteger el aparato fotosintético y las membranas biológicas (Ozgur et al., 2013; Pilarska et al., 2016).

1.2. Germinación de halófitas

La germinación es una etapa crítica en el ciclo de vida de las plantas, y la sequía y la salinidad del suelo puede prevenir o inhibir el desarrollo de las semillas, debido al efecto osmótico y a la toxicidad iónica que producen estos tipos de estreses. Estrategias como la producción de un banco de semillas, la regulación de la dormancia y la producción de semillas heteromórficas en algunas especies, son métodos eficaces para asegurar la supervivencia de la siguiente generación (Gul et al., 2012; Liu et al., 2018).

La germinación se define como la serie de procesos morfogénicos, metabólicos y fisiológicos que conducen a la obtención de una planta viable. Esta etapa junto

con la floración son las más sensibles a los estreses abióticos (Flowers y Colmer, 2008), por tanto, conocer la tolerancia de diferentes halófitas, primero en la etapa germinativa y luego en el crecimiento y desarrollo, puede ayudarnos a seleccionar aquellas especies más productivas para diferentes fines como agricultura biosalina, fitorremediación, restauración ecológica y rehabilitación de zonas degradadas u otras áreas contaminadas, así como profundizar en sus estrategias de tolerancia al estrés.

Frente a una situación estresante, las plantas halófitas pueden optar por llevar a cabo mecanismos de tolerancia o de evitación del estrés. En el caso de la tolerancia, las semillas muestran una elevada tasa de germinación, incluso a elevadas concentraciones salinas, sin embargo, la planta que presenta mecanismos de evitación, más bien lleva a cabo un mecanismo de recuperación, que consiste en germinar una vez haya pasado la situación de estrés en la semilla (Zhang et al., 2015).

1.2.1. Estrategias de adaptación de halófitas a diversos hábitats

El heteromorfismo que presentan ciertas semillas de halófitas consiste en la capacidad de la planta de producir semillas de diferente morfología (forma, peso, tamaño, cubierta protectora, etc.) con el fin de que éstas puedan sobrevivir en medios extremos y cambiantes. Así, las semillas de mayor tamaño presentan una tasa de germinación mayor que las semillas pequeñas bajo condiciones salinas (Wang et al., 2018). Una de las especies dimórficas estudiadas con más detalle es *Suaeda salsa*, esta halófito presenta semillas de color marrón y semillas de color negro, junto con otras características que le permiten germinar en la época más adecuada para hacer frente a diferentes condiciones salinas en su hábitat (Song y Wang, 2015). Así mismo, las semillas marrones de algunas halófitas muestran una mayor concentración de fitohormonas como el ABA (ácido abscísico), lo que permite la acumulación de proteínas de almacenamiento, y un aumento de tamaño del embrión y del peso de la semilla (Wang et al., 2015). Xu et al. (2017) han demostrado que las semillas marrones de algunas especies acumulan más cantidad de iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{+2}) que las semillas negras, lo que favorece la imbibición y conduce a una mayor actividad de transportadores que controlan la homeostasis iónica, consiguiendo mejorar la germinación frente al

estrés salino. Además, las semillas marrones muestran mayor acumulación de osmolitos orgánicos (como la betaina), los cuales intervienen en procesos de ajuste osmótico, protección de membrana, desintoxicación de EROS y señalización. Otros estudios de esta misma especie han descubierto una mayor acumulación de ceras en la capa que envuelve a las semillas negras que en la envoltura de las semillas marrones, de manera que esta capa es característica de semillas latentes (sensibles), más que de semillas no latentes (tolerantes), en donde la capa es más fina y por tanto más permeable (Song et al., 2017).

Otra estrategia de halófitas es la formación de un banco de semillas, que tiene como objetivo principal garantizar la perpetuación de las poblaciones. Al revisar los resultados de los experimentos de Cao et al. (2012) con la halófito *Suaeda corniculata* subsp. *mongólica*, (original de China) se observó que las semillas negras sufrían un ciclo anual de latencia y no germinaban hasta que las lluvias de verano posibilitaban que la salinidad disminuyera y provocara la emergencia de las semillas hacia la superficie, mientras que las semillas marrones se mantuvieron sin latencia e iniciaron una germinación, menos estricta, en un rango más amplio de temperatura y salinidad, con una germinación más temprana, lo que las dota de una importante ventaja selectiva en el medio ambiente en el que viven.

La latencia de las semillas es otro mecanismo adaptativo de las halófitas frente al estrés salino. Algunas fitohormonas como ABA y GA (ácido giberélico) intervienen en este proceso, la primera inhibiendo y la segunda estimulando la germinación. La planta puede mostrar una latencia variable dependiendo del contenido endógeno de estas hormonas y de la sensibilidad que muestren las semillas. Generalmente el ciclo de latencia se compagina con las condiciones ambientales, rompiéndose cuando las condiciones son lo más favorables posibles para la semilla y permitiendo la germinación (Li et al., 2016).

Las halófitas, después de un shock salino (es decir, cuando las condiciones estresantes de salinidad se ven disminuidas), se recuperan, permitiendo una buena germinación en condiciones sin sal. Por ejemplo, las investigaciones realizadas con la halófito anual *Cakile marítima*, muestran que bajo condiciones de estrés salino, evita la germinación, pero cuando llega un periodo favorable en el que la lluvia estimula el aumento del potencial hídrico externo (fase de recuperación), la halófito

pone en marcha una germinación rápida con el sucesivo establecimiento de plántulas, lo que supone una importante ventaja ecológica (Debez et al., 2018).

1.3. Luz y temperatura

Algunos factores ambientales que afectan al proceso de germinación de semillas son la luz y la temperatura, que al combinarse con la salinidad, provocan distintas respuestas de adaptación en estas plantas. Generalmente las halófitas están habituadas a germinar mayoritariamente en condiciones de luz, a diferencia de la mayoría de cultivos agrícolas, que germinan en oscuridad como consecuencia de la domesticación que el agricultor ha sometido a las semillas durante las prácticas agrícolas (Gupta y Huang, 2014). Gran parte de los halófitos poseen estructuras adaptativas para sobrevivir en zonas áridas donde la temperatura es muy elevada, y germinan durante periodos lluviosos, cuando aumenta la humedad y disminuye la temperatura (cuando se alcanzan los 25°C aproximadamente). Un ejemplo de semillas dimórficas se encuentra en la especie *Atriplex rosea*, cuyas semillas negras muestran más sensibilidad a la temperatura que las marrones, de manera que las bajas temperaturas (5/15°C) perjudican la germinación de semillas negras independientemente de si están sometidas o no a una situación de estrés (Khan et al., 2004). Otras halófitas muestran adaptaciones interesantes que pueden ser aprovechadas a nivel práctico, como el caso de *Salsola imbricata*, cuyas semillas tienen la capacidad de germinar en años más secos de lo normal, cuando las precipitaciones en el periodo de crecimiento son tempranas, de forma que su empleo en la regeneración de dunas degradadas del desierto resulta bastante viable (Elnaggar et al., 2018).

1.4. Iones y osmolitos

La ionómica es el conjunto de compuestos inorgánicos que aparecen en el estudio de un grupo de plantas, como son los nutrientes minerales y los oligoelementos. Hay que tener en cuenta que ante determinadas situaciones (diferentes etapas del desarrollo, modificaciones genéticas, tolerancia a determinados tipos de estrés...) los constituyentes inorgánicos variarán en las diferentes partes de la planta (Kumari et al., 2015). Por lo tanto, durante un periodo de estrés salino o de sequía, la absorción y distribución de iones minerales cambiarán, con el fin de conseguir la

adaptación a sustratos salinos y secos y suavizar los efectos adversos que este ambiente pueda causar en la planta (Kumari et al., 2015).

Para que la célula vegetal presente un funcionamiento normal y eficiente, se debe de mantener una elevada relación K^+/Na^+ . Para evitar la toxicidad del Na^+ acumulado en el citosol como consecuencia del estrés salino, las halófitas recurren principalmente a la exclusión y compartimentación intracelular, además de potenciar los sistemas antiporte H^+/Na^+ de las membranas y la recirculación de Na^+ fuera del brote (Shi et al., 2003). Se ha estudiado con detalle la tolerancia a la sal de las halófitas *Atriplex lentiformis* y *Chenopodium quinoa* a elevadas concentraciones de NaCl, observándose que las células radiculares rápidamente activan el mecanismo de la H^+ -ATPasa con el fin de recuperar los valores originales del potencial de membrana y así expulsar Na^+ del citosol a través de un gradiente electroquímico de H^+ (Bose et al., 2014b). En estas mismas condiciones, la extremófila *Mesembryanthemum crystallinum* regula la expresión de determinados transportadores de K^+ , logrando estabilizar la concentración de este ión en el citosol (Su et al., 2003). El aumento de Na^+ en el citosol también provoca que la absorción de Ca^{++} y Mg^{++} se vea mermada, incluso descienda la asimilación del carbono en algunas halófitas. El Ca^{++} actúa como señalizador de la situación de estrés salino, pues al iniciarse el periodo estresante se eleva temporalmente su concentración en el espacio extracelular, por ello es importante mantener un adecuado equilibrio de iones en la célula (Zehra et al., 2012).

Previo a la germinación, la acumulación de osmolitos o solutos compatibles en semillas crecidas bajo salinidad disminuye el potencial hídrico, facilitando la imbibición (es decir la toma de agua desde el suelo a la semilla) y posibilitando una rápida germinación (Gupta y Huang, 2014). Los osmolitos son compuestos orgánicos de diversa estructura química que no interfieren en el metabolismo celular, incluso a elevadas concentraciones y que se encargan principalmente de proteger la estructura celular y mantener el equilibrio osmótico, entre estos osmolitos se encuentran los azúcares libres (manitol y pinitol), la prolina (Pro), la glicina-betaina (GB), colina-O-sulfato, etc. (Gupta y Huang, 2014). Ante condiciones de salinidad, las halófitas tienden a disminuir la concentración de algunos aminoácidos libres como cisteína, arginina y metionina, mientras que aumentan la concentración de otros como la prolina. La Pro es un soluto compatible que

incrementa frente a condiciones de estrés en halófitas, interviniendo en múltiples funciones antioxidantes tales como protector de las membranas biológicas, secuestrador de los EROS y estabilizador del fotosistema II, también reduce la peroxidación lipídica, contribuye a la estabilización de las estructuras subcelulares y puede inducir la expresión de genes de defensa antioxidante (Kaur y Asthir, 2015). La GB es otro importante osmolito que se acumula en halófitas durante las condiciones estresantes, este osmolito posee una estructura única que le permite reaccionar tanto con dominios macromoleculares hidrofóbicos como hidrofílicos, entre los que pueden encontrarse algunos tipos de enzimas y complejos proteicos (Gupta y Huang, 2014). Participa en funciones tales como: mitigación del estrés mediante el aumento de la osmolaridad, protección celular frente al daño oxidativo mediante la reducción de EROS, y además, adquiere un importante papel en la protección del aparato fotosintético frente a daños provocados en el periodo de estrés (Gupta y Huang, 2014). Se ha demostrado que la aplicación de este osmolito como aerosol foliar conduce a estabilizar el crecimiento y la fotosíntesis (Ahmad et al., 2013). La acumulación de azúcares es otro mecanismo protector de las halófitas en situaciones de estrés salino, estos azúcares sirven para erradicar los EROS y para el almacenamiento de carbono (Gupta y Huang, 2014). Los polioles son otro tipo de osmolitos capaces de intervenir en diferentes reacciones orgánicas gracias a que aportan una gran cantidad de grupos hidroxilos funcionales. Los alcoholes de azúcar son un tipo importante de polioles, y pueden clasificarse en cíclicos (pinitol) y acíclicos (manitol). Este tipo de osmolitos actúan como chaperonas de bajo peso molecular, expulsan EROS y además intervienen en la protección y estabilización de enzimas y estructuras de membrana sensibles a la deshidratación y al daño iónico (Gupta y Huang, 2014).

1.5. Fotosíntesis y energía metabólica

Los suelos salinos tienen la capacidad de influir negativamente sobre las plantas, afectando al proceso de fotosíntesis, mediante la disminución de CO₂ intracelular que se provoca debido al cierre de los estomas (Redondo-Gómez et al., 2007). Ante esta situación las plantas halófitas pondrán en marcha una serie de mecanismos, como la regulación diferencial de distintas proteínas de los fotosistemas y del ciclo de Calvin. Entre las proteínas del fotosistema II destaca la proteína OEE (oxygen-evolving enhancer protein), que interviene en la oxidación del H₂O en este

fotosistema y que se disocia fácilmente bajo condiciones salinas estresantes (Kumari et al., 2015). Otras proteínas importantes del fotosistema son las que intervienen en la captación de luz del PSI, como la CAB 2 (Chlorophyll a-b binding protein 2), además de las proteínas de la luz del tilacoide, como *TL18* y *TL19*, ambos tipos de proteínas han sufrido disminución de su expresión génica en condiciones de estrés salino, lo cual es indicativo de la capacidad de este tipo de estrés para reducir la fotosíntesis (Zhang et al., 2012). Por otro lado, la proteína Rubisco se encarga de fijar el CO₂ en el ciclo de Calvin, por lo tanto, su presencia en las hojas es proporcional a la tasa fotosintética, cuyas variaciones a su vez quedarán reflejadas en la cantidad de Rubisco (Kumari et al., 2015). Un incremento en la cantidad de subunidades grande y pequeña de la Rubisco permite sintetizar más compuestos azucarados, volviéndose más eficiente en la tolerancia a la sal (Kumari et al., 2015). Las condiciones estresantes que impone el ambiente salino también afectan a la transferencia de electrones y los gradientes electroquímicos de membrana, interfiriendo en la síntesis de ATP y NADPH, por ello la planta responde mediante la regulación de su metabolismo energético (Kumari et al., 2015). Las halófitas pueden aumentar la síntesis de ATP en condiciones estresantes para invertirlo en mecanismos defensivos como la síntesis de solutos compatibles (Zhang et al., 2013). En el análisis proteómico que llevaron a cabo Wang et al. (2008) sobre la halófito *Physcomitrella patens* se observó un incremento de la síntesis de ATP y de la actividad ATP-asa ante un incremento de salinidad. Por tanto, ante condiciones de estrés salino, la planta incrementa la eficiencia de su metabolismo energético, llevando a cabo una regulación específica de los metabolitos implicados en la biosíntesis de ATP, aumentando la producción de energía para poder sobrevivir a situaciones estresantes (Kumari et al., 2015).

1.6. Sistemas antioxidantes

Los EROS afectan a la fisiología de la planta de forma negativa al causar graves daños oxidativos a las principales moléculas que intervienen en el metabolismo (ADN, proteínas, pigmentos y membranas) (Yu et al., 2011). Sin embargo, estas moléculas, tienen un papel beneficioso, en el sentido de que advierten a la planta para que ponga en marcha el mecanismo de componentes antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) necesario para adaptarse a las elevadas concentraciones de sal (Abogadallah, 2010). Uno de los componentes antioxidantes

más importantes es el enzima SOD (superóxido-dismutasa), que en situaciones de estrés convierte el anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 . Otro enzima valioso en la lucha contra el daño oxidativo, en este caso fotosintético, es la Ferredoxina-NADP reductasa (FNR). Algunos compuestos no enzimáticos que también intervienen en este campo son solutos compatibles como la Pro, la GB, las poliaminas, o los polioles, todos con la habilidad de destruir los radicales hidroxilos (HO^\cdot), los más lesivos para la planta por su capacidad de producir peroxidación lipídica (Bose et al., 2014a).

1.7. Fitohormonas en la germinación de halófitas

Las fitohormonas son mensajeros químicos que aparecen a concentraciones enormemente bajas. La elevada concentración de sal influye en la regulación de la síntesis de estas fitohormonas. Por ejemplo, el ABA es sintetizado cuando aparecen condiciones de estrés hídrico, de manera que ante la escasez de agua aumenta su concentración, lo que induce al cierre de estomas para disminuir la transpiración y conservar el contenido de agua en los tejidos (Kumari et al., 2015). También se ha demostrado que un aumento en la síntesis de ácido jasmónico (JA) en *Arabidopsis thaliana* frente a elevadas concentraciones de sal, eleva la expresión de un gen involucrado en la síntesis de ácido giberélico (GAs), el gen *DWARF3* (Kumari et al., 2015). Otra fitohormona relacionada con el estrés es el etileno, que puede llevar a cabo una regulación positiva o negativa dependiendo de la especie halófitas considerada (Bueno et al., 2015). Kazan et al. (2015) observaron, en *Arabidopsis*, un aumento en los niveles de ACC (1-ácido aminociclopropano-1-carboxílico), un precursor del etileno, que llevó a la reducción de la tolerancia, sin embargo, en la variedad mutante *Arabidopsis sst1* (*soil salinity tolerant 1*), el aumento de los niveles de etileno se tradujo en un aumento de la tolerancia al regular los niveles de Na^+/K^+ . Así, se puede decir que la regulación de la tolerancia por parte de las fitohormonas es un mecanismo complejo en el que se cruzan e interaccionan multitud de vías de regulación de distintos reguladores del crecimiento.

1.8. Especies halófitas objeto de estudio

1.8.1. *Plantago albicans*

Plantago albicans (Fam. Plantaginaceae) es una herbácea perenne con ramas cortas terminadas en hojas dispuestas en roseta, corola con tubo glabro y cápsula con dos semillas. Se distribuye por el sudoeste de Asia hasta Irán, así como por toda la región mediterránea, estableciéndose sobre suelos salinos de ambientes áridos y semiáridos, por lo que generalmente la planta se encuentra expuesta a condiciones de estrés hídrico y salino (Veiga-Barbosa y Pérez-García, 2014). Sus semillas están dotadas de una cubierta mucilaginosa característica que permite la absorción de agua, además de incrementar la superficie de contacto entre semilla y suelo, por lo que es una estructura importante para la germinación (Western, 2012). La capacidad de germinación de esta especie depende en gran medida de su distribución biogeográfica, de manera que en ambientes áridos y desérticos las semillas germinan en tandas sucesivas, y en regiones húmedas germinan inmediatamente (Puech et al., 1998). Esta especie sobrevive en un amplio rango de temperaturas (5-30°C), pudiendo germinar durante una gran parte del año, aunque encuentra las condiciones idóneas a 25°C y tras un corto periodo de lluvias que aprovechan para conseguir el establecimiento rápido de plántulas (Veiga-Barbosa y Pérez-García, 2014). Esta halófita es considerada una importante planta medicinal al presentar compuestos bioactivos antioxidantes, como flavonoides y polifenoles, que evitan daños derivados de algunas enfermedades (Samout et al., 2016).

1.8.2. *Plantago lanceolata*

Plantago lanceolata (Fam. Plantaginaceae) es una herbácea perenne de 70cm de altura, con hojas lanceoladas y flores blanquecinas que se distribuye por la mayor parte de países europeos, habitando sustratos secos de zonas áridas y semiáridas que son frecuentes en la región mediterránea (Sarihan et al., 2005). Es capaz de crecer en condiciones de luz y oscuridad, y la competencia de otras especies como algunas especies pratenses, no afecta a su germinación (Pons y Van der Toorn, 1988). Esta especie es cultivada para la producción de pastos o forraje, y además, posee un importante principio activo, la “aucubina”, que es utilizado en medicina para tratar tumores, trastornos respiratorios e infecciones víricas y microbianas (Acosta de la Luz et al., 2000; Sarihan et al., 2005). La mejor época para su

siembra es el otoño (octubre y noviembre), cuando encuentra las condiciones ambientales idóneas y no sufre el ataque de hongos fitopatógenos, de manera que las semillas pueden germinar a los 5-7 días desde la siembra (Acosta de la luz et al., 2000).

1.8.3. *Juncus acutus*

Juncus acutus (Fam. Juncaceae) es una herbácea perenne, con un rizoma corto, una inflorescencia compacta y una gran bráctea, alcanza los 2m de altura y se distribuye por la región mediterránea y Europa occidental (distribución subcosmopolita), apareciendo a menudo en humedales y marismas, y ocasionalmente en zonas salinas del interior, sobre suelos húmedos que sufren el característico periodo seco mediterráneo, suelos que son ricos en cloruros y sulfatos y que a veces presentan textura arenosa (Vicente et al., 2007; Boscaiu et al., 2011). Normalmente esta especie germina en zonas con mucha cobertura vegetal y raramente se presenta en suelos desnudos en forma de individuos aislados (Martínez-Sánchez et al., 2006). Según Christofilopoulos et al. (2016), *J.acutus* podría ser una valiosa herramienta fitorremediadora en el tratamiento de aguas residuales urbanas e industriales con mezcla de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Estos investigadores demostraron que esta planta fue capaz de eliminar elevadas concentraciones de contaminantes orgánicos tales como ciprofloxacina, sulfametoxazol y bisfenol A y metales pesados (Cr,Ni,Cd, y el Zn), con una eficacia de eliminación del 96%. Además, acumuló elevadas concentraciones de metales pesados en raíces y hojas sin manifestar signos visibles de toxicidad. Por otro lado, Qasem (2015) destaca la gran variedad de propiedades medicinales e industriales que posee *J.acutus* (cura de dolencias estomacales y eccemas de la piel y suministro de aceites, fibra y madera).

1.8.4. *Juncus effusus*

Juncus effusus (Fam. Juncaceae) es una herbácea cespitosa (con aspecto de césped) de 25-140 cm, con un rizoma horizontal ramificado, con inflorescencias de 25 flores o más y una única bráctea, de distribución subcosmopolita, apareciendo en la mayor parte del territorio peninsular (Romero Zarco, 2010). Ocupa hábitats húmedos con sustratos ácidos y aireados donde hay fluctuaciones del nivel freático, hábitats abiertos o ensombrecidos, por lo que es una especie tolerante a diversas

condiciones ecológicas, lo que la convierte en una especie competidora, sobre todo con árboles jóvenes (McCorry y Renou, 2003). En su estudio sobre el crecimiento de *J. effusus*, Lazenby (1955), concluye que la humedad disponible es el factor limitante en el asentamiento inicial de plántulas, y las especies competidoras (hierba y trébol en este caso) afectan a la planta en etapas posteriores del desarrollo. *J. effusus* cuenta con numerosas aplicaciones en el campo de la medicina y la ecología. Esta especie, que es dominante en campos de arroz abandonados en Corea, ha sido utilizada en la creación de hábitat para *Nannopya pygmaea*, una especie de libélula en peligro de extinción (Yoon et al., 2011). Por otro lado, Xia et al. (2020) han desarrollado una interesante aplicación industrial basada en la fabricación de un adsorbente de tintes en aguas residuales, sintetizado a base de fibras celulósicas de *J. effusus* combinadas con un polímero obtenido a partir de conchas de crustáceos, el quitosano, en definitiva, un preparado sostenible, biodegradable y económico. Además, esta especie ha sido utilizada durante siglos en la medicina tradicional china, y actualmente, científicos como Zhao et al. (2018) han conseguido aislar tres nuevos fenantrenos (principales compuestos bioactivos de *J. effusus*) con actividad antimicrobiana.

1.8.5. *Limonium cossonianum*

Limonium cossonianum (Fam. Plumbaginaceae) es una halófito endémica de zonas de acantilados y praderas del sureste de la Península ibérica e Islas Baleares, pudiendo aparecer en marismas del interior (Giménez Luque et al., 2013). Esta especie puede ser muy útil en programas de restauración de la cubierta vegetal del sustrato de zonas semiáridas. En su estudio acerca de la influencia de halófitos mediterráneos sobre las propiedades microbiológicas y bioquímicas del sustrato rizosférico, Caravaca et al. (2005), concluyen que el sustrato desarrollado bajo *L. cossonianum* presenta una elevada actividad deshidrogenasa (oxidoreductasa del suelo relacionada con la respiración microbiana), además de contener gran cantidad de agregados estables que protegen la fracción orgánica.

1.8.6. *Limonium algarvense*

Limonium algarvense (Fam. Plumbaginaceae) es un endemismo del suroeste peninsular (Cádiz, Huelva y zona del Algarve portugués), presente en marismas y dunas costeras (Rodrigues et al., 2016). Entre sus componentes biológicos activos destacan los compuestos fenólicos (catequina, ácido salicílico, ácido gálico, ácido cumárico...), que se encuentran muy concentrados en las flores y que poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Estos pueden ser ingeridos en infusiones naturales con la finalidad de eliminar EROS y algunos mediadores pro-inflamatorios como el NO (óxido nítrico), involucrados en enfermedades como cáncer, trastornos cerebrales y afecciones inflamatorias (Rodrigues et al., 2016). Además, las bebidas naturales antioxidantes con mezcla de *L. algarvense* Erben y *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (té verde) tienen la capacidad de retardar el avance de enfermedades como el Alzheimer o la diabetes mellitus tipo 2, al inhibir la actividad de ciertas enzimas que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades (Rodrigues et al., 2019).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal fue llevar a cabo estudios comparativos sobre la capacidad germinativa y velocidad de germinación de diferentes especies de halófitas pertenecientes a varios taxones, recogidas de diferentes hábitats y sometidas a diferentes concentraciones salinas, para averiguar su mayor o menor grado de tolerancia a la salinidad. El hecho de centrar el estudio en la primera etapa del desarrollo de la planta se debe a que la germinación es la fase en la que la planta se muestra más sensible frente al estrés. Concretamente se ha realizado un análisis de 6 especies de halófitas pertenecientes a 3 familias diferentes, comparándose las halófitas pertenecientes a la misma familia.

Los objetivos específicos fueron:

- Distinguir la morfología de las semillas de las diferentes especies de halófitas e identificar casos de heteromorfismo.

- Estudiar el comportamiento germinativo de las especies halófitas a diferentes concentraciones salinas, entre 0 y 300 mM NaCl, para distinguir su grado de tolerancia a la salinidad.
- Comparar la velocidad de germinación de las especies pertenecientes a la misma familia.
- Determinar la cantidad de osmolitos acumulados (prolina y glicina-betaína) en las plántulas germinadas.
- Estudiar la relación entre la acumulación de osmolitos y la tolerancia al estrés.
- Revisar las aplicaciones de cada una de las halófitas estudiadas con el fin de promover su utilización en programas innovadores de fitorremediación, medicina, industria u otros campos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Obtención y conservación de las semillas

Seis especies de halófitas, presumiblemente con diferente grado de tolerancia al estrés, fueron utilizadas para la experimentación. Las semillas fueron adquiridas, en Septiembre de 2019, a través de la empresa “Semillas Cantueso S.L.” en Palma del Río (Córdoba), encargada de recolectar, almacenar, conservar y vender semillas de plantas autóctonas silvestres de la Península Ibérica. Las semillas se mantuvieron durante varias semanas refrigeradas (4C⁰) en oscuridad, en sobres impermeables, hasta su utilización en la experimentación (aproximadamente 1 mes).

3.2. Experimentos de germinación

En condiciones de esterilidad se prepararon distintas soluciones salinas de cloruro sódico (por ser la sal más perjudicial en la mayoría de los casos para las plantas) a diferentes concentraciones: Control 0mM (agua destilada estéril), 100mM, 200mM, 300mM y 400mM NaCl. Esta última concentración no fue introducida en resultados por tener un efecto totalmente inhibitorio para las 6 especies de halófitas. Por otra parte, la esterilización superficial de las semillas se llevó a cabo por inmersión en solución de hipoclorito sódico (1-2 %) durante 2-5 minutos (según el tamaño y dureza de la semilla), posteriormente las semillas fueron lavadas con agua destilada estéril para asegurarnos de haber eliminado toda la lejía. Dentro de la Cámara de Flujo Laminar, las semillas fueron sembradas en placas Petri de 90mm de diámetro

(25-100 semillas aprox./placa según tamaño de la semilla), a las que previamente se les colocó un papel de filtro estéril en la base y se les añadió entre 3-4 ml de la solución de NaCl correspondiente, obteniendo entre 6 a 15 repeticiones (placas) para cada tratamiento, según el porcentaje de germinación fuera mayor o menor en la especie. Las condiciones de germinación utilizadas (luz y temperatura) fueron las más adecuadas para cada halófito, para ello se tuvo en cuenta la bibliografía consultada de estas especies y la base de datos eHALOPH (<http://www.sussex.ac.uk/affiliates/halophytes/>).

Las semillas de *Plantago albicans*(L.) y *Plantago lanceolata*(L.) (Familia Plantaginaceae), procedentes de la Sierra de Cazorla, se sembraron a 0 mM, 100 mM, 200 mM, y 300 mM NaCl, en placas Petri que fueron señalizadas con nombre de la especie, concentración de NaCl y número de repetición, y finalmente selladas con parafilm para evitar la evaporación excesiva. Posteriormente, todas las placas se llevaron a una cámara de crecimiento con las siguientes condiciones experimentales: densidad del flujo fotónico (PPDF) $450 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (400–700 nm), proporcionado por Sylvania Cool White (Osram Sylvania Inc., Danvers, MA, USA) y Osram Dulux Superstar (Osram Sylvania Inc., Danvers, MA, USA) lámparas, fotoperiodo 16 h/ 8 h (día /noche) respectivamente, temperatura (día) $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y (noche) $16 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, y una humedad relativa entre 55–75% (Bueno et al., 2017). Se observó que las semillas de *Plantago* de estas 2 especies seleccionadas son dimórficas (semillas de mayor tamaño y semillas de tamaño más pequeño, entre 4 a 2 mm) y aspecto mucilaginoso (Fig. 1A). Se observó que en condiciones experimentales de laboratorio (placa Petri) el porcentaje de germinación era similar para semillas grandes y pequeñas, por tanto se utilizaron las de mayor tamaño para conseguir mayor material vegetal.

Las semillas de *Juncus acutus*(L.) Torr. ex. Retz y *Juncus effusus*(L.) (Familia Juncaceae) (Fig. 1B), procedentes del litoral atlántico, se sembraron hasta una concentración máxima de 300mM de NaCl, y se llevaron a la cámara de cultivo, programada a 25°C y fotoperiodo 16 h luz/8h oscuridad, humedad del 55-75%, es decir, con las mismas condiciones comentadas anteriormente.

Las semillas de *Limonium cossonianum* Kuntze y *Limonium algarvense* Erben (Familia Plumbaginaceae) fueron recolectadas en la Sierra de Cazorla para la

primera especie y en el litoral atlántico para la segunda especie, y se sembraron en placas Petri hasta una concentración máxima de 300mM de NaCl, que se llevaron a una cámara de germinación, programada a 25°C (día) y 15°C (noche) y fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad, según las referencias consultadas en la bibliografía.

Para realizar un correcto seguimiento de la germinación de estas especies, se registró diariamente el nº de semillas germinadas con respecto al nº total de semillas para cada placa (% de germinación), considerando que la semilla estaba germinada cuando se pudo observar la emergencia de la radícula (utilización de lupa binocular para semillas muy pequeñas). El tiempo de duración del experimento fue de 20 días para todas las especies.

Además se ha calculado el Índice de Timson (IT), que muestra la velocidad de germinación para cada especie y concentración salina, su fórmula es $IT = \Sigma G/t$, donde G es el porcentaje de germinación de semillas a intervalos de 1 o 2 días, y t es el total de días del periodo de germinación. Un mayor valor de G indica un índice de germinación más rápido (Easton y Kleindorfer, 2009).

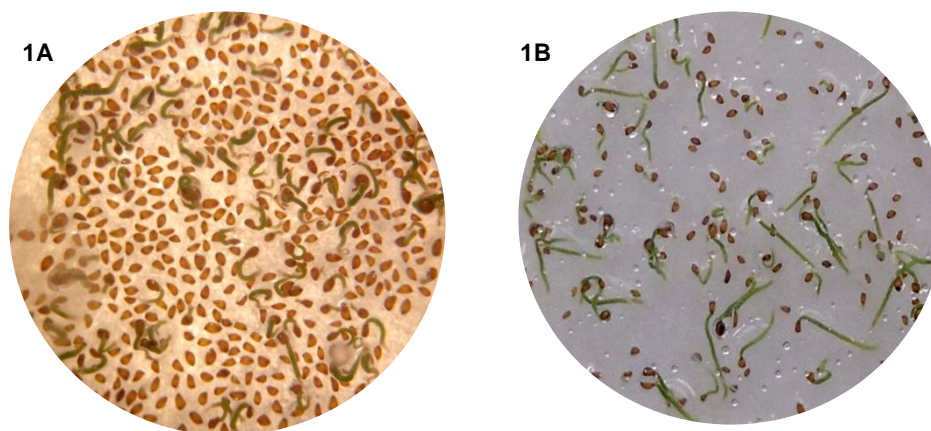


Fig.1. Semillas mucilaginosas de *Plantago albicans* (2-4mm) (1A) y semillas de *Juncus effusus* (2mm) (1B) observadas a la lupa.

3.3. Cuantificación de osmolitos

El contenido de Pro fue determinado por el método de Bates et al. (1973), a partir de (0.1-0.2 mg) de plántulas completas obtenidas después de 20 días de siembra, y congeladas en nitrógeno líquido hasta su utilización (Fig. 2). La Pro fue homogeneizada con ácido sulfosalicílico al 3%, el extracto fue centrifugado a 1000 x g durante 10 min. Un volumen del sobrenadante fue mezclado con un volumen de

solución de ninhidrina y un volumen de ácido acético glacial, e incubados a 95°C durante 1h. en oscuridad, posteriormente fue enfriada en baño de hielo y la muestra se extrajo con 2 volúmenes de tolueno y agitada durante 15 a 20 s. Finalmente, la fase orgánica e inorgánica fueron separadas, y la absorbancia de la fase orgánica conteniendo el grupo cromóforo fue determinada a 520 nm usando un espectrofotómetro (VARIAN Cary 4000 UV-VIS) para cuantificar la cantidad de prolina, utilizando tolueno como blanco. La concentración de Pro fue determinada usando una curva estándar.

La GB fue determinada de acuerdo al protocolo para halófitas de Al Hassan et al. (2016), a partir del de Grieve y Grattan (1983). El material vegetal fue homogeneizado en un mortero con 2ml de agua Mili-Q y extraído con 1-2 dicloroetano; la absorbancia de la solución fue medida a longitud de onda de 365 nm., para ello se utilizó el mismo espectrofotómetro (VARIAN Cary 4000 UV-VIS) que se utilizó para la determinación de Pro. La concentración de GB fue determinada usando una curva estándar. Todos los resultados de osmolitos se expresaron en $\mu\text{moles g}^{-1}$ peso fresco.

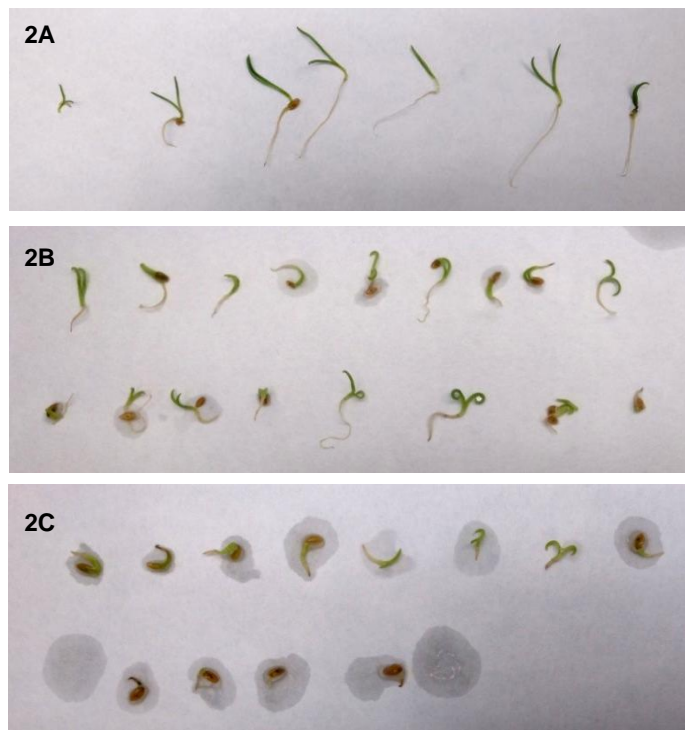


Fig. 2. Plántulas de *Plantago albicans* tras 10 días de siembra en 0 Mm NaCl (2A), 100 mM NaCl (2B) y 200 mM NaCl (2C).

3.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos sobre germinación de semillas, índice de Timson y contenido endógeno de osmolitos en plántulas de 20 días representaban la media \pm ES de entre 6 a 15 repeticiones por tratamiento (según porcentaje de germinación obtenido), llevados a cabo usando el software Statgraphics Centurion XVII proporcionado por la Universidad de Jaén. Diferencias entre medias ($P < 0.01$) fueron analizadas usando el test de rango múltiple de Tuckey.

4. RESULTADOS

4.1. Respuesta a la salinidad de *Plantago albicans*

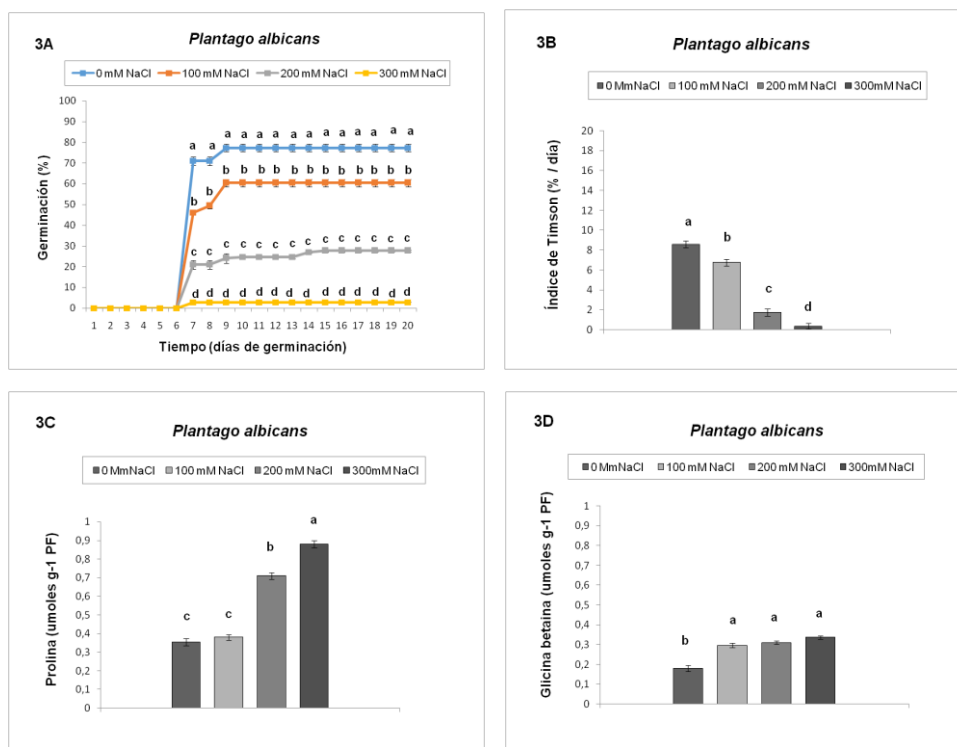


Fig. 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Plantago albicans* (3A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100, 200 y 300 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (3B). Contenido de Prolina (3C). Contenido de Glicina betaina (3D). Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

P. albicans utiliza 6 días para conseguir estrategias que le permitan germinar adecuadamente, presentando el máximo de germinación en el control (0 mM NaCl) (Fig. 3A). La sal provoca una drástica reducción del porcentaje de germinación a medida que su concentración aumenta en el medio de incubación, de manera que a

300 mM NaCl la germinación se reduce un 96%. El máximo de germinación se localiza a los 9 días para 0 y 100 mM de NaCl (80% y 60% de germinación respectivamente), a los 14 días para 200mM (28% de germinación) y a los 7 días para 300mM (3% de germinación), con diferencias significativas para todos los tratamientos ($P < 0.01$), después la germinación se mantiene constante hasta el final de la experimentación (día 20). Por otra parte, el aumento de salinidad ha provocado una disminución en la velocidad de germinación de estas semillas. El valor máximo de I.T. se alcanza en condiciones no salinas, llegando a reducirse un 95,4% para 300mM con respecto al control (o lo que es lo mismo, la velocidad es 21 veces menor a 300mM que en el control) (Fig. 3B). Con respecto al contenido de osmolitos se puede decir, en general, que la Pro alcanza valores superiores a los de GB en todos los tratamientos y que ambos osmolitos alcanzan su máxima concentración a 300 mM NaCl (Fig. 3C y 3D). La Pro muestra una concentración similar para 0 mM y 100 mM, mientras que a 200mM y 300mM se observa un marcado aumento, llegando a alcanzar una concentración 2,4 veces superior a la del control para 300 mM (Fig. 3C), por otra parte, la GB aumenta su concentración ante la situación de estrés con respecto al control, llegando a aumentar hasta un 47% para 300 mM NaCl, aunque este osmolito bajo tratamiento salino aumenta respecto al control, no se presentan diferencias significativas entre tratamientos salinos (Fig. 3D).

4.2. Respuesta a la salinidad de *Plantago lanceolata*

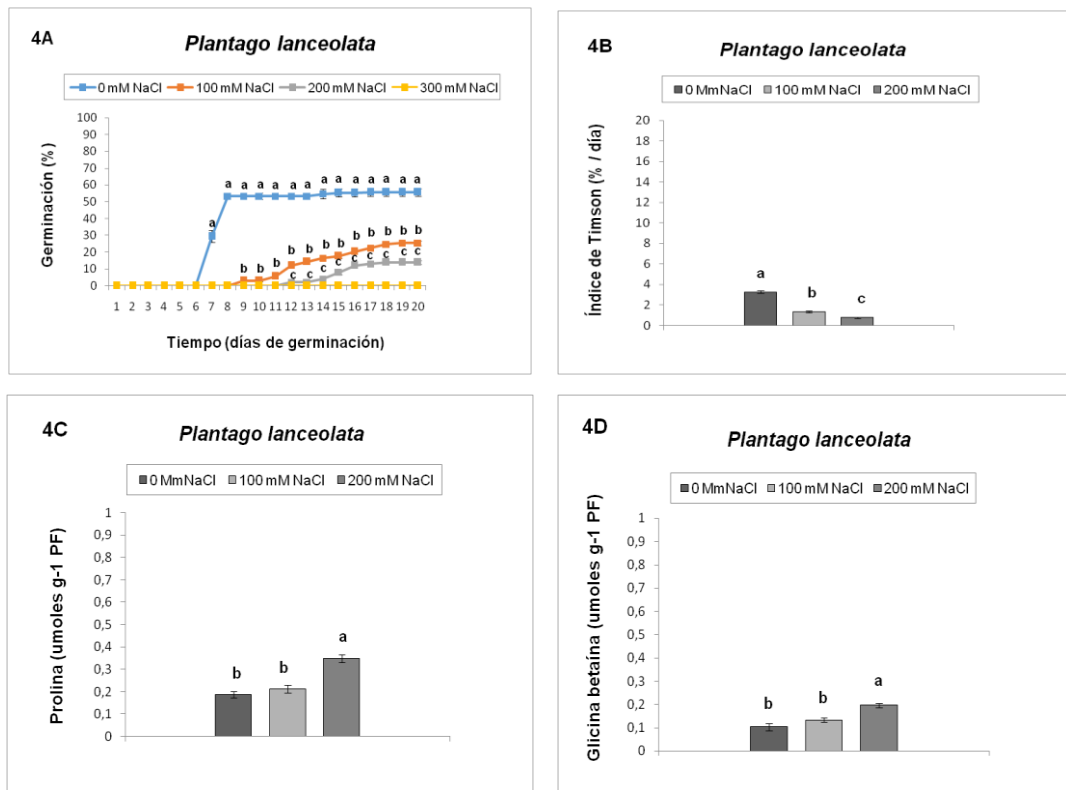


Fig. 4. Porcentaje de germinación de semillas de *Plantago lanceolata* (4A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100, 200 y 300 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (4B). Contenido de Prolina (4C). Contenido de Glicina betaína (4D). Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

P. lanceolata presenta un comportamiento similar en la germinación a *P. albicans*, puesto que también al séptimo día comenzó a observarse germinación en el control. No obstante, esta se inhibe por completo a 300 mM NaCl, por lo que su nivel máximo de tolerancia se alcanza a 200 mM NaCl, presentando diferencias significativas ($P < 0.01$) en todos los tratamientos salinos, al igual que sucede en *P. albicans*. El control alcanza su primer máximo de germinación a la semana de la siembra (54% de germinación), apareciendo un pequeño repunte una semana después (56% de germinación); las semillas expuestas a 100 mM alcanzan la máxima germinación en el día 19 (25% de germinación) y las de 200 mM lo alcanzan el día 18 (14% de germinación) (Fig. 4A). En este caso, el tratamiento salino ha producido inhibición, pero también retraso de la germinación con el aumento de concentración salina (inicio de germinación a los 9 días para 100 mM NaCl, e inicio de germinación a los 12 días para 200 mM NaCl). En la gráfica del

Índice de Timson (Fig. 4B) se observa como el aumento de la concentración salina provoca una disminución en la velocidad de germinación. El Índice de Timson es máximo en condiciones sin estrés y llega a reducirse en un 75% a 200 mM con respecto al control, siendo estos valores inferiores a los obtenidos por *P. albicans*. En cuanto a la acumulación de osmolitos, se observa un comportamiento similar que para *P. albicans*, los niveles de Pro son superiores a los de GB para todos los tratamientos, alcanzando la máxima concentración ambos osmolitos a 300 mM. La Pro muestra niveles similares para 0 y 100 mM, y más elevados para 200 mM, concretamente un 45,7% superiores (Fig. 4C). Por otro lado, la GB muestra valores similares para 0 y 100 mM, y experimenta un marcado incremento a 200 mM, llegando a duplicar los valores del control (Fig. 4D), pero estos valores fueron inferiores a los de *P. albicans* sobre todo para la Pro.

Estos datos demuestran que ambas especies tienen una estrategia similar de germinación, sin embargo, *P. albicans* parece ser más tolerante a la sal que *P. lanceolata*, pues ésta última solo alcanza un 25% de germinación a 100 mM (muestra una gran sensibilidad a la sal) en contraste con el 60% que alcanza *P. albicans* para esta misma concentración (Fig. 3A y 4A). El efecto de la salinidad sobre la Pro es similar en ambas especies. En ambos casos el contenido de Pro es similar entre 0 y 100 mM NaCl y aumenta notablemente a 200 mM NaCl (a esta concentración el contenido es aproximadamente el doble que en 0 y 100 mM NaCl), de manera que, en ambos casos el estrés salino induce a la acumulación de Pro para que la planta pueda realizar un pequeño ajuste osmótico que le permita tomar agua y germinar. Además, este osmolito está en mayor cantidad que la GB, por lo que juega un papel más importante en la tolerancia al estrés en estas halófitas. Por otro lado, el efecto de la salinidad sobre la GB varía un poco entre ambas especies: en *P. albicans* el contenido de GB aumenta significativamente a 100 mM de NaCl, manteniéndose este valor constante para los demás tratamientos, y en *P. lanceolata* no aumenta significativamente hasta 200 mM, cuando alcanza el doble de contenido que en el control.

4.3. Respuesta a la salinidad de *Juncus acutus*

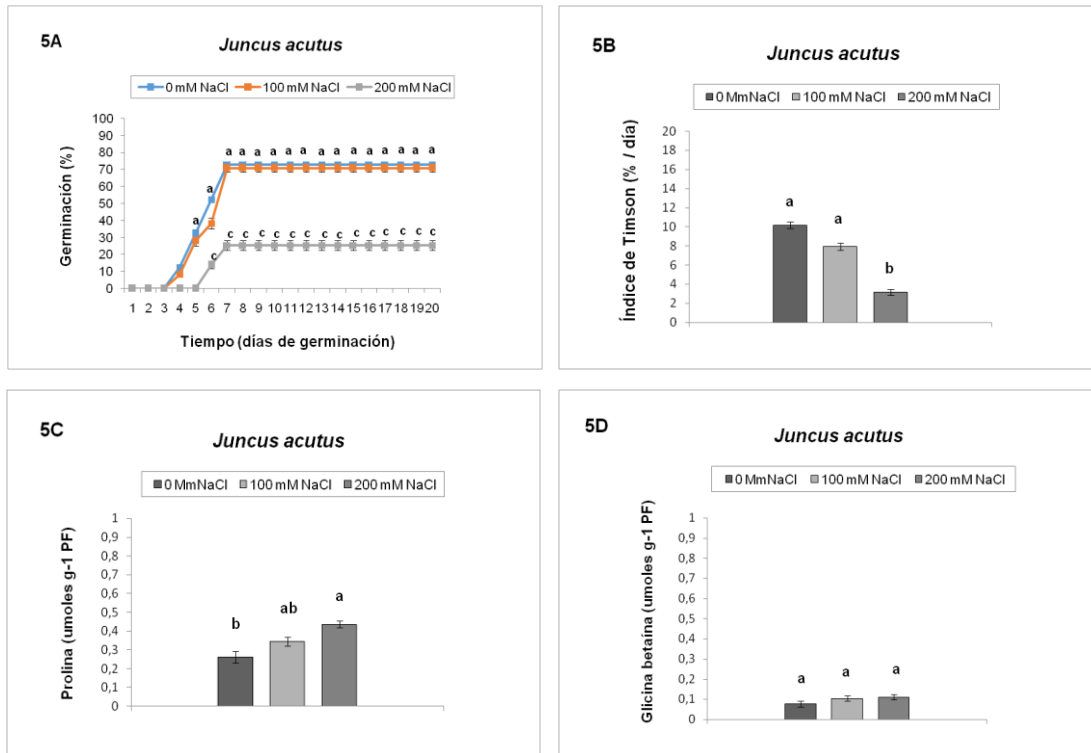


Fig. 5. Porcentaje de germinación de semillas de *Juncus acutus* (5A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100 y 200 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (5B). Contenido de Prolina (5C). Contenido de Glicina betaína (5D). En la figura 3A para 100Mm, los días 4 y 5 se corresponden con “a”, y a partir del día 6 con “b”. Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

Juncus acutus parece tener un mecanismo más eficaz de tolerancia en la germinación, pues solo tarda 3 días en germinar a 0 y 100 mM NaCl, y 5 días para 200 mM NaCl. Una concentración salina de 100 mM no provoca descenso en la germinación, pues a esta concentración la planta muestra prácticamente la misma germinación que en el control, aunque para 200mM ya se observa una drástica disminución y una diferencia significativa ($P < 0.01$) respecto a 0 y 100 mM NaCl. Las semillas de todos los tratamientos obtienen su nivel máximo de germinación a los 7 días, alcanzándose sobre un 73% y un 71% de germinación para 0 y 100 Mm respectivamente, y un 25% para 200 Mm (inhibición de la germinación a 200 mM NaCl), después la germinación se mantiene constante hasta el final del experimento (día 20) (Fig. 5A). La velocidad de germinación se ve afectada a partir de 200Mm (3%) en comparación con los tratamientos de 0 y 100 mM NaCl, que muestran

similares valores de velocidad de germinación (10% y 8% respectivamente) (Fig. 5B). En lo referente al contenido de osmolitos, se puede observar un contenido endógeno de Pro superior al de GB, este contenido de Pro ha aumentado progresivamente con el aumento de concentración salina, llegando a aumentar en un 41% a 200 mM NaCl con respecto al control (Fig. 5C), por otro lado, en cuanto al contenido de GB no existen diferencias significativas entre tratamientos, y es poco acumulado por la plántula (Fig. 5D).

4.4. Respuesta a la salinidad de *Juncus effusus*

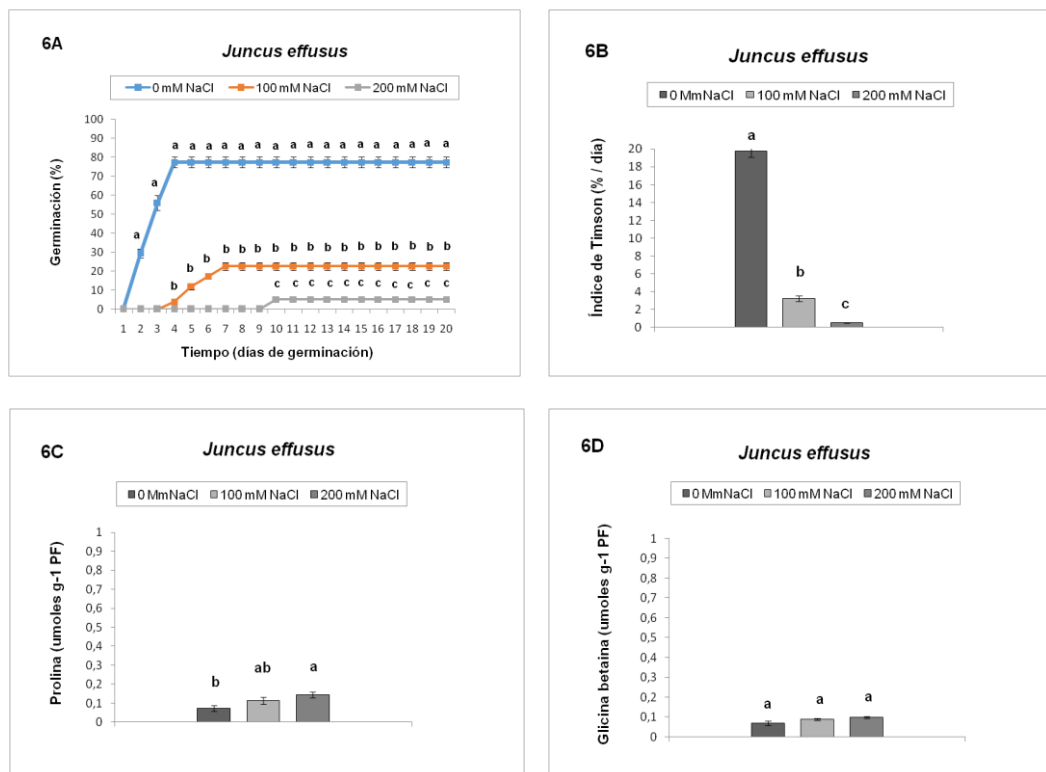


Fig. 6. Porcentaje de germinación de semillas de *Juncus effusus* (6A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100 y 200 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (6B). Contenido de Prolina (6C) Contenido de Glicina betaína (6D). Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

Juncus effusus es la que presenta una germinación más rápida en condiciones no estresantes, ya que germina el primer día que se siembra, y tan solo tarda 3 días en germinar a una concentración de 100Mm de NaCl. Sin embargo, a 200 Mm la germinación no se produce hasta el día 9, por lo tanto el aumento en la concentración de NaCl produce un retraso en la germinación, además de tener un efecto inhibitorio en el porcentaje de germinación. El nivel máximo de germinación

es alcanzado en el 4^o día para el control (77% de germinación), en el 7^o día para 100 Mm (23% de germinación) y en el 10^o día para 200Mm (5% de germinación) (Fig. 6A). Por otro lado, el aumento de salinidad provoca una drástica disminución de la velocidad de germinación, que disminuye un 84% para 100 Mm y un 97% para 200 Mm con respecto al control (Fig. 6B). En cuanto al contenido de osmolitos, se puede observar como la planta presenta un contenido endógeno de Pro y GB muy reducido, la planta aumenta la acumulación de Pro de forma sutil ante el aumento de salinidad, llegando a aumentar su concentración en un 43% a la máxima concentración salina (200 mM NaCl) con respecto al control (Fig. 6C). El contenido de GB, por otra parte, muestra un aumento todavía más leve que el de Pro, tanto que no llega a ser significativo entre los distintos tratamientos (Fig. 6D).

Ambas especies muestran similar viabilidad de sus semillas, y también ambas sufren una inhibición de la germinación con el aumento de salinidad, aunque *J. effusus* parece ser menos tolerante que *J. acutus*, ya que su nivel máximo de germinación a 100 mM es de un 23%, en contraste con el 70% que alcanza *J. acutus* para esta misma concentración (para las mismas concentraciones salinas *J. effusus* se ve más perjudicada). Otro indicador de que *J. effusus* es menos tolerante es la drástica disminución que sufre la velocidad de germinación ante el aumento de salinidad. *J. acutus*, por otro lado, presenta una velocidad de germinación de partida (0 mM) bastante inferior a la de *J. effusus* (la mitad de velocidad), sin embargo, esta sufre una menor disminución ante un aumento de salinidad (se adapta mejor). En cuanto al contenido de osmolitos se puede decir que ninguna de las dos especies lleva a cabo una gran acumulación de Pro y GB bajo estrés salino, de manera que los bajos contenidos endógenos en estas dos especies indican que estos osmolitos no tienen un papel fundamental en el ajuste osmótico durante la primera etapa de crecimiento de la planta.

4.5. Respuesta a la salinidad de *Limonium cossonianum*

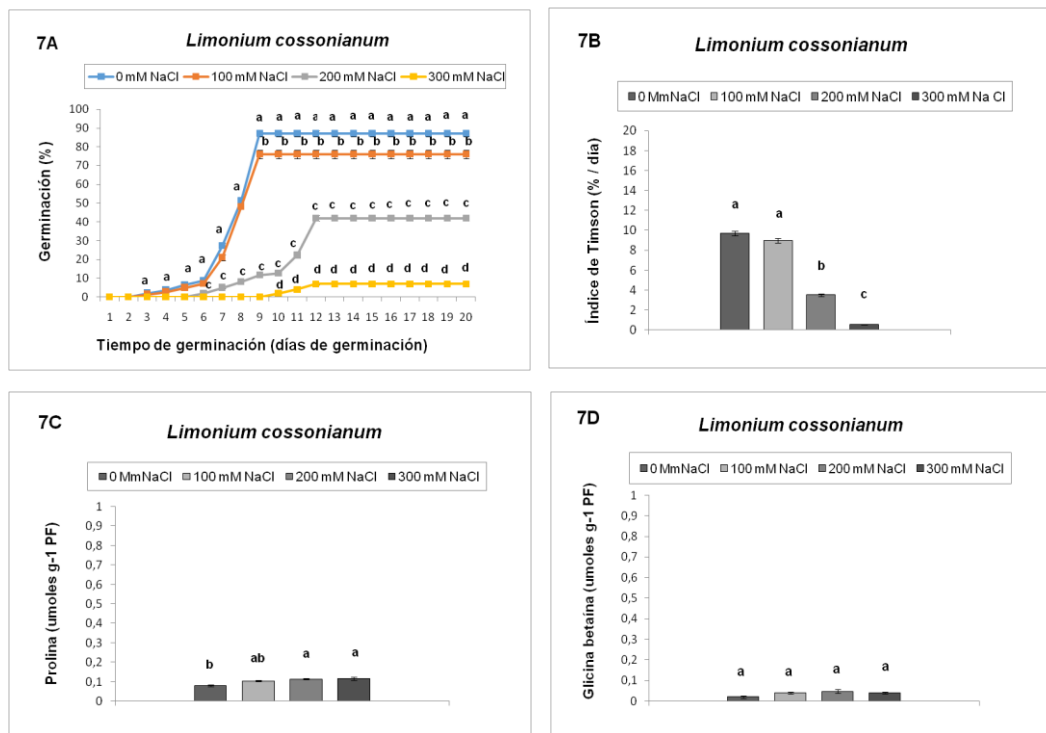


Fig. 7. Porcentaje de germinación de semillas de *Limonium cossonianum* (7A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100, 200 y 300 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (7B). Contenido de Prolina (7C) Contenido de Glicina betaína (7D). En la Fig. 5A, los días 3, 4, 5, 6, 7 y 8 para 100mM presentan las mismas diferencias significativas que el resto de días para este tratamiento ("b"). Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

Limonium cossonianum exhibe una rápida germinación (mecanismo de tolerancia eficaz) para 0 y 100 mM de NaCl (germina a los 2 días), aunque el aumento de concentración salina (200 y 300 mM NaCl) provoca disminución y retraso en la germinación (germina a los 5 y 9 días respectivamente). La máxima germinación se alcanza a los 9 días para 0 y 100 mM (87% y 76% de germinación respectivamente), y a los 12 días para 200 y 300 mM (42% y 7% de germinación respectivamente), manteniéndose constante hasta el final del experimento (día 20) (Fig. 7A). La gráfica del índice de Timson (Fig. 7B) muestra como la velocidad de germinación a 100 mM mantiene semejantes valores a los del control (no existen diferencias significativas), sin embargo, experimenta una marcada disminución para 200 mM y 300 mM (disminución del 63% y 94% respectivamente con respecto al control) ($P < 0.01$). En cuanto al contenido de osmolitos se observa un contenido endógeno de Pro superior al de GB, la Pro experimenta una acumulación suave y

progresiva, el aumento es más marcado para 100mM con respecto al control (aumento del 27%) y después se estabiliza (Fig. 7C). Para el contenido de GB no existen diferencias significativas entre tratamientos, existe un aumento ínfimo en 100 y 200 mM con respecto al control y después incluso disminuye de nuevo para 300mM (Fig. 7D).

4.6. Respuesta a la salinidad de *Limonium algarvense*

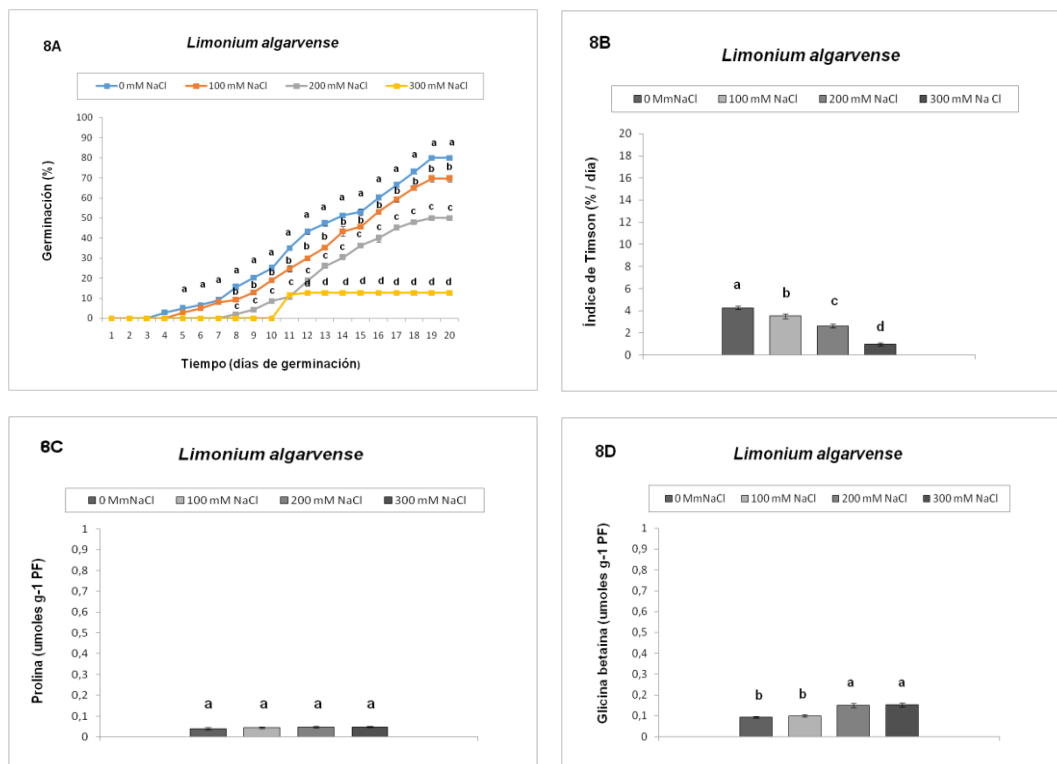


Fig. 8. Porcentaje de germinación de semillas de *Limonium algarvense* (8A) expuestas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 100, 200 y 300 mM). Índice de Timson (velocidad de germinación) (8B). Contenido de Prolina (8C). Contenido de Glicina betaína (8D). En la figura 6A, los días 5, 6 y 7 para 100mM presentan las mismas diferencias significativas que el resto de días para este tratamiento ("b"). Los valores representan la media \pm ES (n=6-15). En todas las gráficas las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de Tuckey; $P < 0.01$)

Limonium algarvense, al igual que *L. cossonianum*, utiliza mecanismos de tolerancia para germinar rápidamente ante situaciones no estresantes (0mM) y a 100mM, germinando a los 3-4 días en ambos casos, y de nuevo aparece un retraso y una disminución en la germinación para 200 y 300 mM, utilizando en estos casos hasta 7 y 10 días, respectivamente para desarrollar mecanismos de tolerancia, por tanto *L. algarvense* ralentiza el proceso de germinación más que *L. cossonianum* (Fig. 8A). Esta especie, además, muestra un aumento de la germinación mucho más

progresivo con el transcurso de los días, llegando a alcanzar los máximos de germinación al final del experimento en todos los tratamientos menos en 300mM, concretamente lo alcanza a los 19 días para 0, 100 y 200 mM (80%, 70% y 50% de germinación respectivamente) y a los 11 días para 300 mM (12% de germinación). Por otro lado, el aumento de concentración salina provoca una disminución progresiva en la velocidad de germinación, que muestra su mayor valor a 0 mM y disminuye hasta un 77% para la máxima concentración salina (300mM) con respecto al control (Fig. 8B). En relación al contenido de osmolitos se puede observar que para el contenido de Pro no hay diferencias significativas entre tratamientos, de manera que no es acumulada ante condiciones estresantes (Fig. 8C), sin embargo, la concentración de GB, aunque para 100 mM mantiene los mismos niveles que en condiciones no estresantes (0 mM), sí que aumenta para 200 mM, manteniéndose esta concentración aumentada para 300 mM (aumento del 38%) (Fig. 8D). Además es importante resaltar que los niveles endógenos de GB son más elevados que los de Pro.

5. DISCUSIÓN

En este estudio, dos especies de *Plantago*, dos especies de *Juncus* y dos especies de *Limonium* fueron seleccionadas para profundizar en los mecanismos que utilizan las halófitas para germinar y sobrevivir en condiciones salinas, comparando dos especies de cada familia con diferente sensibilidad a la sal.

5.1. Estudio comparativo entre las dos especies de *Plantago*

Con respecto a las dos especies de *Plantago*, una semana aproximadamente será necesaria para desarrollar estrategias que les permitan estar en condiciones adecuadas para germinar incluso en condiciones no salinas. Sus semillas pequeñas y mucilaginosas van embebiéndose de agua lentamente hasta producirse la emergencia de la radícula. Aunque presentan dimorfismo (tamaño de semillas diferente), en los experimentos de laboratorio no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la germinación de los dos tipos de semillas, por lo que se eligieron las más homogéneas y de mayor tamaño para tener mayor cantidad de material vegetal para la experimentación. No obstante, aunque las dos especies pueden germinar en condiciones salinas, *P. albicans* comienza su germinación al 6°

día, alcanzándose rápidamente casi el 80% de semillas germinadas en el día 9, mientras que *P. lanceolata* demuestra un retraso (inicio de la germinación para 200 mM NaCl en el día 12) y una drástica disminución significativa de la germinación conforme la concentración salina incrementa, de manera que a 300 mM NaCl no hay germinación. En general, en especies menos tolerantes, un retraso en la germinación y un lento crecimiento son esenciales para la supervivencia en condiciones salinas, permitiendo la síntesis de compuestos de defensa frente al estrés (Fig. 3 y 4). En otras especies de halófitas como *Cakile maritima*, *Suaeda salsa*, *Phragmites australis* y *Spartina alterniflora* se han encontrado estrategias parecidas (Ellouzi et al., 2011; Xiao et al., 2016). Los datos comparativos entre las dos especies sugieren que *P. albicans* tiene mecanismos más eficaces para tolerar la exposición de sal (sobre todo a 100 y 200 mM NaCl) que *P. lanceolata*. En ambas especies, la tolerancia a la salinidad disminuye progresivamente con el tiempo de exposición a la sal, siendo la germinación con las diferentes soluciones salinas siempre más bajas que el control, y con diferencias significativas para todos los tratamientos ($P < 0.01$). El efecto dañino de la sal se debe al estrés osmótico y/o toxicidad iónica en la semilla (Kumari et al., 2015), no obstante, existe una gran variedad de tolerancia a la salinidad en las especies de *Plantago* tal como ha sido demostrado por Al-Hassan et al. (2016). La velocidad de germinación de las semillas (Índice de Timson) depende de la velocidad de absorción de agua. *Plantago lanceolata* absorbe agua más lentamente desde la solución salina, y por tanto retrasa el tiempo de emergencia de la radícula. Esta lenta velocidad en la toma de agua puede dificultar la reparación de daños en las membranas biológicas como consecuencia del estrés salino, permitiendo la exudación de solutos y la entrada de iones tóxicos (Na^+) en las semillas. Con el incremento de la salinidad y el tiempo de exposición, el daño puede llegar a ser importante y afectar a la germinación disminuyéndola considerablemente (Liu et al., 2010). Sin embargo, en *P. albicans* el I.T. demuestra una mayor velocidad de germinación, que junto con los mayores valores de porcentaje de germinación indican la mayor tolerancia a la salinidad de esta última especie. Por otro lado, una de las estrategias utilizadas por las halófitas para mantener las apropiadas condiciones osmóticas es realizar el ajuste osmótico. Este ajuste osmótico por acumulación de Na^+ en la vacuola va acompañado de la acumulación de solutos orgánicos en el citoplasma para mantener un adecuado balance entre la vacuola y el citoplasma, sin interferir en ninguna ruta metabólica de

la célula (Gupta y Huang, 2014). Este ajuste osmótico se realiza por la presencia de osmolitos que tienen un papel osmoprotector estabilizando proteínas y macromoléculas bajo condiciones de estrés, así como secuestro de los EROS para evitar la peroxidación lipídica de las membranas, e incluso como señalizador molecular implicado en la inducción de cambios en el patrón de expresión génica (Kaur y Asthir, 2015). Generalmente se asume que cada familia de plantas usa preferentemente un componente particular (osmolito), y en el caso de la Familia *Plantaginaceae* el sorbitol es el mayor osmolito funcional en esta familia de plantas (Slama et al., 2015). No obstante, la prolina y la glicina-betaina son los osmolitos más comunes usados en angiospermas para mantener el balance osmótico celular. En un estudio realizado por Tipirdamaz et al. (2006), se encontró que estos dos osmolitos estaban omnipresentes en 51 halófitas muestreadas en diferentes regiones de Túnez. Quisimos saber la importancia de los osmolitos Pro y GB en la etapa germinativa de las semillas objeto de estudio. Una clara acumulación de Pro fue detectada en plántulas de *P. albicans* y *P. lanceolata*, a todos los niveles de sal ensayados (especialmente a las concentraciones más elevadas). En otras especies de *Plantago* también se han encontrado altas cantidades de este osmolito (Al Hassan et al., 2016). Estos autores consideran que el transporte y secuestro de iones tóxicos en la vacuola y la alta concentración de osmolitos tales como el sorbitol, pero también la prolina y la glicina betaina en el citoplasma pueden ser utilizados para el balance osmótico y por tanto ser mecanismos eficaces usados por las especies de *Plantago* para tolerar la salinidad. En nuestro caso se ha detectado Pro y GB a todas las concentraciones salinas estudiadas, sobre todo Pro se acumula a 200 y 300 mM NaCl, la GB presenta valores similares en todos los tratamientos salinos en *P. albicans*, por otro lado en *P. lanceolata* existe un comportamiento similar de acumulación para los dos osmolitos, siendo más abundantes a la más alta concentración salina (200 mM NaCl). Es interesante destacar que la especie *P. albicans*, con más capacidad y velocidad germinativa frente a la salinidad, es la que presenta mayor acumulación de estos osmolitos frente a menores valores en *P. lanceolata* con menor capacidad germinativa. Por lo tanto, podemos dilucidar que la especie más tolerante (*P. albicans*) se adapta más rápidamente a las concentraciones salinas del ambiente, para la germinación, mientras que *P. lanceolata* necesita más tiempo para germinar, siendo sus niveles de osmolitos más bajos que en la primera especie, lo cual puede indicar que tanto

Pro como GB pueden tener un significativo papel en la tolerancia de las dos especies estudiadas cuando las condiciones de estrés se hacen más fuertes. A parte de intervenir en el balance osmótico, Cuin y Shabala (2005, 2007) también demostraron que estos osmolitos pueden contribuir a la reducción de la pérdida de K^+ desde las células en presencia de altas concentraciones de sal. Las plantas de *P. albicans* en condiciones no estresantes muestran el doble de contenido de Pro y GB que las plántulas de *P. lanceolata*, por lo que se podría dilucidar que *P. albicans* ya cuenta con mecanismos de tolerancia innatos, mientras que *P. lanceolata* lo adquiere ante una situación de estrés, estas mismas estrategias se han encontrado en otras especies de *Plantago* (Al Hassan et al., 2006). La acumulación de osmolitos en el citoplasma, junto con la compartimentalización celular, (entrada de iones Na^+ a la vacuola) para el balance osmótico, y la activación de sistemas antioxidantes para eliminar los radicales libres, también pueden contribuir a conseguir una mayor tolerancia a la salinidad. La mayor eficacia en estas estrategias conseguirá que la planta sea más tolerante.

5.2. Estudio comparativo entre las dos especies de *Juncus*

Las semillas de *Juncus* son de tamaño muy pequeño (tamaño $\approx 2\text{mm}$), por lo que la planta puede producir una gran cantidad de semillas; esto implica la posibilidad de producir un “banco de semillas” de manera que haya la posibilidad de encontrar siempre semillas en el suelo dispuestas a germinar cuando lleguen las condiciones más favorables. El hecho de tener pocas reservas nutritivas implica que una vez que la semilla encuentra las condiciones óptimas (luz, temperatura y humedad) para germinar, se desarrolle rápidamente una plántula con su primer par de hojas para poder realizar fotosíntesis, con lo cual se asegura su supervivencia, antes de que se acaben las pocas reservas nutritivas que contiene la semilla (Bueno, 2019). A raíz de los datos de germinación observados en *J. acutus* y *J. effusus* (Fig. 5 y 6), y una vez que la semilla se embebe de agua (entre 2 a 4 días) la germinación es muy rápida y máxima en el control (0 mM NaCl) tal como ocurre en la mayoría de halófitas. Sin embargo a medida que aumenta la concentración salina existe una “inhibición dependiente de concentración” para las dos especies, de manera que a mayor concentración de solución salina, mayor es la inhibición en la germinación (100 y 200 mM NaCl), tal como ocurre en otras especies de este taxón recogidas en diferentes zonas mediterráneas (Boscaiu et al., 2011), lo cual indica que el NaCl

tiene un efecto inhibitorio sobre la toma de agua por la semilla. Por tanto, la rápida germinación puede ser una estrategia adaptativa de estas dos especies para conseguir un rápido establecimiento de la plántula, una vez que las condiciones medioambientales sean óptimas en su hábitat natural. Por otro lado, las concentraciones elevadas de Na^+ dañan las membranas plasmáticas o influyen negativamente en el flujo de K^+ en los embriones o en la plántula, el K^+ es activador de al menos 50 enzimas en la célula y el Na^+ puede sustituirlo produciéndose daños irreparables en el metabolismo celular (Gupta y Huang, 2014). A raíz de los datos obtenidos sobre (%) de germinación y velocidad de germinación (I.T.), *J. acutus* es más tolerante al estrés que *J. effusus* ya que tanto los valores de semillas germinadas como el I. T. son superiores en la primera especie, esto indica que tendrá mayor éxito en el hábitat salino donde se desarrollen. No obstante parece existir tanto un efecto osmótico e iónico que afecta negativamente a la germinación en las dos especies bajo condiciones salinas.

Los osmoprotectores más frecuentes en la familia *Juncaceae* encontrados sobre todo en hojas son los azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) (Gil et al., 2011). No obstante, la presencia de otros osmolitos como la Pro y la GB son muy frecuentes en la mayoría de halófitas. Los valores de estos osmolitos observados en las gráficas 5 C,D y 6 C,D son muy bajos en ambas especies, sobre todo el contenido de GB que no fue significativo con el tratamiento salino para ninguna de las dos especies de *Juncus*. Estos osmoreguladores no parecen desempeñar un importante papel protector en las plántulas debido a sus bajos contenidos endógenos, por tanto otro tipo de estrategias deben utilizar estas especies para conseguir tener éxito en la germinación en condiciones medioambientales salinas.

Juncus pertenece al grupo de especies halófitas monocotiledóneas, en este sentido este grupo de plantas, que pueden crecer en suelos con alta salinidad, limitan la toma de Na^+ y Cl^- desde el suelo a la semilla o a la planta, impidiendo que dañe al embrión o llegue a la parte aérea, en concreto a las hojas perjudicando drásticamente la fotosíntesis ya que puede alterar membranas, pigmentos y enzimas (Al Hassan et al., 2016). Las especies sobre todo con cubierta dura juegan un papel importante como barrera protectora frente a un medio con alta concentración de iones. De manera que el Na^+ puede ser compartimentalizado en la cubierta de la semilla disminuyendo su concentración en el embrión, por lo cual

puede proteger a éste de la toxicidad iónica para asegurar la viabilidad de la semilla y por tanto ser un mecanismo adaptativo en condiciones ambientales salinas (Song et al., 2005). Por lo tanto, en las especies de *Juncus* estudiadas, podría darse un mecanismo similar, la cubierta de las semillas podría ejercer mayor efecto protector que la presencia de osmoreguladores durante la primera etapa de germinación, compartimentalizando los iones tóxicos en la cubierta de la semilla y dejando libre al embrión. No obstante con el desarrollo de la planta, estos osmolitos si serán importantes durante el crecimiento y desarrollo de la planta.

5.3. Estudio comparativo entre las dos especies de *Limonium*

Las plantas pertenecientes a la familia *Plumbaginaceae* comprenden un gran número de especies (500-700 especies) con un alto grado de tolerancia a la salinidad y a condiciones de sequía, aunque algunas especies presentan diferencias dependiendo del hábitat en el que crezcan (Labbe, 1962). Hemos observado que las dos especies de *Limonium* (situadas en hábitats diferentes) presentan un aumento lento y gradual sobre el porcentaje de la germinación conforme aumentan los días de experimentación. Pero mientras *L. algarvense* (de zonas más húmedas y frías) presenta un retraso en la germinación, de manera que a 300 mM NaCl deben pasar 10 días para comenzar a observarse la emergencia de la radícula, y el valor máximo de semillas germinadas se alcanza el día 19 (0, 100, 200 mM NaCl), en *L. cossonianum* (recogidas de zonas más calurosas y secas) se alcanza el máximo de germinación en el día 9 (0 y 100 mM NaCl) y en el día 12 para (200 y 300 mM NaCl). Este rápido aumento de la germinación en *L. cossonianum* puede ser debido a que esta especie está acostumbrada en su hábitat natural a aprovechar la época más húmeda para germinar rápidamente y asentarse como plántula, antes de que llegue la época de sequía, mientras que *L. algarvense* (al vivir en zonas de litoral) tiene que soportar bajas temperaturas y los aerosoles salinos procedentes del mar, además de la salinidad del suelo (es decir un estrés más persistente), así, necesita varias semanas para desarrollar mecanismos de tolerancia que le permiten tener éxito en la germinación (por lo que ralentiza este proceso) para dotarse de estrategias que le permitan asegurarse el éxito en la etapa germinativa (osmoprotectores, compartimentalización de iones, activar sistemas antioxidantes para eliminar los EROS). El I.T. refleja el comportamiento en la velocidad de germinación, y en este caso es *L. cossonianum* la que presenta valores más

elevados en concordancia con los resultados de las gráficas de germinación (Fig. 7 y 8).

La mayoría de miembros de esta familia acumulan colina-O-sulfato y β -alanina betaina como componentes osmoprotectores, junto con prolina, azúcares y glicina betaina durante el desarrollo de las plantas (Slama et al., 2015). Nuestro estudio, en la etapa germinativa de las dos especies de *Limonium*, indica que los osmolitos Pro y GB presentan un comportamiento diferente para realizar el ajuste osmótico y proteger sus estructuras celulares. Mientras que la GB se acumula más en *L. algarvense*, la Pro se acumula en mayor cantidad en *L. cossonianum*. Normalmente la Pro se acumula más rápidamente que la GB, lo que indica que la Pro está implicada en la respuesta de la planta en las primeras horas de estrés, mientras que la acumulación de GB se realiza más lentamente y en ambientes más persistentes (Hassine et al., 2008). Por otro lado, la Pro estaría más relacionada con el estrés osmótico y en poblaciones crecidas en el interior, por lo tanto más relacionadas con la sequía, mientras que la acumulación de GB tiene una síntesis más lenta, es más estable que la Pro y más altamente metabolizable (Hassine et al., 2008). Estos hallazgos pueden explicar nuestros resultados, *L. cossonianum* más adaptada a climas con periodos áridos germina rápidamente, sintetizando también rápidamente Pro como osmoprotector frente al estrés, mientras que *L. algarvense* acumula GB, osmolito que se acumula más lentamente en situaciones de estrés salino y relacionado con la lenta germinación de esta especie. Por lo tanto, estas dos especies podrían utilizar un set de solutos para llevar a cabo el ajuste osmótico en condiciones de estrés, pero la proporción de cada componente podría variar de acuerdo a la población considerada y las condiciones medioambientales en donde hayan crecido las plantas (Hassine et al., 2008).

6. CONCLUSIONES

Ambas especies de *Plantago* utilizan un mecanismo de tolerancia (lenta imbibición de la semilla) que les permite sintetizar los compuestos necesarios para hacer frente al estrés, aunque *P. albicans* cuenta con mecanismos de tolerancia más eficaces al exhibir mayor capacidad germinativa y velocidad de germinación que *P. lanceolata*, además de mostrar una mayor acumulación de los osmolitos Pro y GB, lo que le permite realizar un pequeño ajuste osmótico y germinar más rápidamente.

Por otro lado, las diminutas semillas de *J. acutus* y *J. effusus* procedentes de un banco de semillas, muestran un mecanismo de tolerancia eficaz, en el que pueden germinar rápidamente (rápida imbibición de agua) en cuanto aparecen las condiciones favorables para ello y así asegurar el establecimiento y supervivencia de las plántulas, su cubierta protectora frente a la toxicidad iónica puede utilizarse como estrategia frente al estrés.

Por último, en el caso de las especies de *Limonium* destaca su diferente respuesta a la salinidad, probablemente relacionada con el hábitat que ocupan. *L. cossonianum* germina más rápidamente para evitar la época seca patente en su hábitat, y *L. algarvense*, que está habituada a soportar un estrés prolongado en la zona del litoral, necesita más tiempo para desarrollar los mecanismos de tolerancia que aguanten el prolongado periodo de estrés. La GB está relacionada con estos mecanismos de tolerancia persistentes, por lo que su acumulación es mayor en *L. algarvense*, mientras que la mayor acumulación de Pro, característica de mecanismos de tolerancia rápidos, se da en *L. cossonianum*.

Así, se puede observar como diferentes especies halófitas pertenecientes a la misma familia, pueden exhibir distintos niveles de tolerancia, incluso diferentes mecanismos de tolerancia dependiendo del hábitat ocupado, como en el caso de las dos especies de *Limonium*.

El estudio de la ecofisiología de estas plantas resulta interesante por la gran variedad de aplicaciones que ofrecen. Ambas especies de *Plantago* destacan por sus metabolitos secundarios con capacidad antioxidante eficaces contra diversas enfermedades; *J. acutus* y *J. effusus* aportan su gran capacidad fitorremediadora en la eliminación de contaminantes presentes en aguas residuales, posibilitando la

fabricación de preparados eficientes y respetuosos con el medio ambiente; *L. cossonianum* constituye una valiosa herramienta en programas de restauración vegetal y *L. algarvense* destaca por las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de sus componentes bioactivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abogadallah, G. M. (2010). Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 369–374. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10873>

Acosta de la Luz, L., Fuentes Fiallo, V., y Rodríguez Ferradá, C. (2000). Investigaciones agrícolas en especies de uso frecuente en la medicina tradicional. IV. Llantén menor. *Plantago lanceolata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(3), 84-86.

Ahmad, R., Lim, C. J., y Kwon, S. (2013). Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnology Reports*, 7, 49-57. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0266-8>

Al Hassan, M., Pacurar, A., López-Gresa, M.P., Donat-Torres, M.P., Llinares, J.V., Boscaiu, M., y Vicente, O. (2016). Effects of salt stress on three ecologically distinct *Plantago* species. *PLOS ONE*, 11(8), Artículo e0160236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160236>

Bates, L.S., Waldren, R.P., y Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

Boscaiu, M., Ballesteros, G., Naranjo, M. A., Vicente, O., y Boira, H. (2011). Responses to salt stress in *Juncus acutus* and *J. maritimus* during seed germination and vegetative plant growth. *Plant Biosystems*, 145(4), 770-777. <https://doi.org/10.1080/11263504.2011.628446>

Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., y Shabala, S. (2014a). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1241-1257. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert430>

- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., Lai, D., Xie, Y., Shen, W., y Shabala, S. (2014b). Rapid regulation of the plasma membrane H⁺ - ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*, 115(3), 481–494. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu219>
- Bueno, M. (2019). Adaptation of Halophytes to Different Habitats. *Seed Dormancy and Germination*. Jiménez López, J.C. (Ed.). <https://doi.org/10.5772/intechopen.87056>
- Bueno, M., Lendínez, M. L., Aparicio, C., y Cordovilla, M. P. (2017). Germination and growth of *Atriplex prostrata* and *Plantago coronopus*: Two strategies to survive in saline habitats. *Flora*, 227, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.11.019>
- Bueno, M., Lendínez, M.L., Aparicio, C., y Cordovilla, M.P. (2015). Effect of salinity on polyamines and ethylene in *Atriplex prostrata* and *Plantago coronopus*. *Biologia Plantarum*, 59, 596-600. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0510-5>
- Cao, D., Baskin, C.C., Baskin, J.M., Yang, F., y Huang, Z. (2012). Comparison of germination and seed bank dynamics of dimorphic seeds of the cold desert halophyte *Suaeda corniculata* subsp. *mongolica*. *Annals of Botany*, 110(8), 1545-1558. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs205>
- Caravaca, F., Alguacil, M. M., Torres, P., y Roldán, A. (2005). Plant type mediates rhizospheric microbial activities and soil aggregation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma*, 124(3-4), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.05.010382>.
- Christofilopoulos, S., Syranidou, E., Gkavrou, G., Manousaki, E., y Kalogerakis, N. (2016). The role of halophyte *Juncus acutus* L. in the remediation of mixed contamination in a hydroponic greenhouse experiment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(6), 1665-1674. <https://doi.org/10.1002/jctb.4939>
- Cuin, T.A., y Shabala, S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant, Cell & Environment*, 30(7), 875–885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01674.x>

Cuin, T.A., y Shabala, S. (2005). Exogenously Supplied Compatible Solutes Rapidly Ameliorate NaCl-induced Potassium Efflux from Barley Roots. *Plant Cell Physiology*, 46(12), 1924-1933. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci205>

Debez, A., Belghith, I., Pich, A., Taamalli, W., Abdelly, C., y Braun, H.P. (2018). High salinity impacts germination of the halophyte *Cakile maritima* but primes seeds for rapid germination upon stress release. *Physiologia Plantarum*, 164, 134-144. <https://doi.org/10.1111/ppl.12679>

Easton, L.C., y Kleindorfer, S. (2009). Effects of salinity levels and seed mass on germination in Australian species of *Frankenia* L. (Frankeniaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 65(2-3), 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.10.006>

Ellouzi, H., Hamed, K.B., Cela, J., Munné-Bosch, S., y Abdelly, C. (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum*, 142(2), 128-143. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01450.x>

Elnaggar, A., El-Keblawy, A., Mosa, K.A., y Soliman, S. (2018). Drought tolerance during germination depends on light and temperature of incubation in *Salsola imbricata*, a desert shrub of Arabian deserts. *Flora*, 249, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.001>

Flowers, T.J., y Colmer, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179, 945-963. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x>.

Gil, R., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidón, A., y Vicente, O. (2011). Soluble Carbohydrates as Osmolytes in Several Halophytes from a Mediterranean Salt Marsh. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39, 09-17. <https://doi.org/10.15835/nbha3927176>

Giménez Luque, E., Delgado Fernández, I. C., y Gómez Mercado, F. (2013). Effect of salinity and temperature on seed germination in *Limonium cossonianum*. *Botany*, 91, 12-16. <https://doi.org/10.1139/cjb-2012-0157>

- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., y Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 5, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Grieve, C. M., y Grattan, S.R. (1983). Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil*, 70, 303-307. <https://doi.org/10.1007/BF02374789>
- Gul, B., Ansari, R., Flowers, T.J., y Khan, M.A. (2012). Germination strategies of halophyte seeds under salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.11.006>
- Gupta, B., y Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 701596. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Hassine, A.B., Ghanem, M. E., Bouzid, S., y Lutts, S. (2008). An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1315-1326. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern040>
- Kaur, G., y Asthir, B. (2015). Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, 59, 609-619. <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0549-3>
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 20(4), 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.02.001>
- Khan, M.A., Gul, B., y Weber, D.J. (2004). Temperature and high salinity effects in germinating dimorphic seeds of *Atriplex rosea*. *Western North American Naturalist*, 64, 193-201. <https://www.jstor.org/stable/41717362?seq=1>
- Kumari, A., Das, P., Parida, A.K., y Agarwal, P.K. (2015). Proteomics, metabolomics, and ionomics perspectives of salinity tolerance in halophytes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 537. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00537>.

Labbe, A. (1962). Les Plombaginacees: structure, developpement, répartition, consequences en systematique. Grenoble: Imprimerie Allier.

Lazenby, A. (1955). Germination and establishment of *Juncus effusus* L.: II. The Interaction Effects of Moisture and Competition. *Journal of Ecology*, 43, 595-605. <https://doi.org/10.2307/2257013>

Li, W., Yamaguchi, S., Khan, M. A., An, P., Liu, X., y Tran, L. S. P. (2016). Roles of Gibberellins and Abscisic Acid in Regulating Germination of *Suaeda salsa* Dimorphic Seeds Under Salt Stress. *Frontiers in plant science*, 6, 1235. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01235>

Liu, J., Guo, W.Q., y Shi, D.C. (2010). Seed germination, seedlings survival and physiological response of sunflowers under saline and alkaline conditions. *Photosynthetica*, 48(2), 278-286. <https://doi.org/10.1007/s11099-010-0034-3>

Liu, R., Wang, L., Tanveer, M., y Song, J. (2018). Seed Heteromorphism: An Important Adaptation of Halophytes for Habitat Heterogeneity. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1515. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01515>

Martínez-Sánchez, J. J., Conesa, E., Vicente, M. J., Jiménez, A., y Franco, J. A. (2006). Germination responses of *Juncus acutus* (*Juncaceae*) and *Schoenus nigricans* (*Cyperaceae*) to light and temperature. *Journal of Arid Environments*, 66(1), 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.11.004>

McCorry, M. J., y Renou, F. (2003). Ecology and management of *Juncus effusus* (soft rush) on cutaway peatlands. *Forest Ecosystem Research Group Report*, Department of Environment Resource Management, University Colleague Dublin, 69, 66.

Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H., y Turkan, I. (2013). Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology*. 40(9), 832–847. <https://doi.org/10.1071/FP12389>

Panta, S., Flowers, T., Lane, P., Doyle, R., Haros, G., y Shabala, S. (2014). Halophyte agriculture: Success stories. *Environmental and Experimental Botany*, 107, 71-83. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.05.006>

Pilarska, M., Wiciarz, M., Jajic, I., Kozieradzka-Kiszkurno, M., Dobrev, P., Vanková, R., y Niewiadomska, E. (2016). A Different Pattern of Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Halophytic *Eutrema salsugineum* (*Thellungiella salsuginea*) Plants in Comparison to *Arabidopsis thaliana* and Its Relation to Salt Stress Signaling. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1179. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01179>

Pons, T. L., y van der Toorn, J. (1988). Establishment of *Plantago lanceolata* L. and *Plantago major* L. among grass. *Oecologia*, 76, 341-347. <https://doi.org/10.1007/BF00377027>

Puech, S., Rascol, J.P., Michel, V., y Andary, C. (1998). Cytogenetics and adaptation to increasingly arid environments: the example of *Plantago albicans* L. (Plantaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 26(3), 267–283. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00111-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00111-7)

Qasem, J. R. (2015). Prospects of wild medicinal and industrial plants of saline habitats in the Jordan valley. *Pakistan Journal of Botany*, 47(2), 551-570.

Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A.J., Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E.M., Luque, T., y Figueroa, E. (2007). Growth and Photosynthetic Responses to Salinity of the Salt-marsh Shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany*, 100(3), 555-563. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm119>

Rodrigues, M. J., Neves, V., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M.F., Varela, J., Barreira, L., y Custódio, L. (2016). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 200, 322-329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.048>

Rodrigues, M. J., Oliveira, M., Neves, V., Ovelheiro, A., Pereira, C. A., Neng, N. R., Nogueira, J.M.F., Varela, J., Barreira, L., y Custódio, L. (2019). Coupling sea lavender (*Limonium algarvense* Erben) and green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) to produce an innovative herbal beverage with enhanced enzymatic inhibitory

properties. *South African Journal of Botany*, 120, 87-94.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.12.003>

Romero Zarco, C. (2010). *Juncus* L. *Flora Iberica*, 17, 123-187.

Samout, N., Ettaya, A., Bouzenna, H., Ncib, S., Elfeki, A., y Hfaiedh, N. (2016). Beneficial effects of *Plantago albicans* on high-fat diet-induced obesity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1768-1775.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.105>

Sarihan, E. O., Ipek, A., Khawar, K. M., Atak, M., y Gurbuz, B. (2005). Role of GA₃ and KNO₃ in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 883-887.

Shi, H., Lee, B., H., Wu, S. J., y Zhu, J. K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 81–85. <https://doi.org/10.1038/nbt766>

Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., y Saviouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany*, 115(3), 433-447.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>

Song, J., y Wang, B. (2015). Using euhalophyte to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Annals of Botany*, 115(3), 541-553. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu194>

Song, J., Feng, G., Tian, C., y Zhang, F. (2005). Strategies for Adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a Saline Environment During Seed-Germination Stage. *Annals of Botany*, 96(3), 399-405.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci196>

Song, J., Shi, W., Liu, R., Xu, Y., Sui, N., Zhou, J., y Feng, G. (2017). The role of the seed coat in adaptation of dimorphic seeds of the euhalophyte *Suaeda salsa* to salinity. *Plant Species Biology*, 32(2), 107-114. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12132>

Su, H., Balderas, E., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Zhao, C., Pantoja, O., y Bohnert, H.J. (2003). Expression of the cation transporter McHKT1 in a halophyte. *Plant Molecular Biology*, 52, 967–980. <https://doi.org/10.1023/A:1025445612244>

Tadeo, F.R., Gómez-Cadenas, A. (2008). En Azcón-Bieto, J., y Talón, M. (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Fisiología de las plantas y el estrés. 2^o edición. McGraw-Hill Interamericana de España.

Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhazé, C., Aïnouche, A., Monnier, C., Özkum, D., y Larher, F. (2006). Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany*, 57(1-2), 139-153. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.007>

Veiga-Barbosa, L., y Pérez-García, F. (2014). Germination of mucilaginous seeds of *Plantago albicans* (Plantaginaceae): effects of temperature, light, pre-sowing treatments, osmotic stress and salinity. *Australian Journal of Botany*, 62(2), 141-149. <https://doi.org/10.1071/BT14034>

Vicente, M. J., Conesa, E., Álvarez-Rogel, J., Franco, J. A., y Martínez-Sánchez, J. J. (2007). Effects of various salts on the germination of three perennial salt marsh species. *Aquatic Botany*, 87(2), 167-170. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.04.004>

Wang, F., Xu, Y., Wang, S., Shi, W., Liu, R., Feng, G., y Song, J. (2015). Salinity affects production and salt tolerance of dimorphic seeds of *Suaeda salsa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 95, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.005>

Wang, F., Yin, C.H., Song, Y.P., Li, Q., Tian, C.Y., y Song J. (2018). Reproductive allocation and fruit-set pattern in the euhalophyte *Suaeda salsa* in controlled and field conditions. *Plant Biosystems*, 152(4), 749-758. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1330776>

Wang, X., Yang, P., Gao, Q., Liu, X., Kuang, T., Shen, S., y He, Y. (2008). Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta*, 228, 167-177. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0727-z>

Western, T.L. (2012). The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research*, 22(1), 1–25. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000249>

Xia, L., Zhou, S., Zhang, C., Fu, Z., Wang, A., Zhang, Q., Wang, Y., Liu, X., Wang, X., y Xu, W. (2020). Environment-friendly *Juncus effusus*-based adsorbent with a three-dimensional network structure for highly efficient removal of dyes from wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 259, 120812. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120812>

Xiao, Y., Sun, J., Liu, F., y Xu, T. (2016). Effects of salinity and sulphide on seed germination of three coastal plants. *Flora*, 218, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2015.12.002>

Xu, Y., Zhao, Y., Duan, H., Sui, N., Yuan, F., y Song, J. (2017). Transcriptomic profiling of genes in matured dimorphic seeds of euhalophyte *Suaeda salsa*. *BMC Genomics*, 18, 727. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4104-9>

Yoon, J., Kim, H., Nam, J., y Kim, J. (2011). Optimal environmental range for *Juncus effusus*, an important plant species in an endangered insect species (*Nannopya pygmaea*) habitat in Korea. *Journal of Ecology and Environment*, 34(2), 223-235. <https://doi.org/10.5141/JEFB.2011.024>

Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., Sun, G., y Dai, S. (2011). Physiological and Proteomic Analysis of Salinity Tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*, 10(9), 3852–3870. <https://doi.org/10.1021/pr101102p>

Yuan, F., Guo, J., Shabala, S., y Wang, B. (2019). Reproductive Physiology of Halophytes: Current Standing. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1954. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01954>

Zehra, A., Gul, B., Ansari, R., y Khan, M.A. (2012). Role of calcium in alleviating effect of salinity on germination of *Phragmites karka* seeds. *South African Journal of Botany*, 78, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.05.016>

Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y., y Dai, S. (2012). Mechanisms of Plant Salt Response: Insights from Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11, 49–67. <https://doi.org/10.1021/pr200861w>

Zhang, H., Zhang, G., Lü, X., Zhou, D., y Han, X. (2015). Salt tolerance during seed germination and early seedling stages of 12 halophytes. *Plant Soil*, 388, 229-241. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2322-3>

Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.C., y Yates, J.R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 113, 2343-2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>

Zhao, W., Xu, L. L., Zhang, X., Gong, X. W., Zhu, D. L., Xu, X. H., Wang, F., y Yang, X. L. (2018). Three new phenanthrenes with antimicrobial activities from the aerial parts of *Juncus effusus*. *Fitoterapia*, 130, 247-250. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.09.007>

Zhou, C., Sun, Y., Ma, Z., y Wang, J. (2015). Heterologous expression of *EsSPDS1* in tobacco plants improves drought tolerance with efficient reactive oxygen species scavenging systems. *South African Journal of Botany*, 96, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.10.008>