



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

ABSORCIÓN DE AGUA Y NUTRIENTES
Y RESPUESTA FISIOLÓGICA DE
PLANTAS HALOFITAS Y GLICOFITAS
BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS
SALINO

PRESENTADA POR
AGATHA AGUDELO SÁNCHEZ
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
POR LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE VALENCIA
MENCIÓN TESIS INDUSTRIAL
SEPTIEMBRE 2021



DIRECTORES:

DRA. MICAELA CARVAJAL ALCARAZ

DRA. MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ BALLESTA

DR. JUAN JOSÉ RÍOS RUIZ

ABSORCIÓN DE AGUA Y NUTRIENTES Y RESPUESTA FISIOLÓGICA DE PLANTAS HALOFITAS Y GLICOFITAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

Tesis presentada por

Agatha Agudelo Sánchez

Ingeniera Agrónoma por la Universidad Politécnica de Valencia

MDes en Diseño e Innovación para la Sostenibilidad por Cranfield University

Para obtener el título de

Doctor en Biotecnología

por la Universidad Politécnica de Valencia

Mención Tesis Industrial

Directores:

Dra. Micaela Carvajal Alcaraz

Doctora en Biología por la Universidad de Murcia

Grupo de Aquaporinas

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CSIC)

Dra. María del Carmen Martínez Ballesta

Doctora en Bioquímica por la Universidad de Murcia

Grupo de Hortofloricultura Mediterránea

Universidad Politécnica de Cartagena

Dr. Juan Jose Ríos Ruiz

Doctor en Biología por la Universidad de Granada

Departamento de Fisiología Vegetal

Universidad de Granada

Tutor:

Dr. José Miguel Mulet Salort

Catedrático de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)

Universidad Politécnica de Valencia



ABSTRACT

The increase in the concentration of salts in soils and water is one of the problems that most threatens humanity due to its direct effect on crop productivity. All this in a context of population growth such as humanity has never experienced before. In general terms, the question we want to contribute to is how to deal with salinization in the context of climate change and population growth? More specifically, we study the problems in south-eastern Spain from an approach in which the results can be exploited in the short and medium-term by the business sector.

The region of Murcia is one of the main producing areas in south-eastern Spain where there are also serious salinization problems for various reasons: from the contamination of aquifers by very intensive agricultural practices, to factors such as the proximity to the sea and the high level of the water table, for which the processes of marine intrusion in the aquifers are of relevance. On the other hand, this producing area is among the areas that will be most affected by the effects of climate change, such as increased temperatures, reduced rainfall and rising sea levels.

In this doctoral thesis, it is proposed to use saline water for irrigation and to investigate the implications that this entails at the level of water and nutrient absorption, also studying the physiological changes in the plant to obtain applications that allow economic growth. In this sense, two strategies are approached: on the one hand, the study of halophytic plants, and on the other hand, biostimulation in glycophyte plants.

Most of the productive crops are glycophyte plants, their productions are affected when there are high concentrations of salt in the culture medium. On the contrary, halophyte plants have developed different mechanisms to resist the negative effects of salinity. That is why the direct exploitation of halophytes have been identified as an economic outlet for the salt-affected areas. Another way of mitigating the effects of climate change is the development of biostimulation to increase resistance to stresses or to increase the concentration of bioactive compounds in food. A biostimulant or elicitor is any substance capable of activating the defence mechanisms of plants, activating the metabolism, and increasing the synthesis of phytochemicals or secondary metabolites. It has been suggested that research in this sense can lead to obtaining important results for industrial applications, contributing to food sustainability, and obtaining raw materials. In addition, there is an interest in the consumption of foods with superior nutritional characteristics, both in traditional crops and in the introduction of new plant species. Consumers pay increasing attention to the content of compounds such as phenolics, unsaturated fatty acids, or glucosinolates. Mainly because of the numerous studies relating them to good health properties. For the studies carried out in this doctoral thesis, 6 plant species were selected that were representative of the different behaviours towards salinity, that were specific to the selected location (The region of Murcia), and of interest to the company promoting the research project (Sakata Seed

Ibérica). The species studied were: *Brassica oleracea* L., *Brassica rapa* L., *Cakile maritima*, *Salicornia fruticosa*, and *Atriplex halimus*.

The first objective of this thesis focused on the analysis of the effects of salinity on the species under study. More specifically trying to identify traits that could serve to discriminate between species and/or cultivars that best respond to salinity. Moreover, the interrelationships between different physiological traits in response to the salinity were statistically analysed using a Discriminant Canonical Analysis (DCA), in which a relationship between growth and succulence of the leaves were observed as a measure of adaptation to salinity. It was also observed that the variations in the accumulation of Na^+ to the detriment of the accumulation of K^+ were characteristic of the response to the salinity of *Salicornia fruticosa* and *Atriplex halimus*, while for *Brassica rapa* L. and *Cakile maritima* the variations of relevance was in the content of Ca^{2+} , S and P. Patterns such as ion accumulation, protein content, and unsaturated fatty acids in response to salinity can be used to discriminate between different responses to salt stress. On the other hand, the effect of salinity on the concentration and profile of glucosinolates of different cultivars of broccoli (*Brassica oleracea* L.) indifferent productive periods were also studied. The different levels of sensitivity to the salinity of the cultivars were identified, being Marathon and Triton the ones that presented the best behaviours. The stimulating effect of stresses such as temperature and salinity on the glucosinolate profile and the possibility of inducing glucosinolates with phenolics complexes that had not been previously described in Brassicales were also observed.

The second objective focused on the search for forms of economic exploitation of the different physiological responses. On the one hand, a methodology was developed that allowed increasing the glucosinolate content of broccoli plants, without affecting the production or any organoleptic parameter of the commercial organ. This was possible through the application of methyl jasmonate and a polyether polysiloxane in foliar form.

On the other hand, for the halophyte species, an analysis was carried out to determine their aptitude for possible culinary and industrial uses. It was concluded that the *Atriplex* spp. could be a good source of functional ingredients because they are the halophyte with the highest resistance to salinity and because of their good nutritional properties. Another productive option could be *Salicornia* spp. which can be used as a horticultural product that is sold freshly. In moderate salinities, *Cakile maritima* could be nutritionally interesting due to its content in Zn and antioxidants, especially flavonoids.

RESUMEN

El incremento en la concentración de sales en suelos y agua es una de las problemáticas que más amenazan a la humanidad por su efecto directo sobre la productividad de las cosechas. Todo esto en un contexto de crecimiento poblacional como nunca ha experimentado la humanidad. En líneas generales la pregunta a la que queremos contribuir es ¿cómo enfrentarnos a una situación de salinización en un contexto de cambio climático y crecimiento demográfico? Más concretamente estudiamos la problemática en el sureste español desde un enfoque en que los resultados puedan ser explotados en el corto y medio plazo por el sector empresarial.

La Región de Murcia es una de las principales zonas productoras del sureste español donde además existen graves problemas de salinización por diversos motivos; desde la contaminación de acuíferos por prácticas agrícolas muy intensivas, hasta factores como la cercanía al mar y el alto nivel de la capa freática, por lo que los procesos de intrusión marina en los acuíferos son de relevancia. Por otro lado, esta zona productora se encuentra entre las áreas que se verán más afectadas por los efectos del cambio climático como son el incremento de las temperaturas, la reducción de las precipitaciones y la subida del nivel del mar.

En la presente tesis doctoral se propone utilizar aguas salinas para riego e investigar las implicaciones que ello conlleva a nivel de absorción de agua y nutrientes, estudiando también los cambios fisiológicos en la planta para obtener aplicaciones que permitan el crecimiento económico. En este sentido se abordan dos estrategias: por un lado, el estudio de plantas halofitas, y por otro, la bioestimulación en plantas glicofitas.

La mayoría de los cultivos productivos son plantas glicofitas, ven afectadas sus producciones cuando hay elevadas concentraciones de sal en el medio de cultivo. Por el contrario, las plantas halofitas han desarrollado diferentes mecanismos para resistir los efectos negativos de la salinidad. Es por ello que la explotación directa de halofitas se ha identificado como una salida económica para las zonas afectadas. Otra forma de mitigación de los efectos del cambio climático es el desarrollo de la bioestimulación para incrementar la resistencia a estreses o para incrementar la concentración de compuestos bioactivos en los alimentos. Un bioestimulador o elicitador es cualquier sustancia capaz de activar los mecanismos de defensa las plantas, accionando el metabolismo e incrementando la síntesis de fitoquímicos o metabolitos secundarios. Se ha sugerido que las investigaciones en este sentido pueden llevar a la obtención de resultados importantes tanto para las aplicaciones industriales, contribuir a la sostenibilidad alimentaria y a la obtención de materias primas. Además, existe un interés por el consumo de alimentos con características nutricionales superiores, tanto en cultivos tradicionales como en la introducción de nuevas especies vegetales. El consumidor presta cada vez mayor atención al contenido en compuestos como pueden ser los fenólicos, los ácidos grasos insaturados o los

glucosinolatos. Principalmente por los numerosos estudios relacionándolos con buenas propiedades para la salud. Para los estudios realizados en la presente tesis doctoral, se seleccionaron 6 especies vegetales que fuesen representativas de los diferentes comportamientos frente a la salinidad, que fuesen propias de la localización seleccionada (Región de Murcia) y de interés para la empresa promotora del proyecto de investigación (Sakata Seed Ibérica). Las especies estudiadas fueron: *Brassica oleracea* L., *Brassica rapa* L., *Cakile maritima*, *Salicornia fruticosa* y *Atriplex halimus*.

El primer objetivo se centró en el análisis de los efectos de la salinidad sobre las especies objeto de estudio. Más concretamente intentando identificar rasgos que pudiesen servir para discriminar entre especies y/o cultivares las mejores respuestas a la salinidad. Por un lado, las interrelaciones entre distintos rasgos fisiológicos en respuesta a la salinidad se analizaron estadísticamente mediante un *Discriminant Canonical Analysis* (DCA), en el que se observó una relación entre el crecimiento y la succulencia de las hojas como medida de adaptación a la salinidad. También se observó que las variaciones en la acumulación de Na^+ en detrimento de la acumulación de K^+ fueron características de la respuesta a salinidad de *Salicornia fruticosa* y *Atriplex halimus*, mientras que para *Brassica rapa* L. y *Cakile maritima* las variaciones de relevancia fueron en el contenido de Ca^{2+} , S y P. Patrones como la acumulación de iones, el contenido en proteínas y ácidos grasos insaturados en respuesta a la salinidad pueden emplearse para discriminar entre distintas respuestas al estrés salino. Por otro lado, se estudió el efecto de la salinidad sobre la concentración y el perfil de glucosinolatos de distintos cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* L.) en distintos periodos productivos. Se identificaron los diferentes niveles de sensibilidad a salinidad de los cultivares, siendo Marathon y Tritón los que presentaron los mejores comportamientos. También se observó el efecto estimulador de los estreses como la temperatura y la salinidad sobre el perfil de glucosinolatos y la posibilidad de inducir complejos de glucosinolatos con fenólicos que no habían sido descritos previamente en Brassicales.

El segundo objetivo se centró en la búsqueda de formas de explotación económica de las distintas respuestas fisiológicas. Por un lado, se desarrolló una metodología que permitiese incrementar el contenido en glucosinolatos de las plantas de brócoli, sin que se viese en detrimento ni la producción ni los parámetros organolépticos del órgano comercial, lo cual fue posible mediante la aplicación de metil jasmonato y un políeter polisiloxano de forma foliar.

Por otro lado, para las especies halofitas se llevó a cabo un análisis para determinar su aptitud para posibles usos tanto culinarios como a nivel industrial. Se concluyó que las *Atriplex* spp. pueden suponer una buena fuente de ingredientes funcionales por ser la halofita con mayor resistencia a la salinidad y por las buenas propiedades nutricionales. Otra opción productiva pueden ser *Salicornia* spp. que pueden emplearse como producto hortícola para su venta en fresco. En salinidades moderadas, *Cakile maritima* puede ser nutricionalmente interesante por su contenido en Zn y antioxidantes, especialmente flavonoides.

RESUM

L'augment de la concentració de sals en sòls i aigua és un dels problemes que més amenacen la humanitat pel seu efecte directe sobre la productivitat dels cultius. Tot això en un context de creixement poblacional com la humanitat no ha experimentat mai abans. En termes generals, la qüestió a la qual volem contribuir és: com afrontar una situació de salinització en un context de canvi climàtic i creixement de la població? Més concretament, hem estudiat els problemes del sud-est d'Espanya des d'un enfocament en què els resultats poden ser explotats a curt i mitjà termini pel sector empresarial.

La Regió de Múrcia és una de les principals zones productores del sud-est d'Espanya on també hi ha greus problemes de salinització per diversos motius; des d'evitar la contaminació d'aqüífers mitjançant pràctiques agrícoles molt intensives, fins factors com la proximitat a la mar i l'alt nivell de la capa freàtica, de manera que el procés d'intrusió marina en aqüífers és de rellevància. D'altra banda, aquesta zona productora es troba entre les zones més afectades pels efectes del canvi climàtic com l'augment de les temperatures, la reducció de les precipitacions i l'augment del nivell del mar.

En aquesta tesi s'utilitzen aigües salines per al reg i s'investiguen les implicacions que això comporta a nivell d'absorció d'aigua i nutrients, estudiant també els canvis fisiològics en la planta per obtenir aplicacions que permetin el creixement econòmic. En aquest sentit s'aborden dues estratègies: d'una banda, l'estudi de les plantes d'halòfites i, de l'altra, la bioestimulació en plantes glicòfites.

La majoria dels cultius productius són plantes glicòfites, la seva producció es veu afectada quan hi ha altes concentracions de sal en el medi de creixement. Per contra, les plantes halòfites han desenvolupat diferents mecanismes per resistir els efectes negatius de la salinitat. És per això que l'explotació directa d'halòfites s'ha identificat com una sortida econòmica per a les zones afectades. Una altra forma de mitigació dels efectes del canvi climàtic és el desenvolupament de bioestimulació per augmentar la resistència a estrès o augmentar la concentració de compostos bioactius en els aliments. Un bioestimulador o elicitor és qualsevol substància capaç d'activar els mecanismes de defensa de les plantes, activar el metabolisme i augmentar la síntesi de fitoquímics o metabòlits secundaris. S'ha suggerit que la recerca en aquest sentit pot conduir a l'obtenció de resultats importants tant per a aplicacions industrials, com per a la sostenibilitat alimentària i per a l'obtenció de matèries primeres. A més, hi ha un interès pel consum d'aliments amb característiques nutricionals superiors, tant en cultius tradicionals com en la introducció de noves espècies vegetals. El consumidor presta cada vegada més atenció al contingut de compostos com els fenòlics, els àcids grassos insaturats o els glucosinolats. Principalment pels nombrosos estudis relacionats amb les bones propietats sanitàries. Per als estudis realitzats en aquesta tesi doctoral es van seleccionar 6 espècies vegetals representatives dels diferents comportaments contra la salinitat, típics de la ubicació seleccionada (Regió de Múrcia) i d'interès per a

l'empresa promotora del projecte de recerca (Sakata Seed Ibérica). Les espècies estudiades van ser: *Brassica oleracea* L., *Brassica rapa* L., *Cakile maritima*, *Salicornia fruticosa* i *Atriplex halimus*.

El primer objectiu es va centrar en l'anàlisi dels efectes de la salinitat sobre les espècies objecte d'estudi. Més específicament tractant d'identificar trets que podrien servir per discriminar entre espècies i/o cultivars amb les millors respostes a la salinitat. D'una banda, les interrelacions entre diferents trets fisiològics en resposta a la salinitat van ser analitzades estadísticament per una Anàlisi *Canònica Discriminant* (DCA), en la qual s'observava una relació entre el creixement i la suculència de les fulles com a mesura d'adaptació a la salinitat. També es va observar que les variacions en l'acumulació de Na⁺ en detriment de l'acumulació de K⁺ eren trets característics de la resposta a la salinitat de *Salicornia fruticosa* i *Atriplex halimus*, mentre que per a *Brassica rapa* L. i *Cakile maritima* les variacions rellevants estaven en el contingut de Ca²⁺, S i P. Patrons com l'acumulació d'ions, el contingut de proteïnes i àcids grassos insaturats en resposta a la salinitat es poden utilitzar per discriminar entre diferents respostes a l'estrès salí. D'altra banda, s'ha estudiat l'efecte de la salinitat en la concentració i perfil de glucosinolats de diferents cultius de bròquil (*Brassica oleracea* L.) en diferents períodes de producció. Es van identificar els diferents nivells de sensibilitat a la salinitat dels cultivars, sent Marathon i Triton els que van presentar els millors comportaments. També vam observar l'efecte estimulador d'estrès com la temperatura i la salinitat en el perfil dels glucosinolats i la possibilitat d'induir complexos glucosinolatats amb fenòlics que no s'havien descrit prèviament en brassicales.

El segon objectiu es va centrar en la recerca de formes d'explotació econòmica de les diferents respostes fisiològiques. D'una banda, es va desenvolupar una metodologia que permetia augmentar el contingut de glucosinolat de plantes de bròquil, sense perjudici ni de la producció ni dels paràmetres organolèptics de l'òrgancomercial, que va ser possible mitjançant l'aplicació de jasmonat de metil i un polièter de polisiloxà de forma foliar.

D'altra banda, per a les espècies d'halòfits, es va realitzar una anàlisi per determinar la seva idoneïtat per a possibles usos tant culinaris com industrials. Es va concloure que *Atriplex* spp. pot ser una bona font d'ingredients funcionals perquè és l'halòfit amb major resistència a la salinitat i bones propietats nutricionals. Una altra opció productiva pot ser *Salicornia* spp. que es pot utilitzar com a producte hortícola per a la venda fresca. En salinitats moderades, *Cakile maritima* pot ser nutricionalment interessant pel seu contingut de Zn i antioxidants, especialment flavonoides.

AGRADECIMIENTOS

Estoy profundamente agradecida por todo el camino recorrido e incluso por los obstáculos encontrados. Son muchas las personas y experiencias que han permitido que llegase hasta aquí. Agradezco cada día a Dios por haberme dado la fuerza, a mi familia, a mis apoyos; por haber puesto en mi camino a tanta gente maravillosa.

La presente tesis doctoral se enmarca en un proyecto de investigación llamado *IMBRASICA – Implementación Genética de Variedades de Brásicas para su Utilización en la Mejora de la Respuesta a Estréses Bióticos y Abióticos*. Los fondos para la realización de esta investigación proceden de varias instituciones: Por un lado, del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, mediante la convocatoria Proyectos Restos Colaboración 2015 (RTC-2015-3536-2) que contó con Fondos FEDER. Por otro lado, de fondos para la investigación de la empresa Sakata Seed Ibérica.

Quiero agradecer de forma muy especial al director general de Sakata Seed Ibérica, Javier Bernabeu, por ser un mentor para mí y por permitirme realizar esta tesis doctoral. No solo me ha motivado a ser mejor profesional sino también mejor persona.

A mis directores, Juan José Ríos, María del Carmen Martínez Ballesta y Micaela Carvajal, quienes me han servido de ejemplo de lo que es el amor por la investigación y la ciencia.

A mi tutor, José Miguel Mulet, quien me convenció de que era capaz y me ofreció todo su apoyo durante este viaje.

Finalmente, nunca encontraré suficientes palabras para agradecer a mis familiares. De todos he aprendido, pero son demasiados para nombrarlos. Mi padre no duda en motivarme para conseguir lo que me proponga. Mi hermano, no solo me ha aguantado todo este tiempo, sino que ha sido todo un ejemplo. Y muy especialmente mi madre, nadie cree en mí como lo hace ella. Me enseñó el valor del trabajo duro y la constancia. Jamás le podré devolver todo lo que me ha dado.

*Dedico esta tesis a mi madre,
porque mis éxitos son también suyos.*

*Gracias,
Agatha.*

ÍNDICE

ABSTRACT	I
RESUMEN	III
RESUM	V
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE	XI
LISTADO DE FIGURAS	XV
LISTADO DE TABLAS	XVII
1 ANTECEDENTES Y CONTEXTO	1
1.1 PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD	1
1.2 SALINIDAD EN UN CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO	1
1.3 IMPACTO SOCIOECONÓMICO	3
1.4 ESTRATEGIAS ABORDADAS	4
1.4.1 PLANTAS HALOFITAS	4
1.4.2 BIOESTIMULADORES EN PLANTAS	6
1.5 NUEVOS ENFOQUES EN ALIMENTACIÓN	7
1.6 EL SECTOR PRIVADO – SAKATA	8
1.7 LOCALIZACIÓN Y ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO	9
1.7.1 EL SURESTE ESPAÑOL - LA REGIÓN DE MURCIA	9
1.7.2 ESPECIES SELECCIONADAS	10
2 SINOPSIS	15
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15

3	<u>CAPÍTULO UNO - ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL TRAITS IN THE RESPONSE OF CHENOPODIACEAE, AMARANTHACEAE, AND BRASSICACEAE PLANTS TO SALINITY STRESS</u>	17
	ABSTRACT	18
3.1	INTRODUCTION	19
3.2	MATERIAL AND METHODS	21
3.2.1	PLANT CULTURE	21
3.2.2	GROWTH	21
3.2.3	LEAF PARAMETERS	21
3.2.4	ANALYSIS OF MINERAL ELEMENTS	22
3.2.5	ROOT HYDRAULIC CONDUCTANCE (L_0)	22
3.2.6	LEAF WATER POTENTIAL (Ψ_Ω)	22
3.2.7	OSMOTIC POTENTIAL (Ψ_Π)	22
3.2.8	LEAF TURGOR POTENTIAL (Ψ_T)	22
3.2.9	PROTEIN CONTENT, LIPID EXTRACTION, AND FATTY ACID DETERMINATION	23
3.2.10	CATALASE DETERMINATION	23
3.2.11	STATISTICS ANALYSIS	23
3.3	RESULTS AND DISCUSSION	24
3.3.1	GROWTH	25
3.3.2	LEAF SUCCULENCE AND SALT ACCUMULATION	25
3.3.3	MINERAL ANALYSIS	27
3.3.4	HYDRAULIC PARAMETERS	29
3.3.5	PROTEIN CONTENT, CATALASE ACTIVITY, DOUBLE BOND INDEX, AND FATTY ACIDS	31
3.4	CONCLUSIONS	34
	CONTRIBUTIONS	35
	FUNDING INFORMATION	35
	ACKNOWLEDGEMENTS	35
	APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA	36
	REFERENCES	40
4	<u>CAPÍTULO 2: GROWING BROCCOLI UNDER SALINITY: THE INFLUENCE OF CULTIVAR AND SEASON ON GLUCOSINOLATES CONTENT</u>	47
	ABSTRACT	48
4.1	INTRODUCTION	49
4.2	MATERIALS AND METHODS	50

4.2.1 PLANT MATERIAL AND GROWTH CONDITIONS	50
4.2.2 INTACT GLUCOSINOLATES ANALYSIS	51
4.2.3 STATISTICAL ANALYSIS	51
4.3 RESULTS	51
4.4 DISCUSSION	60
ACKNOWLEDGEMENTS	62
AUTHORS' CONTRIBUTIONS	62
REFERENCES	63
<u>5 COMPOSICIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS EN PLANTAS ADULTAS DEL GÉNERO BRASSICA</u>	<u>67</u>
RESUMEN	68
DESCRIPCIÓN	68
5.1 ANTECEDENTES DE LA INVENCION	69
5.2 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION	72
5.3 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS	76
5.4 EJEMPLOS	76
5.4.1 MATERIAL Y MÉTODOS	76
5.5 REIVINDICACIONES	83
<u>6 CAPÍTULO 4: HALOPHYTES OF THE MEDITERRANEAN BASIN - UNDERUTILIZED SPECIES WITH THE POTENTIAL TO BE NUTRITIOUS CROPS IN THE SCENARIO OF THE CLIMATE CHANGE</u>	<u>87</u>
ABSTRACT	88
6.1 INTRODUCTION	89
6.2 MATERIAL AND METHODS	90
6.2.1 RELATIVE GROWTH RATE	90
6.2.2 ANALYSIS OF MINERAL ELEMENTS	91
6.2.3 PHENOLIC COMPOUNDS	91
6.2.4 PROTEIN AND TOTAL LIPID ANALYSIS	91
6.3 RESULTS	92
6.3.1 RELATIVE GROWTH RATE	92
6.3.2 MINERAL ELEMENTS	92
6.3.3 PHENOLIC CONTENT	93
6.3.4 PROTEIN AND LIPID CONTENT	93
6.4 DISCUSSION	98

6.5 CONCLUSIONS	102
AUTHOR CONTRIBUTIONS	102
FUNDING	103
INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT	103
INFORMED CONSENT STATEMENT	103
ACKNOWLEDGMENTS	103
CONFLICTS OF INTEREST	103
REFERENCES	103
7 <u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	<u>111</u>
8 <u>CONCLUSIONES</u>	<u>119</u>
9 <u>REFERENCIAS</u>	<u>121</u>

LISTADO DE FIGURAS

CAPITULO 1

- Fig. 1. Dry weight (g) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa* plants treated with 0, 100, 200 or 300mM NaCl. Different letters mean significant differences _____ 25
- Fig. 2. Leaf succulence, L_s , ($g\ mm^{-2}$) against leaf Na content (A) and leaf thickness, L_t , (μm) (B) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa* plants treated with _____ 26
- Fig. 3. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity \times species interaction, for macronutrients (A) and micronutrients (B). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (*A.h*=*A. halimus*, *S.f*=*S. fruticosa*, *C.m*=*C. maritima*, and *B.r*=*B. rapa*). The centroids of each group are indicated by the symbol "+". The obligatory halophyte species (*A. halimus* and *S. fruticosa*) are surrounded by dots and dashes (-.-), and the facultative halophyte species (*C. maritima*) and the glycophyte species (*B. rapa*) are surrounded by dotted lines (.....). _____ 27
- Fig. 4. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity \times species interaction, for hydric parameters (LO, water potential, and osmotic potential). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (*A.h*=*A. halimus*, *S.f*=*S. fruticosa*, *C.m*=*C. maritima*, and *B.r*=*B. rapa*). _____ 29
- Fig. 5. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity \times species interaction, for the variables protein, catalase activity (CAT), and double bond index (DBI). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (*A.h*=*A. halimus*, *S.f*=*S. fruticosa*, *C.m*=*C. maritima*, and *B.r*=*B. rapa*). The obligatory halophyte species (*A. halimus* and *S. fruticosa*) are surrounded by dashed lines (- - -), the facultative halophyte species (*C. maritima*) is surrounded by dots and dashes (-.-), and the glycophyte species (*B. rapa*) is surrounded by dotted lines (.....). _____ 31
- Fig. 6. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity \times species interaction, for fatty acids. There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (*A.h*=*A. halimus*, *S.f*=*S. fruticosa*, *C.m*=*C. maritima*, and *B.r*=*B. rapa*). The obligatory halophyte species (*A. halimus* and *S. fruticosa*) are surrounded by continuous lines, the facultative halophyte species (*C. maritima*) is surrounded by dots and dashes (-.-), and the glycophyte species (*B. rapa*) is surrounded by dotted lines (.....). _____ 33

CAPÍTULO 2

- Figure 1. Inflorescence yield of different broccoli cultivars grown in control and saline conditions, in the field, during the (A) autumn, (B) winter, and (C) spring seasons. Bars with different letters show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 5$). _____ 54
- Figure 2. Total GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during the autumn, winter, and spring seasons. For each glucosinolate, different letters show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$). _____ 58

CAPÍTULO 3

FIG. 1	85
FIG. 2	85
FIG. 3	85
FIG. 4	86

CAPÍTULO 4

Figure 1. Relative Growth Rate, RGR ($g \cdot g^{-1} DW \cdot day^{-1}$) of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa* under different salinity treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) after two weeks of treatment. Means ($n = 5 \pm SE$) with different letter are significantly different at p -value < 0.05 , different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison. _____ 92

LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Two-way MANOVA for five groups of variables, where df_1 is the numerator degrees of freedom, df_2 is the denominator df, Pillai is the value of the statistic, $\sim F$ is the approximate value of the F statistic, and P is the probability ($\alpha = 0.05$).	24
Table S 1. The macronutrients content ($g \cdot 100g^{-1}$ DW) in <i>A. halimus</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>C. maritima</i> and <i>B. rapa</i> . Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.	36
Table S 2. The micronutrient content ($mg \cdot kg^{-1}$ DW) in <i>A. halimus</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>C. maritima</i> and <i>B. rapa</i> . Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.	36
Table S 3. Hydraulic parameters (root hydraulic conductance (L0) ($mg \cdot g \text{ root } FW^{-1} \cdot h^{-1} \text{ MPa}^{-1}$), leaf water potential (Ψ_w) (MPa), osmolarity of exuded sap (Ψ_π) (MPa), leaf turgor potential (Ψ_t) (MPa)) in <i>A. halimus</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>C. maritima</i> and <i>B. rapa</i> . Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.	37
Table S 4. Protein content ($mg \cdot g^{-1}$ DW), double bond index of fatty acids (DBI), and CAT activity ($UC \cdot mg^{-1} \text{ protein } \text{min}^{-1}$) in <i>A. halimus</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>C. maritima</i> and <i>B. rapa</i> . Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.	37
Table S 5. The fatty acid percentage (%) in <i>A. halimus</i> , <i>S. fruticosa</i> , <i>C. maritima</i> and <i>B. rapa</i> . Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.	38
Table S 6. Coefficients of total canonical structure of the first three canonical functions and variation explained by each vector variable for the species \times salinity interaction for each group of variables.	39

CAPÍTULO 2

Table 1. Average values of environmental conditions in each month during experiments.	50
Table 2. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during autumn season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).	55
Table 3. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during winter season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).	56
Table 4. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during spring season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).	57
Table 5. Cinnamoyl-indol-GLs in different organs of broccoli plants grown under control and saline stress in the field during the autumn, winter, and spring seasons. Different letters in a column and treatment show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).	59

CAPÍTULO 3

Tabla A. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura. _____	70
Tabla 1. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en hojas de distintas variedades de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>) registradas en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos. _____	79
Tabla 2. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en inflorescencias de distintas variedades de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>) registrados en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos. _____	80
Tabla 3. Concentración de los glucosinolatos en hojas e inflorescencias de la variedad <i>Parthenon</i> en el ensayo en invernadero utilizando distintos tratamientos _____	81
Tabla 4. Resultados del porcentaje de inflorescencias comerciales de la variedad <i>Parthenon</i> en el ensayo en invernadero _____	82

CAPÍTULO 4

Table 1. Macronutrient content in the leaves and stems of <i>Atriplex halimus</i> , <i>Cakile maritima</i> , and <i>Salicornia fruticosa</i> grown with different salinity doses (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) for two weeks. Cation concentrations are expressed as mg/100 g ⁻¹ DW (mean ± SE, n = 5). Values followed by different letters are significantly different at p-value < 0.05; upper-case letters indicate the differences among the salinity treatments for the same species, lower-case letters indicate the differences among the species for the same treatment. The Tukey HSD test was used for the comparison of means. _____	94
Table 2. Micronutrients content in the leaves and stems of <i>Atriplex halimus</i> , <i>Cakile maritima</i> , and <i>Salicornia fruticosa</i> grown with different salinity doses (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) for two weeks. Cation concentrations are expressed as mg 100 g ⁻¹ DW (mean ± SE, n = 5). Values followed by different letters are significantly different at p < 0.05; upper-case letters indicate the differences among the salinity treatments for the same species, lower-case letters indicate the differences among the species for the same treatment. The Tukey HSD test was used for the comparison of means. _____	95
Table 3. Flavonoid glycosides, Sinapic and Chlorogenic acid derivatives, and Total (as the sum of all) in the leaves and stems of <i>Atriplex halimus</i> , <i>Cakile maritima</i> , and <i>Salicornia fruticosa</i> , (mg g ⁻¹ DW) under different treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Means (n = 5 ± SE) with different letter are significantly different at p-value < 0.05; different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison. ____	96
Table 4. Protein and Lipid content in the leaves and stems of <i>Atriplex halimus</i> , <i>Cakile maritima</i> , and <i>Salicornia fruticosa</i> (mg g ⁻¹ DW) under different treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Means (n = 5 ± SE) with different letter are significantly different at p-value < 0.05, different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison. _____	97

1 ANTECEDENTES Y CONTEXTO

1.1 PROBLEMÁTICA DE LA SALINIDAD

El incremento en la concentración de sales en suelos y agua es un problema creciente en todo el mundo (Rengasamy, 2006; Herbert *et al.*, 2015; Kaushal *et al.*, 2018). La progresiva salinización de los recursos ha sido sucesivamente identificada como una de las problemáticas que más amenazan a la humanidad. Efectivamente, de los más de 5000 cultivos que se cosechan alrededor del mundo para la producción de alimentos, muy pocos son capaces de sobrevivir con aguas de riego con un contenido en sales superior al 0.5% y la mayoría ven seriamente afectada su productividad cuando la salinidad alcanza el 0.1% (Council, 1990). Esto se debe a que la salinidad afecta al crecimiento, a la nutrición y a las relaciones hídricas de las plantas. El estrés salino se caracteriza por producir una disminución del potencial osmótico, alterar el equilibrio nutricional, producir toxicidad específicamente relacionada a la acumulación de ciertos iones y/o por la combinación de los efectos anteriores (Shannon and Grieve, 1998; George, Horst and Neumann, 2011; Khan *et al.*, 2020).

El desconocimiento y la falta de aplicación de técnicas más sostenibles con los recursos hídricos y del suelo han contribuido a que la problemática se agrave. Más concretamente, se ha relacionado el uso inadecuado de fertilizantes químicos y la sobreexplotación de acuíferos con que ya en 2003 se estimase que la tercera parte de la superficie cultivable de la tierra estaba afectada por salinidad (Azcón-Bieto and Talón, 2003).

Según las observaciones de Corwin (2021), la salinización del suelo en zonas productoras, especialmente en zonas costeras, se debe principalmente a la intrusión marina por la subida del nivel del mar (directamente relacionado con el cambio climático), la sobre-explotación de acuíferos (relacionado con largos periodos de sequía) y la salinización del subsuelo por lixiviados de enmiendas y fitosanitarios de las explotaciones agrarias (malas prácticas agrarias).

1.2 SALINIDAD EN UN CONTEXTO DE CAMBIO CLIMÁTICO

Uno de los principios básicos de la revolución verde fue la optimización de los recursos mediante la selección de los suelos más productivos para la producción de alimentos. Este planteamiento junto con el empleo de variedades más productivas y de nuevas técnicas de cultivo permitieron incrementar la producción de alimentos sin tener que deforestar amplias áreas forestales. De esta manera se pudo proteger una mayor superficie dedicadas a espacios naturales y reservorio de fauna y flora. De hecho, este planteamiento fue premiado en la persona del Dr. Norman Ernest Borlaug, quién obtuvo el premio nobel de la paz por su trabajo en la investigación sobre el incremento de la productividad en cultivo s de trigo (Iwanaga, 2009). A este ingeniero agrónomo se le ha llamado "el hombre que salvó mil millones de vidas" ya que consiguió que la producción de este alimento superase la demanda exigida en su

momento. Recientemente, muchos científicos y políticos han puesto de manifiesto la necesidad de que se produzca una nueva revolución verde para poder hacer frente a los retos que se plantean actualmente en alimentación. Estos desafíos se recogieron en los objetivos para el desarrollo sostenible que incorpora las lecciones aprendidas de la primera revolución verde y recoge los nuevos retos. Se estimaba que la producción de alimentos tendría que incrementar en torno el 38% en 2025 y al 57% en 2050 (ABROL, 2004). No obstante, a falta de datos oficiales más actualizados se sabe que las expectativas eran de hecho optimistas, ya que se esperaba que la población alcanzase los 9500 millones en 2050, cuando ya en 2019 las estimaciones actualizan este dato a 10 000 millones de habitantes, lo que supone tener que incrementar la producción de alimentos en un 70% para el 2050 (Ranganathan *et al.*, 2018)

Actualmente, las tierras de cultivo más productivas ya están siendo explotadas y no se podrá disponer de nuevas zonas productoras para incrementar el suministro de alimentos. A todo esto, hay que sumar la problemática de la degradación de suelos, la desertificación y los efectos que el cambio climático puede tener sobre la producción de alimentos. La degradación de los suelos repercute directamente en la agricultura, al disminuir los rendimientos de los cultivos. Uno de los principales motivos por el cual los suelos pierden productividad es la salinización. La salinización de suelos se produce por diversos motivos, desde la intrusión marina en zonas de costa hasta el uso de sistemas de riego y/o drenajes inadecuados, pasando por sistemas inadecuados de fertilización y manejo (Shainberg and Shalhevet, 1984).

En zonas productoras como la Región de Murcia, en el sureste español, la agricultura intensiva, especialmente relacionada con la concentración masiva de invernaderos, ha provocado la generación de grandes cantidades de residuos líquidos y sólidos (Ranganathan *et al.*, 2018). Estos vertidos de fertilizantes y pesticidas han contribuido significativamente a la salinización de aguas subterráneas y superficiales, llegando a contaminar de forma significativa la laguna del Mar Menor. Esta situación incrementa la necesidad de agua de riego en las producciones ya que estas sales introducidas por el fertirriego deben ser lavadas para evitar que se acumulen cerca de las raíces de las plantas. Para esto, se debe hacer una aportación adicional de agua durante el riego que aleje estas zonas de acumulación de sales de las raíces y así evitar los efectos negativos sobre la productividad. Estos efectos son de especial relevancia cuando se juntan con factores como la alta evapotranspiración (relacionado con las altas temperaturas de la región) o la baja conductancia eléctrica de suelos sódicos o ricos en arcillas (Rengasamy, 2006). Esta aportación adicional de agua puede constituir un factor limitante; teniendo en cuenta que a nivel mundial el agua se ha convertido en un recurso escaso en grandes regiones, especialmente en zonas áridas y semiáridas del planeta. Es especialmente significativo que muchas de las principales zonas productoras de alimentos coinciden con las zonas que más se ven afectadas por la escasez de agua (FAO, 2017).

En lo que se refiere a proyecciones a futuro, se están empleando diferentes metodologías y complejos modelos climáticos para realizar proyecciones para los próximos 100 años. Si bien estimar el impacto del cambio climático sobre la disponibilidad de recursos hídricos y su respectiva relación directa con la producción de alimentos es complicada, estos modelos son de gran utilidad para poder tomar decisiones tanto a nivel de política territorial como de apoyo a la investigación (Fung, Lopez and New, 2010). De manera generalizada se esperan cambios importantes en el patrón de precipitaciones, con disminuciones entorno al 30% en verano y al 10% en invierno para 2100. Es especialmente significativo que esta situación afectará principalmente al sureste del Mediterráneo, donde se estima que se registrará la disminución en precipitaciones más significativa, entorno al 60%. Precisamente estas áreas presentaran también el incremento más importante en temperaturas (Orlowsky and Seneviratne, 2012).

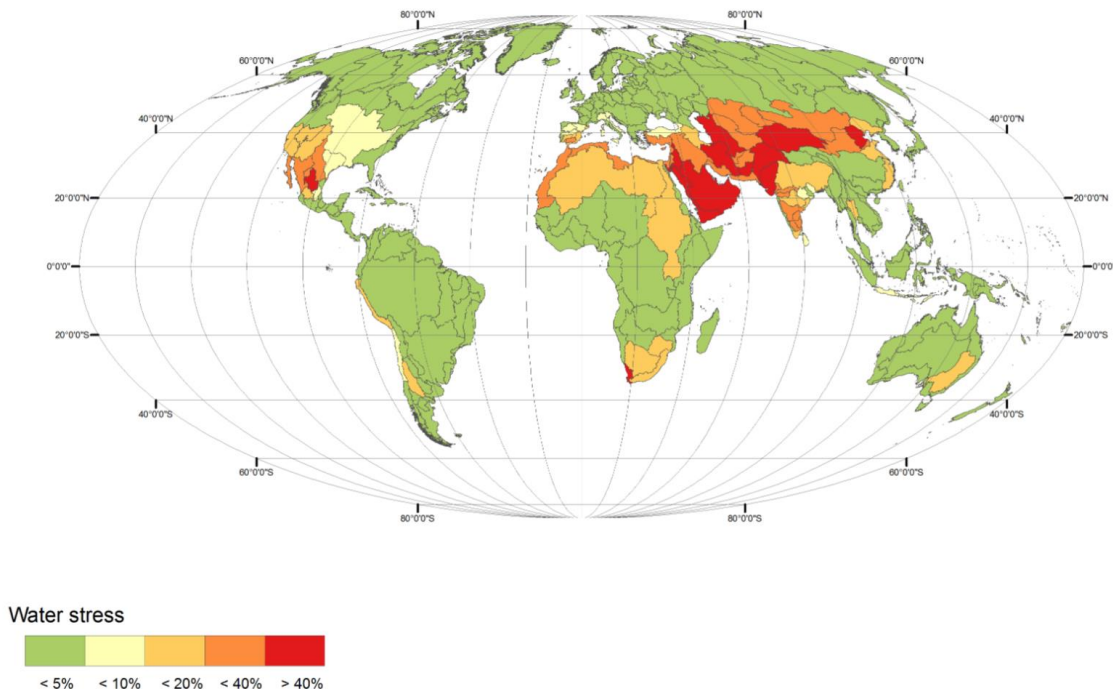


Ilustración 1. Estrés hídrico por cuenca fluvial principal, expresado como porcentaje de incremento en la evaporación debido al riego respecto de la generada por el agua subterránea y los recursos hídricos superficiales (Hoogeveen *et al.*, 2015).

1.3 IMPACTO SOCIOECONÓMICO

El efecto de la salinidad sobre los cultivos se ha relacionado a grandes catástrofes para el desarrollo de la sociedad. Por ejemplo, la salinización de suelos en el sur de Mesopotamia y en grandes extensiones de terreno del valle Tigris-Éufrates ha sido directamente relacionada con la destrucción de antiguas civilizaciones que hasta la fecha habían experimentado un desarrollo y crecimiento que en nada hacían presagiar su destino (Jacobsen and Adams, 1958). Más recientemente, el efecto socioeconómico de cambios en la productividad de los cultivos debido a factores como la salinización de suelos ha sido objeto de estudio por diversos autores. De hecho, las pérdidas económicas pueden

alcanzar las principales zonas productoras se han estimado en millones según la revisión bibliográfica realizada por Qadir *et al.* (2014). Mukhopadhyay *et al.* (2021) sugieren que las pérdidas económicas son de alrededor del 15-69% respecto de las producciones no afectadas por salinidad, pero que estas serían mucho mayores si se tuviesen en cuenta factores como la pérdida de empleo, la pérdida de infraestructura o el coste medioambiental asociado. Todo esto tiene un impacto directo sobre las poblaciones, como es el caso de Bangladesh donde Chen and Mueller (2018) sugieren que existe una relación entre los procesos de salinización de suelos y acuíferos y las migraciones internas e internacionales de la población de Bangladesh, estando ésta directamente relacionada con la disminución de la productividad de las cosechas.

En conclusión, la problemática de la salinidad es de extrema importancia tanto a nivel económico como social y medioambiental. Además, el contexto actual es más complejo y con peores previsiones que en la primera revolución verde. No obstante, el problema al que se enfrenta la humanidad sigue siendo el mismo: cómo alimentar a una población creciente con los recursos disponibles.

1.4 ESTRATEGIAS ABORDADAS

1.4.1 PLANTAS HALOFITAS

Para satisfacer la creciente demanda de alimentos va a ser necesario recurrir a zonas productoras con condiciones poco favorables tanto en temperatura como de acceso a agua y en condiciones de salinidad. Frente a esta situación, el empleo de plantas halofitas se presenta como una oportunidad tanto para su uso como alimento o fuente de materia prima de forma directa en agricultura salina (Panta *et al.*, 2014) o mediante de domesticación y mejora de estas especies (Flowers and Muscolo, 2015; Khan *et al.*, 2020). Por otro lado, también pueden suponer una oportunidad para la identificación de genes, zonas del genoma o mecanismos que puedan ser explotados por mejoradores genéticos para incrementar la tolerancia en cultivos productivos (Munns and Tester, 2008; Khan *et al.*, 2020). En tal sentido, se ha sugerido la posibilidad de emplear técnicas de transgénesis para incrementar la tolerancia a salinidad de los cultivos (Mukhopadhyay *et al.*, 2021). Todo esto es debido a que las plantas halofitas, a diferencia de las plantas glicofitas, son capaces de crecer, reproducirse y completar su ciclo de vida en condiciones de elevada salinidad, más de 200mM NaCl (Flowers, Hajibagheri and Clipson, 1986). Aunado a esto, las plantas halofitas son de especial interés ya que no solo presentan caracteres de resistencia a salinidad sino que también a sequía y a altas temperaturas (Munns, 2011). Esto es de gran relevancia dada las previsiones en cuanto a incremento de las sequías y temperaturas que experimentará el planeta. De hecho, la década de 2009 a 2019 ha sido la más cálida desde que se tienen registros (United Nations, 2020).

Los efectos negativos de la salinidad en las plantas van desde estrés producido por la disminución del potencial osmótico de la solución del suelo, desequilibrios nutricionales y el efecto

tóxico de la acumulación de algunos iones, hasta la combinación de todos estos mayor o menor medida (Shannon and Grieve, 1998; Flowers, Galal and Bromham, 2010). Las plantas halofitas han desarrollado diferentes mecanismos para resistir los efectos negativos de desarrollarse en presencia de concentraciones elevadas de sal (Flowers, Galal and Bromham, 2010). Entre los más comunes se encuentran:

La compartimentación de iones: Se trata de una acumulación de iones en zonas donde no supongan un problema de toxicidad y no afecten al equilibrio osmótico de las plantas. Muy habitualmente, el sodio es acumulado en células modificadas localizadas en la superficie de las hojas y de los tallos, denominadas tricomas. En algunas especies estas sales son posteriormente excretadas a la superficie. Este mecanismo lo emplea por ejemplo *Mesembryanthemum crystallinum* L., la cual realiza un secuestro del sodio empleando un intercambiador de sodio/protones (Na^+/H^+) que es activado por la bomba de protones del tonoplasto V-ATPasa (Barkla *et al.*, 2000). De esta manera, el Na^+ es almacenado en vacuolas que lo transportan a las partes maduras de la planta donde se acumulan y excretan.

Los transportadores iónicos: Se ha identificado que la acción coordinada de sensores, bombas de iones y canales situados en las membranas, se puede revertir el flujo de Na^+ . Uno de estos mecanismos está relacionado con la actividad de la H^+ ATPasa; en halofitas como *Atriplex lentiformis* y *Chenopodium quinoa*, la tolerancia a salinidad se ha relacionado directamente con capacidad de regular rápidamente al alza la actividad de la H^+ ATPasa de la membrana plasmática (Bose *et al.*, 2015). También se han identificado canales que son más selectivos con el K^+ en detrimento del Na^+ , los denominados HKT (*high affinity K⁺ transporters*). Un ejemplo de estos transportadores es el *OsHKT2;1* del arroz, del cual se ha demostrado una mayor expresión en cultivares de arroz resistente a salinidad que en los cultivares sensibles (Barkla *et al.*, 2000).

Cambios metabólicos: La salinidad induce la activación de genes con capacidad biosintética de ABA, el ABA está involucrado en complejas rutas metabólicas que reestablecen el equilibrio iónico a nivel celular (Tuteja, 2007). Por otro lado, la presencia de sales fomenta las reacciones oxidativas en las plantas. Las ROS que se generan en estas reacciones son reactivas con las moléculas biológicas, causando daños celulares y desordenes metabólicos. Para hacer frente a estos, muchas halofitas incrementan la síntesis de moléculas antioxidantes.

Cabe destacar que muchos de los rasgos identificados en las halofitas que les aportan esa tolerancia a salinidad, son comunes también para la resistencia a sequía (Munns, 2011). En efecto, la mayoría de las plantas halofitas son también xerofitas, lo que quizá esté relacionado con las mismas rutas de tolerancia-estrés (Tuteja, 2007).

El futuro de las aplicaciones genéticas para incrementar la productividad de los cultivos frente a salinidad y sequía dependerá en gran medida de poder entender fisiológicamente los mecanismos de

resistencia a estrés y establecer experimentos para su evaluación (Munns, 2011). Uno de los retos será el de establecer metodologías de evaluación que pueden emplearse para discriminar el nivel de resistencia del material vegetal en experimentos de campo, solo entonces se podrá emplear en programas de mejora genética vegetal (Munns *et al.*, 2016).

La explotación directa de halofitas también se ha identificado como una salida económica para las zonas afectas por salinidad, tanto para su uso como forraje, como fuente de aceites o componentes bioactivos e incluso como alimento (BOER, 2008). De hecho, se ha sugerido que de igual manera que se hizo con los cultivos productivos actuales, se podría domesticar plantas halofitas comestibles como método directo de obtención de cultivares resistentes a salinidad (Flowers, 2004; Flowers and Colmer, 2008). Siendo de especial relevancia el contenido nutricional de los productos y el contenido en metabolitos de interés como ácidos grasos omega-3, antioxidantes, compuestos fenólicos y/o el contenido mineral (Petropoulos *et al.*, 2018).

1.4.2 BIOESTIMULADORES EN PLANTAS

Otra forma de enfrentarse a la problemática de cómo mitigar efectos del cambio climático es el desarrollo de la bioestimulación para incrementar la resistencia a estreses o los compuestos bioactivos en los alimentos. Un bioestimulador o elicitor es cualquier sustancia capaz de activar los mecanismos de defensa las plantas, similares a las respuestas a los ataques de patógenos o a las condiciones climáticas adversas, accionando el metabolismo e incrementando la síntesis de fitoquímicos o metabolitos secundarios (du Jardin, 2015; Rouphael and Colla, 2020).

Los bioestimuladores se pueden clasificar por su naturaleza, ya que su procedencia puede ser diversa. Puede ser una sustancia, cuando se trata de una molécula simple o compleja de una fuente natural o sintética; o un inóculo, cuando se trata de microorganismos con efectos beneficiosos en el crecimiento y desarrollo de los vegetales (Przybysz, Gawrońska and Gajc-Wolska, 2014). Además, la bioestimulación se puede producir bien a nivel celular, como puede ser el incremento en la función de algunas proteínas de membrana, el intercambio de agua, la protección de fotosistemas; o a nivel fisiológico, produciendo por ejemplo el incremento de la elongación radicular, la síntesis de compuestos protectores (flavonoides) o el mantenimiento de la tasa fotosintética (Huang *et al.*, 2010; Shabala *et al.*, 2012).

La problemática del cambio climático y su efecto sobre la seguridad alimentaria ha promovido que en la agricultura moderna se empleen estas nuevas estrategias para contribuir a la mejora de las prácticas agrarias y la productividad de los cultivos con cada vez mayor frecuencia (Carletti *et al.*, 2021). Además, existe una gran demanda por productos vegetales o de origen vegetal con un perfil nutricional mejorado, lo que se ha visto reflejado en programas de mejora vegetal con cada vez más líneas trabajo en este sentido (Raskin and Ripoll, 2005). Investigaciones con distintos cultivos y compuestos han sido desarrolladas comprobando la viabilidad de la bioestimulación como herramienta

para hacer frente al estrés salinos. Por ejemplo, extractos de semillas de Moringa fueron usados en cultivos de pimientos donde las plantas biostimuladas presentaron un incremento en la capacidad antioxidante, el contenido en prolina y una disminución en Na^+ en las hojas, presentando un mayor crecimiento en condiciones salinas (Rady, Elrys and Desoky, 2018). Posteriormente, (Bulgari, Franzoni and Ferrante (2019) demostraron que la aplicación de una mezcla de ácidos carboxílicos, óxido de calcio y Zn bajo condiciones de salinidad en cultivo de lechugas, incrementaba la ratio de fotosíntesis, disminuyendo la concentración de nitratos en las hojas e incrementando el crecimiento de las plantas. Recientemente, Calero Hurtado *et al.* (2020) demostraron que la aplicación de Si inhibe la entrada de Na^+ mientras que estimulaba la entrada de K^+ y Ca^{2+} , mejorando el crecimiento de las plantas en condiciones salinas.

El estudio de las propiedades de los bioestimuladores, la caracterización de su funcionalidad y modo de acción es clave para entender la compleja interacción entre distintas variables del medio y la planta. Se ha sugerido que las investigaciones en este sentido pueden llevar a la obtención de resultados importantes tanto para las aplicaciones industriales, la conservación y mejora ecológica del medio, como para la sostenibilidad alimentaria y la obtención de materias primas (Carletti *et al.*, 2021). Es por esto que estos estudios son de gran interés para la comunidad científica y el sector privado (Rouphael and Colla, 2020).

1.5 NUEVOS ENFOQUES EN ALIMENTACIÓN

La alimentación juega un papel crucial en la salud de la población, quizá por esto es habitual que tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados se consuman plantas salvajes para hacer frente a distintas enfermedades (Bharucha and Pretty, 2010). Si bien en muchas ocasiones no hay un respaldo científico sobre los beneficios de su consumo, el avance de la ciencia permitirá esclarecer la efectividad de estos productos, así como un diseño, optimización y estandarización con base científica de los suplementos alimenticios (Raskin and Ripoll, 2005). De hecho, se espera que el papel de la alimentación funcional, los suplementos alimenticios y las sustancias de origen vegetal tengan un mayor peso en el mercado en el corto y largo plazo. Especialmente, dada la aceptación de estos productos entre los mercados más jóvenes (Del Giudice and Pascucci, 2010).

Esta tendencia se ve reflejada en el cada vez mayor interés por el consumo de alimentos con características nutricionales superiores, tanto en cultivos tradicionales como en la introducción de nuevas especies vegetales (Petropoulos *et al.*, 2018). De hecho, Łuczaj *et al.*, (2012) tras analizar los cambios en el uso de plantas salvajes de Europa, concluyeron que aunque el consumo de plantas salvajes decrece con los cambios socioeconómicos y ecológicos, este pasa formar parte de una nueva forma de entender la alimentación; más relacionada con la alimentación saludable, la seguridad alimentaria y el consumo de productos de cercanía.

A nivel comercial, si bien el sabor de los alimentos sigue siendo prioritario sobre las características funcionales (Del Giudice and Pascucci, 2010), el consumidor presta cada vez mayor atención al contenido en compuestos como:

Compuestos Fenólicos: Se trata de metabolitos secundarios derivados de las rutas metabólicas de la pentosa fosfato, shikimato y fenilpropanoides en plantas (Randhir, Lin and Shetty, 2004). Han sido ampliamente estudiados por sus propiedades beneficiosas para la salud, desde antioxidantes hasta antiinflamatorias pasando por cardio protectoras y antitrombótica, entre otras (Cartea *et al.*, 2011). Es por este motivo que se ha planteado la explotación de los subproductos de los cultivos ricos en estos compuestos (Balasundram, Sundram and Samman, 2006).

Ácidos Grasos Poliinsaturados: Para la nutrición humana, las dos familias de ácidos grasos poliinsaturados más importantes son las series omega-3 y omega-6; los cuales tienen un papel importante en el mantenimiento de los niveles de colesterol en sangre y se les ha relacionado con propiedades antivirales, antimutagénico y cardioprotectoras, entre otras (De Meester, Watson and Zibadi, 2013; Nichols and Miller, 2018).

Glucosinolatos: Se trata de compuestos del metabolismo secundario casi exclusivos de las plantas del orden Capparales. Han sido ampliamente estudiados en diferentes brásicas relacionándolos con buenas propiedades para la salud humana (Verkerk *et al.*, 2009), destacando especialmente las propiedades antiinflamatorias y el efecto protector frente a varios tipos de cáncer (Capuano *et al.*, 2017; Arumugam and Razis, 2018; Bayat Mokhtari *et al.*, 2018; Soundararajan and Kim, 2018; García-Ibañez *et al.*, 2020).

1.6 EL SECTOR PRIVADO – SAKATA

No son pocos los esfuerzos de la comunidad científica por intentar solventar o aliviar los efectos de la salinidad sobre las explotaciones agrarias. Desde el empleo de enmiendas, el uso de diferentes estrategias de riego y drenaje, la utilización de cultivares más resistentes, la fitorremediación, etc. (Mukhopadhyay *et al.*, 2021). En este sentido, el sector agroindustrial será un actor clave tanto para desarrollar estrategias como para llevarlas a la aplicación. Más concretamente el sector de la mejora genética varietal ha sido identificado como uno de los más importantes para la búsqueda de soluciones a la problemática de la salinidad (Munns and Tester, 2008; Munns *et al.*, 2016; Carletti *et al.*, 2021; Mukhopadhyay *et al.*, 2021). Históricamente, este sector ha contribuido al desarrollo de la humanidad de manera significativa. De hecho, un estudio de la FAO reconoce que desde el año 2000, la productividad de los cultivos ha incrementado entorno al 2% anual y que el 40% de ese incremento es debido a la mejora de las variedades vegetales (FAO, 2009). Solo en Europa, el sector de la mejora genética vegetal genera un volumen de negocio aproximado de más 7000 millones de euros y da empleo a más de 50 000 personas. De hecho, Europa es el primer exportador mundial de semillas (ANOVE, 2019).

Desde su lanzamiento en 1984, uno de los principales objetivos del Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea ha sido el fomento de las colaboraciones público-privadas para el desarrollo de proyectos de investigación (Comisión Europea, 2018). Se entiende que estos proyectos consorciados entre empresas y organismos públicos de investigación favorecen la dinamización del sector en el que se desarrollan. Además, se ajustan mejor a la velocidad a la que se producen los cambios tecnológicos, los costes y la complejidad de la investigación.

La presente tesis doctoral se enmarca en una colaboración público-privada entre la empresa de mejora genética vegetal Sakata Seed Ibérica y el centro de investigación CEBAS-CSIC. Consecuentemente, esta tesis doctoral opta al reconocimiento de tesis industrial. El proyecto de investigación cubre objetivos que son prioritarios para cumplir con los retos establecidos por Europa y que se recogen a su vez en los distintos programas de ayudas y fomento de la investigación, a la vez que genera conocimiento y nuevas líneas de negocio para la empresa.

Sakata Seed Ibérica es la filial española de Sakata Seed Corporation. Sakata es una empresa líder en mejora genética vegetal en productos hortícolas y ornamentales. Sakata ofrece más de 900 cultivares en diferentes cultivos clave, aunque es especialmente conocida por su contribución al desarrollo de cultivos de brásicas, cucurbitáceas y solanáceas. Sus líneas de investigación incluyen el desarrollo de cultivares mejor adaptados al estrés biótico y abiótico, cultivares con contenidos mayor contenido en compuesto bioactivos o con mejorado perfil nutricional, mejora en rasgos organolépticos, entre otros.

1.7 LOCALIZACIÓN Y ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO

1.7.1 EL SURESTE ESPAÑOL - LA REGIÓN DE MURCIA

España es el país de Europa que se ve más afectado por problemas de escasez de agua. Más concretamente el sureste de España presenta zonas donde la problemática es más grave (FAO, 2017). Según el banco público de indicadores ambientales del Ministerio de Medio Ambiente, en España la pérdida media anual de suelo es de 12.2 t/ha y habría un 67.14% del territorio con riesgo de desertificación (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2019). Adicionalmente, otros muchos factores han propiciado que el sureste español sea un muy buen caso de estudio para la investigación enfocada en la búsqueda de soluciones a la salinización: La prolongada agricultura intensiva en la zona, las altas temperaturas, especialmente en verano, y las pocas precipitaciones han propiciado la salinización del suelo. Además, la falta de agua es la razón por la que durante años los agricultores hayan extraído indebidamente agua de los acuíferos para riego. Esto, unido a la cercanía al mar de la zona, ha propiciado la aparición de procesos de intrusión marina. Como consecuencia, los niveles de sal en el agua son excesivamente altos. En definitiva, se han sobreexplotado los acuíferos y contaminado el agua (Vera Nicolás, 2004). Esta situación ha llevado consigo dos procesos, por un lado

un crecimiento económico y fijación de población en las zonas productoras, y por otro la desaparición de las salidas naturales de los acuíferos y de sus ecosistemas asociados (Molina, García-Aróstegui and Benavente, 2009). La falta de agua del sureste español no es un problema nuevo, ya hace más de 50 años que las demandas de agua sobrepasan a los recursos propios. De hecho, se han adoptado medidas de tan grande envergadura como el trasvase Tajo-Segura (Vera Nicolás, 2004). No obstante, en los últimos años los problemas de falta de agua se han agravado afectando de forma directa a las producciones agrarias de la región, lo que provoca tensiones políticas y sociales, además de enfrentar a colectivos ecologistas y productores (Ranganathan *et al.*, 2018).

A pesar de estas condiciones, la Región de Murcia es una zona de referencia en Europa en el cultivo de frutas y verduras, un ejemplo de ello es que es el primer exportador de brócoli a nivel nacional (HortoInfo, 2014). Esto se explica en parte por el elevado número de horas de sol (alrededores de 3000 al año) lo que le permite realizar actividad agraria fuera de la estación productiva y poder realizar agricultura intensiva (Romero Díaz and Belmonte Serrato, 2011). De hecho, la superficie de invernaderos en las principales zonas productoras ha aumentado desde 1980, probablemente relacionado con el trasvase Tajo-Segura (Pedraza, Díaz and Soto, 2015).

La empresa promotora de este proyecto de investigación, Sakata Seed Ibérica, cuenta con gran prestigio en la Región de Murcia al estar muy establecida en la región y contar con gran cuota de mercado en cultivos de brásicas, especialmente brócoli. En efecto, el mercado está dominado por un cultivar de la empresa, Parthenon, que constituye más del 50% de la producción. La realización de la investigación en una de las principales zonas productivas es de vital importancia para los objetivos estratégicos de la empresa y para asegurar la posterior explotación de los resultados de la investigación

1.7.2 ESPECIES SELECCIONADAS

Las especies seleccionadas para el proyecto de investigación han sido seleccionadas para que fuesen representativas de diferentes comportamientos frente a la salinidad, que fuesen propias de la localización seleccionada y de interés para la empresa promotora. Según esto, las especies seleccionadas para ser estudiadas dentro del proyecto fueron: *Brassica oleracea* L., *Brassica rapa* L., *Cakile maritima*, *Salicornia fruticosa* y *Atriplex halimus*.

1.7.2.1 *Brassica oleracea* L.

El brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) es una planta con peciolos desnudos, limbos con los bordes ondulados y nervaduras marcadas. Su origen parece estar ubicado en el Mediterráneo oriental y concretamente en el Próximo Oriente (Asia Menor, Líbano, Siria, etc.). Fue domesticada por la civilización etrusca en alguna zona del norte de Italia, y posteriormente su cultivo se extendió por el mediterráneo con el Imperio Romano. Su consumo ha experimentado un gran aumento en los últimos

30 años. En España, la Región de Murcia es la primera productora y se destina principalmente a Europa, exportándose más de 500.000 toneladas cada año (INNOVAGRI, 2017).

Su cultivo se realiza fundamentalmente durante las estaciones de primavera, otoño e invierno ya que para su desarrollo normal necesita temperaturas de entre 20 y 24°C durante la fase de crecimiento oscilen y entre 10 y 15°C durante varias horas del día para la inducción floral (Maroto Borrego, Pomares García and Baixauli Soria, 2007). Sin embargo, la plasticidad de los nuevos cultivares puestos en el mercado en los últimos años permiten que se consigan producciones durante todo el año.

La tolerancia a salinidad depende del cultivar y es una de las líneas de trabajo en la mayoría de los programas de mejora. No obstante, en general se ha determinado que las *Brassica oleracea* L. spp. son glicofitas altamente tolerantes a la salinidad (Su *et al.*, 2013).

El consumo del brócoli está incrementando notablemente y esto es debido en gran medida a los importantes beneficios que tiene para la salud. El brócoli contiene compuestos como el indol-3-carbinol, sulforrafano, flavonoides, y vitamina C, los cuales se han relacionado con actividad anti-carcinogénica, antioxidante, protectora frente radicales libres, y por reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Keck, Qiao and Jeffery, 2003; Lund, 2003; Mukherjee, Gangopadhyay and Das, 2008; Angelino and Jeffery, 2014; Abbaoui *et al.*, 2018).

Estudios previos han demostrado que el contenido en glucosinolatos de las brásicas, y en particular de brócoli, son dependientes del genotipo (Zaghdoud *et al.*, 2012), la época de cultivo, las condiciones medioambientales (Pérez-Balibrea, Moreno and García-Viguera, 2008) y la duración del ciclo y las condiciones de crecimiento (Rosa *et al.*, 1997).

Por lo tanto, el estudio de como las condiciones ambientales determinan la respuesta fisiológica de variedades de brócoli y su contenido en glucosinolatos. Con el fin de poder establecer los parámetros de calidad de estos y comparar nuevas líneas pre-comerciales con las tradicionales es de gran interés para de los objetivos de las empresas obtentoras.

1.7.2.2 *Brassica rapa* L.

Los nabos (*Brassica rapa* L. subsp. Napus) son consumidos de formas muy diferentes alrededor del mundo, crudos en ensaladas, hervidos, al vapor, en mezclas con carnes, en encurtidos, etc. (Azam *et al.*, 2013). En España y Portugal hay una gran tradición, distribución y consumo de este vegetal. De hecho, de la misma planta se cosechan distintos órganos vegetativos que forman parte de distintos platos tradicionales: Los nabos, raíz engrosada o hipocótilo, las nabizas, hojas vegetativas, y los grelos, tallos junto con hojas florales previos a la floración (Obregón-Cano *et al.*, 2016).

Aunque la tolerancia a salinidad depende del cultivar, en general se ha demostrado que las *Brassica rapa* spp. son glicofitas con cierta tolerancia a la salinidad (Su *et al.*, 2013).

1.7.2.3 *Atriplex halimus*

Atriplex halimus es una especie leñosa de interés para forraje (Barrett-Lennard, Bathgate and Clive, 2003; Benzarti *et al.*, 2013). Es una especie fácil de encontrar en diferentes zonas del mediterráneo y está especialmente adaptada a condiciones áridas y semiáridas (McKell, 1975; Walker *et al.*, 2014). Esto se debe en gran medida a su capacidad para tolerar sequía y salinidad (Le Houérou, 1992). Su explotación se ve limitada principalmente por su alto contenido en sales que condicionan negativamente su digestibilidad y por tanto su empleo en la alimentación de rumiantes (Obeidat *et al.*, 2016). No obstante, esta condición es el motivo por el que se ha reportado su uso como condimento y sal vegetal (Wright, 2009).

El elevado contenido en sales de esta planta se debe a los mecanismos de adaptación que emplea para sobrevivir en ambientes salinos. Esta planta es capaz de tolerar altos contenidos de sales en sus tejidos y, además, dispone de un mecanismo de excreción de sales en sus hojas (Ben Hassine *et al.*, 2008). Las sales son secuestradas y compartimentadas en vacuolas y, posteriormente, gran cantidad de ellas son excretadas a través de unas células especializadas llamadas tricomas localizadas en la superficie de las hojas. Este mecanismo le permite acumular grandes cantidades de iones tóxicos, por ello ha sido sugerido su uso en programas de fitorremediación de suelos degradados (Belkheiri and Mulas, 2013). Para poder explotar esta especie vegetal son necesarios dos aspectos: desarrollar parámetros que permitan su comparación con otras especies halofitas con diferentes mecanismos de adaptación, e identificar posibles usos rentables para su explotación.

1.7.2.4 *Salicornia fruticosa*

Salicornia fruticosa es una especie suculenta característica de varias regiones, entre ellas la mediterránea (Scott, 1977; Kadereit *et al.*, 2007). Existen alrededor de 25-30 especies perteneciente al género *Salicornia* cuya caracterización taxonómica es bastante pobre (Kadereit *et al.*, 2012). Esta situación dificulta la diferenciación entre distintas especies, micro especies, subespecies, variedades e híbridos, limitando su estudio científico al constituir un elemento de incertidumbre en las revisiones bibliográficas.

La *Salicornia* ha sido introducida en el mercado europeo como producto vegetal gourmet. Se trata de unos brotes sin hojas similares a los espárragos verdes, pero con un marcado sabor salado y muy apreciados por su alto contenido nutricional (Ventura *et al.*, 2011). También se ha descrito como materia prima en la elaboración de sal vegetal, aprovechando así su contenido nutricional y bajo contenido en sodio como reclamo comercial (Hoi and Hyun, 2013). En efecto, a nivel nutricional, la *Salicornia* destaca por su contenido elevado en polifenoles (1.2 mg GAE g⁻¹ FW), una notable capacidad antioxidante, y un contenido elevado en Vitamina C y ácidos grasos esenciales (Ventura *et al.*, 2011; Ventura and Sagi, 2013).

Una vez más, es imprescindible investigar el potencial económico de esta especie en comparación con otras halofitas para fomentar su explotación (Ventura and Sagi, 2013)

1.7.2.5 *Cakile marítima*

Cakile marítima es una especie halofita suculenta. Es habitual de zonas de marisma, dunas y zonas costeras (Megdiche *et al.*, 2007). No obstante, fisiológicamente presenta gran variabilidad según especies y subespecies que se relacionan con los ambientes en los que se desarrollan (Davy, Scott and Cordazzo, 2006). Tradicionalmente, esta planta se ha empleado para dar sabor a las ensaladas, como ingrediente en harinas o para la producción de aceites (Guil-Guerrero, Giménez-Martínez and Torija-Isasa, 1999; Khan and Weber, 2006).

2 SINOPSIS

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO GENERAL

En líneas generales la pregunta a la que queremos contribuir es ¿cómo enfrentarnos a una situación de salinización de suelos en un contexto de cambio climático y crecimiento demográfico? Más concretamente abordamos el caso específico de la Región de Murcia desde un enfoque que pueda ser explotado por la empresa en el mercado. Esta localización es un ejemplo de zona productora bajo condiciones de escasez de recursos hídricos, sobreexplotación de acuíferos directamente relacionada con intrusión marina y el empleo de aguas con alta salinidad para riego. Todo ello supone una salinización de los suelos y la necesidad de incorporar plantas adaptadas a condiciones de salinidad.

Esta tesis doctoral propone como fin el utilizar aguas salinas para riego e investigar las implicaciones que ello conlleva a nivel de absorción de agua y nutrientes, estudiando también los cambios fisiológicos en la planta para obtener aplicaciones que permitan el crecimiento económico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El primer objetivo se centró en el análisis minucioso de los efectos de la salinidad sobre las especies objeto de estudio. Más concretamente intentando identificar rasgos que pudiesen servir para discriminar entre especies y/o cultivares las mejores respuestas a la salinidad. En el primer capítulo (**Manuscrito 1: *Analysis of physiological traits in the response of Chenopodiaceae, Amaranthaceae, and Brassicaceae plants to salinity stress***) se llevó a cabo una evaluación de diferentes respuestas fisiológicas a salinidad según dos factores. Por un lado, las distintas especies vegetales (*Atriplex halimus*, *Salicornia fruticosa*, *Cakile maritima* y *Brassica rapa*), y por otro, distintos niveles de salinidad (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Los rasgos fisiológicos estudiados fueron: La succulencia de la hoja, el contenido mineral (micronutrientes y macronutrientes), el estado hídrico de las plantas (potencial osmótico, potencial hídrico y conductividad hidráulica), el contenido en proteínas, catalasa y ácidos grasos insaturados. Las interrelaciones entre los distintos rasgos fisiológicos fueron analizadas estadísticamente mediante un *Discriminant Canonical Analysis* (DCA). La información adicional suministrada por las interacciones entre las variables nos permite obtener un patrón de respuesta multivariado en el que dos factores (especie y salinidad) tienen influencia sobre la relación entre respuestas fisiológicas en vez de afectar a una sola. Este análisis nos permite determinar si los rasgos seleccionados estaban asociados entre ellos, lo que nos permite definir más adecuadamente el mejor set de parámetros relacionado con la respuesta de un genotipo a la salinidad. En el segundo capítulo (**Manuscrito 2: *Growing broccoli under salinity: the influence of cultivar and season on glucosinolates content***), los trabajos se centraron en el estudio de dos variables, el contenido en glucosinatos y la producción, frente a 4 factores, el cultivar (se emplearon 7 cultivares de *Brassica oleracea* var. *Itálica*),

el órgano vegetativo (raíz, hoja e inflorescencia), la salinidad (riego habitual o riego salino) y el ciclo de cultivo (producciones de otoño, invierno o primavera). Con este trabajo se observó que la salinidad activa la síntesis de glucosinolatos solo en algunos cultivares y en determinados ciclos. Además, se observó la aparición de derivados del feruloyl-indol-glucosinato en algunos cultivares y ciclos bajo riego salino.

El segundo objetivo se centró en la búsqueda de formas de explotación económica de las distintas respuestas fisiológicas del material objeto de estudio. Por un lado, se desarrolló una metodología que permitiese incrementar el contenido en glucosinolatos de las plantas de brócoli, sin que se viese en detrimento ni la producción ni los parámetros organolépticos del órgano comercial (las pellas). En el capítulo 3 (**Manuscrito 3:** Composición y procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas del género *Brassica*), se describe el procedimiento por el que mediante la aplicación de metil jasmonato y un polieter polisiloxano de forma foliar se consigue un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos (principalmente Glucorafanina y neoglucobrasicina) en plantas adultas del género *Brassica*, por ejemplo, el brócoli.

Por otro lado, para las especies halofitas se llevó a cabo un análisis para determinar su aptitud para posibles usos tanto culinarios como a nivel industrial. En el capítulo 4 (**Manuscrito 4:** *Halophytes of the mediterranean basin – Underutilized species with the potential to be nutritious crops in the scenario of the climate change*) se evaluó la calidad nutricional de *Atriplex halimus*, *Salicornia fruticosa* y *Cakile maritima* cultivadas en condiciones de salinidad (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Las variables estudiadas fueron el contenido en proteína total, lípidos totales, polifenoles, elementos minerales y el crecimiento.

CAPÍTULO UNO - ANALYSIS OF PHYSIOLOGICAL TRAITS IN THE RESPONSE OF CHENOPODIACEAE, AMARANTHACEAE, AND BRASSICACEAE PLANTS TO SALINITY STRESS

Yepes, L.; Chelbi, N.; Vivo, J.M.; Franco, M.; Agudelo, A.; Carvajal, M.; Martínez-Ballesta, M. del C. Analysis of physiological traits in the response of Chenopodiaceae, Amaranthaceae, and Brassicaceae plants to salinity stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2018**, *132*, 145–155, doi:10.1016/j.plaphy.2018.08.040.

ABSTRACT

Soil salinity is one of the main factors affecting plant growth. Dissection of plant response to salinity into physiological traits may result a simple approximation than the overall response that may influence many aspects of the plant. In the present study two factors were considered to evaluate the correlation of different physiological variables in the plant response to salinity. The first factor was the species, with four levels (*Atriplex halimus*, *Salicornia fruticosa*, *Cakile maritima*, and *Brassica rapa*), and the second was the salinity (0, 100, 200, and 300mM NaCl). Thus, the interrelationships of distinct physiological traits – leaf succulence, minerals (micronutrients and macronutrients), plant water relations (osmotic potential, water potential, and hydraulic conductivity), protein content, catalase, and unsaturated fatty acids - were analyzed by Discriminant Canonical Analysis (DCA). Additional information supplied by the interaction between the variables provided a multivariate response pattern in which the two factors (species x salinity) influenced the relationship between responses rather than affecting a single response. Such analysis allows to establish whether the selected trait was associated to each other for helping to define the best set of parameters in relation to the response of new genotypes to salinity. Thus, plant growth was influenced by leaf succulence adaptation to salt stress whereas it was not determined by water relations. The Na ion prevailed over K as the element with the highest variability in the response to salinity in *A. halimus* and *S. fruticosa*, whereas in *C. maritima* and *B. rapa*, Ca, S, and P stood out more. Patterns of ion accumulation together with the protein and unsaturated fatty acid ratios could be used in discriminating plant response to salt stress may be positioned in interrelated groups. The results highlight new evidences in the response to salt stress associated to a specific interrelationship of a set of physiological parameters.

KEYWORDS

Atriplex halimus, *Brassica rapa*, *Cakile maritima*, Discriminant Canonical Analysis, *Salicornia fruticosa*, and Salinity.

2.3 INTRODUCTION

Saline soils are widespread in many regions of the world due to abundant seawater intrusion in coastal areas, as well as the occurrence of saline groundwater and inadequate irrigation and/or drainage (Souza Filho et al., 2003). Therefore, the possibility of cultivating crops under saline conditions is of high importance in these areas. The breeding of new cultivars is the most common approach to increasing the salt tolerance of crop species (Megdiche et al., 2007). It has been suggested that the salt tolerance of plants could be improved by defining genes or characters for geneticists or breeders to exploit (Munns, 1993). However, salt adjustment mechanisms are complex phenomena, with both biophysical and biochemical implications at different plant levels (Duarte et al., 2014).

Plants have evolved numerous salt tolerance mechanisms to subsist with the damaging effects of salinity. Among these, ion exclusion, adjustment of the cell osmotic potential ($\Psi\pi$) (Türkan and Demiral, 2009), and stability of the cell structure and function (Chalbi et al., 2013) are of special importance.

In nature, halophytes are found on the rocky coastlines of the Mediterranean regions and were recently recommended as cash crops for bio-saline agriculture (Ventura et al., 2014). Halophytes grow in very salty soil, and are typically considered as plants able to complete their life cycle in such conditions. In contrast to most glycophytic crops, during their evolution they have not lost their mechanisms of resistance to salt-stress conditions (Koyro and Lieth, 1998). One of these mechanisms is to store the salt ions in the vacuole as osmotica, together with neutral molecules (Belkheiri and Maurizio, 2013). Osmotic adjustment is a mechanism used to preserve turgor and lessen the deadly effects of water stress on vegetative and reproductive tissues. For this, plants are required to keep their hydraulic potential lower than that of the solution surrounding the roots, thereby maintaining turgidity and the uptake of the water necessary for their growth (Flowers et al., 1991). Moghaieb et al. (2004) showed that *Suaeda maritima* has the ability to maintain osmotic adjustment due to the accumulation of higher solute concentrations in its cells in response to salinity. However, little is known about the interaction between these physiological components.

Also due to salinity, nutrient deficiencies or imbalances in plant tissues occur. Decreases in K, Ca, Mg, and NO_3^- concentrations have been observed in plants under salinity, a result of the competition of Na and Cl with nutrients (Romero-Aranda et al., 1998). The accumulation of a high Na concentration in the aerial parts is a typical halophytic response (Chalbi et al., 2013).

Changes in the fatty acid content and profile have been reported in some halophytes under salt stress. Thus, the fatty acid composition of *Salicornia* and *Sarcocornia* shoots was dominated by 16- and 18-carbon polyunsaturated acids, but a significant amount of saturated acids was also present (Imai

et al., 2004; Kulis et al., 2010; Ventura et al., 2011). In *Crithmum maritimum* a high percentage of palmitic, linoleic, and linolenic acids was observed (Ben Hamed et al., 2005). In addition, an intrinsically high degree of unsaturation in the plasma membrane of the halophyte *Cakile maritima*, relative to *Brassica napus* and *Brassica oleracea*, was considered as a constitutive mechanism to cope with salt stress (Chalbi et al., 2015) and was correlated with lipoxygenase activity. Amongst different halophytes, the proportion of membrane lipids (phospholipids and sterols) and unsaturated fatty acids was correlated to different levels of salt tolerance through the control of permeability and membrane functions (Sui and Guoliang, 2014). In addition, salinity stress can cause oxidative damage to lipids and disturb the cellular metabolism (Anjum et al., 2014). A significant increase in lipid peroxidation in shoots occurred at high salt concentration in halophytes and an elevated antioxidant capacity of halophytes is one of the main reasons of a higher tolerance in relation to glycophytes (Ozgun et al., 2013). Among the antioxidant enzymes to maintain redox status, catalase (CAT) is one of the most efficient in the degradation of H₂O₂ (Lesser, 2006) and the levels of CAT increased under salt stress in plants and was correlated with salt tolerance (Anjum et al., 2014).

In this work, we select a set of physiological and biochemical parameters to define the responses of one Chenopodiaceae (*Atriplex halimus*) and one Amaranthaceae (*Salicornia fruticosa*) and two Brassicaceae (*Cakile maritima* and *Brassica rapa*) to salinity. *Atriplex halimus*, a typically Mediterranean species, is a xero-halophyte (Bendaly et al., 2016), *S. fruticosa* is a salt marsh euhalophyte (Feng et al., 2015), *C. maritima* is a highly salt tolerant plant, frequently found on the Mediterranean seashore, where it contributes to sand dune fixation due to its deep root system (Debez et al., 2013), and *B. rapa* is classified as a tolerant glycophyte (Su et al., 2013).

Previous reports have studied the response of two contrasting genotypes to different levels of salt stress at; transcriptional (Beritognolo et al., 2011), proteomic (Cui et al., 2015) or metabolomics (Zhao et al., 2014). However, but in addition to genotypic information, the potential variability of the particular trait under study must be considered when selecting among a set of physiological parameters. In order to compare the adaptive response to salinity among the four studied species, with the aim of finding the parameter that has most influence within the response to salt stress, a complete study of water relations (root hydraulic conductance (L₀), leaf water potential (Ψ_ω), osmolarity of exuded sap (Ψ_π), leaf turgor potential (Ψ_t)) and nutrients (macronutrients (Ca, K, Mg, Na, P, and S) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, and Zn)) was performed. Also, the protein content, double bond index of fatty acids (DBI), and CAT activity were determined. With the objective of obtaining reliable conclusions from the tests performed, and due to the interrelation of the variables, a multivariate statistical technique, namely Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) (Daoyu and Lawes, 2000; Johnson et al., 2007), was carried out instead of ANOVA, followed by Discriminant Canonical Analysis (DCA) to interpret the MANOVA (Tatsuoka, 1973).

2.4 MATERIAL AND METHODS

2.4.1 PLANT CULTURE

The Chenopodiaceae (*A. halimus*), the Amaranthaceae (*S. fruticosa*), and two Brassicaceae (*C. maritima* and *B. rapa*) were chosen for their differing responses to salinity. Plants of *A. halimus* and *S. fruticosa* were provided by Viveros Muzalén S.L. (Murcia, Spain). Seeds of *C. maritima* were collected from Raoued (20 km North of Tunis, Tunisia). Seeds of *B. rapa* were provided by Sakata Ibérica S.L. (Valencia, Spain). The seeds of *C. maritima* and *B. rapa* were sterilized in 0.5% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min, pre-hydrated with de-ionized water, and aerated continuously for 24 h. Then, the seeds were germinated in vermiculite, in the dark at 28 °C, for 2 days. They were then transferred to a controlled environment chamber for 5 days, with a 16-h light and 8-h dark cycle with temperatures of 25 and 20 °C and relative humidities of 60 and 80%, respectively. Photosynthetically active radiation (PAR) of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ was provided by a combination of fluorescent tubes (Philips TLD 36 W/83, Jena, Germany and Sylvania F36 W/GRO, Manchester, NH, USA) and metal halide lamps (Osram HQL, T 400 W, Berlin, Germany). The two Amaranthaceae species - after extensive rinses with running tap water and deionized water - were acclimated to hydroponics. During acclimation and before the start of the treatments, six plants of each specie were maintained in 15 L containers with halfstrength Hoagland's solution (Hoagland and Arnon, 1950). At the beginning of an experiment, all the plants (Amaranthaceae and Brassicaceae) were treated with 50mM increments of NaCl daily until the final level was reached (0, 100, 200, and 300mM NaCl). The solutions were changed every 2 weeks during acclimation and once per week during the experiments. Salinity was applied for one month. After the treatments, the leaves were harvested and used for chemical analyses. All the experiments involved at least four replicates of two independent experiments.

2.4.2 GROWTH

Five plants per treatment were chosen for plant biomass determination. Dry weight (DW) of the plants was obtained after drying plant material (root and aerial part) in a forced air oven at 70 °C until reaching a constant weight during 3 days.

2.4.3 LEAF PARAMETERS

Leaf parameters were assessed using both leaf succulence (L_S) and leaf thickness (L_T) ratios (Amanullah, 2015), as:

$$L_S (\text{mg cm}^{-2}) = \frac{\text{Leaf FW}}{\text{Leaf surface area}} \quad L_T (\mu\text{m}) = \frac{\text{Leaf water content (ml g}^{-1} \text{ DW)}}{\text{SLA (m}^2 \text{ g}^{-1})}$$

$$\text{With SLA being the Specific Leaf Areas: } \text{SLA (m}^2 \text{ g}^{-1}) = \frac{\text{Leaf surface area}}{\text{Leaf DW}}$$

Where leaf dry weight (DW) was obtained after dried at 65 °C for 4 days until constant weight.

2.4.4 ANALYSIS OF MINERAL ELEMENTS

The concentrations of macronutrients (Ca, K, Mg, Na, P, S) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn) were analyzed in lyophilized leaf tissue, which had been ground finely in a mill grinder, IKA model A10 (Staufen, Germany), to give particle sizes of 0.5–0.7 mm. The samples were digested in a microwave oven (CEM Mars Xpress, Mattheus, NC, USA) by HNO₃eHClO₄ (2:1) acid digestion. The elemental analysis was carried out using a Perkin–Elmer (Waltham, MA) 5500 model ICP emission spectrophotometer (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA), at 589 nm. The concentrations were expressed as g.100 g⁻¹ DW for macronutrients and mg.kg⁻¹ DW for micronutrients.

2.4.5 ROOT HYDRAULIC CONDUCTANCE (L₀)

Root hydraulic conductance (L₀) was measured by pressurizing the roots using a Schölander chamber (Jackson et al., 1996). The aerial parts of the plants were removed, and the base of the stem was sealed into a plastic tube. The plant was then placed in the pressure chamber, with the same nutrient solution in which it had been grown, and a gradual increase in pressure (from 0.1 to 0.4 MPa) was applied to the roots, thereby generating a range of sap flows that represented wholeplant transpiration rates. Sap was collected in Eppendorf tubes and weighed on a precision balance. The sap flow, JV, was expressed in mg.g root FW⁻¹.h⁻¹ and plotted against pressure (MPa), the slope being the L₀ value [mg.g root FW⁻¹.h⁻¹ MPa⁻¹]. The measurements were made in the middle of the photoperiod, 1 week after applying the different treatments.

2.4.6 LEAF WATER POTENTIAL (Ψ_ω)

The leaf water potential (Ψ_ω) of the third fully-expanded leaf was measured in the middle of the photoperiod using the pressure chamber technique (Turner, 1988).

2.4.7 OSMOTIC POTENTIAL (Ψ_π)

The osmotic potential (Ψ_π) of leaves was measured using an osmometer (Digital Osmometer, Roebing, Berlin). This was calibrated using a standard solution of KNO₃. The osmotic potential of the sap was calculated as follows (Nobel, 2009):

$$\Psi\pi = nRT$$

Where “n” is the osmotic concentration (mOsmol), “R” is the gas constant (0.083 L atm K⁻¹ mol⁻¹), and “T” is the ambient temperature (K).

2.4.8 LEAF TURGOR POTENTIAL (Ψ_t)

The turgor potential (Ψ_t) was estimated as the difference between leaf water potential (Ψ_ω) and osmotic potential (Ψ_π), as follows:

$$(\Psi_t) = (\Psi_\omega) - (\Psi_\pi)$$

2.4.9 PROTEIN CONTENT, LIPID EXTRACTION, AND FATTY ACID DETERMINATION

Protein was determined using the method of Bradford (1976), using the Bio-Rad reagent with BSA as standard, and was expressed as mg.g DW⁻¹. Total lipids were extracted according to the method of Folch et al. (1957), including some modifications. Leaves (100 mg of fresh material) were fixed in boiling water for 5 min, to denature phospholipases, and then homogenized in a chloroform-methanol mixture (2:1, v/v). The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The lower chloroformic phase, containing lipids, was aspirated and evaporated under N₂ gas. The residue was immediately dissolved in 1 mL of chloroform for conservation.

Fatty acids from the total lipids were transmethylated with NaMeO (0.5 N in anhydrous methanol). To ensure rapid saponification of fatty acids, the sealed tubes were placed in a water bath at 65 °C for 10 min. The resultant fatty acid methyl esters were extracted with hexane (2 mL), evaporated under N₂, dissolved in ethyl acetate (200 µL), and analyzed by Gas Chromatography (GC) using an HP5-bonded capillary column (30m×0.25mm×0.25 µm), with a Flame Ionization Detector (FID), He as carrier (1 mL min⁻¹), and a temperature program of 150–195 °C at 3 °C min⁻¹, 195–220 °C at 2 °C min⁻¹, and finally 220–300 °C at 6 °C min⁻¹. The injector and detector temperatures were 280 and 300 °C, respectively. The double bond index (DBI) was calculated as the unsaturated fatty acid per number of double bonds.

2.4.10 CATALASE DETERMINATION

The measurements of proteins and CAT activities were obtained for the same extracts. Fresh material (0.5 g of leaves) was homogenized at 4 °C with 1 mL of phosphate buffer (KPB, 50 mM; pH 7.8) containing Triton x-100 (0.2%). After centrifugation at 8000g for 15 min, at 4 °C, the supernatant (extract) was conserved. Catalase activity was determined by spectrophotometric measurement, following the method of Aebi (1984). To initiate the reaction, the extract was homogenized with 50mM phosphate buffer (KPB, pH 7.0) and 10.6mMH₂O₂. The reduction in absorbance was followed at 240 nm for 3 min; 1 unit decomposes 1 µmol of H₂O₂ per 1 min at 25 °C and pH 7. The CAT activity was expressed as Units mg⁻¹ (protein) min⁻¹.

2.4.11 STATISTICS ANALYSIS

All parameters (excluding dry weight and leaf thickness) were analyzed using two-way MANOVA, with species and saline treatment as factors, and DCA. Dry weight and leaf thickness were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's multiple comparison test whenever a significant difference was detected (significance level of 5%). Both techniques were performed to

determine significant differences among 16 subgroups of samples. The R software (R Core Team, 2018) has been chosen as the computing environment, and the R package “candisc” (Friendly and Fox, 2016) was used to apply the DCA procedure.

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

To study the interrelationships among the four species under the four saline treatments, DCA was used. The two-way MANOVA realised for each group of variables showed that the factors species and salinity were statistically significant, as was their interaction ($P < 0.05$), for all variables of each group as a whole (Table 1).

Table 1. Two-way MANOVA for five groups of variables, where *df1* is the numerator degrees of freedom, *df2* is the denominator *df*, *Pillai* is the value of the statistic, $\sim F$ is the approximate value of the *F* statistic, and *P* is the probability ($\alpha = 0.05$).

Two-way MANOVA: Pillai test statistic					
	df	Pillai	$\sim F$	[df1, df2]	P
Macronutrients and sodium					
Salinity (S)	3	1.994	9.577	[18, 87]	6.67e-14 ***
Species (Sp)	3	2.860	98.816	[18, 87]	< 2.2e-16 ***
S x Sp	9	3.403	4.659	[54, 192]	< 2.2e-16 ***
Residual	32				1.50e-15 ***
Micronutrients and sodium					
Salinity (S)	3	1.656	5.952	[18, 87]	4.771e-09 ***
Species (Sp)	3	2.349	17.458	[18, 87]	< 2.2e-16 ***
S x Sp	9	2.773	3.055	[54, 192]	9.555e-09 ***
Residual	32				
Hydric parameters					
Salinity (S)	3	1.499	10.656	[9, 96]	2.668e-11 ***
Species (Sp)	3	2.339	37.749	[9, 96]	< 2.2e-16 ***
S x Sp	9	1.841	5.644	[27, 96]	1.229e-10 ***
Residual	32				
Protein content, double bond index, and catalase activity					
Salinity (S)	3	1.391	9.224	[9, 96]	5.837e-10 ***
Species (Sp)	3	1.133	26.225	[9, 96]	< 2.2e-16 ***
S x Sp	9	2.300	11.690	[27, 96]	< 2.2e-16 ***
Residual	32				
Fatty acids					
Salinity (S)	3	0.959	1.881	[21, 84]	0.022714 *
Species (Sp)	3	1.249	2.855	[21, 84]	0.0003611 ***
S x Sp	9	4.092	5.002	[63, 224]	< 2.2e-16 ***
Residual	32				

Significance codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’

2.5.1 GROWTH

In our species, the maximum increments in the biomass (dry weight; DW) induced by salinity (Fig. 1), were for *A. halimus*, where 100, 200 and 300mM NaCl gave increases of DW of 60.04, 82.20 and 77.39%, respectively, with respect to the control. In *S. fruticosa*, at 100, 200, and 300mM NaCl increments of- 38.20, 43.49 and 30.50%, respectively, were observed. For *C. maritima*, relative to the control, the DW was enhanced by 29.74% at 100mM NaCl and reduced at higher salinities. Finally, the DW of *B. rapa* decreased progressively as the NaCl concentration rose.

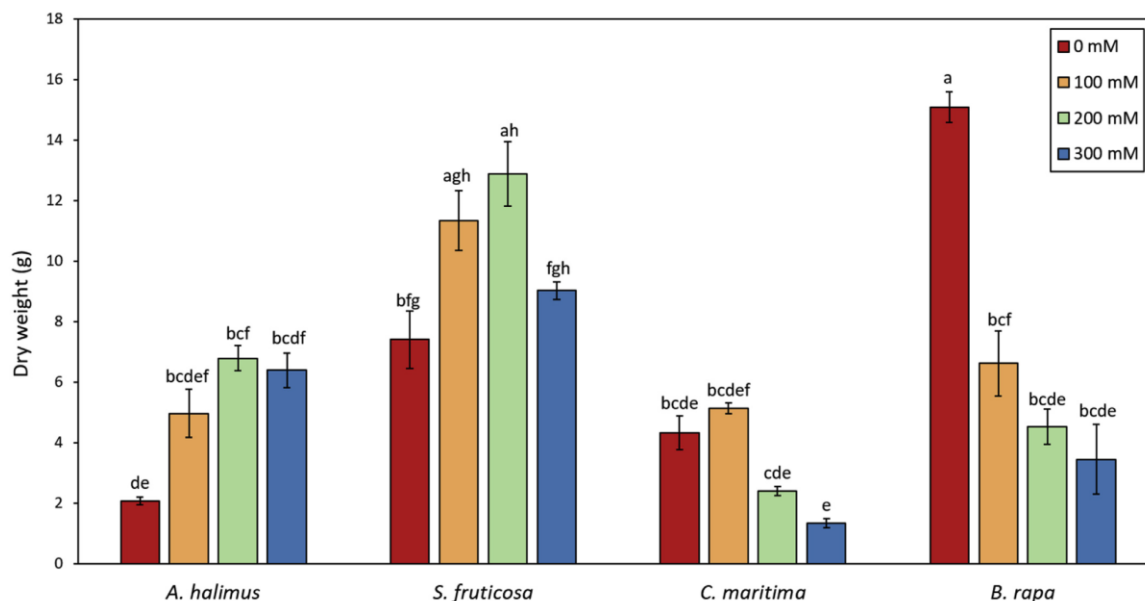


Fig. 1. Dry weight (g) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa* plants treated with 0, 100, 200 or 300mM NaCl. Different letters mean significant differences

Previous reports indicated that *Salicornia*, a leafless succulent, was more salt tolerant than *Atriplex* (Egan et al., 2001). However, in our work, at moderate salinity the *A. halimus* growth induction was higher than in *S. fruticosa*. In fact, an optimal photosynthetic capacity has been described for *A. halimus* at 200mM NaCl (Debez et al., 2006) whereas for *S. fruticosa* it was obtained at 500mM NaCl (Redondo-Gómez et al., 2006). Two different mechanisms to cope with salinity have been described in the *Atriplex* genus: they are salt includers at low salinities and excluders at high ones (Bajji et al., 1998). These authors observed that in the range from 150 to 400mM NaCl the growth of two *Atriplex* species, *A. nummularia* and *A. halimus*, was stimulated. Regarding *C. maritima*, its growth has been shown to be maximal at 100mM NaCl while it was reduced at 200 and 300mM NaCl (Ben Amor et al., 2010), in consonance with the DW data at different salinities for this species under the present experimental conditions.

2.5.2 LEAF SUCCULENCE AND SALT ACCUMULATION

Leaf succulence (Ls) was positively correlated with leaf Na⁺ concentration in all species *A. halimus* (r=0.94), *S. fruticosa* (r=0.96), *C.maritima* (r=0.88) and *B. rapa* (r=0.95) (Fig. 2A). One of the

major factors involved in plant salt tolerance is the leaf succulence that it has been postulated as a main quality for stimulated growth in halophytes, although the mechanism involved is still elusive. Previous reports showed modifications in the leaf morphology due to an enhanced salinity (Boughalleb et al., 2009). According to this, in all species, leaf thickness (Lt) (Fig. 2B) was modified in a close relation to the Ls, that showed the highest value in *S. fruticosa* at 200mM NaCl. This salinity corresponded with the most favourable NaCl concentration for an optimal growth in this specie under our experimental conditions, where an increased leaf availability for Na⁺ storage was due to changes in the leaf anatomy (Shabala and Mackay, 2011). By contrast, at 300mM NaCl, a decreased Lt was associated to less Na⁺ content in the leaf tissues comparing to 200mM NaCl. Thus, a mechanism of Na⁺ exclusion at root membrane level could not be discarded at a certain salt threshold in *S. fruticosa*. *A. halimus* had a similar response at moderate salinities, 100 and 200 mM, with enhanced succulence as Na⁺ leaf content was raised. However, at 300 mM, a decreased Ls and Lt with regard moderate salinities, were observed with a highest leaf Na⁺ content. This fact may be consequence of salt excretion once salinity reaches a leaf threshold for vacuoles accumulation (Bajji et al., 1998). Thus, at moderate salt concentrations *A. halimus* behaved like a salt includer and at high salinity it was a salt excluder, in two different mechanisms to cope with salt stress. Although typically *S. fruticosa* was a halophyte able to tolerate a wide range of salinities, such as 510mM NaCl (Redondo-Gómez et al., 2006), in our experiment this specie showed scarce adaptation to 300mM NaCl when salt was directly applied in hydroponics. It has been reported that genetic differentiation between populations of *Salicornia* may explain distinct growth, phenology, density, and mortality patterns depending on the upper and lower salt marsh origin as it has been reported for *Salicornia europaea* (Davy and Smith, 1985).

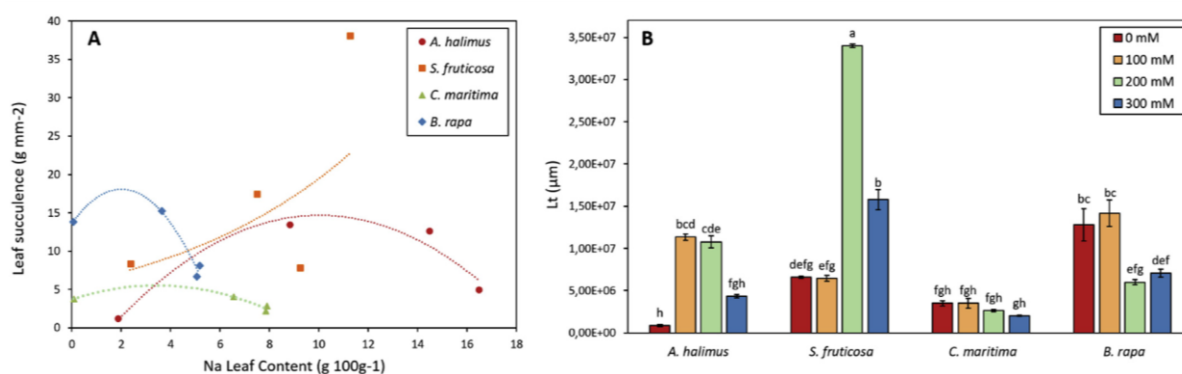


Fig. 2. Leaf succulence, Ls, (g mm⁻²) against leaf Na content (A) and leaf thickness, Lt, (μm) (B) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa* plants treated with

C. maritima, one genus in the family Brassicaceae, was classified as an annual succulent halophyte plant (Clausing et al., 2000). In fact, both Ls and Lt were maintained after moderate salt application. However, in the also Brassicaceae, *B. rapa*, a glycophyte, Ls and Lt values were decreased.

2.5.3 MINERAL ANALYSIS

Macronutrients (K, Mg, Ca, P, and S) (Table S1) and micronutrients (B, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, and Zn) (Table S2) were analyzed, and Na was included in both analyses since it was considered the main reference cation under saline conditions.

For the macronutrients, DCA was performed (Table S6) for the interaction salinity x species; it was mainly influenced by Na, Ca, and S (the longest vectors in Fig. 3A), which thus have greater meaningful weight in the discrimination among the 16 groups.

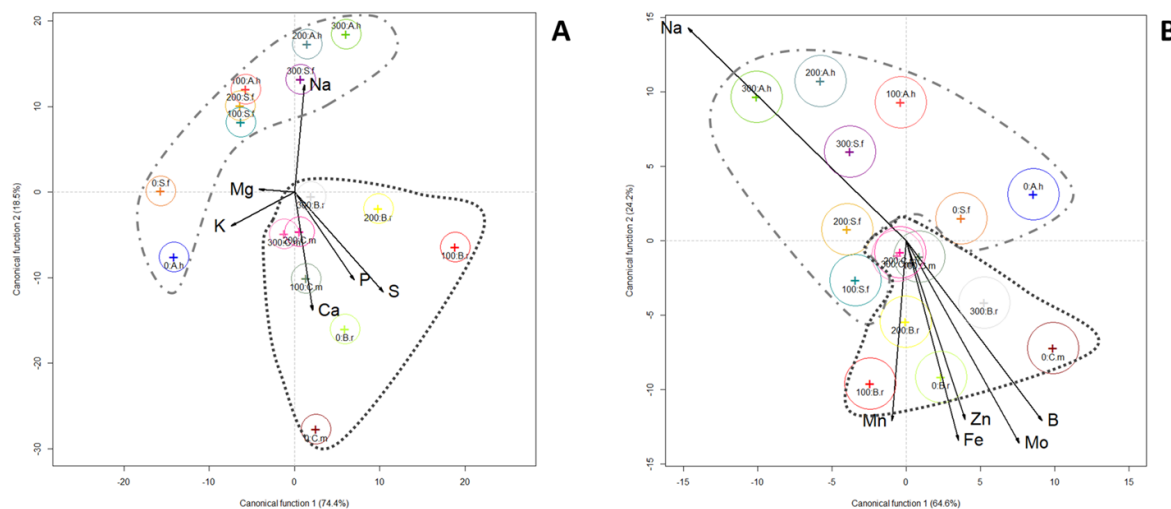


Fig. 3. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity x species interaction, for macronutrients (A) and micronutrients (B). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (A.h=A. halimus, S.f=S. fruticosa, C.m=C. maritima, and B.r=B. rapa). The centroids of each group are indicated by the symbol “+”. The obligatory halophyte species (A. halimus and S. fruticosa) are surrounded by dots and dashes (-.-.-), and the facultative halophyte species (C. maritima) and the glycophyte species (B. rapa) are surrounded by dotted lines (.....).

The results show that two canonical dimensions explain a total of 92.9% of the variation, which is sufficient for a correct two-dimensional interpretation.

In the canonical discriminant structure plot, the distribution of the means of the groups (centroids) on the two canonical axes (Fig. 3) indicates that the two linear combinations discriminate the majority of the groups. The vectors of each variable established the correlation of each of them with the canonical axes. Therefore, the relative length of these vectors is proportional to their contribution to the discrimination between the groups. Also, the variance of each variable was determined by this length. In addition, overlapping among some groups were observed, this means that there are not significant differences respect to dependent variables between these groups.

Regarding the relationships among the dependent variables (Fig. 3A), Ca, P, and S were positively correlated among themselves, as were Mg and K. However, Na showed a contribution with the opposite sign to that of Ca, K, S, and P, while the remaining combinations did not present a correlation, neither positive nor negative (Na and Mg, S and P with K, Mg, and Ca).

The fact that Na had a greater effect on the salinity×species interaction than K (Fig. 3A) in *A. halimus* and *S. fruticosa* indicates the superior relative importance of Na over K as a macronutrient and osmolyte. Similarly, the contribution of different cations and anions to the development of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* demonstrated that Na was more effective than K at increasing cell expansion and shoot development (Wang et al., 2012).

The discrimination by the Na concentration was indicated by canonical function 2; so, moving up the Y axis, the Na concentration increased in the groups. Therefore, the groups in the first and second quadrants had a high Na content and low contents of Ca, P, S, and K. To this group belong the *A. halimus* and *S. fruticosa* plants of all three saline treatments. It has been reported that many plants which are resistant to Na do not tolerate high concentrations of K or Ca, and plants sensitive to Na were able to tolerate high concentrations of Ca (Iljin, 1932). This could explain the distribution of the groups. In the third and fourth quadrants, the groups had a lower content of Na and higher contents of Ca, P, and S; that is, the group formed by *C. maritima* and *B. rapa*. *Cakile maritima* was considered a facultative halophyte by Mishra and Tanna (2017), whereas *B. rapa*, as a glycophyte, does not have the mechanisms of vacuolar compartmentation necessary to accumulate Na; so, the presence of other ions prevailed over Na in both species.

In *S. fruticosa* control plants, the contribution of Na and Ca ions was negligible compared with the rest of the treatments and species - but, as in *A. halimus* control plants, there was a high significance of the Mg and K ions. However, as the external Na increased, so did the Na contribution in the plants, to the detriment of the K and Mg contributions in these two species.

The distribution of the circles shows that *A. halimus* could be considered more efficient than *S. fruticosa* at Na sequestration in excessively saline soils, since the distance between the 0mM and 300mM groups was greater for *A. halimus*, an indication of greater Na withdrawal. However, the physiological mechanisms underlying the growth stimulation of *Atriplex* plants are still unknown.

With respect to the micronutrients (Mn, Fe, Zn, Mo, and B) (Fig. 3B and Table S6), all were strongly and negatively correlated with Na (Fig. 3B). The two canonical dimensions explain a total of 88.8% of the variation.

Although the levels of Fe, Cu, and Zn have been reported to be higher in *Atriplex leuoclada* than in *Salicornia virginica* (Samiullah and Bano, 2011), our results indicate the opposite tendency in *A. halimus* and *S. fruticosa*. Thus, the genotype, as well as the saline conditions in which the different species were grown, conditioned the micronutrient content in the leaf tissues of these halophytes. In addition, in *S. fruticosa* the weight of the micronutrients variability was lower than for *C. maritima* and *B. rapa*.

Finally, the results allow us to conclude that, independently of the saline treatment applied, the contents of Ca, P, S, K, Mn, Mo, Zn, Fe, and B in the obligatory halophyte species were lower than in the facultative halophyte and glycophyte species.

2.5.4 HYDRAULIC PARAMETERS

The DCA performed (Fig. 4 and Table S6) shows the correlations among the dependent variables of the multivariate statistical model (LO, water potential, and osmotic potential) (Table S3). In the analysis, turgor was not included since this variable was calculated from the water and osmotic potentials.

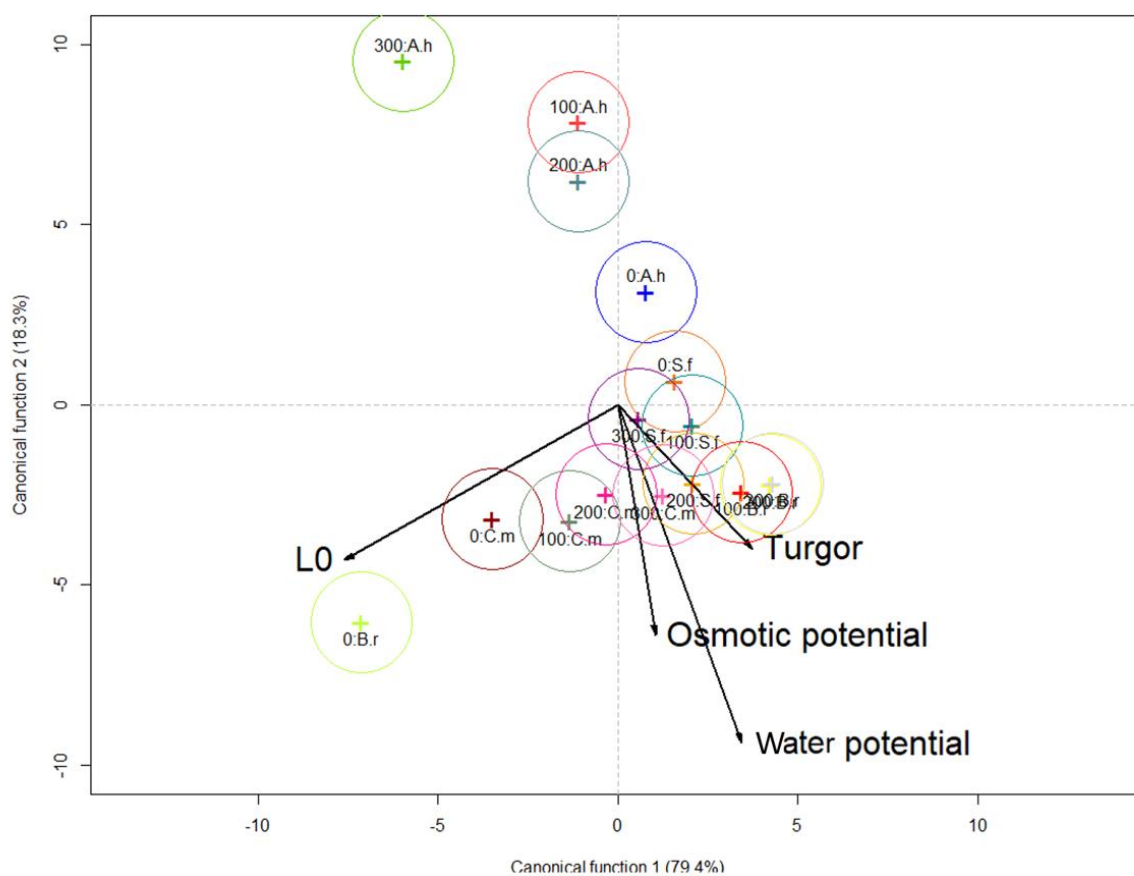


Fig. 4. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity×species interaction, for hydric parameters (LO, water potential, and osmotic potential). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (A.h=A. halimus, S.f=S. fruticosa, C.m=C. maritima, and B.r=B. rapa).

The results show that two canonical dimensions explain a total of 97.70% of the variation, which is sufficient for a correct two-dimensional interpretation. The canonical discriminant structure plot (Fig. 4) shows that the water and osmotic potentials were strongly and positively correlated. Also, both water and osmotic potential were weakly correlated with LO. In addition, overlapping among groups was observed (with no significant differences with respect to the dependent variables), except for the well differentiated group corresponding to *A. halimus*.

The *A. halimus* groups moved to the left on the abscissa axis and up on the ordinate axis as salinity increased. This involved a decrease in the water and osmotic potentials, whose vectors were in the opposite direction to the displacement of the groups. In these plants, the decrease in water potential imposed by salinity is overcome by osmotic regulatory mechanisms, and the plants gain the capacity to take up water from the saline medium and maintain their turgor (Benzarti et al., 2014). This turgor regulation, while changes in plant water status occur, preserves metabolic processes, resulting in increased plant growth. In fact, in *A. halimus*, although a decrease in L0 was observed with salt stress, the reduction when plants were treated with high salinity (300mM NaCl) was lower than in *C. maritima* and *B. rapa*. Among different *Atriplex* species (*A. halimus*, *A. canescens*, *A. nummularia*), *A. halimus* in particular was found to maintain an enhanced relative water content (RWC) at high salinity, the reduction in its L0 at 300mM NaCl being lower than in the other two species (Nedjimi, 2014).

The *S. fruticosa* groups overlapped and were located at the same height on the ordinate axis; so, the variables were not significantly modified by salt stress, relative to the control. In fact, there were no significant changes in L0 with salt stress and this was reflected in the plant water driving force, the water potential, a variable that in *S. fruticosa* was not decreased by increasing salinity. Maintenance of the root's capacity to take up water together with the accumulation of ions allows these plants to increase greatly the leaf succulence as a mechanism to cope with salt stress (Mishra and Tanna, 2017). When L0 values from the glycophyte *Raphanus sativus* and the halophyte *Salicornia virginica* were compared after the suppressive effect of salinity, *S. virginica* was able to move water through the roots with a constant root hydraulic conductivity whereas the ability of *R. sativus* to move water through the roots was depressed (Ownbey and Mahall, 1983). The authors concluded that the growth of *S. virginica* in solutions of higher salinities stimulated the ability of this plant to take up water when, after stress, the roots were placed in distilled water.

In *C. maritima* and *B. rapa* the water and osmotic potentials decreased with respect to the control as the external salinity increased, but the fact that these groups practically did not move on the ordinate axis shows that there was no significant effect of the salinity intensity on the values of these potentials. In general, *S. fruticosa* and *A. halimus* had low L0 values compared to *C. maritima* and *B. rapa*, and, in these latter species, L0 decreased as the salinity rose. However, in *B. rapa* the reductions were greater than in *C. maritima*, in accordance with its greater salt sensitivity.

It has been demonstrated that the water relations and growth strategies of Poaceae family, including their halophytic representatives, may differ (Rozema et al., 1991, 1987). Also, it has been argued that succulence represents an adaptation to the water stress imposed by the low water potential as consequence of salinity (Rozema and Schat, 2013). In our work, halophytes, with the exception of *S. fruticosa*, and the glycophyte appear to maintain similar water potential gradients. Thus, an association

between water relations and growth could not be directly established, but succulence could be a prerequisite for growth stimulation under salt stress.

2.5.5 PROTEIN CONTENT, CATALASE ACTIVITY, DOUBLE BOND INDEX, AND FATTY ACIDS

Plots of the DCA and canonical discriminant structure were produced for protein content, CAT activity, and DBI (Fig. 5, Table S4 and Table S6) and for fatty acids (Fig. 6, Table S5 and Table S6), to determine whether the groups presented differences in the variables due to the interaction of the two factors (salinity x species). The results show that two canonical dimensions explain a total of 98.2% and 83.7% of the variation, respectively, sufficient for a correct two-dimensional interpretation.

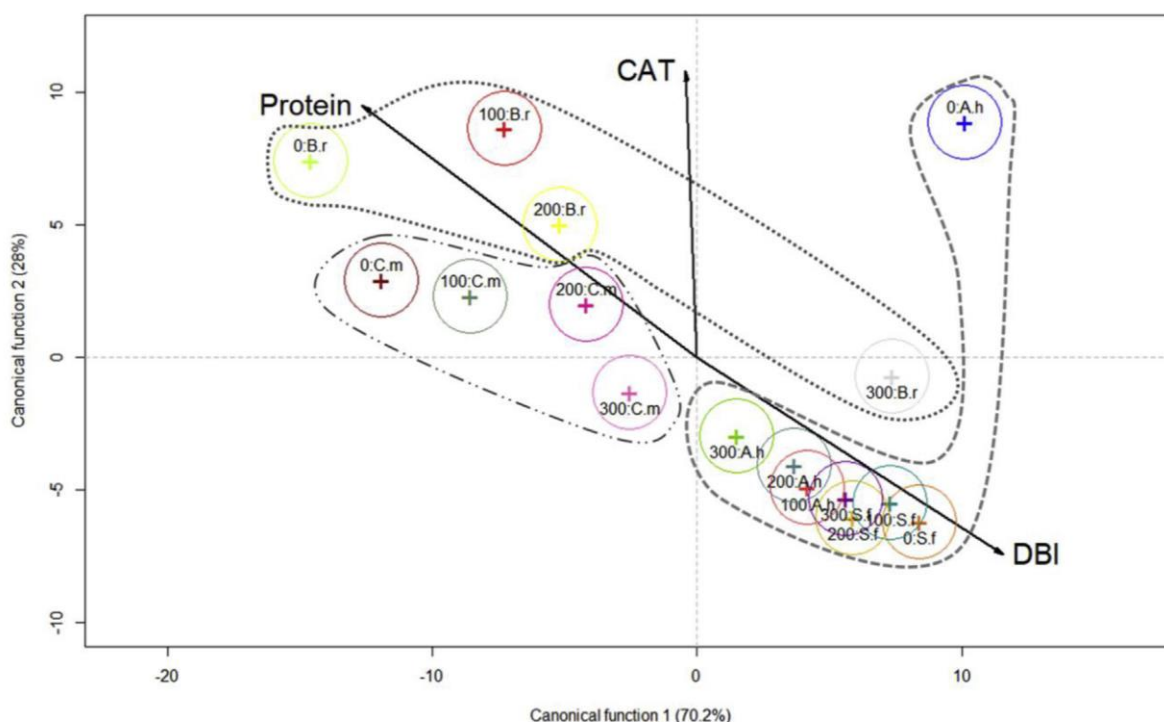


Fig. 5. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity×species interaction, for the variables protein, catalase activity (CAT), and double bond index (DBI). There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (A.h=A. halimus, S.f=S. fruticosa, C.m=C. maritima, and B.r=B. rapa). The obligatory halophyte species (A. halimus and S. fruticosa) are surrounded by dashed lines (- - -), the facultative halophyte species (C. maritima) is surrounded by dots and dashes (-.-.), and the glycohyte species (B. rapa) is surrounded by dotted lines (.....).

For protein, CAT activity, and DBI (Fig. 5), canonical function 1 discriminated according to species and salinity. On the left side of the graph are the groups formed by the facultative halophyte (*C. maritima*) and the glycohyte (*B. rapa*). On the right side are positioned the two obligatory halophytes (*A. halimus* and *S. fruticosa*) (Fig. 5).

The overlapping groups are mainly those formed by obligatory halophyte species, indicating that the studied physiological parameters were not modified by the intensity of the NaCl treatment. By

contrast, most of the groups formed by *C. maritima* and *B. rapa* were separated, and in these species the DBI, protein content, and CAT activity were significantly modified by the NaCl concentration.

The presence of highly unsaturated fatty acids had a strong influence in *A. halimus* and *S. fruticosa* when the interaction of this parameter with the protein and CAT variables was considered. Previously, it has been reported the importance of plasma membrane fluidity in plant adaptation to salt stress in different plant species. Thus, in pepper (*Capsicum annuum*) plants lipid composition determined a more rigid plasma membrane that was accomplished by an increase of the saturation of fatty and sterols concentration in the membrane under excess of NaCl (Silva et al., 2007b). Also, in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp cv. Pitiúba), increased saturated/unsaturated fatty acid ratio was found in leaves associated with reduced membrane fluidity under salinity (Guimarães et al., 2011; Silva et al., 2007a). This increment in the saturated/unsaturated fatty acid ratio and lower membrane fluidity reduced the entrance of Na and Cl ions into the cells. In maize (*Zea mays* L.) also a decreased unsaturated/saturated fatty acid ratio was observed under 100mM NaCl (Salama et al., 2007).

The highest DBI values were observed in *A. halimus* and *S. fruticosa* and were provided by an intrinsically highly unsaturated lipid composition. In *A. halimus* the DBI was maintained with salinity, a consequence of an increased oleic and linoleic acids content, while linolenic acid was less abundant. In *S. fruticosa* the DBI decreased, relative to the control, as the external salt concentration rose - a consequence of a strong fall in linolenic acid abundance. The reduction of the DBI with increasing salinity in *S. fruticosa* could be interpreted as a minor necessity to maintain a high degree of lipid saturation in this species.

In the canonical discriminant structure plot for fatty acids, *A. halimus* and *S. fruticosa* formed a group of major influence on the right side of Fig. 6, where unsaturated fatty acids were situated. The oleic, linolenic, and eicosanoic variables (the vectors with the greatest lengths in the graph of discriminant structure) were mainly responsible for the salinity×species interaction; that is, they discriminated the most among the 16 groups. The linoelaidic, palmitoleic, and eicosanoic variables were correlated positively with each other and negatively with the linolenic, linoleic, and oleic variables, which were positively correlated among themselves.

For *C. maritima* there was a similar influence of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, without changes in the DBI with salinity. Although *C. maritima* was described as a species with a high degree of unsaturated fatty acids, when compared with *Brassica oleracea* and *Brassica napus* (Chalbi et al., 2013), its DBI was lower than in other halophytes. In addition to the statistical analysis, differences in the results may also be due to different ecotypes, sources of lipids, or experimental conditions.

In *B. rapa* the modifications were greater in monounsaturated than in polyunsaturated fatty acids, with the exception of the plants treated with 300mM NaCl, where a high increase in linolenic acid was observed. This group of plants was situated in the same halophyte cluster whose DBI values were comparable with those of *B. rapa*. The increment in the DBI caused by salinity was a mechanism employed by the plants to cope with the stress at this concentration, and shows the extreme sensitivity of this genotype to 300mM NaCl. Similarly, in broccoli roots, salinity enhanced unsaturated fatty acids increasing plasma membrane fluidity to cope with salt stress (López-Pérez et al., 2009).

In general, in *A. halimus* and *S. fruticosa*, the protein content and CAT activity did not exert a high influence in the plant response to salinity, when compared with the DBI modifications. However, the CAT activity was highest in *A. halimus* control plants and was greatly reduced after the salinity treatments. These two findings are an indicator of the higher salt supply required for optimal plant growth in *A. halimus*, in comparison with *S. fruticosa*, and are also a sign of the elevated level of stress in these plants in the absence of salinity.

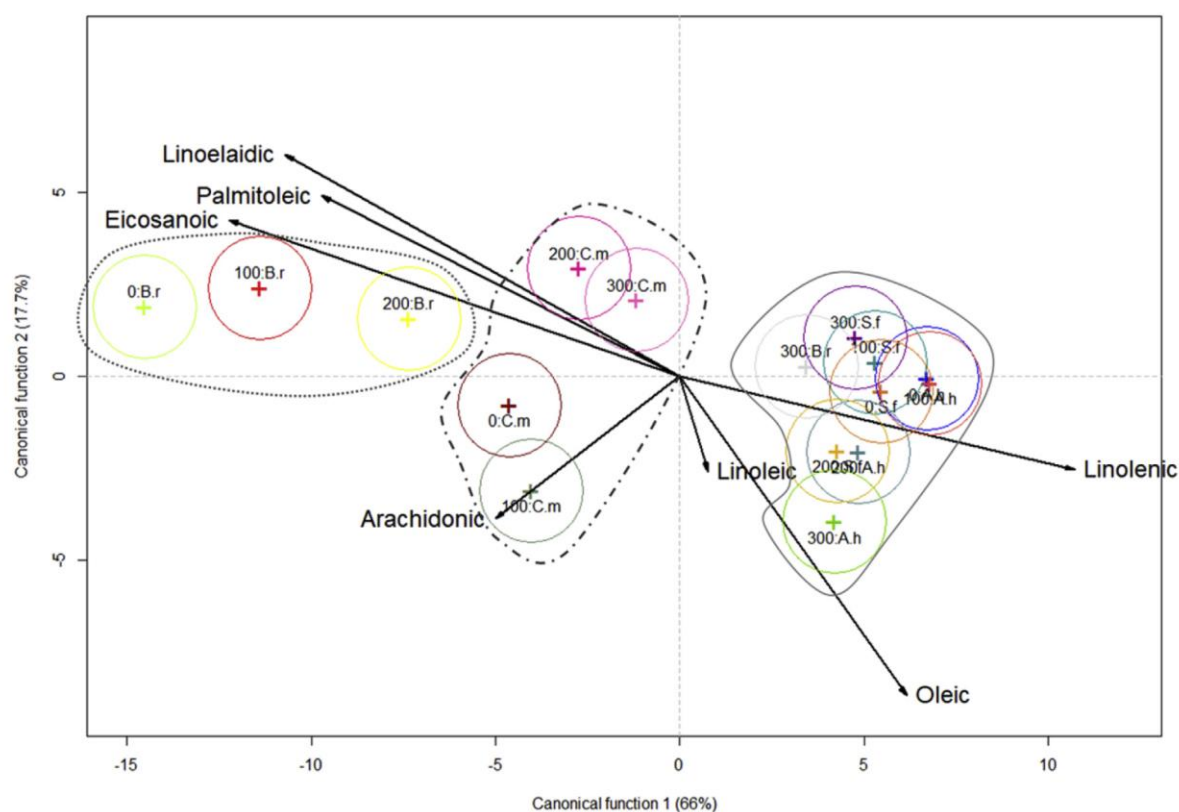


Fig. 6. DCA graphic of the canonical discriminant analysis for the salinity×species interaction, for fatty acids. There are 16 subgroups, where the saline treatment (mM) is the first number and the letters are the species (A.h=A. halimus, S.f=S. fruticosa, C.m=C. maritima, and B.r=B. rapa). The obligatory halophyte species (A. halimus and S. fruticosa) are surrounded by continuous lines, the facultative halophyte species (C. maritima) is surrounded by dots and dashes (-.-.-), and the glycophyte species (B. rapa) is surrounded by dotted lines (.....).

It has been established that succulent species such as *Salicornia* can be classified as extreme halophytes, growing best at high salinity, whereas *Atriplex* species were classified as reversible halophytes without a strict relationship to increased salinity (Grigore and Constantin, 2010). However,

on the basis of our results, this classification of halophytes should be interpreted cautiously and with reference to their interrelated dependence on their habitats.

The protein content was a determinant factor in the responses of *C. maritima* and *B. rapa* to salinity, these species having higher values than the extreme halophytes. It has been postulated that halophytic proteins are intrinsically more active than the corresponding glycophytic proteins (Anjum et al., 2012; Das and Strasser, 2013; Himabindu et al., 2016; Muchate et al., 2016) and this could explain the lower protein content in our extreme halophytes.

In *C. maritima* and *B. rapa* the protein content decreased progressively with increasing external salt concentration, but the reductions were greater in *B. rapa*, especially at 300mM NaCl. In *A. halimus* and *S. fruticosa* the protein content was lower but tended to increase with salt stress. Changes in the proteome (energy metabolism, redox metabolism, stress- and defense-related proteins, osmolyte metabolism, phytohormones, lipid and secondary metabolism, mechanical stress-related proteins) were described in halophytes as responses to salinity (Kosová et al., 2013), and the differences between the sensitive (glycophytes) and the tolerant (halophytes) plants at the protein level show the complexity of the adaptation response to salinity in halophytes.

2.6 CONCLUSIONS

There is a complex interaction between the species and salinity that for each variable was resolved to show clear positions of the groups, related to different physiological responses. Thus, leaf succulence was an adaptive mechanism to salt stress related to growth in all species, but a direct correlation between water relations and growth promotion by salinity could not be established. In *A. halimus* and *S. fruticosa*, Na ion prevailed over K as a determining element which bypass is determinant for these species and with higher variability in the response to salinity, whereas in *C. maritima* and *B. rapa*, alterations of Ca, S, and P resulted more marked by salt stress. Distinct ion patterns may point out differences as contributors in the plant-salinity response with a genotype-dependence.

Also, *A. halimus* could be considered more efficient than *S. fruticosa* at Na sequestration in excessively saline soils due to its osmotic regulatory mechanisms. These mechanisms allowed *A. halimus* to maintain turgor at moderate salinities, with greater growth promotion than in the other halophytes. But, *S. fruticosa* maintained water uptake through a constant L_0 and unmodified water potential gradient, its ion accumulation increased greatly the osmotic potential, as a mechanism to tolerate higher Na concentrations. Finally, highly unsaturated fatty acids had a strong influence in the *A. halimus* and *S. fruticosa* responses to salt stress, whereas protein rather than lipids was determinant factor in the response of *C. maritima* and *B. rapa*.

Although, *Salicornia* was classified as an extreme halophyte, growing best at moderate salinity, *Atriplex* species were classified as a reversible halophyte without a strict relationship to increased salinity and *Cakile* as a succulent halophyte, on the basis of our results, this classification should be interpreted cautiously and with reference to their interrelated dependence on their habitats. Therefore, the MANOVA - performed to differentiate several vectors of means in the test of the multiple dependent variables in the salinity response of halophytic and glycophytic plants - has been accomplished, providing useful information for agronomical studies. In addition, the selection of traits which are important to define the contrasting responses to salt stress and the interrelation between these variables, have to be accounted for new genotypes. Also, the relevance of the selected traits on growth maintenance under salinity should be tested in the field.

CONTRIBUTIONS

María del Carmen Martínez-Ballesta, Lucia Yepes and Najla Chelbi: Conception and design Analysis and interpretation of the data.

María del Carmen Martínez-Ballesta and Micaela Carvajal: Drafting of the article Critical revision of the article for important intellectual content.

María del Carmen Martínez-Ballesta and Micaela Carvajal: Final approval of the article. Provision of study materials. **Juana María Vivo:** Article processing, Critical review of the article, Statistical analysis of data.

Manuel Franco: Critical review of the article, Statistical analysis of data. Final approval of the article.

Micaela Carvajal and Agatha Agudelo: Obtaining of funding Administrative, technical, or logistic support Collection and assembly of data.

FUNDING INFORMATION

This work was partially funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation. Project “Retos Colaboración (RTC-2015-3536-2)” FEDER.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. D. Walker, for correction of the written English in the manuscript.

The authors thank. Prof, Christian Wilhelm for the manuscript comments.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.08.040>.

Table S 1. The macronutrients content (g.100g⁻¹ DW) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa*. Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates ± S.E.

Species	Treatment NaCl (mM)	Macronutrients (g.100g ⁻¹ DW)					
		K	Mg	Ca	P	S	Na
<i>A. halimus</i>	0	10.87±1.48	0.54±0.07	2.26 ±0.17	0.45±0.05	0.41±0.05	2.27 ±0.36
	100	4.10±0.39	0.17±0.02	0.37 ±0.04	0.23±0.02	0.18±0.02	10.28±1.25
	200	3.85±0.91	0.17±0.03	0.32±0.04	0.27±0.03	0.26±0.02	14.96±0.22
	300	3.46±0.07	0.42±0.03	0.53±0.00	0.38±0.00	0.30±0.00	16.95±0.30
<i>S. fruticosa</i>	0	8.73±0.71	0.43±0.03	1.36 ±0.11	0.30±0.02	0.26±0.02	2.23±0.17
	100	2.16±0.13	0.29±0.02	0.27±0.07	0.37±0.07	0.19±0.01	6.29±0.38
	200	2.56±0.37	0.23±0.04	0.22±0.01	0.35±0.08	0.17±0.02	8.23±0.27
	300	3.85±0.31	0.43±0.11	0.57±0.12	0.27±0.03	0.28±0.03	9.92±0.46
<i>C. maritima</i>	0	5.59±0.02	0.28±0.00	3.15 ±0.02	0.65±0.00	0.78±0.01	0.05±0.00
	100	1.99±0.03	0.17±0.00	1.48 ±0.02	0.90±0.02	0.57±0.01	6.52±0.03
	200	2.46±0.05	0.14±0.00	1.22 ±0.02	0.73±0.01	0.50±0.00	7.87±0.16
	300	2.79 ±0.02	0.13±0.00	1.28 ±0.01	0.67±0.01	0.45±0.00	8.11±0.09
<i>B. rapa</i>	0	6.09±0.08	0.35±0.00	2.45 ±0.03	0.58±0.00	0.79±0.01	0.04±0.00
	100	3.00±0.02	0.25±0.00	1.69±0.01	0.70±0.01	0.91±0.01	3.62±0.02
	200	3.36±0.01	0.24±0.00	1.29±0.01	0.64±0.00	0.69±0.00	5.04±0.01
	300	3.56±0.08	0.16±0.00	0.99±0.03	0.60±0.02	0.53±0.01	5.15±0.14

Table S 2. The micronutrient content (mg kg⁻¹ DW) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa*. Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates ± S.E.

Species	Treatment NaCl (mM)	Micronutrients (mg.kg ⁻¹ DW)				
		Zn	Fe	B	Mn	Mo
<i>A. halimus</i>	0	26.50±2.85	22.86±3.01	27.07±3.53	35.91±4.43	2.40±0.29
	100	14.93±1.62	20.06±2.14	16.47±1.76	13.58±1.44	1.44±0.16
	200	18.50±3.74	23.20±2.26	14.57±0.69	16.49±3.00	1.99±0.07
	300	19.32±0.19	35.36±0.62	16.13±0.29	35.43±0.57	2.04±0.06
<i>S. fruticosa</i>	0	23.40±1.82	26.39±2.42	17.82±1.42	34.68±2.58	1.54±0.11
	100	69.38±22.75	47.96±12.57	22.38±4.44	70.47±3.59	3.59±0.96
	200	62.55±21.24	39.14±13.17	20.54±5.14	58.47±20.29	2.90±0.96
	300	21.07±1.40	24.81±2.62	15.52±2.33	33.93±7.15	1.75±0.21
<i>C. maritima</i>	0	153.20±1.70	63.59±2.03	28.77±0.04	37.33±0.17	6.50±0.14
	100	140.79±4.68	38.53 ±0.15	19.46 ±0.22	33.39±0.32	4.45±0.05
	200	150.08±1.54	35.51±0.20	18.06±0.22	31.02±0.30	4.92±0.06
	300	192.43±30.65	31.98±0.24	18.09±0.04	30.90±0.25	4.73±0.02
<i>B. rapa</i>	0	98.90±1.31	53.91±0.57	26.66±0.38	81.77±0.98	4.94±0.06
	100	156.74±1.98	58.28±0.73	28.14±0.33	96.21±1.15	5.26±0.06
	200	79.52±0.70	49.26±0.32	25.73±0.09	69.75±0.45	6.13±0.01
	300	62.20±1.01	47.89±1.35	26.03±0.77	39.46±0.76	8.35±0.29

Table S 3. Hydraulic parameters (root hydraulic conductance (L0) ($\text{mg.g root FW}^{-1}.\text{h}^{-1} \text{MPa}^{-1}$), leaf water potential (Ψ_w) (MPa), osmolarity of exuded sap ($\Psi\pi$) (MPa), leaf turgor potential (Ψ_t) (MPa)) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa*. Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.

Species	Treatment NaCl (mM)	Hydraulic parameters			
		L0	Water potential	Osmotic potential	Turgor
<i>A. halimus</i>	0	474.91 \pm 24.84	-2.73 \pm 0.15	-3.49 \pm 0.07	0.76 \pm 0.11
	100	193.92 \pm 3.40	-5.00 \pm 0.47	-5.51 \pm 0.52	0.51 \pm 0.06
	200	215.47 \pm 4.22	-4.83 \pm 0.07	-6.32 \pm 0.61	1.49 \pm 0.54
	300	361.30 \pm 0.65	-6.83 \pm 0.49	-7.86 \pm 0.57	1.03 \pm 0.11
<i>S. fruticosa</i>	0	215.80 \pm 13.31	-2.50 \pm 0.24	-5.03 \pm 0.32	2.53 \pm 0.14
	100	117.54 \pm 1.50	-2.27 \pm 0.07	-5.74 \pm 0.20	3.21 \pm 0.15
	200	141.81 \pm 1.84	-2.07 \pm 0.05	-6.20 \pm 0.10	4.13 \pm 0.09
	300	208.69 \pm 9.07	-3.13 \pm 0.15	-7.30 \pm 0.10	4.16 \pm 0.06
<i>C. maritima</i>	0	2714.63 \pm 122.84	-0.57 \pm 0.10	-1.35 \pm 0.09	0.79 \pm 0.18
	100	1729.64 \pm 51.59	-1.10 \pm 0.05	-3.45 \pm 0.26	2.35 \pm 0.25
	200	1313.55 \pm 29.39	-1.30 \pm 0.09	-3.70 \pm 0.36	2.40 \pm 0.28
	300	686.71 \pm 11.98	-1.49 \pm 0.16	-4.67 \pm 0.02	3.18 \pm 0.14
<i>B. rapa</i>	0	4013.31 \pm 156.70	-0.20 \pm 0.00	-1.61 \pm 0.22	1.41 \pm 0.22
	100	569.96 \pm 5.87	-0.26 \pm 0.03	-1.73 \pm 0.27	1.49 \pm 0.30
	200	243.80 \pm 2.99	-0.35 \pm 0.02	-2.12 \pm 0.03	1.77 \pm 0.04
	300	129.27 \pm 14.98	-0.55 \pm 0.04	-2.65 \pm 0.21	2.10 \pm 0.24

Table S 4. Protein content ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$), double bond index of fatty acids (DBI), and CAT activity ($\text{UC mg}^{-1} \text{protein min}^{-1}$) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. maritima* and *B. rapa*. Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.

Species	Treatment NaCl (mM)	Protein	DBI	CAT activity
<i>A. halimus</i>	0	63.50 \pm 0.74	231.93 \pm 18.89	131.38 \pm 10.92
	100	75.14 \pm 1.48	251.87 \pm 3.49	11.12 \pm 1.65
	200	69.99 \pm 1.33	204.39 \pm 21.43	9.10 \pm 2.48
	300	81.02 \pm 4.33	150.76 \pm 5.54	5.05 \pm 0.83
<i>S. fruticosa</i>	0	17.38 \pm 0.41	221.11 \pm 1.69	4.04 \pm 0.83
	100	27.56 \pm 0.64	206.36 \pm 6.64	5.05 \pm 0.83
	200	36.50 \pm 1.03	195.41 \pm 5.76	0.00 \pm 0.00
	300	36.10 \pm 2.51	174.44 \pm 1.95	0.00 \pm 0.00
<i>C. maritima</i>	0	233.93 \pm 7.56	120.98 \pm 6.98	21.22 \pm 1.43
	100	195.72 \pm 11.37	117.18 \pm 4.15	22.23 \pm 1.49
	200	148.46 \pm 2.95	113.22 \pm 2.94	27.79 \pm 7.01
	300	123.44 \pm 7.89	130.79 \pm 4.37	7.07 \pm 2.18
<i>B. rapa</i>	0	259.95 \pm 3.52	54.11 \pm 3.11	41.44 \pm 3.60
	100	202.27 \pm 5.02	97.38 \pm 4.51	72.76 \pm 4.95
	200	171.21 \pm 2.81	114.94 \pm 1.75	50.53 \pm 4.37
	300	49.97 \pm 1.66	221.05 \pm 12.67	46.49 \pm 1.65

Table S 5. The fatty acid percentage (%) in *A. halimus*, *S. fruticosa*, *C. marítima* and *B. rapa*. Treated with 0, 100, 200 or 300 mM NaCl. Values are the mean of three replicates \pm S.E.

Species	Treatment NaCl (mM)	Fatty acids (%)						
		Palmitoleic acid	Oleic acid	Linoelaidic acid	Linoleic acid	Linolenic acid	Eicosanoic acid	Arachidonic acid
<i>A. Halimus</i>	0	0.01 \pm 0.00	2.56 \pm 0.71	0.05 \pm 0.01	13.25 \pm 3.32	67.25 \pm 8.83	16.63 \pm 4.74	0.26 \pm 0.06
	100	0.05 \pm 0.00	1.99 \pm 0.09	0.02 \pm 0.00	8.27 \pm 0.541	77.39 \pm 1.58	12.01 \pm 0.93	0.28 \pm 0.02
	200	0.08 \pm 0.02	3.41 \pm 0.66	0.03 \pm 0.00	15.20 \pm 3.81	55.42 \pm 9.86	24.82 \pm 5.57	1.05 \pm 0.22
	300	0.12 \pm 0.01	6.18 \pm 0.34	0.03 \pm 0.00	27.01 \pm 1.68	28.87 \pm 3.16	36.85 \pm 1.1	0.95 \pm 0.07
<i>S. fruticosa</i>	0	0,05 \pm 0.03	2.41 \pm 0.06	0.03 \pm 0.00	12.26 \pm 0.24	63.96 \pm 0.74	20.74 \pm 0.46	0.55 \pm 0.01
	100	0.19 \pm 0.02	2.57 \pm 0.15	0.04 \pm 0.01	16.09 \pm 1.11	56.38 \pm 3.06	24.19 \pm 1.75	0.55 \pm 0.04
	200	0,07 \pm 0.01	3.56 \pm 0.22	0.04 \pm 0.01	15.30 \pm 0.97	52.65 \pm 2.73	27.60 \pm 1.48	0.79 \pm 0.07
	300	0.18 \pm 0.00	2.88 \pm 0.12	0.08 \pm 0.01	23.23 \pm 0.61	40.45 \pm 0.93	32.33 \pm 0.66	0.86 \pm 0.02
<i>C. marítima</i>	0	1,29 \pm 0.20	1.05 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	12.07 \pm 0.43	26.52 \pm 2.56	55.29 \pm 2.01	3.69 \pm 0.74
	100	1.83 \pm 0.15	2.46 \pm 0.36	0.11 \pm 0.01	19.09 \pm 1.44	17.25 \pm 1.01	53.58 \pm 1.06	5.69 \pm 0.70
	200	1.71 \pm 0.04	1.73 \pm 0.09	0.08 \pm 0.00	19.32 \pm 1.48	21.40 \pm 0.05	54.07 \pm 1.526	1.69 \pm 0.04
	300	1,77 \pm 0.3	2.22 \pm 0.24	0.07 \pm 0.00	20.58 \pm 1.92	25.68 \pm 3.04	47.57 \pm 0.55	2.12 \pm 0.12
<i>B. rapa</i>	0	1,19 \pm 0.03	1.36 \pm 0.02	3.47 \pm 0.01	12.33 \pm 0.27	5.43 \pm 1.038	75.30 \pm 0.91	0.92 \pm 0.12
	100	1,27 \pm 0.07	1.12 \pm 0.04	3.70 \pm 0.12	13.70 \pm 0.18	18.19 \pm 1.54	60.62 \pm 1.45	1.41 \pm 0.05
	200	1,15 \pm 0.05	1.30 \pm 0.33	2.00 \pm 0.65	12.55 \pm 0.15	25.85 \pm 0.61	55.69 \pm 0.52	1.46 \pm 0.07
	300	0,34 \pm 0.09	1.20 \pm 0.21	0.03 \pm 0.00	6.64 \pm 1.116	67.57 \pm 5.11	23.35 \pm 3.69	0.88 \pm 0.12

Table S 6. Coefficients of total canonical structure of the first three canonical functions and variation explained by each vector variable for the species x salinity interaction for each group of variables.

Variable	Canonical structure		
	Can1	Can2	Can3
	Macronutrients		
K	-0.496	-0.264	0.435
Mg	-0.276	0.02	0.515
Ca	0.143	-0.922	-0.223
P	0.466	-0.684	-0.680
S	0.695	-0.777	-0.252
Na	0.077	0.837	-0.093
	Micronutrients		
Zn	0.221	-0.667	0.282
Fe	0.196	-0.746	0.084
B	0.510	-0.672	0.337
Mn	-0.052	-0.673	0.393
Mo	0.424	-0.755	-0.041
Na	-0.817	0.794	-0.811
Protein content	-0.032	0.830	0.205
Double bound index	0.890	-0.572	0.205
Catalase activity	-0.973	0.730	-0.699
	Hydraulic parameters		
Osmotic potential	0.761	-0.431	0.651
Water potential	-0.344	-0.939	0.645
L0	-0.105	-0.639	0.949
	Fatty acids		
Palmitoleic acid	-0.747	0.376	0.838
Oleic acid	0.474	-0.667	-0.514
Linoelaidic acid	-0.824	0.463	0.022
Linolenic acid	0.058	-0.199	0.076
Linoleic acid	0.824	-0.195	-0.559
Eicosanoic acid	-0.941	0.326	0.596
Arachidonic acid	-0.385	-0.298	0.816

REFERENCES

- Aebi H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- Ahrens H. 1986. Seber, G. A. F.: *Multivariate Observations*. J. Wiley & Sons, New York 1984, xx, 686 S. £ 48, 50. *Biometrical Journal* 28: 766–767.
- Amaro IR, Vicente-Villardón JL, Galindo-Villardón MP. 2004. Manova Biplot para arreglos de tratamientos con dos factores basado en modelos lineales generales multivariantes. *Interciencia* 29: 26-32.
- Ben Amor N, Megdiche W, Jiménez A, Sevilla F, Abdelly C. 2010. The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 453–461.
- Anjum NA, Ahmad I, Duarte AC, et al. 2012. Understanding stress-responsive mechanisms in plants: An overview of transcriptomics and proteomics approaches In: *Improving Crop Resistance to Abiotic Stress*.337–355.
- Anjum NA, Aref IM, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I, Iqbal M. 2014. Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal(loid) and salinity stresses. *Frontiers in Plant Science* 5: 662.
- Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* 137: 131–142.
- Belkheiri O, Maurizio M. 2013. Effect of water stress on growth, water use efficiency and gas exchange as related to osmotic adjustment of two halophytes *Atriplex* spp. *Functional Plant Biology* 40: 466.
- Bendaly A, Messedi D, Smaoui A, Ksouri R, Bouchereau A, Abdelly C. 2016. Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 208–218.
- Benzarti M, Rejeb K Ben, Messedi D, et al. 2014. Effect of high salinity on *Atriplex portulacoides*: Growth, leaf water relations and solute accumulation in relation with osmotic adjustment. *South African Journal of Botany* 95: 70–77.
- Boughalleb F, Denden M, Tiba B Ben. 2009. Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 947–960.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.

Camacho Rosales J. 1990. Interpretación de MANOVA. Análisis de la importancia de las variables dependientes. *Curriculum: Revista de teoría, investigación y práctica educativa* 1: 107–120.

Chalbi N, Hessini K, Gandour M, et al. 2013. Are changes in membrane lipids and fatty acid composition related to salt-stress resistance in wild and cultivated barley? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 176: 138-147.

Chalbi N, Martínez-Ballesta MC, Youssef NB, Carvajal M. 2015. Intrinsic stability of Brassicaceae plasma membrane in relation to changes in proteins and lipids as a response to salinity. *Journal of Plant Physiology* 175: 148–156.

Chatfield C, Collins AJ. 1980. *Introduction to Multivariate Analysis*. London and New York: Springer US.

Clausing G, Vickers K, Kadereit JW. 2000. Historical biogeography in a linear system: Genetic variation of Sea Rocket (*Cakile maritima*) and Sea Holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. *Molecular Ecology* 9: 1823–1833.

Daoyu Z, Lawes GS. 2000. Manova and discriminant analyses of phenotypic data as a guide for parent selection in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) breeding. *Euphytica* 114: 151–157.

Das AB, Strasser RJ. 2013. Salinity-induced genes and molecular basis of salt-tolerant strategies in mangroves In: *Molecular Stress Physiology of Plants*.53–86.

Davy AJ, Smith H. 1985. Population differentiation in the life-history characteristics of salt-marsh annuals. *Vegetatio* 61: 117–125.

Debez A, Rejeb K Ben, Ghars MA, et al. 2013. Ecophysiological and genomic analysis of salt tolerance of *Cakile maritima*. *Environmental and Experimental Botany* 92: 64–72.

Debez A, Saadaoui D, Ramani B, et al. 2006. Leaf H⁺-ATPase activity and photosynthetic capacity of *Cakile maritima* under increasing salinity. *Environmental and Experimental Botany* 57: 285–295.

Duarte B, Sleimi N, Caçador I. 2014. Biophysical and biochemical constraints imposed by salt stress: learning from halophytes. *Frontiers in plant science* 5: 746.

Egan TP, Dewald HD, Ungar IA. 2001. The effect of different salts of sodium and potassium on the accumulation of glycinebetaine in *Atriplex Prostrata*. *Biologia Plantarum* 44: 595–597.

Egesel CO, Kahnman F, Güi MK. 2011. Discrimination of maize inbreds for kernel quality traits and fatty acid composition by a multivariate technique. *Acta Sci. Agron. Maringá* 33: 613–620.

Feng J, Wang J, Fan P, et al. 2015. High-throughput deep sequencing reveals that microRNAs play important roles in salt tolerance of euhalophyte *Salicornia europaea*. *BMC Plant Biology* 15: 63.

Flowers TJ, Hajibagheri MA, Yeo AR. 1991. Ion accumulation in the cell-walls of rice plants growing under saline conditions - evidence for the oertli hypothesis. *Plant Cell and Environment* 14: 319–325.

Folch J, Lees M, Stanley Sloane GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226: 497–509.

Friendly M, Meyer D. 2015. *Discrete Data Analysis with R: Visualization and Modeling Techniques for Categorical and Count Data* (Taylor & Francis Group, Ed.). London and New York: Chapman and Hall/CRC.

Grigore M, Constantin T. 2010. A proposal for a new halophytes classification, based on integrative anatomy observations. *Muz. Olteniei Craiova. Studii și Comunicări, Științele Naturii* 26: 45–50.

Guimarães FVA, de Lacerda CF, Marques EC, et al. 2011. Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress. *Plant Growth Regulation* 65: 55–63.

Ben Hamed K, Ben Youssef N, Ranieri A, Zarrouk M, Abdelly C. 2005. Changes in content and fatty acid profiles of total lipids and sulfolipids in the halophyte *Crithmum maritimum* under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 599–602.

Himabindu Y, Chakradhar T, Reddy MC, Kanygin A, Redding KE, Chandrasekhar T. 2016. Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany* 124: 39–63.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347: 1–32.

Iljin WS. 1932. Zusammensetzung der Salzein der Pflanze auf verschiedenen Standorten. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* 50: 95–137.

Imai H, Kinoshita M, Ohnishi M. 2004. Chemical characterization of glycerolipids and cerebrosides in halophytic plant, *Salicornia europaea* L. *Journal of Oleo Science* 53: 337–341.

Johnson HE, Lloyd AJ, Mur LAJ, Smith AR, Causton DR. 2007. The application of MANOVA to analyse *Arabidopsis thaliana* metabolomic data from factorially designed experiments. *Metabolomics* 3: 517-530.

Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P. 2013. Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 6757–6789.

Koyro H-W, Lieth L. 1998. Salinity conversion table (H Lieth (ed) Osnabrück, Ed.).

Kulis MJ, Hepp AF, Pham PX, Ribita D, Duraj SA. 2010. Extraction and characterization of lipids from *Salicornia Virginica* and *Salicornia Europaea*. NASA/Technical Memorandum-2010-216891, Washington, DC.

Megdiche W, Amor N Ben, Debez A, et al. 2007. Salt tolerance of the annual halophyte *Cakile maritima* as affected by the provenance and the developmental stage. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 375–384.

Mishra A, Tanna B. 2017. Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Frontiers in Plant Science* 8: 829.

Moghaieb REA, Saneoka H, Fujita K. 2004. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant Science* 166: 1345–1349.

Muchate NS, Nikalje GC, Rajurkar NS, Suprasanna P, Nikam TD. 2016. Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *Botanical Review* 82: 371–406.

Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environment* 16: 15–24.

Nedjimi B. 2014. Effects of salinity on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in three saltbush species. *Biochemical Systematics and Ecology* 52: 4–13.

Nobel PS. 2009. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Canada: Elsevier Ltd.

Ownbey RS, Mahall BE. 1983. Salinity and root conductivity: differential responses of a coastal succulent halophyte, *Salicornia virginica*, and a weedy glycophyte, *Raphanus sativus*. *Physiologia Plantarum* 57: 189–195.

Quinn GP, Keough MJ. 2002. Experimental design and data analysis for biologist. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 277: 537.

Redondo-Gómez S, Wharmby C, Castillo JM, et al. 2006. Growth and photosynthetic responses to salinity in an extreme halophyte, *Sarcocornia fruticosa*. *Physiologia Plantarum* 128: 116–124.

Romero-Aranda R, Moya JL, Tadeo FR, Legaz F, Primo-Millo E, Talo M. 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus : beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell & Environment*: 1243–1253.

Rozema J, Arp W, Diggelen J Van, Kok E, Letschert J. 1987. An ecophysiological comparison of measurements of the diurnal rhythm of the leaf elongation and changes of the leaf thickness of salt-resistant dicotyledonae and monocotyledonae. *Journal of Experimental Botany* 38: 442–453.

Rozema J, Dorel F, Janissen R, et al. 1991. Effect of elevated atmospheric CO₂ on growth, photosynthesis and water relations of salt-marsh grass species. *Aquatic Botany* 39: 45–55.

Samiullah, Bano A. 2011. Physiological and biochemical analysis of the selected halophytes of district Mardan, Pakistan. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 1 :239-243.

Rozema J, Schat H. 2013. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany* 92: 83-95.

Shabala S, Mackay A. 2011. Ion transport in halophytes. *Advances in Botanical Research* 57:151–199.

Silva C, Aranda FJ, Ortiz A, Carvajal M, Martínez V, Teruel JA. 2007. Root plasma membrane lipid changes in relation to water transport in pepper : a response to NaCl and CaCl₂ treatment. *Journal of Plant Biology* 50: 650–657.

Souza Filho APS, Alves SM, Figueiredo FJ. 2003. Allelopathic effects of calopo according to its age and to seed density of the receiver plant. *Planta Daninha* 21: 211–218.

Su J, Wu S, Xu Z, et al. 2013. Comparison of salt tolerance in Brassicas and some related species. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1911–1917.

Sui N, Guoliang H. 2014. Increases of unsaturated fatty acids in membrane lipids protects photosystem II from photoinhibition under salinity in different halophytes. *Journal of Agricultural Science* 6: 12.

Tatsuoka MM. 1973. Multivariate analysis: techniques for educational and psychological research. *Research in Education* 1: 273–319.

Türkan I, Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2–9.

Turner NC. 1988. Measurement of plant water status by the pressure chamber technique. *Irrigation Science* 9: 289–308.

Ventura Y, Myrzabayeva M, Alikulov Z, Omarov R, Khozin-Goldberg I, Sagi M. 2014. Effects of salinity on flowering, morphology, biomass accumulation and leaf metabolites in an edible halophyte. *AoB PLANTS* 6: 053.

Ventura Y, Wuddineh WA, Myrzabayeva M, et al. 2011. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae* 128: 189–196.

Wang D, Wang H, Han B, et al. 2012. Sodium instead of potassium and chloride is an important macronutrient to improve leaf succulence and shoot development for halophyte *Sesuvium portulacastrum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 51: 53–62.

CAPITULO 2: GROWING BROCCOLI UNDER SALINITY: THE INFLUENCE OF CULTIVAR AND SEASON ON GLUCOSINOLATES CONTENT

Rios JJ, Agudelo A, Moreno DA, Carvajal M. Growing broccoli under salinity: the influence of cultivar and season on glucosinolates content. *Sci Agric.* 2020;77(6). doi:10.1590/1678-992x-2019-0028

ABSTRACT

The evaluation of factors that affect glucosinolates (GLS) concentrations in the roots, leaves, and inflorescence of broccoli plants is important in the improvement of the concentration of bioactive compounds and thus in the enhancement of the nutritional properties. In this work, the yield and the concentration of GLS of seven broccoli cultivars (*Brassica oleracea* var. *italica*) grown under salinity in field conditions were studied during three different seasons (autumn, winter, and spring). The results show that, generally, salinity did not alter significantly the inflorescence yield during any of the seasons, indicating a high tolerance of the cultivars tested. Yield was reduced only in cultivar Gea in autumn and in cultivar Parthenon in spring. The distribution of the GLS showed that their accumulation was greater in inflorescences and leaves, with higher concentrations in autumn and spring. The activation of GLS synthesis by salinity was restricted to several cultivars and depended on the season, with no reductions compared to control plants. In this study, we discuss the appearance of a Cinnamoyl-indol-GLS derivative in some of the cultivars and seasons with higher incidence in NaCl-treated plants.

KEYWORDS

Cinnamoyl-indol-GLS, water relations, inflorescence yield, mineral nutrients

2.7 INTRODUCTION

The provision of plants and plant products with enhanced nutritional and medicinal qualities is becoming a great challenge (Raskin and Ripoll, 2004). Potential health-promoting compounds, which have been widely described, are glucosinolates (GLS) and their degradation products from *Brassica* species (Brandt et al., 2004; Moreno et al., 2006). Glucosinolates – and products of their metabolic breakdown, the isothiocyanates - found in *Brassica* vegetables have been described as potent modulators of xenobiotic-metabolizing enzymes that protect DNA from damage (Gerhauser, 2013). Therefore, high intake of cruciferous vegetables is associated with a reduced risk of cancer, particularly lung and gastrointestinal (Lund, 2003), cardiovascular diseases (Angelino and Jeffery, 2014), and, to a lesser extent, prostate cancer (Kristal and Lampe, 2002). Glucosinolates are chemically defined compounds, all GLS characterized, and share a similar basic structure consisting of a B-D-thioglucose group. Glucosinolates are converted into isothiocyanates or indoles by the activity of myrosinase (Martinez-Ballesta and Carvajal, 2015).

Salinity is one of the most prevalent limiting factors for crop production (Zhu, 2001). Previous studies focused on the adaptation mechanisms of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) to salinity (Zaghoud et al., 2012; 2016). In addition, changes in the GLS concentration in response to salinity have been related to their participation in signaling mechanisms (López-Berenguer et al., 2009). Hence, quantitative and qualitative changes in the GLS profile occur in response to environmental changes, although their specific functions are still unknown. This is of particular importance in the case of broccoli cultivars, where different GLS are involved in plant defense against abiotic stress (Martinez-Ballesta et al., 2013). The GLS response to salinity may vary according to the experimental conditions, such as temperatures (Schonhof et al., 2007), the type of glucosinolate, and plant genotype (Dominguez-Perles et al., 2011; López-Berenguer et al., 2009).

The aim of this work was to determine the GLS profile of seven broccoli cultivars grown under the current environmental conditions of the Mediterranean semiarid zones of production (Murcia, southeast Spain), during the autumn, winter, and spring seasons. Through the analysis of all organs of the plants (root, leaves, and inflorescence), the effect of irrigation with saline water was determined in terms of suitability of using this abiotic stress to stimulate GLS synthesis. Moreover, the detection of novel molecular species, feruloyl-indol-glucosinolates (F-GLS), in some of the cultivar-treatment combinations is reported.

2.8 MATERIALS AND METHODS

2.8.1 PLANT MATERIAL AND GROWTH CONDITIONS

Seven commercial broccoli cultivars were used: Parthenon, Naxos, Heraklion, Triton, Marathon, Gea, and Mykonos. All the seedlings were obtained from a commercial nursery for horticultural plants in Murcia (Spain). Three experiments were conducted during different seasons, in the field on an experimental farm in Murcia (Spain), under a semiarid Mediterranean climate (geographic coordinates: 37°47'52.7" N, 0°52'00.7" W, 15 m asl). The first crop was planted in October and harvested in December, while the second crop was planted in January and harvested in March, and the third crop was planted in April and harvested in June.

The temperature and relative humidity were recorded every 10 min using dataloggers (Table 1). We planted 360 plants, 180 per treatment (control and salinity), in a 300 m² plot, with a randomized block design. We planted 360 plants, 180 per treatment (control and salinity), in a 300 m² plot, with a randomized block design. All plants were drip-irrigated with fertirrigation with CaNO₃ (3.7 g m⁻² in autumn and winter and 7.5 g m⁻² in spring) and K₂NO₃ (2.2 g m⁻² in autumn and winter and 5.2 g m⁻² in spring). In the salinity treatment, 80 mM NaCl was added to the nutrient solution (7.3 dS m⁻¹). The plants were harvested when inflorescences reached commercial size. The cultivars Naxos, Heraklion, and Mykonos were harvested 79 days after transplanting the seedlings, while Parthenon, Triton, Marathon, and Gea after 86 days of transplanting. The inflorescences were separated from the rest of the plant and weighed. We analyzed the GLS of the inflorescences, leaves, and roots.

Table 1. Average values of environmental conditions in each month during experiments.

Month	Sun (h)	Rainfall (L m ⁻²)	Temperature (°C)	Radiation (W m ⁻²)
September	265	7.8	19.94	203.54
October	271	31.8	19.06	161.56
November	231	28.3	14.81	129.15
December	220	6	12.89	98.83
January	214	8.6	12.62	109.83
February	235	5.4	13.03	142.06
March	296	23	13.57	221.07
April	321	22.3	15.85	257.62
May	358	3.4	18.4	305.69
June	369	0	22.75	346.88

2.8.2 INTACT GLUCOSINOLATES ANALYSIS

Freeze-dried fine powders (100 mg) of inflorescences, leaves, and roots were extracted in 1 mL of 70 % methanol at 70 °C during 30 min, vortexing every 5 min (Dominguez-Perles et al., 2011). Afterwards, the samples were placed in ice bath to stop the reaction and then centrifuged for 15 min at 13000 rpm, at 4 °C. The supernatants were collected and the methanol was removed using a rotary evaporator. Each dried residue was re-dissolved in ultrapure Milli-Q water to the initial volume of the supernatant and filtered through a 0.2- μ m polyethersulfone membrane filter.

The HPLC-DAD analyses were carried out in a binary capillary pump equipped with an autosampler, a degasser, a sample cooler, and a photodiode array detector. The compounds were separated in a Luna C18 column (25 cm \times 0.46 cm, 5 μ m particle size). The mobile phase was a mixture of water/trifluoroacetic acid (99.9:0.1, v/v) (A) and acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9:0.1, v/v) (B). The flow rate was 1 mL min⁻¹ in a linear gradient, starting with 1 % B for 5 min and reaching 17 % B at 15 min (maintained for 2 min), 25 % B at 22 min, 35 % B at 30 min, 50 % B at 35 min, and 99 % B at 40 min. The monitored compounds eluted off the column in 35 min. The identification of the glucosinolates was carried out according to their UV-Vis spectra, retention times and comparison with authentic standards. Compounds were quantified using sinigrin (SIN) and glucobrassicin (GBS) as external standards of aliphatic and indole GLS, respectively. The concentrations were expressed as mg g⁻¹ of DW.

2.8.3 STATISTICAL ANALYSIS

The data were analyzed using the software SPSS Release 18 for Windows. Duncan's test at $p \leq 0.05$ was chosen to determine the significance of differences between groups.

2.9 RESULTS

Regarding the results of inflorescence yield (Figures 1A, B and C), during the autumn season, the values were higher for cultivar Gea under control conditions. When salinity was applied, there was a significant yield increase in Triton and Marathon and a significant decrease in Gea. In the rest of the cultivars (Parthenon, Naxos, Heraklion, and Mykonos), no differences in yield between control and NaCl-treated plants were observed. During the winter season, there were no significant differences among the seven cultivars studied and Triton, Marathon, Gea, and Mykonos showed values slightly lower than in autumn. Salinity did not significantly affect any of the cultivars. In the spring season, Parthenon and Mykonos had higher yields than in the rest of the seasons while the other cultivars showed yields similar to those in winter. Salinity affected Parthenon negatively and Triton positively, but it did not produce significant differences in Naxos, Heraklion, Marathon, Gea, or Mykonos. No

variation was found in % water between cultivars, seasons and treatments (ranged from 88-91 %, data not shown).

The analysis of GLS in inflorescences in the autumn season (Table 2) showed that the glucoraphanin (GRA) and glucobrassicin (GBS) concentrations were higher than in the rest of the GLS; 4-hydroxyglucobrassicin (HGB), metoxiglucobrassicin (MGB), and neoglucobrassicin (NGB). In addition, in control conditions, the levels of GLS were only significantly higher in Gea (Figure 2). Salinity increased significantly the total GLS concentrations in cultivars Triton and Marathon, mainly due to increases in GRA, while the GBS concentration rose in Parthenon, Heraklion, and Triton (Table 2). No significant differences were found for the rest of the GLS.

In leaves, also, the most abundant GLS were GRA and GBS (Table 2). In this organ, salinity provoked an increase in total GLS in all cultivars and was significant in Triton, Marathon, and Mykonos (Figure 2). The increases were due to GBS in Triton, Marathon, and Gea, to MGB in Naxos and Marathon, and to NGB in Mykonos.

In roots of plants grown in autumn, there was an increase in total GLS in Heraklion, Triton, and Marathon, in relation to winter and spring (Figure 2). In these cases, different GLS appeared, such as gluconapin (GNA) and gluconasturtin (PE) (Table 2). The higher total values observed were due to a higher concentration of GRA in Heraklion, of GNA in Heraklion and Gea, of GBS in Heraklion, Triton, and Marathon, of MGB in Heraklion and Triton, and of NGB in all the cultivars.

When the crop grew in the winter season, the general levels of GLS in inflorescences were lower than in autumn (Figure 2), while in leaves and roots, the levels were similar for both seasons. In this case, the levels of total GLS in inflorescences under control conditions were higher in Naxos and lower for Gea. The salinity treatment did not produce an apparent change in inflorescences and leaves in any of the cultivars; however, in roots, there was an increase in all the cultivars except for Parthenon. The increases in total GLS in roots were due to higher levels of GRA, PE, GBS, MGB, and NGB (Table 3).

In the spring season, the total GLS concentration was much higher than in the rest of the seasons, nearly double in most cultivars (Figure 2). In inflorescences, the concentration was higher under saline conditions in Heraklion, Gea, and Mykonos and was lower in Naxos, with no significant differences in the rest of the cultivars. The increases were due to GRA in Heraklion, to GBS in Heraklion and Gea, and to NGB in Gea and Mykonos (Table 4).

In leaves, an increase in total GLS caused by salinity was observed in Parthenon, Heraklion, and Gea (Figure 2). The increases were due to GRA in Heraklion and Gea, to GBS in Parthenon and Gea, to MGB in Gea, and to NGB in Parthenon, Heraklion, and Gea (Table 4).

In roots, the total GLS concentration was increased significantly by salinity only in Parthenon (Figure 2), mainly due to increases in GBS and NGB.

The detection of a cinnamoyl-indol-glucosinolate is shown in Table 5. In leaves and inflorescences of plants grown during the autumn season, it only appeared - at low concentrations - in Parthenon Triton, and Marathon when salinity was applied and with no significant differences between cultivars. However, this compound was not observed in roots of any of the cultivars or treatments.

During the winter season, the cinnamoyl-indol-GLS was not detected in leaves or inflorescences of any of the cultivars. However, this complex compound appeared in roots of Parthenon, Marathon, and Gea. In this season, the concentrations were also very low and no significant differences between cultivars were observed.

In the spring samples, the presence of the cinnamoyl-indol-GLS was more intense in the roots, leaves and inflorescences of Parthenon, Triton, and Marathon, in untreated (control) and NaCl-treated plants. For Mykonos, it was only detected in NaCl-treated plants. In leaves, the occurrence according to the cultivar and treatment was similar to that in inflorescences. However, in this organ, the concentrations in NaCl-treated plants were always higher than in the control. In roots, the cinnamoyl-indol-GLS was observed in all cultivars and in both treatments (control and NaCl), but the concentration in NaCl-treated plants was higher than in the control.

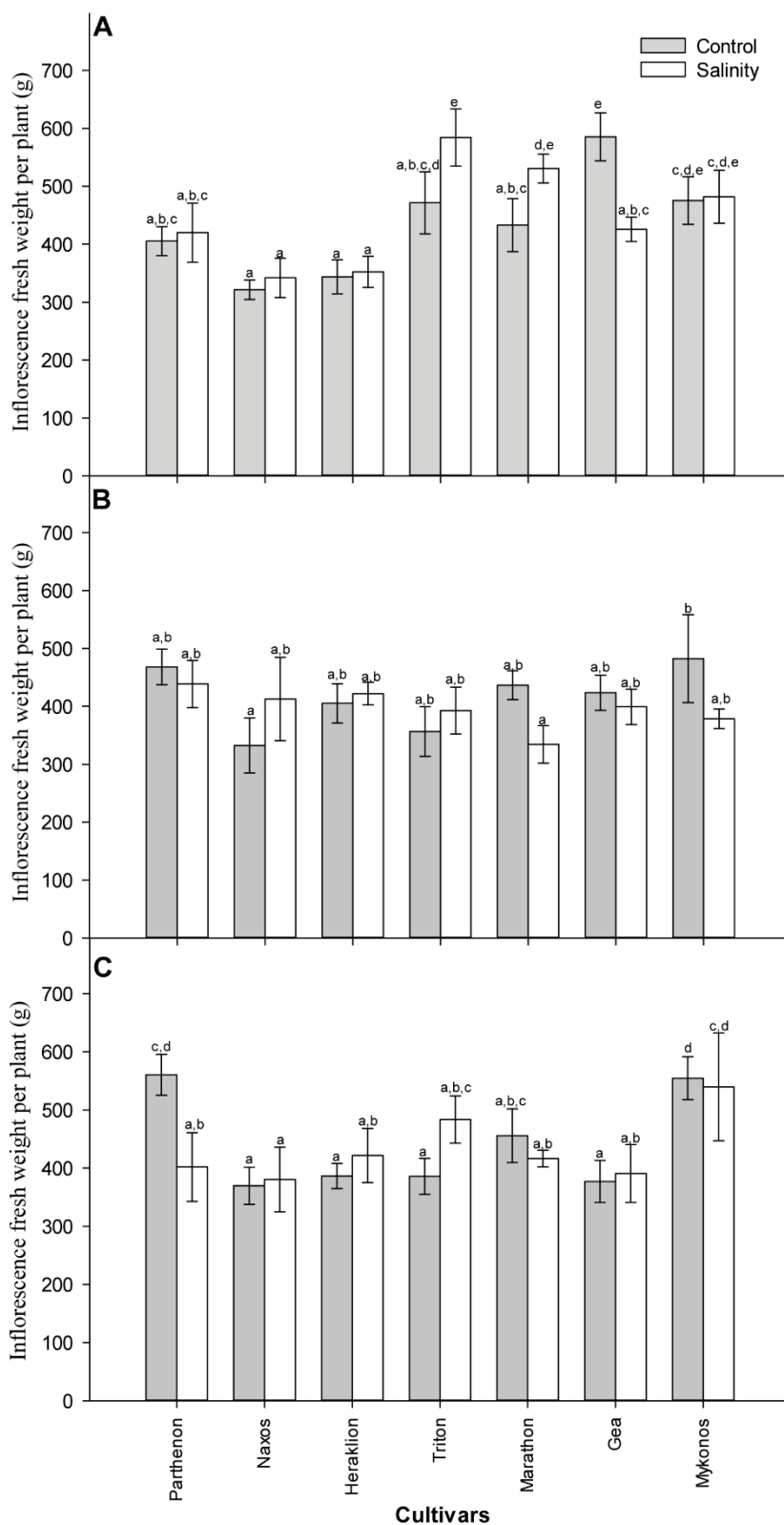


Figure 1. Inflorescence yield of different broccoli cultivars grown in control and saline conditions, in the field, during the (A) autumn, (B) winter, and (C) spring seasons. Bars with different letters show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 5$).

Table 2. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during autumn season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).

Inflorescences	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	1.12 \pm 0.16 ^{dfg}	1.32 \pm 0.06 ^{dfg}	0.10 \pm 0.013 ^a	0.12 \pm 0.06 ^e	0.88 \pm 0.10 ^{abcd}	1.067 \pm 0.14 ^{cd}	0.20 \pm 0.02 ^d	0.26 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03 ^{ab}	0.42 \pm 0.12 ^{ab}		
Naxos	1.14 \pm 0.03 ^{dfg}	1.15 \pm 0.23 ^{dfg}	0.07 \pm 0.006 ^b	0.06 \pm 0.006 ^{abc}	1.25 \pm 0.19 ^d	1.27 \pm 0.24 ^d	0.23 \pm 0.01 ^{cd}	0.22 \pm 0.02 ^{bcd}	0.96 \pm 0.23 ^{bc}	0.62 \pm 0.12 ^c		
Heraklion	0.56 \pm 0.08 ^b	0.39 \pm 0.07 ^{abc}	0.1 \pm 0.014 ^{cde}	tr	0.66 \pm 0.03 ^{abc}	0.91 \pm 0.09 ^{bcd}	0.18 \pm 0.01 ^{abc}	0.18 \pm 0.02 ^{abc}	0.54 \pm 0.07 ^{abc}	0.57 \pm 0.15 ^{ab}		
Triton	0.29 \pm 0.15 ^a	0.59 \pm 0.05 ^{abcd}	0.02 \pm 0.003 ^a	0.07 \pm 0.013 ^{cd}	0.76 \pm 0.15 ^{abc}	1.06 \pm 0.07 ^{cd}	0.19 \pm 0.03 ^{abc}	0.22 \pm 0.02 ^{bcd}	0.17 \pm 0.02 ^{ab}	0.33 \pm 0.44 ^{ab}		
Marathon	0.82 \pm 0.21 ^{bcd}	1.44 \pm 0.12 ^e	0.07 \pm 0.014 ^{bcd}	0.07 \pm 0.021 ^{bcd}	0.68 \pm 0.18 ^{abc}	0.85 \pm 0.03 ^{abcd}	0.17 \pm 0.02 ^{abc}	0.14 \pm 0.03 ^{ab}	0.16 \pm 0.03 ^a	0.19 \pm 0.07 ^{ab}		
Gea	0.64 \pm 0.12 ^{abcd}	1.05 \pm 0.15 ^{efg}	0.03 \pm 0.007 ^b	tr	0.52 \pm 0.18 ^{ab}	0.37 \pm 0.27 ^{abcd}	0.16 \pm 0.03 ^{abc}	0.22 \pm 0.01 ^{bcd}	0.38 \pm 0.02 ^{ab}	0.30 \pm 0.04 ^{ab}		
Mykonos	0.45 \pm 0.19 ^{abcd}	0.92 \pm 0.01 ^{def}	tr	tr	0.55 \pm 0.05 ^{ab}	0.41 \pm 0.14 ^a	0.016 \pm 0.01 ^{abc}	0.16 \pm 0.03 ^a	0.42 \pm 0.12 ^{ab}	0.29 \pm 0.09 ^{ab}		
Leaves	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.57 \pm 0.05 ^a	0.41 \pm 0.07 ^a	tr	tr	0.84 \pm 0.1 ^{de}	1 \pm 0.10 ^e	0.13 \pm 0.01 ^{ab}	0.23 \pm 0.08 ^{abc}	0.20 \pm 0.01 ^{abc}	0.27 \pm 0.02 ^{bcd}		
Naxos	0.48 \pm 0.13 ^a	0.56 \pm 0.04 ^a	tr	tr	0.63 \pm 0.07 ^{abcd}	0.67 \pm 0.09 ^{bcd}	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	0.32 \pm 0.07 ^{bc}	0.31 \pm 0.02 ^{cd}	0.28 \pm 0.01 ^{bcd}		
Heraklion	0.46 \pm 0.06 ^a	0.52 \pm 0.05 ^a	tr	tr	0.69 \pm 0.03 ^{bcd}	0.82 \pm 0.09 ^{cde}	0.09 \pm 0.03 ^a	0.19 \pm 0.02 ^{ab}	0.34 \pm 0.03 ^d	0.23 \pm 0.04 ^{abcd}		
Triton	0.40 \pm 0.02 ^a	0.51 \pm 0.03 ^a	tr	tr	0.38 \pm 0.01 ^a	0.65 \pm 0.07 ^{bcd}	0.13 \pm 0.03 ^a	0.10 \pm 0.01 ^{ab}	0.13 \pm 0.03 ^a	0.17 \pm 0.01 ^{ab}		
Marathon	0.51 \pm 0.06 ^a	0.43 \pm 0.04 ^a	tr	tr	0.45 \pm 0.01 ^{ab}	0.69 \pm 0.09 ^{bcd}	0.18 \pm 0.06 ^{ab}	0.40 \pm 0.10 ^c	0.21 \pm 0.06 ^{abc}	0.23 \pm 0.02 ^{abcd}		
Gea	0.51 \pm 0.03 ^a	0.45 \pm 0.06 ^a	tr	tr	0.57 \pm 0.08 ^{abc}	1.03 \pm 0.51 ^d	0.13 \pm 0.02 ^{ab}	0.18 \pm 0.03 ^{ab}	0.27 \pm 0.05 ^{bcd}	0.19 \pm 0.02 ^{abc}		
Mykonos	0.45 \pm 0.01 ^a	0.49 \pm 0.04 ^a	tr	tr	0.47 \pm 0.02 ^{ab}	0.46 \pm 0.08 ^{ab}	0.08 \pm 0.02 ^{ab}	0.16 \pm 0.05 ^a	0.17 \pm 0.02 ^{ab}	0.30 \pm 0.02 ^{cd}		
Roots	GRA		GNA		PE		GBS		MGBS		NGBS	
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.27 \pm 0.04 ^{cd}	0.35 \pm 0.04 ^d	280 \pm 10 ^a	50 \pm 5 ^c	0.69 \pm 0.04 ^{ab}	0.75 \pm 0.05 ^{ab}	0.54 \pm 0.03 ^{ef}	0.47 \pm 0.07 ^f	0.16 \pm 0.03 ^{ab}	0.16 \pm 0.08 ^{ab}	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	0.21 \pm 0.01 ^{de}
Naxos	0.26 \pm 0.05 ^{cd}	0.27 \pm 0.03 ^{cd}	10 \pm 0.5 ^d	30 \pm 5 ^c	0.80 \pm 0.05 ^{ab}	0.71 \pm 0.07 ^{ab}	0.38 \pm 0.05 ^{cde}	0.22 \pm 0.02 ^a	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	0.22 \pm 0.02 ^{bc}	0.17 \pm 0.02 ^{abcd}	0.25 \pm 0.01 ^e
Heraklion	0.03 \pm 0.006 ^a	0.23 \pm 0.03 ^e	tr	140 \pm 10 ^b	0.65 \pm 0.11 ^a	0.69 \pm 0.05 ^{ab}	0.14 \pm 0.02 ^a	0.41 \pm 0.03 ^{def}	0.20 \pm 0.01 ^{bc}	0.32 \pm 0.06 ^c	0.12 \pm 0.01 ^{ab}	0.21 \pm 0.01 ^{cde}
Triton	0.052 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	tr	tr	0.63 \pm 0.04 ^a	0.81 \pm 0.06 ^{ab}	0.24 \pm 0.02 ^{ab}	0.42 \pm 0.04 ^{def}	0.13 \pm 0.02 ^{ab}	0.20 \pm 0.02 ^{ab}	0.11 \pm 0.02 ^{ab}	0.18 \pm 0.03 ^{abcd}
Marathon	0.08 \pm 0.03 ^a	0.11 \pm 0.02 ^{ab}	tr	tr	0.72 \pm 0.08 ^{ab}	0.89 \pm 0.08 ^b	0.42 \pm 0.05 ^{def}	1.81 \pm 0.03 ^{def}	0.11 \pm 0.03 ^{ab}	0.18 \pm 0.01 ^{ab}	0.17 \pm 0.01 ^{abcd}	0.21 \pm 0.03 ^{de}
Gea	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	0.18 \pm 0.02 ^{bc}	tr	12 \pm 1 ^d	0.60 \pm 0.03 ^a	0.82 \pm 0.07 ^{ab}	0.38 \pm 0.03 ^{abcde}	0.42 \pm 0.04 ^{def}	0.16 \pm 0.02 ^{ab}	0.22 \pm 0.02 ^{bc}	0.10 \pm 0.02 ^a	0.18 \pm 0.02 ^{bcd}
Mykonos	0.06 \pm 0.03 ^a	0.09 \pm 0.01 ^{ab}	tr	tr	0.79 \pm 0.03 ^{ab}	0.76 \pm 0.08 ^{ab}	0.27 \pm 0.03 ^{abc}	0.30 \pm 0.02 ^{abcd}	0.07 \pm 0.01 ^a	0.15 \pm 0.02 ^{ab}	0.11 \pm 0.01 ^{ab}	0.14 \pm 0.02 ^{abc}

GLS concentration expressed as mg or μ mg of GLS g⁻¹ DW of broccoli plants. GRA = glucoraphanin; 4HGBS = 4-hydroxyglucobrassicin; GBS = glucobrassicin; MGBS = 4-methoxyglucobrassicin; NGBS = neoglucobrassicin; GNA = gluconapin; PE = gluconasturtin; tr = trace values.

Table 3. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during winter season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).

Inflorescences	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.53 \pm 0.1 ^{de}	0.42 \pm 0.04 ^{cd}	tr	tr	0.92 \pm 0.04 ^{bc}	0.77 \pm 0.08 ^{ab}	tr	tr	0.39 \pm 0.13 ^{bcd}	0.47 \pm 0.03 ^{cde}		
Naxos	0.78 \pm 0.05 ^e	0.55 \pm 0.05 ^{de}	tr	tr	1.44 \pm 0.15 ^d	1.16 \pm 0.09 ^c	tr	tr	0.25 \pm 0.01 ^{abc}	0.60 \pm 0.14 ^e		
Heraklion	0.34 \pm 0.05 ^{abcd}	0.5 \pm 0.02 ^{de}	tr	tr	0.96 \pm 0.07 ^{bc}	0.70 \pm 0.10 ^{ab}	tr	tr	0.56 \pm 0.16 ^{bcd}	0.33 \pm 0.01 ^{bcd}		
Triton	0.18 \pm 0.04 ^{abc}	0.16 \pm 0.04 ^{abc}	tr	tr	0.92 \pm 0.06 ^{bc}	0.87 \pm 0.17 ^{bc}	tr	tr	0.31 \pm 0.06 ^{bcd}	0.26 \pm 0.07 ^{abc}		
Marathon	0.35 \pm 0.1 ^{cd}	0.20 \pm 0.02 ^{abc}	tr	tr	0.63 \pm 0.07 ^{ab}	0.73 \pm 0.13 ^{ab}	tr	tr	0.15 \pm 0.05 ^a	0.36 \pm 0.01 ^{bcd}		
Gea	0.15 \pm 0.01 ^{abc}	0.15 \pm 0.03 ^{abc}	tr	tr	0.5 \pm 0.05 ^a	0.66 \pm 0.10 ^{ab}	tr	tr	0.13 \pm 0.04 ^{ab}	0.32 \pm 0.07 ^{bcd}		
Mykonos	0.12 \pm 0.03 ^{ab}	0.06 \pm 0.01 ^a	tr	tr	0.5 \pm 0.04 ^a	0.76 \pm 0.08 ^{ab}	tr	tr	0.27 \pm 0.05 ^{abcd}	0.59 \pm 0.09 ^{de}		
Leaves	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.30 \pm 0.07 ^b	0.33 \pm 0.03 ^b	0.04 \pm 0.004 ^{ab}	0.04 \pm 0.003 ^{ab}	0.80 \pm 0.07 ^{ab}	0.96 \pm 0.1 ^{ab}	0.23 \pm 0.02	0.25 \pm 0.03	0.28 \pm 0.02	0.34 \pm 0.05		
Naxos	0.26 \pm 0.05 ^{ab}	0.37 \pm 0.01 ^b	0.04 \pm 0.003 ^{ab}	0.04 \pm 0.01 ^{ab}	1.04 \pm 0.08 ^{ab}	1.20 \pm 0.01 ^a	0.28 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03	0.44 \pm 0.01	0.42 \pm 0.03		
Heraklion	0.24 \pm 0.04 ^{ab}	0.14 \pm 0.04 ^a	0.05 \pm 0.002 ^{ab}	0.05 \pm 0.009 ^{ab}	1.14 \pm 0.06 ^{ab}	1.06 \pm 0.12 ^{ab}	0.22 \pm 0.04	0.22 \pm 0.03	0.35 \pm 0.04	0.40 \pm 0.07		
Triton	0.22 \pm 0.03 ^{ab}	0.16 \pm 0.04 ^a	0.07 \pm 0.001 ^{ab}	0.06 \pm 0.005 ^b	0.95 \pm 0.15 ^{ab}	0.86 \pm 0.16 ^{ab}	0.18 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.34 \pm 0.03	0.31 \pm 0.03		
Marathon	0.21 \pm 0.04 ^{ab}	0.15 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{ab}	0.06 \pm 0.01 ^b	0.69 \pm 0.12 ^b	1.08 \pm 0.02 ^{ab}	0.20 \pm 0.03	0.22 \pm 0.05	0.32 \pm 0.04	0.36 \pm 0.01		
Gea	0.26 \pm 0.01 ^{ab}	0.19 \pm 0.04 ^a	0.05 \pm 0.003 ^{ab}	0.05 \pm 0.001 ^{ab}	1.06 \pm 0.07 ^{ab}	1.22 \pm 0.05 ^a	0.20 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	0.31 \pm 0.04	0.39 \pm 0.02		
Mykonos	0.31 \pm 0.08 ^b	0.18 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.003 ^a	0.05 \pm 0.01 ^{ab}	1.38 \pm 0.05 ^a	1.36 \pm 0.15 ^a	0.21 \pm 0.03	0.25 \pm 0.07	0.28 \pm 0.03	0.49 \pm 0.07		
Roots	GRA		GNA		PE		GBS		MGBS		NGBS	
	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.19 \pm 0.04 ^{abcd}	0.32 \pm 0.02 ^{de}	18 \pm 2 ^{ab}	50 \pm 5 ^b	0.60 \pm 0.04	0.70 \pm 0.13	0.72 \pm 0.02	0.74 \pm 0.02 ^{bc}	0.27 \pm 0.05 ^{abc}	0.35 \pm 0.03 ^{bc}	0.18 \pm 0.05 ^a	0.27 \pm 0.06
Naxos	0.13 \pm 0.05 ^{ab}	0.26 \pm 0.03 ^{abcd}	22 \pm 5 ^{ab}	37 \pm 7 ^b	0.49 \pm 0.04	0.62 \pm 0.01	0.61 \pm 0.03 ^{abc}	0.69 \pm 0.02 ^{abc}	0.28 \pm 0.02 ^{abc}	0.36 \pm 0.02 ^{bcd}	0.20 \pm 0.02 ^{ab}	0.28 \pm 0.02 ^{abc}
Heraklion	0.10 \pm 0.01 ^a	0.26 \pm 0.03 ^{bcd}	46 \pm 5 ^b	14 \pm 1 ^a	0.50 \pm 0.07	0.52 \pm 0.04	0.58 \pm 0.04 ^{abc}	0.81 \pm 0.04 ^c	0.28 \pm 0.01 ^{abc}	0.39 \pm 0.01 ^d	0.20 \pm 0.02 ^{ab}	0.31 \pm 0.01 ^{bc}
Triton	0.11 \pm 0.03 ^a	0.19 \pm 0.01 ^{abc}	20 \pm 4 ^{ab}	tr	0.55 \pm 0.05	0.66 \pm 0.07	0.62 \pm 0.05 ^{abc}	0.77 \pm 0.02 ^{bc}	0.25 \pm 0.04 ^a	0.29 \pm 0.03 ^{abcd}	0.17 \pm 0.04 ^a	0.21 \pm 0.03 ^{abc}
Marathon	0.20 \pm 0.02 ^{abcd}	0.32 \pm 0.03 ^{de}	30 \pm 3 ^{ab}	tr	0.51 \pm 0.08	0.69 \pm 0.07	0.59 \pm 0.03 ^{abc}	0.78 \pm 0.04 ^{bc}	0.25 \pm 0.02 ^a	0.33 \pm 0.03 ^{cd}	0.17 \pm 0.01 ^a	0.25 \pm 0.03 ^{abc}
Gea	0.19 \pm 0.04 ^{abcd}	0.34 \pm 0.06 ^e	12 \pm 4 ^a	12 \pm 2 ^a	0.56 \pm 0.03	0.61 \pm 0.04	0.54 \pm 0.02 ^a	0.48 \pm 0.02 ^{ab}	0.27 \pm 0.03 ^{ab}	0.37 \pm 0.01 ^d	0.19 \pm 0.01 ^{ab}	0.29 \pm 0.01 ^{bc}
Mykonos	0.18 \pm 0.01 ^{ab}	0.31 \pm 0.07 ^{cde}	22 \pm 4 ^{ab}	tr	0.55 \pm 0.08	0.63 \pm 0.04	0.60 \pm 0.05 ^{bc}	0.73 \pm 0.03 ^{bc}	0.25 \pm 0.01 ^a	0.32 \pm 0.03 ^{cd}	0.15 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.03 ^{abc}

GLS concentration expressed as mg or μ mg of GLS g⁻¹ DW of broccoli plants. GRA = glucoraphanin; 4HGBS = 4-hydroxylglucobrassicin; GBS = glucobrassicin; MGBS = 4-methoxyglucobrassicin; NGBS = neoglucobrassicin; GNA = gluconapin; PE = gluconasturtin; tr = trace values.

Table 4. GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during spring season. Each glucosinolate followed with different letter showed significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).

Inflorescences	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.44 \pm 0.09 ^a	0.33 \pm 0.14 ^{de}	0.11 \pm 0.01 ^{abcd}	0.15 \pm 0.02 ^{cd}	1.36 \pm 0.21 ^b	1.61 \pm 0.15 ^{bcd}	0.24 \pm 0.03 ^c	0.26 \pm 0.02 ^c	1.89 \pm 0.30 ^{ab}	2.12 \pm 0.02 ^{abc}		
Naxos	0.54 \pm 0.08 ^{cde}	0.31 \pm 0.10 ^{cde}	0.12 \pm 0.01 ^{abcd}	0.13 \pm 0.01 ^{bcd}	2.14 \pm 0.10 ^g	1.77 \pm 0.15 ^{cdef}	0.33 \pm 0.03	0.23 \pm 0.02 ^{bc}	2.33 \pm 0.23	2.00 \pm 0.18 ^{abc}		
Heraklion	0.14 \pm 0.02 ^{abc}	0.29 \pm 0.01 ^c	0.08 \pm 0.01 ^{abcd}	0.13 \pm 0.01 ^{bcd}	1.41 \pm 0.10 ^{bc}	1.94 \pm 0.04 ^{efg}	0.18 \pm 0.02 ^{ab}	0.22 \pm 0.01 ^b	2.21 \pm 0.22 ^{abcd}	2.40 \pm 0.16 ^{bcd}		
Triton	0.11 \pm 0.02 ^{abc}	0.09 \pm 0.01 ^{ab}	0.17 \pm 0.02 ^d	0.17 \pm 0.03 ^d	1.84 \pm 0.06 ^{defg}	1.24 \pm 0.63 ^{efg}	0.31 \pm 0.02 ^d	0.81 \pm 0.05 ^e	2.80 \pm 0.12 ^{de}	2.54 \pm 0.11 ^{cde}		
Marathon	0.10 \pm 0.03 ^{ab}	0.10 \pm 0.03 ^{abc}	0.06 \pm 0.003 ^a	0.10 \pm 0.01 ^{abcd}	1.67 \pm 0.09 ^{bcd}	1.48 \pm 0.04 ^{bcd}	0.17 \pm 0.01 ^{ab}	0.17 \pm 0.01 ^{ab}	2.08 \pm 0.15 ^{abc}	2.40 \pm 0.04 ^{bcd}		
Gea	0.27 \pm 0.07 ^c	0.14 \pm 0.04 ^{abc}	0.09 \pm 0.007 ^{ab}	0.09 \pm 0.01 ^{ab}	1.35 \pm 0.07 ^b	2.08 \pm 0.08 ^{fg}	0.16 \pm 0.01 ^a	0.18 \pm 0.02 ^{ab}	2.05 \pm 0.08 ^{abc}	2.77 \pm 0.07 ^e		
Mykonos	0.06 \pm 0.02 ^a	0.10 \pm 0.03 ^{ab}	0.09 \pm 0.007 ^{ab}	0.08 \pm 0.01 ^{ab}	0.76 \pm 0.03 ^a	0.78 \pm 0.05 ^a	0.19 \pm 0.01 ^{ab}	0.20 \pm 0.01 ^b	1.65 \pm 0.06 ^a	2.32 \pm 0.16 ^{bcd}		
Leaves	GRA		4HGBS		GBS		MGBS		NGBS			
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity		
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.54 \pm 0.05 ^{cdef}	0.54 \pm 0.04 ^{cdef}	0.03 \pm 0.003 ^a	0.04 \pm 0.001 ^a	1.12 \pm 0.14 ^a	1.57 \pm 0.05 ^{cde}	0.27 \pm 0.015 ^{ef}	0.31 \pm 0.01 ^f	2.15 \pm 0.08 ^{bc}	2.98 \pm 0.01 ^f		
Naxos	0.53 \pm 0.06 ^{cdef}	0.68 \pm 0.03 ^{def}	0.03 \pm 0.002 ^a	0.04 \pm 0.001 ^a	1.65 \pm 0.10 ^{cdef}	1.84 \pm 0.12 ^{def}	0.15 \pm 0.005 ^a	0.14 \pm 0.008 ^a	3.02 \pm 0.13	2.83 \pm 0.13 ^{ef}		
Heraklion	0.30 \pm 0.05 ^a	0.56 \pm 0.05 ^{cdef}	0.04 \pm 0.001 ^a	0.05 \pm 0.005 ^a	1.50 \pm 0.02 ^{cd}	1.62 \pm 0.05 ^{cdef}	0.22 \pm 0.015 ^{cd}	0.21 \pm 0.004 ^{bcd}	2.34 \pm 0.04	3.03 \pm 0.03 ^f		
Triton	0.35 \pm 0.08 ^{ab}	0.43 \pm 0.008 ^{abc}	0.04 \pm 0.001 ^a	0.06 \pm 0.01 ^a	1.51 \pm 0.07 ^{cde}	1.87 \pm 0.03 ^{ef}	0.16 \pm 0.008 ^a	0.18 \pm 0.012 ^{abc}	2.79 \pm 0.09 ^{ef}	2.80 \pm 0.03 ^{ef}		
Marathon	0.40 \pm 0.01 ^{abc}	0.75 \pm 0.05 ^f	0.05 \pm 0.004 ^a	0.06 \pm 0.005 ^a	1.47 \pm 0.07 ^{bc}	1.94 \pm 0.06 ^f	0.17 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.002	2.59 \pm 0.13 ^{de}	2.29 \pm 0.06 ^{cd}		
Gea	0.51 \pm 0.04 ^{bcd}	0.72 \pm 0.34 ^f	0.04 \pm 0.002 ^a	0.05 \pm 0.003 ^a	1.46 \pm 0.03 ^{bc}	1.95 \pm 0.09 ^f	0.17 \pm 0.004 ^{ab}	0.24 \pm 0.006 ^{de}	2.16 \pm 0.03 ^{bc}	2.70 \pm 0.07 ^{ef}		
Mykonos	0.48 \pm 0.06 ^{bcd}	0.70 \pm 0.09 ^f	0.04 \pm 0.004 ^a	0.05 \pm 0.008 ^a	1.00 \pm 0.06 ^a	1.15 \pm 0.05 ^{ab}	0.18 \pm 0.016 ^{abc}	0.18 \pm 0.015 ^{abc}	1.71 \pm 0.09 ^a	1.90 \pm 0.02 ^{ab}		
Roots	GRA		GNA		PE		GBS		MGBS		NGBS	
Cultivars	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity
mg g ⁻¹ DW												
Parthenon	0.87 \pm 0.02 ^{cd}	0.95 \pm 0.01 ^d	27 \pm 2 ^{ab}	36 \pm 3 ^b	0.10 \pm 0.008 ^a	0.097 \pm 0.01 ^a	1.01 \pm 0.05 ^d	1.43 \pm 0.04 ^a	0.27 \pm 0.02 ^{abc}	0.39 \pm 0.04 ^c	0.46 \pm 0.01 ^{cde}	0.55 \pm 0.02 ^f
Naxos	0.85 \pm 0.01 ^{bcd}	0.89 \pm 0.04 ^d	21 \pm 1 ^a	23 \pm 1 ^a	0.17 \pm 0.009 ^a	0.16 \pm 0.01 ^a	0.96 \pm 0.04 ^d	0.98 \pm 0.04 ^d	0.28 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.03 ^{ab}	0.41 \pm 0.01 ^{abcd}	0.53 \pm 0.02 ^{ef}
Heraklion	0.84 \pm 0.04 ^{bcd}	0.64 \pm 0.08 ^{abc}	19 \pm 1 ^a	29 \pm 2 ^{ab}	0.95 \pm 0.04 ^b	0.14 \pm 0.02 ^a	0.73 \pm 0.03 ^a	0.97 \pm 0.04 ^d	0.28 \pm 0.01 ^{ab}	0.23 \pm 0.01 ^{ab}	0.39 \pm 0.03 ^{abc}	0.44 \pm 0.01 ^{bcd}
Triton	0.73 \pm 0.04 ^{abcd}	0.78 \pm 0.03 ^{abcd}	22 \pm 4 ^a	26 \pm 3 ^{ab}	0.16 \pm 0.03 ^a	0.12 \pm 0.02 ^a	0.79 \pm 0.03 ^{abc}	0.87 \pm 0.02 ^{bcd}	0.25 \pm 0.02 ^{abc}	0.36 \pm 0.02 ^{bc}	0.37 \pm 0.02 ^{ab}	0.44 \pm 0.01 ^{bcd}
Marathon	0.63 \pm 0.08 ^{ab}	0.78 \pm 0.03 ^{abcd}	22 \pm 4 ^a	25 \pm 2 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	0.13 \pm 0.04 ^a	0.64 \pm 0.02 ^a	0.74 \pm 0.03 ^{ab}	0.25 \pm 0.02 ^{abc}	0.34 \pm 0.45 ^{bc}	0.38 \pm 0.01 ^{abc}	0.49 \pm 0.02 ^{def}
Gea	0.57 \pm 0.07 ^a	0.74 \pm 0.05 ^{abcd}	30 \pm 3 ^{ab}	28 \pm 2 ^{ab}	0.13 \pm 0.006 ^a	0.13 \pm 0.04 ^a	0.72 \pm 0.02 ^a	0.89 \pm 0.01 ^{cd}	0.27 \pm 0.05 ^{abc}	0.31 \pm 0.03 ^{abc}	0.41 \pm 0.02 ^{abcd}	0.48 \pm 0.01 ^{def}
Mykonos	0.60 \pm 0.08 ^a	0.76 \pm 0.05 ^{abcd}	22 \pm 3 ^a	20 \pm 1 ^a	0.17 \pm 0.006 ^a	0.17 \pm 0.05 ^a	0.69 \pm 0.02 ^a	0.78 \pm 0.04 ^{abc}	0.25 \pm 0.03 ^{abc}	0.31 \pm 0.02 ^{abc}	0.34 \pm 0.03 ^a	0.46 \pm 0.03 ^{cde}

GLS concentration expressed as mg or μ mg of GLS g⁻¹ DW of broccoli plants. GRA = glucoraphanin; 4HGBS = 4-hydroxyglucobrassicin; GBS = glucobrassicin; MGBS = 4-methoxyglucobrassicin; NGBS = neoglucobrassicin; GNA = gluconapin; PE = gluconasturtin.

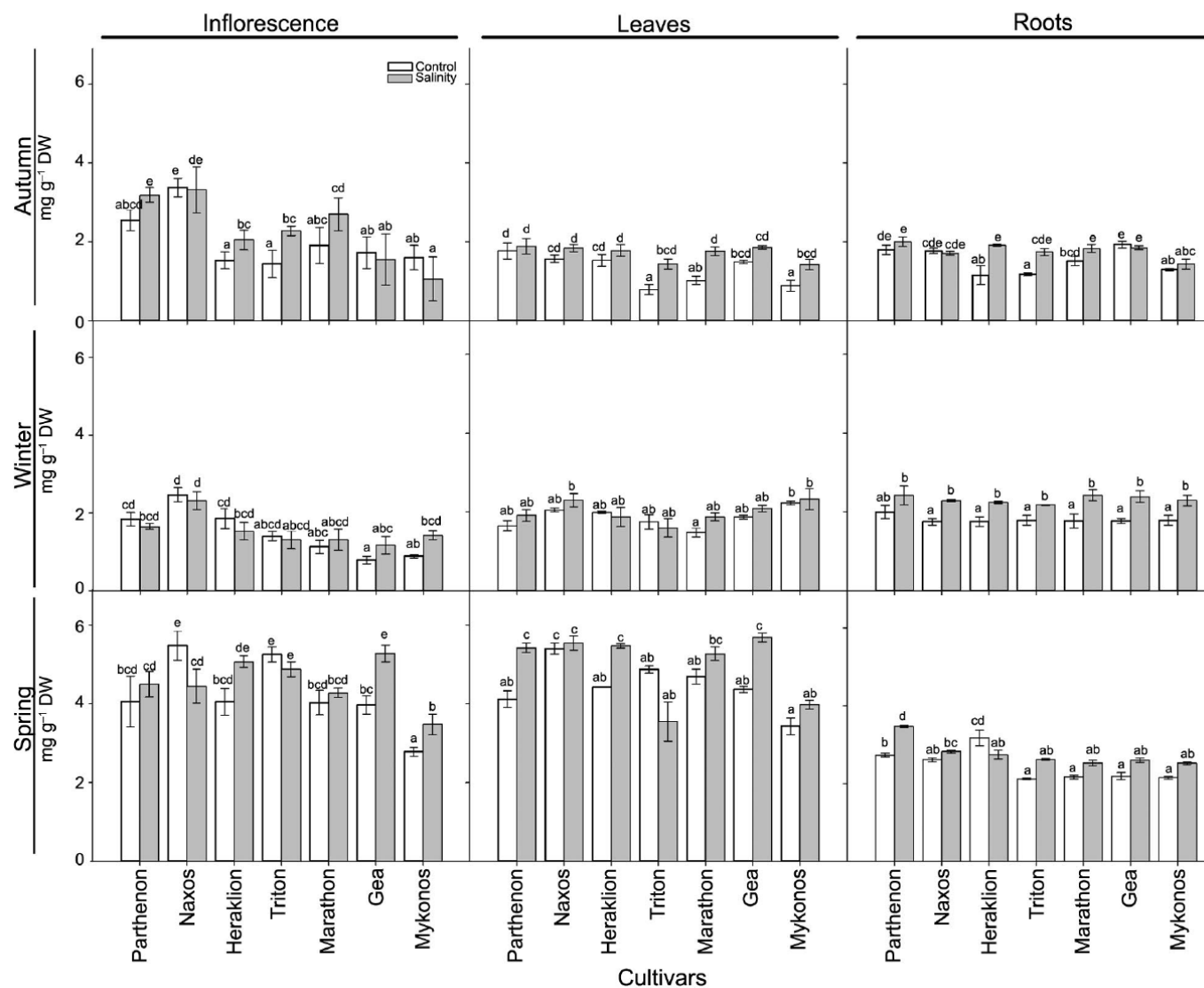


Figure 2. Total GLS concentrations in different organs of broccoli plants grown in control and saline conditions, in the field, during the autumn, winter, and spring seasons. For each glucosinolate, different letters show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).

Table 5. Cinnamoyl-indol-GLs in different organs of broccoli plants grown under control and saline stress in the field during the autumn, winter, and spring seasons. Different letters in a column and treatment show significant differences according to the Duncan's test at $p < 0.05$. Values are means \pm SE ($n = 4$).

Autumn	Cultivars	Cinnamoyl-indol-GLS (mg g ⁻¹ DW)					
		Inflorescence		Leaves		Roots	
		Control	Salinity	Control	Salinity	Control	Salinity
	Parthenon	tr	0.006 \pm 0.001	tr	0.010 \pm 0.002	tr	tr
	Naxos	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Heraklion	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Triton	tr	0.010 \pm 0.001	tr	0.010 \pm 0.001	tr	tr
	Marathon	tr	0.010 \pm 0.001	tr	0.030 \pm 0.001	tr	tr
	Gea	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Mykonos	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Winter							
	Parthenon	tr	tr	tr	tr	0.020 \pm 0.007	0.030 \pm 0.005
	Naxos	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Heraklion	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Triton	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	Marathon	tr	tr	tr	tr	0.010 \pm 0.002	0.020 \pm 0.007
	Gea	tr	tr	tr	tr	0.005 \pm 0.001	0.006 \pm 0.002
	Mykonos	tr	tr	tr	tr	tr	tr
Spring							
	Parthenon	0.010 \pm 0.001 ^a	0.020 \pm 0.001 ^{ab}	0.020 \pm 0.001 ^b	0.030 \pm 0.001 ^{bc}	0.020 \pm 0.003 ^{ab}	0.040 \pm 0.001 ^c
	Naxos	tr	0.010 \pm 0.001 ^a	tr	tr	0.010 \pm 0.001 ^a	0.020 \pm 0.003 ^{ab}
	Heraklion	tr	tr	tr	tr	0.010 \pm 0.001 ^a	0.020 \pm 0.001 ^b
	Triton	0.020 \pm 0.001 ^{ab}	0.040 \pm 0.001 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.020 \pm 0.001 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.030 \pm 0.001 ^{bc}
	Marathon	0.030 \pm 0.001 ^b	0.040 \pm 0.002 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.040 \pm 0.001 ^c	0.020 \pm 0.02 ^{ab}	0.040 \pm 0.002 ^c
	Gea	tr	tr	tr	tr	0.010 \pm 0.001 ^a	0.010 \pm 0.001 ^a
	Mykonos	tr	0.010 \pm 0.001 ^a	tr	0.020 \pm 0.002 ^b	0.010 \pm 0.001 ^a	0.020 \pm 0.001 ^{ab}

Cinnamoyl-indol-GLS concentrations are expressed as: mg g⁻¹ DW; tr = trace values.

2.10 DISCUSSION

Growth reductions in broccoli has been reported to depend on the duration of stress application. Thus, a two-phase growth decrease in response to salinity has been recorded (López-Berenguer et al., 2006). The first phase of growth reduction was reported to be due to water stress, while the second phase was derived from internal damage due to salt (Na^+) accumulation. Lower reduction of growth during the second phase was reported to be related to vacuolar compartmentalization of Na^+ and Cl^- (Munns, 1993), in which the regulation of aquaporin functionality is key (López-Berenguer et al., 2006). In our work, the fact that there were only significant reductions in inflorescence yield with salinity in two cultivars and in specific seasons indicates that salinity was not the dominant stress at this salinity level (80 mM) in field conditions. Recently, irrigation with saline water for only part of the crop cycle (until the appearance of the broccoli head or from the appearance of the broccoli head) or during the entire autumn growing season decreased the total broccoli yield by 20 % and 24 %, respectively, compared to the control (Gioia et al., 2018). This observation is in line with our findings in previous experiments with hydroponic culture (Dominguez-Perles et al., 2011). However, in the present field experiment, the application of 80 mM NaCl through soil irrigation only reduced significantly the inflorescence weight in cultivar Gea in autumn (by 27 %) and in Parthenon in spring (by 28 %). For the rest of the cultivars, inflorescence yield was not altered significantly during any of the seasons, indicating their high tolerance of salinity together with the buffer effect of the soil. In this regard, other studies revealed salt-induced permanent modifications of soil physical-chemical properties, affecting yield of broccoli cultivar Marathon grown during the winter, in agreement with our results (De Pascale et al., 2005).

In addition, the effect of the season was dependent on the cultivar: Triton, Marathon, and Gea had higher inflorescence weights during the autumn, whereas Parthenon and Mykonos had higher yields in spring. For all the other cultivars and seasons, the weight was around 400 to 450 g per inflorescence, with no significant differences. It has been reported that when multiple abiotic stresses were applied to different *Brassica oleracea* L. crop types, no relevant differences were found among them, which is promising for the development of more environmentally robust lines (Beacham et al., 2017). Therefore, if we consider the different temperatures and day lengths of the seasons as additional stresses to salinity, this can explain the differing responses of the cultivars studied.

The GLS determined here (GRA, GBS, HGB, MGB, NGB) had a profile different from that of broccoli cultivars studied previously (in which glucoiberin was present), which were grown under different (crop chamber and greenhouse) conditions (Dominguez-Perles et al., 2011; López-Berenguer et al., 2009), suggesting that field conditions orientated the secondary metabolism through different pathways. Still, other experiments carried out in field conditions showed different profile in similar cultivars as Marathon (Vallejo et al., 2003) pointing that GLs should be investigated for each individual

condition. The results in previous work showed a marked increase in GLS abundance in young leaves with salinity, higher with the 40 mM NaCl treatment than with 80 mM NaCl; however, in inflorescences, GLS abundance increased regardless of the NaCl concentration applied (López-Berenguer et al., 2009). Moreover, the three cultivars studied previously and grown in perlite under greenhouse conditions - ‘Nubia’, ‘Naxos’, and ‘Parthenon’ - showed an increase in GLS due to NaCl application (40 mM NaCl), which was apparently co-influenced by the growth temperature (Dominguez-Perles et al., 2011). Furthermore, under the field conditions of our experiment the increase in GLS levels due to salinity depended on the season and cultivar, influenced more by the temperature increase than by salinity for most cultivars. Other authors reported that the spring-summer climatic conditions increased directly the concentration of GLS (Aires et al., 2011), leading to higher antioxidant activity in broccoli inflorescences and kale leaves. In our experiment, additional enhancement by salinity and higher temperatures was only observed in Heraklion, Gea, and Mykonos.

In our cultivars, the indole GLS were influenced by salinity more than the aliphatic GLS. In addition, inflorescences and leaves showed higher GLS concentrations than roots in autumn and spring, and similar values (or lower for cultivars Triton, Marathon, and Gea) in winter. In this sense, additional stress factors, such as temperature that influenced GLS production in our cultivars, as the concentrations in inflorescences and leaves in spring were double than those in autumn and 3-fold greater than in winter. However, root concentrations remained similar in all seasons. It has been proposed that, since the GLS profile of root tissues differs from that in leaves and inflorescences, their associated isothiocyanates (GLS hydrolysis products) would also be different (Lee et al., 2017). Furthermore, the reported low nitrile formation capacity in root tissues was related to the low epithiospecifier protein gene transcription, which made the roots of broccoli a good source of isothiocyanates (Zhang et al., 2006).

The activation of GLS synthesis has been related to the recent description of WD40 domain proteins, and activator- and repressor-type transcription factors of the R2R3-type myeloblastosis (MYB), R3-type MYB, and basic helix-loop-helix (bHLH) families have been identified that regulate plant secondary metabolism and associated specialized cell development across diverse plant species, suggesting an ancient transcriptional component of gene regulatory networks in plants (Chezem and Clay, 2016). These authors pointed out that the biosynthetic pathways of phenylpropanoids and GLS are associated to transcriptional mechanisms that regulate the production of both. The direct regulatory network controlling GLS synthesis in *Arabidopsis* involves activator-type MYBs from subgroup 12 (Zhong et al., 2007), which are activated by biotic (Ahuja et al., 2010) and abiotic stress (Martínez-Ballesta et al., 2013).

One interesting point of our results is the appearance of a cinnamoyl-indol-glucosinolate in broccoli inflorescences. This type of derivatives has been described in broccoli (Survay et al., 2010)

and the occurrence of this type of compounds was also confirmed by the HPLCDAD- ESI-MSⁿ analysis of broccoli florets and in *Arabidopsis* (Survay et al., 2010; Lee et al., 2012), as well as in representatives of the *Cardamineae* tribe (Olsen et al., 2016). In our experiment, this derivative was induced in some of the cultivars, but only under saline conditions in autumn and winter. The physiological relevance of these type of compounds remains unclear; however, they can act as signal molecules involved in the machinery of plant defense (Chezem and Clay, 2016). This cinnamoyl- indol-GLS could be a signal molecule participating in a negative feedback to prevent over-production of GLS under stress (Heinze et al., 2015), a mode of action that requires further investigation.

It can be concluded that broccoli grown in field conditions is tolerant of moderate salinity (80 mM NaCl) in autumn, winter, and spring. In fact, the inflorescence weight was reduced significantly by NaCl exposure only for cultivars Gea, in autumn, and Parthenon, in spring. In addition, the total GLS concentration was increased by salinity in cultivars Parthenon, Heraklion, Triton, and Marathon, in autumn, and in Heraklion and Gea, in spring, representing a good technique for stimulation of GLS synthesis. The spring conditions led to much higher GLS accumulation, with an additional effect of salinity only in cultivars Heraklion, Gea, and Mykonos. Interestingly, the appearance of cinnamoyl-indol-GLS under stress-induced conditions and acting as signal molecule deserves further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (AGL2016- 80247-C2-1-R and RTC-2015-3536-2). The authors thank Dr. David Walker for the revision of the written English in the manuscript.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Conceptualization: Carvajal, M. Data acquisition: Rios, J.J.; Agudelo, A.; Data analysis: Rios, J.J.; Agudelo, A.; Moreno, D. Design of methodology: Moreno, D.; Carvajal, M. Writing and editing: Rios, J.J.; Agudelo, A.; Moreno, D.; Carvajal, M. Rios J.J. and Agudelo A. contributed equally.

REFERENCES

- Ahuja, I.; Rohloff, J.; Bones, A.M. 2010. Defense mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 311–348.
- Aires, A.; Rosa, E.; Carvalho R. 2011. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Journal of Science and Food Chemistry* 86: 1512–1516.
- Angelino, D.; Jeffery, E. 2014. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Food* 7: 67–76.
- Beacham, A.M.; Hand, P.; Pink, D.A.C.; Monaghan, J.M. 2017. Analysis of *Brassica oleracea* early stage abiotic stress responses reveals tolerance in multiple crop types and for multiple sources of stress. *Journal of Science and Food Chemistry* 97: 5271-5277.
- Brandt, K.; Christensen, L.P.; Hansen-Møller, J.; Hansen, S.L.; Haraldsdottir, J.; Jespersen, L.; Purup, S.; Kharazmi, A.; Barkholt, V.; Frøkiær, H.; Kobæk-Larsen, M. 2004. Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends in Food Science and Technology* 15: 384-393.
- Chezem, W.R.; Clay, N.K. 2016. Regulation of Plant Secondary Metabolism and Associated Specialized Cell Development by MYBs and bHLHs. *Phytochemistry* 131: 26–43.
- De Pascale, S.; Maggio, A.; Barbieri, G. 2005. Soil salinization affects growth, yield and mineral composition of cauliflower and broccoli. *European Journal of Agronomy* 23: 254-264.
- Di Gioia, F.; Roskopf, E.N.; Leonardi, C.; Guiffrida, F. 2018. Effects of application timing of saline irrigation water on broccoli production and quality. *Agricultural Water Management* 203: 97-104.
- Dominguez-Perles, R.; Martinez-Ballesta M.C.; Carvajal, M.; Garcia-Viguera, C.; Moreno, D.A. 2011. Novel varieties of broccoli for optimal bioactive components under salinity stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 91: 1638-1647.
- Gerhauser, C. Epigenetic impact of dietary isothiocyanates in cancer chemoprevention. 2013. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16: 405-410.
- Guiffrida, F.; Scuderi, D.; Giurato, R.; Leonardi, C. 2013. Physiological response of broccoli and cauliflower as affected by NaCl salinity. *Acta Horticulturae* 1005: 435-442.
- Heinze, M.; Brandt, W.; Marillonnet, S.; Roos, W. 2015. “Self” and “non-self” in the control of phytoalexin biosynthesis: plant phospholipases A2 with alkaloid-specific molecular fingerprints. *The Plant Cell* 27: 448–462.
- Kristal, A.R.; Lampe, J.W. 2002. Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 42: 1-9.

Lee, S.; Kaminaga, Y.; Cooper, B.; Pichersky, E.; Dudareva, N.; Chapple, C. 2012. Benzoylation and sinapoylation of glucosinolate R-groups in Arabidopsis. *The Plant Journal* 72: 411-422.

Lee, Y.S.; Ku, K.M.; Becker, T.M.; Juvik, J.A. 2017. Chemopreventive glucosinolate accumulation in various broccoli and collard tissues: Microfluidic-based targeted transcriptomics for by-product valorization. *PLOS ONE* 12: 1-18.

López-Berenguer, C.; García-Viguera, C.; Carvajal, M. 2006. Are root hydraulic conductivity responses to salinity controlled by aquaporins in broccoli plants? *Plant and Soil* 279: 13–23.

López-Berenguer, C.; Martínez-Ballesta, M.C.; Moreno, D.A.; Carvajal, M.; García-Viguera, C. 2009. Growing hardier crops for better health: Salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 572-578.

Lund, E. 2003. Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 73:135–143.

Martínez-Ballesta, M.C.; Carvajal, M. 2015. Myrosinase in Brassicaceae: The most important issue for glucosinolate turnover and food quality. *Phytochemistry Reviews* 16.

Martínez-Ballesta, M.C.; Moreno, D.A.; Carvajal, M. 2013. The physiological importance of glucosinolates on plant response to abiotic stress in Brassica. *International Journal of Molecular Science* 14: 11607–11625.

Moreno, D.A.; Pérez-Balibrea, S.; Gracia-Viguera, C. 2006. Phytochemical quality and bioactivity of edible sprouts. *Natural Product Communication* 1: 1037-1048.

Munns, R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell & Environmental* 16: 15-24.

Olsen, C.E.; Huang, X.; Hansen, C.I.C.; Cipollini, D.; Ørgaard, M.; Matthes, A.; Geu-Flores, F.; Koch, M.A.; Agerbirk, N. 2016. Glucosinolate diversity within a phylogenetic framework of the tribe Cardamineae (Brassicaceae) unraveled with HPLC-MS/MS and NMR-based analytical distinction of 70 desulfoglucosinolates. *PhytoChemistry* 132: 33-56.

Raskin, I.; Ripoll, C. 2004. Can an apple a day keep the doctor away? *Current of Pharmacology Desing* 10: 3419-3429.

Schonhof, I.; Blankenburg, D.; Müller, S.; Krumbein, A. 2007. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolates concentration of broccoli. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 170: 65–72.

Survay, N.S.; Kumar, B.; Upadhyaya, C.P.; Ko, E.Y.; Lee, C.H.; Choi, J.N.; Yoon, D.Y.; Park, S.W. 2010. Characterization of a cinnamoyl derivative from broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets. *Fitoterapia* 81: 1062-1066.

Vallejo, F.; Tomás-Barberán, F.A.; Gonzales Benavente-García, A.; García-Viguera, C. 2003. Total and individual glucosinolate contents in inflorescences of eight broccoli cultivars grown under various climatic and fertilization conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 83: 307–313.

Zaghdoud, C.; Alcaraz-López, C.; Mota-Cadenas, C.; Martínez-Ballesta, M.C.; Moreno, D.A.; Ferchichi, A.; Carvajal, M. 2012. Differential responses of two broccoli (*Brassica oleracea* L. var *Italica*) cultivars to salinity and nutritional quality improvement. *Scientific World Journal* 291435.

Zaghdoud, C.; Carvajal, M.; Moreno, D.A.; Ferchichi, A.; Martínez-Ballesta, M.C. 2016. Health-promoting compounds of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) plants as affected by nitrogen fertilisation in projected future climatic change environments. *Journal of Science and Food Agriculture* 96: 694-702.

Zhang Z, Ober JA, Kliebenstein DJ. 2006. The Gene Controlling the Quantitative Trait Locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 Alters Glucosinolate Hydrolysis and Insect Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1524-1536.

Zhong, R.; Richardson, E.A.; Ye, Z.H. 2007. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 2776–2792.

Zhu, J.K. 2001. Cell signaling under salt stress, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 401–406.

COMPOSICIÓN Y PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS EN PLANTAS ADULTAS DEL GÉNERO BRASSICA

Carvajal Alcaraz, M.; Moreno Fernandez, D. A.; Rios Ruiz, J. J.; Bernabeu Durá, J.; Agudelo Sanchez, A. Composición Y Procedimiento Para Incrementar El Contenido De Glucosinolatos En Plantas Adultas Del Género Brassica. Es 2 737 454 A1, 2020.

RESUMEN

Composición y procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica*.

La presente invención se refiere a una composición que comprende metil jasmonato y un polieter polisiloxano para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica*, por ejemplo, el brócoli. Mediante aplicaciones foliares de dicha composición en plantas adultas que presentan una cutícula desarrollada, se consigue un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos (principalmente glucorrafanina y neoglucobrasicina), en el florete de las plantas, sin que se produzca una degradación de sus características organolépticas.

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a una composición y a un procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica*, preferiblemente aquellas que se utilizan en alimentación humana, como por ejemplo el brócoli, mediante aplicación foliar una vez alcanzada la fase vegetativa reproductiva de la planta, sin que se produzca ninguna degradación de las características organolépticas de las partes de la planta destinadas a alimentación humana.

2.11 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El brócoli, planta del orden *Brassicales*, es una fuente rica de compuestos bioactivos entre los que destacan los glucosinolatos, compuestos del metabolismo secundario con nitrógeno y azufre en su molécula, que están recibiendo una gran atención científica por sus implicaciones en la fisiología de los vegetales (defensa vegetal) y en la calidad y bioactividad de los alimentos (calidad organoléptica y funcionalidad). Estos compuestos se encuentran casi exclusivamente en las crucíferas (Orden Capparales) y se hidrolizan cuando entran en contacto con la enzima mirosinasa (glucosidasa vegetal) así como por la acción de glucosidasas de la microbiota intestinal, dando lugar a los isotiocianatos, compuestos bioactivos, que están implicados en los mecanismos detoxificadores de las células a través de diferentes mecanismos de estimulación e inhibición de ciertas enzimas. Dos de los glucosinolatos que se pueden encontrar en variedades de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*) son la glucorrafanina y la neoglucobrasicina. Los derivados hidrolizados de estos glucosinolatos dan lugar al isotiocianato sulforrafano (proveniente de la glucorrafanina) y el indol-3-carbinol (proveniente de la glucobrasicina y sus compuestos relacionados). Ambos han atraído la atención de muy diversos grupos de investigación a nivel mundial por estar implicados en las propiedades antitumorales, antioxidantes, y protectoras frente radicales libres derivadas del consumo de brócoli (Moreno, D.A. et al. (2008) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1472-1481). Por lo tanto, o bien en fresco o como ingredientes derivados, el brócoli ofrece la posibilidad de desarrollar alimentos enriquecidos en compuestos bioactivos que ayuden a reducir la incidencia de enfermedades, con la consiguiente importancia en la industria agroalimentaria (Dominguez-Perles, R. et al. (2012) *Acta Horticulturae*, 939, 159-163). De hecho, se la reconoce como “la hortaliza con mayor valor nutritivo” en relación con el peso de la parte comestible.

Los mencionados glucosinolatos, también llamados “tioglucósidos”, son metabolitos secundarios aniónicos nitrógeno-sulfurados que se encuentran exclusivamente en la familia *Brassicaceae* (Verkerk, R. et al. (2010) *Acta Horticulturae* vol. 856, pp. 63-69). El esqueleto básico de los glucosinolatos (β -D-tioglucósido-N-hidroxisulfato) consiste en un grupo β -D-tioglucosa, una oxima sulfonada y una cadena lateral derivada de los aminoácidos metionina, fenilalanina, o triptófano (Figura 1). La estructura química de los glucosinolatos puede variar entre especies y entre variedades dentro de la misma especie (Dominguez-Perles, R. et al. (2010) *Journal of Food Chemistry* 75, 383-392). De acuerdo con la cadena lateral, los glucosinolatos pueden clasificarse ampliamente en: alifáticos, aromáticos, benzoicos, glicosilados múltiples, con azufre en su cadena lateral y heterocíclicos o indólicos (Halkier, B. A. et al. (2006). *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 303-333). En el caso del brócoli los más representativos son los alifáticos, aromáticos e indólicos (A).

Tabla A. Clasificación de los glucosinolatos más representativos en brócoli según su estructura.

ESTRUCTURA	GLUCOSINOLATO
Alifáticos	Glucoiberina (GI) Glucorafanina (GR) Glucoerucina (GE)
Aromáticos	Gluconasturtina (GN)
Indólicos	Glucobrassicina (GB) Neoglucobrassicina (NGB)

Los glucosinolatos presentan diversas e importantes propiedades fisiológicas y constituyen un mecanismo de defensa para la planta contra herbívoros y patógenos, que a altas concentraciones producen estrés metabólico en herbívoros invertebrados, afectando a su crecimiento.

Tienen propiedades biológicas de interés para la prevención de algunas enfermedades en los humanos que los consumen (Jeffery, E. H. et al. (2009). *Phytochemistry Reviews*, vol. 8, 283–298). Además, contribuyen al mantenimiento de los tejidos corporales, aumentan la resistencia a las infecciones, regulan el correcto desarrollo del sistema nervioso e intervienen en el crecimiento, y resultan beneficiosos para la elaboración de enzimas en el hígado (Moreno, D.A. et al. (2008). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 88, 1472-1481; Jeffery, E. H. et al. (2009). *Phytochemistry Reviews*, vol. 8, 283–298).

Los elicitadores o bioestimuladores son sustancias naturales que inducen cambios fisiológicos en la planta, activando sus mecanismos de defensa. Las plantas responden a estos factores mediante la activación de una serie de mecanismos, similares a las respuestas de defensa a las infecciones de patógenos o estímulos ambientales, que afectan al metabolismo de las plantas y mejoran la síntesis de fitoquímicos o metabolitos secundarios. Los primeros elicitadores bióticos se describieron a principios de la década de 1970 (Keen, N.T. (1975) *Science* 187, 74–75). Desde entonces, numerosas publicaciones han acumulado evidencias de aplicación de compuestos que inducen respuestas de defensa en plantas intactas como el brócoli (Ku KM et al. (2016) *Int J Mol Sci*. 15, 17(7), 1135). El uso de elicitadores se realiza también como herramienta para mejorar el contenido fitoquímico en plantas con fines de mejora alimentaria, aplicados solos o en combinaciones en puntos de tiempo seleccionados del crecimiento vegetal (para revisión ver: Baenas, N. et al. (2014). *Molecules*, 19(9), 13541-13563). Los elicitadores pueden clasificarse como compuestos bióticos y abióticos, y las hormonas vegetales (ácido salicílico, jasmonatos, etc.) pueden considerarse también elicitadores.

La elicitación puede usarse como tratamiento precosecha o postcosecha. Entre los tratamientos de precosecha se considera también la preparación de semillas (“priming”), consistente en hidratar las semillas en una disolución con el elicitador para inducir la respuesta de defensa de las células. Así, por ejemplo, se ha observado que las semillas de perejil tratadas con jasmonato mostraron un incremento

de los sistemas antioxidantes y la inducción de los sistemas de defensa por medio de la síntesis de fenilpropanoides (Conrath, U. et al. (2015) Annual Review of Phytopathology 53, 97-119). Los elicidores también pueden aplicarse como un gas en un entorno cerrado (como MeJA), en forma líquida a una disolución hidropónica o por aerosoles exógenos.

El ácido jasmónico (JA) y su éster metílico, el jasmonato de metilo (MeJA), son ampliamente conocidos por suscitar una amplia gama de compuestos al inducir la expresión de genes vegetales para diversas rutas biosintéticas. Estas pequeñas moléculas de señalización también definidas como "hormonas", se inducen en las células en respuesta a heridas o ataque de patógenos en las plantas, y pueden, a su vez, inducir respuestas celulares a bajas concentraciones distantes de su sitio de síntesis.

En las prácticas de postcosecha, se han utilizado tratamientos con elicidores específicos para mejorar el contenido fitoquímico y la calidad de alimentos como el brócoli (Villarreal-García D. et al (2016) Front Plant Sci. 10;7:45). Los resultados concluyeron que un tratamiento simple y efectivo con MeJA mejoraba el contenido de glucosinolatos individuales y de componentes fenólicos en el brócoli durante el almacenamiento, protegiéndolo de las contaminaciones en heridas.

Las investigaciones de los últimos años han demostrado el potencial de la aplicación de JA y MeJA en *Brassicas* para incrementar la concentración de compuestos bioactivos como los glucosinolatos. Casi todos los artículos están centrados en aplicaciones y determinaciones en germinados (Baenas, N. et al. (2014) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 1881-1889) y en hojas de plantas jóvenes (Yi, GE et al. (2016) Molecules 24, 21(10)), esto es, en plantas sin cutícula desarrollada, aunque también aparecen algunas investigaciones con aplicación en inflorescencia (Kim, H.S. et al. (2001) J. Amer. Soc. Hort. Sci. 136(4):239–246).

Por otra parte, los surfactantes, también conocidos como tensoactivos son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases y que pueden, por ejemplo, facilitar la penetración de moléculas (biocidas, fertilizantes, elicidores, etc.) en las plantas. El número de surfactantes conocidos en el estado de la técnica es muy elevado, y su actividad y efecto dependen de muchos factores, como por ejemplo la especie vegetal, su estado fisiológico (presencia de cutícula o no) o las condiciones ambientales. Pudiendo incluso ocasionar efectos negativos en la coloración o en la forma de las partes comestibles de la planta, incluyendo la parte comestible del Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cuando se combina con metil jasmonato (J Sci Food Agric 2014; 94: 2090–2096), aspecto este que supone una depreciación o merma de la producción muy negativa para el productor.

El objeto de la presente invención es una composición que se fundamenta en la combinación de un elicidor como el metil jasmonato y de un surfactante como el polieter polisiloxano, que puede ser utilizado mediante aplicaciones foliares en plantas adultas del género *Brassica* que presentan una cutícula desarrollada, preferiblemente en las que se utilizan en alimentación humana y más

preferiblemente en el brócoli, consiguiendo un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos (principalmente glucorafanina y neoglucobrasicina) en los floretes, sin que se produzca una degradación de sus características organolépticas. Además, su aplicación permite la aparición de un metabolito secundario que se identifican por primera vez en plantas del orden *Brassicales*, concretamente un feruloil-indol-glucosinolato (en adelante, feruloil-GLS).

2.12 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición caracterizada porque comprende jasmonato de metilo (MeJA), un poliéter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4, preferiblemente etanol.

En una realización preferida, el alcohol C2-C4 es etanol.

En una realización más preferida la composición de la invención consiste en jasmonato de metilo (MeJA), un poliéter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4, preferiblemente etanol.

El poliéter polisiloxano es un copolímero de polisiloxano modificado con poliéter, preferiblemente con actividad surfactante. En la presente invención el poliéter polisiloxano también se denominará poliéter polisiloxano modificado (PPM).

Poliéter-polisiloxanos adecuados para su uso en la presente invención se conocen en el estado de la técnica y están comercialmente disponibles. Por ejemplo, poliéter-polisiloxanos modificados están disponibles bajo la marca Break-Thru 9902™, Break-Thru 9903™, Break-Thru 5503™, Break-Thru 9907™ y Break-Thru 9908™.

Más preferiblemente, el poliéter polisiloxano es un trisiloxano no iónico, por ejemplo, el disponible bajo la marca BREAK-THRU® S 233.

La concentración de jasmonato de metilo en la composición final está entre 50 y 500 μ molar, más preferiblemente la concentración de jasmonato de metilo en la composición es de 100 μ molar.

En una realización preferida de la invención, la composición comprende

- jasmonato de metilo entre el 0,0015% y el 0,0028 % en volumen,
- poliéter polisiloxano entre el 0,068% y el 0,1272% en volumen,
- alcohol C2-C4 entre 0,15 y el 0,28% en volumen, y
- agua hasta completar el 100% del volumen (esto es: agua entre 99,7805 y 99,59% en volumen).

Una realización más preferida de la composición de la invención consiste en: 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.

El uso de MeJA como elicitador en combinación con un polieter polisiloxano da lugar a un incremento significativo de las concentraciones de glucosinolatos y la generación de un metabolito feruloil-GLS en las plantas a las que se aplica, incluso utilizando mínimas cantidades del elicitador MeJA.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en plantas adultas del género *Brassica* que comprende las siguientes etapas:

- a) realizar una primera aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención en el momento de aparición del botón floral en la planta;
- b) realizar una segunda aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención cinco días después de la primera aplicación;
- c) realizar una tercera aplicación foliar de la composición definida en el primer aspecto de la invención cinco días después de la segunda aplicación.

Mediante este procedimiento se producen incrementos del contenido en glucosinolatos tanto en la inflorescencia como en las hojas sin que se produzca ninguna merma en las propiedades organolépticas o comerciales, preferentemente, producción, color, compactación, forma y sabor de la primera.

En la presente invención, los glucosinolatos se seleccionan preferiblemente entre glucorrafanina, glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y combinaciones de ellos, más preferiblemente, neoglucobrasicina.

Adicionalmente, y de forma sorprendente, mediante este el procedimiento también se obtiene al menos un compuesto (metabolito secundario), preferentemente un feruloil-indol-glucosinolato, en el que se unen un ácido fenólico y un glucosinolato indólico (tentativamente, neoglucobrasicina, NGB).

Hasta donde se conoce, es la primera vez que se describe este metabolito secundario en plantas del orden Brassicales, derivado de glucosinolato y compuesto fenólico, que puede ser un compuesto para movilización de glucosinolatos entre órganos de la planta. Adicionalmente, y dado que los componentes del metabolito secundario presentan por separado efectos beneficiosos sobre la salud del que los ingiere, es de esperar que la combinación de ambos también conserve dicho efecto.

La magnitud del incremento de la concentración de glucosinolatos que se obtiene con la aplicación de la composición de la invención, utilizando una muy baja concentración del elicitador MeJA (preferiblemente no superior a 100 μ molar), necesita en otros ensayos realizados con el mismo

elicitador y recogidos en el estado de la técnica, de concentraciones muy superiores para alcanzar igual magnitud (ver ejemplos de la presente invención).

En una realización preferida de la invención, la planta del género *Brassica* se selecciona de la lista que comprende brócoli, coliflor, repollo, grelo, coles de Bruselas, colinabo, nabo, colirrábano, kale y colza. Aún más preferiblemente, la planta es el brócoli.

En una realización preferida de la invención, se aplica una cantidad entre 100 y 150 ml de la composición en cada una de las aplicaciones foliares por planta cada planta.

Preferiblemente, la aplicación foliar de la composición es mediante spray.

En una realización más preferida del procedimiento de la invención:

- la aplicación foliar de la composición es mediante spray aplicando una cantidad entre 100 y 150 ml de la composición por planta de brócoli en cada aplicación.
- la composición comprende un 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.

El procedimiento de la invención permite obtener alimentos funcionales que, además de sus efectos nutricionales habituales, tienen compuestos biológicos con efecto selectivo positivo añadido sobre una o varias funciones del organismo y que presentan efectos beneficiosos para la salud, mejorándola o reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades. Todo ello debido a que se incrementa en gran medida la síntesis y el contenido de glucosinatos y de al menos un metabolito secundario derivado de glucosinolato y compuesto fenólico (feruloil-GLS) en los distintos tejidos de las plantas, incluidos sus floretes, utilizando muy bajas concentraciones de metil jasmonato cuando las plantas han desarrollado su cutícula, sin que se produzcan daños en los mismos.

Un último aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición para mejorar los mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos en una planta del orden Brassicales.

Hasta ahora, en el estado de la técnica, se ha descrito la posibilidad de incrementar los glucosinolatos de plantas del género *Brassica*, como por ejemplo el brócoli por medio de metil jasmonato, solo o combinado con un surfactante, tanto en germinados como en hoja y en inflorescencia. En la presente invención el metil jasmonato en combinación con un poliéter polisiloxano se aplica en una concentración reducida en hojas y consigue un incremento de los glucosinolatos en hojas y en florete, así como la generación de al menos un metabolito secundario derivado de glucosinolato y compuesto fenólico, un feruloil-GLS, con sólo tres aplicaciones. Este incremento se observa, además, en diferentes variedades de brócoli. Adicionalmente, la composición de la invención no provoca una reducción de las propiedades organolépticas tal y como se describe en las publicaciones incluidas en el

estado de la técnica y se demuestra en los resultados incluidos en la tabla 4 de la presente invención, utilizando una combinación de metil jasmonato y un surfactante de diferente naturaleza.

En la presente invención, el término “planta adulta” se refiere a una planta que ha terminado su periodo vegetativo pasa al período reproductivo. Las plantas adultas presentan una cutícula con mayor espesor que aquellas que se encuentran en los estadios iniciales del período vegetativo. De hecho, en la fase reproductiva del desarrollo de la planta, la cutícula de la hoja alcanza su máximo espesor. La cutícula es una capa de polímeros lipídicos impregnado con ceras que está presente en las superficies externas de los órganos primarios de todas las plantas terrestres vasculares. La cutícula forma una cobertura externa homogénea cuya función es evitar la permeabilidad del agua para prevenir la evaporación desde las células de la epidermis.

El término “botón floral” se refiere al primordio de la inflorescencia que parte de la yema apical del tallo principal. Estadio en el cual se inicia el desarrollo de la inflorescencia recubierta por unas pequeñas hojas para su protección.

El término “florete”, “florete” o “pella” se refiere a la inflorescencia inmadura o en desarrollo. Se trata del principal órgano de consumo alimentario con forma de corimbo compuesto, desarrollado a partir del botón floral. Está constituido por numerosos primordios florales sostenidos en tallos florales o pedicelos, que a su vez se disponen sobre pedúnculos suculentos.

El término “propiedades organolépticas” se refiere a las propiedades que se miden a través de los sentidos. Este análisis sensorial se basa en los parámetros básicos de color, forma, tamaño, aroma, textura, sabor y temperatura. En la presente invención, preferentemente se refieren a color, compactación, redondez y sabor.

El término “alcohol C2-C4” se refiere a un alcohol orgánico con un número de carbonos que va de dos a cuatro. Por ejemplo: etanol, propanol, butanol, tect-butanol, isobutanol.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

2.13 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Estructura básica de un glucosinolato.

FIG. 2: Estructura química de un feruloil-indol-glucosinolato, en el que el glucosinolato indólico es la neoglucobrasicina.

FIG. 3: Fotografía que muestra la dispersión de una gota cuando el metil jasmonato se añade con agua, Triton X-100 y PPM (polieter polisiloxano modificado).

FIG. 4. Espectro de absorción (UV-Vis), con los picos máximos de absorción coincidentes con un feruloil-GLS, las flechas indican los picos de máxima absorción a 227 ± 3 nm (GLS) y 320 ± 16 nm (ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico).

2.14 EJEMPLOS

A continuación se ilustra la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la composición y procedimiento de la invención.

2.14.1 MATERIAL Y MÉTODOS

2.14.1.1 Ensayo en campo

Se utilizaron plántulas de tres cultivares de brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) obtenidas de un semillero donde las semillas crecieron durante 30 días. Concretamente las variedades fueron Ares, Parthenon y Marathon, todas ellas de la compañía SAKATA. El experimento se llevó a cabo durante el período de otoño/invierno en una finca experimental en el campo del Mirador en el término municipal de San Javier (Murcia), bajo un clima mediterráneo semiárido. La media diaria de temperatura y la humedad relativa se calcularon a partir de las mediciones realizadas cada 10 minutos utilizando un registrador de datos. La humedad alcanzada en la parcela fue del 50/80% (día / noche) y la temperatura del aire osciló entre los 24/8 °C de día y de noche respectivamente.

Se plantaron un total de 40 plantas por cultivar, 20 por cada tratamiento. Todas las plántulas se plantaron el mismo día, en las mismas condiciones y se regaron con fertirrigación [2 dS m⁻¹ conductividad eléctrica (CE)] dos veces al día durante 10 minutos durante los primeros 45 días, pasando a 15 minutos durante los siguientes 45 días.

Una vez alcanzada la fase reproductiva, esto es cuando aparece el botón floral (aproximadamente tras 120 días desde la siembra de las semillas en semillero) se aplicaron los tratamientos utilizando la Composición 1 y la Composición Control que se realizaron en tres ocasiones sobre la hoja. Una en el momento de la aparición del botón floral y las siguientes a 5 y 10 días respectivamente tras la primera aplicación. Cada aplicación se realizó mediante spray, aplicando 100-150 ml por planta. Las hojas y las inflorescencias fueron recogidas para su análisis una vez que

alcanzaron su tamaño comercial (aproximadamente 18 días después de la aparición del botón floral) y se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron inmediatamente para evitar la degradación de los compuestos de interés hasta el momento de la determinación de glucosinolatos y otros metabolitos.

Durante la aplicación de los tratamientos se prolongó el riego por fertirrigación en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo con anterioridad a la aplicación de los tratamientos.

Composición 1: Se preparó una disolución que contenía 0,0022 % en volumen de MeJA (para una concentración final 100 micromolar en la composición), 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano (Break-Thru S 233 ®) y 99,6978% en volumen de agua.

Composición Control: El tratamiento control consistió en la aplicación de una disolución que contenía un 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y 99,9% en volumen de agua.

2.14.1.2 Ensayo en invernadero

En cámara de cultivo se hicieron germinar semillas del cultivar de brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) Parthenon que crecieron durante 30 días. Posteriormente se dejaron crecer en invernadero 75 días hasta que las inflorescencias alcanzaron el tamaño comercial. En este caso se realizó una aplicación foliar mediante spray de entre 100 y 150 ml por planta de los tratamientos que se indican a continuación: una en el momento de la aparición del botón floral y las siguientes a 5 y 10 días respectivamente tras la primera aplicación.

Composición control: consistente en una disolución que contenía un 0,2% en volumen de etanol y un 99,8% en volumen de agua.

Composición surfactante 1 (Triton X-100): consistente en una disolución que contenía un 0,1% en volumen del surfactante Triton x-100 y un 99,9% en volumen de agua.

Composición surfactante 2 (PPM): consistente en una disolución que contenía un 0,1% en volumen del surfactante poliéter polisiloxano modificado y un 99,9% en volumen de agua.

Composición elicitor (MeJA): consistente en una disolución que contenía un 0,0022 % en volumen de MeJA, un 0,2% en volumen de etanol y un 99,7978% en volumen de agua.

Composición 1 (MeJA + PPM): Se preparó una disolución que contenía 0,0022 % en volumen de MeJA (para una concentración final 100 micro molar en la composición), 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y 99,7968% en volumen de agua.

Composición 2 (MeJA +Triton x-100): consistente en una disolución que contenía un 0,0022 % en volumen de MeJA, un 0,2% en volumen de etanol, un 0,1% en volumen de Triton X-100 y 99,70% en volumen de agua.

Posteriormente se cosecharon las plantas, las hojas y las inflorescencias se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron inmediatamente para evitar degradaciones en los compuestos de interés hasta el momento de la determinación de glucosinolatos y metabolitos de interés.

2.14.1.3 Determinación de glucosinolatos y de un feruloil-GLS

Los análisis se realizaron en hoja e inflorescencia en el momento de recolección del tamaño comercial. El método empleado para la extracción de glucosinolatos se basó en el método desarrollado por el grupo de investigación y de dominio público actualmente: Dominguez-Perles et al. (2010) *Journal of Food Science* 75, 383-392. El análisis cuantitativo se realizó por HPLC-DAD. Las muestras liofilizadas y molidas (100 mg) se extrajeron con 1 ml de MeOH 70% en un baño caliente a 70°C durante 30 minutos agitando cada 5 minutos en vortex, para optimizar la extracción. A continuación se detuvo la reacción en baño de hielo y se centrifugaron las muestras para precipitar el material insoluble, durante 15 minutos, a 10000 g y a 4 °C. El sobrenadante se recogió y el metanol se eliminó en un rotavapor con baño termostatzado a 38 °C. El residuo seco que se obtuvo se redisolvió en agua ultra pura y se filtró (Ø0,22 µm de PVDF) para su análisis posterior.

Cada muestra (20 µl) se analizó en un cromatógrafo líquido de alta precisión (HPLC) equipado con bomba para reparto de eluyentes binaria, degasificador en línea, automuestreador detector de fotodiodos (DAD). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna C18 de 250x4 mm y 0,4µm de diámetro de poro, en modo de cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). La identificación de glucosinolatos se realizó mediante la metodología ya descrita por el grupo de investigación y disponible públicamente de análisis multipropósito de glucosinolatos intactos (Martínez-Sánchez et al. 2006 *Postharvest Biol. Technol.* 42, 86-97; Dominguez-Perles et al. (2010) *Journal of Food Sci.* 75, 383-392), basándose en los tiempos de retención de los respectivos picos analíticos, sus espectros de absorción máximos en el rango UV-Vis y la comparación con estándares externos disponibles comercialmente, sinigrina para glucosinolatos alifáticos y glucobrasicina para glucosinolatos indólicos (Baenas et al. (2012) *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 11409-11420). La detección se realizó a 227 nm y la concentración de glucosinolatos se expresó en µmol/ g peso seco de tejido vegetal.

El espectro tipo del feruloil-GLS (véanse Figuras 2 y 4) en el que se unen un ácido fenólico y un glucosinolato indólico (tentativamente, neoglucobrasicina, NGB) se determinó por fragmentación HPLC-DAD-ESI-MS/MS, observando el ión parental de 724 (M-H, m/z, 100%) y los fragmentos resultantes de 499 m/z (100%), 259 m/z (10.2%, indicador de glucosinolato) y 193 m/z (100%, indicador de feruloil derivado).

Los resultados de la aplicación de los tratamientos en los dos ensayos realizados se muestran a continuación.

2.14.1.3.1 Ensayo en campo

Tabla 1. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en hojas de distintas variedades de Brassica oleracea var. Italica) registradas en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos.

VARIEDAD	TRATAMIENTO	MG GRA/G PS	MG GBS/G PS	MG MBG/G PS	MG NGB/G PS	MG F-GSL/G PS	TOTAL GSLS
ARES	Control	0.59 ± 0.03	0.42 ± 0.07	0.55 ± 0.07	1.38 ± 0.11	tr	2.59 ± 0.15
ARES	Composición 1	0.63 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.69 ± 0.05	1.43 ± 0.09	0.01 ± 0.001	3.31 ± 0.16
PARTHENON	Control	1.03 ± 0.10	1.09 ± 0.11	0.30 ± 0.05	1.17 ± 0.10	tr	3.59 ± 0.11
PARTHENON	Composición 1	1.11 ± 0.10	2.25 ± 0.15	0.33 ± 0.04	2.04 ± 0.18	0.01 ± 0.001	5.73 ± 0.43
MARATHON	Control	0.60 ± 0.10	1.09 ± 0.23	0.24 ± 0.04	0.28 ± 0.05	tr	2.21 ± 0.28
MARATHON	Composición 1	0.77 ± 0.05	2.61 ± 0.14	0.41 ± 0.02	1.53 ± 0.11	0.01 ± 0.002	5.32 ± 0.24

GR: Glucorrafanina; GB: Glucobrasicina; MGB: Metoxiglucobrasicina; NGB: Neoglucobrasicina; F-GSL: Feruloil-glucosinolatos; Tr: Concentración en cantidades traza; PS: Peso seco.

Tabla 2. Concentración de los glucosinolatos y de un feruloil-GLS en inflorescencias de distintas variedades de *Brassica oleracea* var. *Italica*) registrados en el ensayo en campo utilizando distintos tratamientos.

VARIEDAD	TRATAMIENTO	MG GRA/G PS	MG GBS/G PS	MG MBG/G PS	MG NGB/G PS	MG F-GSL/G PS	TOTAL GSLS
ARES	Control	0.15 ± 0.04	1.05 ± 0.05	0.48 ± 0.03	1.65 ± 0.08	tr	4.33 ± 0.15
ARES	Composición 1	1.61 ± 0.26	0.77 ± 0.11	0.58 ± 0.05	2.51 ± 0.10	0.03 ± 0.01	5.50 ± 0.19
PARTHENON	Control	1.75 ± 0.04	2.12 ± 0.16	0.50 ± 0.05	1.10 ± 0.25	tr	5.48 ± 0.21
PARTHENON	Composición 1	2.02 ± 0.11	2.01 ± 0.14	0.70 ± 0.02	4.48 ± 0.06	0.25 ± 0.02	9.47 ± 0.42
MARATHON	Control	1.74 ± 0.10	1.77 ± 0.07	0.41 ± 0.02	1.14 ± 0.05	tr	5.06 ± 0.53
MARATHON	Composición 1	2.01 ± 0.16	2.11 ± 0.20	0.62 ± 0.03	4.65 ± 0.18	0.29 ± 0.03	9.69 ± 0.15

GR: Glucorrafanina; GB: Glucobrasicina; MGB: Metoxiglucobrasicina; NGB: Neoglucobrasicina; F-GSL: Feruloil-glucosinolato; Tr: Concentración en cantidades traza; PS: Peso seco.

En las tablas 1 y 2 se puede observar que la aplicación foliar de la composición de la invención (Composición 1) en plantas adultas que han alcanzado la fase de reproducción y presentan cutícula desarrollada provoca, para plantas de distintos cultivares de las variedades Ares, Parthenon y Marathon un evidente efecto en el incremento de la concentración de los glucosinolatos individuales (GRA: Glucorafanina, MGB: Metoxiglucobrasicina y NGB: Neoglucobrasicina), tanto en hoja como en inflorescencia, y la aparición de un feruloil-GLS, también en las inflorescencias y en las hojas elicidadas.

Adicionalmente, no se registró ninguna merma de las propiedades organolépticas de las inflorescencias obtenidas en este ensayo.

2.14.1.3.2 Ensayo en invernadero

Tabla 3. Concentración de los glucosinolatos en hojas e inflorescencias de la variedad Parthenon en el ensayo en invernadero utilizando distintos tratamientos

HOJA (mg/ g PS)					
Parthenon	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgNGB/g PS	feruloil-GLS /g PS	GLS total
Control	0,37 ± 0.02	0,73 ± 0,12	0,71 ± 0,12	-	1,81 ± 0,05
Triton x-100	0,35 ± 0.06	0,70 ± 0,14	0,69 ± 0,15	-	1,74 ± 0,05
PPM	0,33 ± 0.04	0,68 ± 0,12	0,68 ± 0,12	-	1,69 ± 0,05
MeJA	0,35 ± 0.06	0,71 ± 0,12	0,69 ± 0,14	-	1,75 ± 0,05
MeJA +Triton x-100	0,29 ± 0.08	1,34 ± 0,11	3,41 ± 0,25	-	5,05 ± 0,06
MeJA +PPM	0,58 ± 0.21	1,36 ± 0,3	5,62 ± 0,38	1,68 ± 0,01	9,23 ± 0,18

INFLORESCENCIA (mg/g PS)					
Parthenon	mg GRA/g PS	mgGBS/g PS	mgNGB/g PS	feruloil-GLS /g PS	GLS total
Control	1,74± 0,06	2,08 ± 0,09	1,12± 0,09	-	4,94 ± 0,10
Triton x-100	1,75 ± 0,06	2,16 ± 0,14	1,19 ± 0,15	-	5,10 ± 0,12
PPM	1,73 ± 0,04	2,08 ± 0,12	1,08 ± 0,12	-	4,98 ± 0,15
MeJA	1,70± 0,10	2,05 ± 0,10	1,22± 0,12	-	4,97 ± 0,25
MeJA+Triton x-100	2,09 ± 0,14	2,31 ± 0,15	2,75 ± 0,19	-	7,15 ± 0,33
MeJA +PPM	2,08 ± 0,16	2,76 ± 0,28	4,83 ± 0,26	1,08 ± 0,10	10,75 ± 0,38

GR: Glucorafanina; GB: Glucobrasicina; MGB: Metoxiglucobrasicina; NGB: Neoglucobrasicina; F-GSL: Feruloil-glucosinato; Tr: Concentración en cantidades traza; PS: Peso seco.

Como se puede ver en la tabla 3, la aplicación de la Composición 1 (MeJA +PPM), consigue incrementos en la concentración de glucosinolatos sustancialmente superior al resto de tratamientos aplicados en inflorescencias y hojas y, además, es el único que consigue la aparición de un feruloil-GLS. La Composición 2 (MeJA + Triton x-100) que también favorece el incremento de los glucosinolatos aunque no de un feruloil-GLS, sin embargo, consigue incremento mucho menor (concretamente con la composición 1 del 116%, y con la composición 2 del 44%).

Tabla 4. Resultados del porcentaje de inflorescencias comerciales de la variedad Parthenon en el ensayo en invernadero

Parthenon	% de Pellas comerciales
Control	100
Triton x-100	81,1
PPM	100
MeJA	100
MeJA +Triton x-100	58,4
MeJA+PPM	100

Como se puede ver en la tabla 4, la aplicación de la Composición 1 (MeJA +PPM) no produce ninguna degradación de las inflorescencias, considerando como degradación la forma irregular o la alteración del color, que sí se produce de forma ostensible cuando se utiliza otro surfactante.

2.14.1.4 *Dispersión de la gota*

La dispersión de la gota de las Composiciones 1 y 2 y la de Composición elicitador (MeJA) y se determinó bajo un binocular (1,6x) (Figura 3). Se puede apreciar que en la gota de MeJA no se observa dispersión alguna, hay más dispersión en la gota de MeJA que contiene el surfactante Triton x-100 y una dispersión total en la gota que contiene el surfactante PPM.

El cálculo del área de dispersión de la gota indica que el Triton x-100 se dispersa 4 veces más que el agua y el PPM se dispersa 41 veces más que el agua y 10 veces más que el Triton x-100 (véase Figura 3).

2.15 REIVINDICACIONES

1. Composición caracterizada porque comprende jasmonato de metilo (MeJA), un polieter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que consiste en jasmonato de metilo (MeJA), un polieter polisiloxano, agua y un alcohol C2-C4.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que:
 - el jasmonato de metilo representa entre el 0,0015% y el 0,0028 % de su volumen total;
 - el polieter polisiloxano representa entre el 0,068% y el 0,1272% de su volumen total;
 - el alcohol C2-C4 representa entre el 0,15% y el 0,28% de su volumen total;
 - el agua representa el resto del volumen de la composición.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el alcohol C2-C4 es etanol.
5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizada por que consiste en 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y el resto agua hasta un volumen total del 100%.
6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polieter polisiloxano, es un trisiloxano no iónico.
7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la concentración jasmonato de métilo está entre 50 y 500 μ molar.
8. Composición según la reivindicación 7, donde la concentración de jasmonato de métilo es 100 μ molar.
9. Procedimiento para incrementar el contenido de glucosinolatos en una planta adulta del género Brassica que comprende las siguientes etapas:
 - realizar una primera aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el momento de aparición del botón foliar en la planta;
 - realizar una segunda aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cinco días después de la primera aplicación;
 - realizar una tercera aplicación foliar de la composición definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cinco días después de la segunda aplicación.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde los glucosinolatos se seleccionan de la lista que comprende glucorrafanina, glucobrasicina, metoxiglucobrasicina, neoglucobrasicina y combinaciones de ellos.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, donde la planta del género Brassica se selecciona entre brócoli, coliflor, repollo, grelo, coles de Bruselas, colinabo, nabo, colirrabano, kale y colza.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde la planta es el brócoli.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde se aplica una cantidad de entre 100 y 150 ml de la composición en cada una de las aplicaciones.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 donde la aplicación foliar de la composición es mediante spray.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde:
 - la composición comprende un 0,0022 % en volumen de MeJA, 0,2% en volumen de etanol, 0,1% en volumen de polieter polisiloxano y agua hasta un volumen total del 100%.
16. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para mejorar los mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos en una planta del orden Brassicales.
17. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para obtener un alimento funcional.

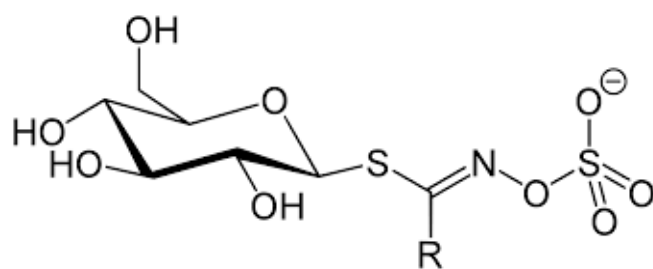


FIG. 1

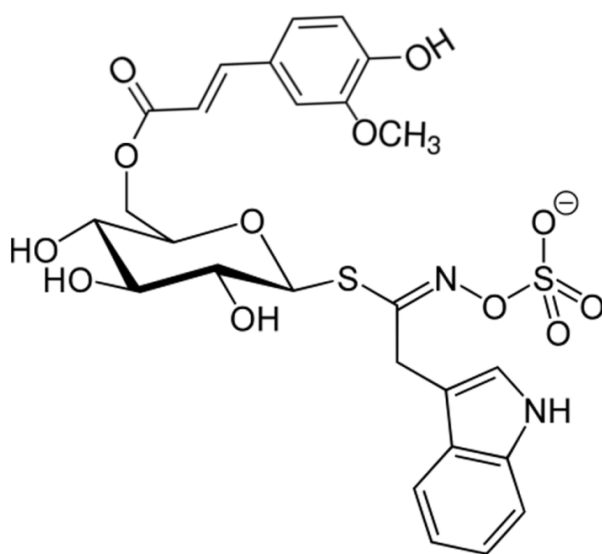


FIG. 2



FIG. 3

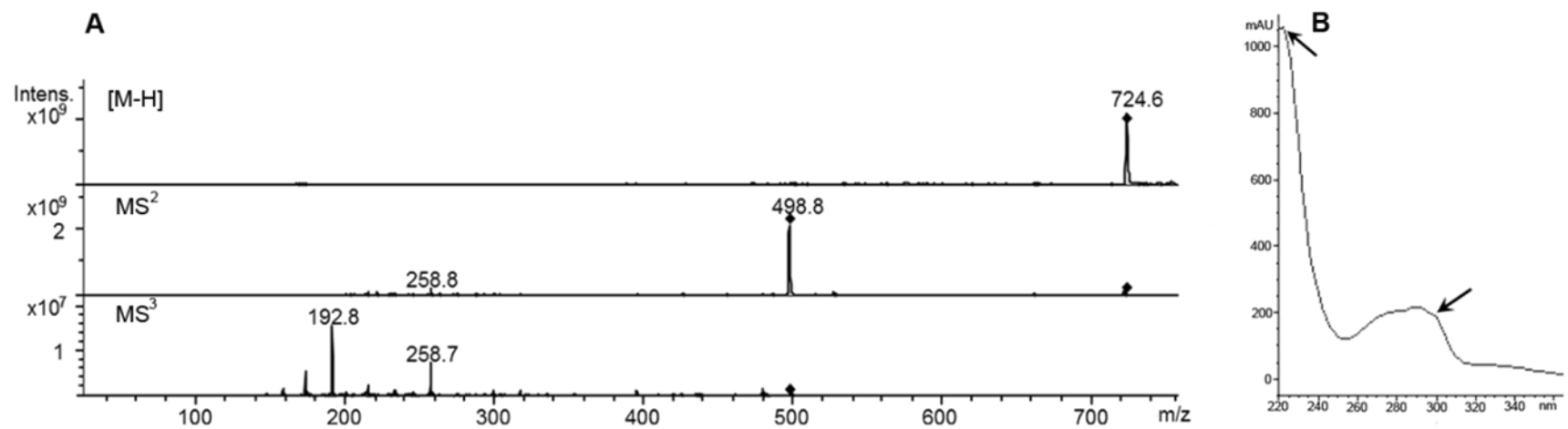


FIG. 4

CAPÍTULO 4: HALOPHYTES OF THE MEDITERRANEAN BASIN - UNDERUTILIZED SPECIES WITH THE POTENTIAL TO BE NUTRITIOUS CROPS IN THE SCENARIO OF THE CLIMATE CHANGE

Agudelo, A.; Carvajal, M.; Martinez-Ballesta, M. D. C. Halophytes of the Mediterranean Basin— Underutilized Species with the Potential to Be Nutritious Crops in the Scenario of the Climate Change. *Foods* **2021**, *10* (1). <https://doi.org/10.3390/foods10010119>.

ABSTRACT

Halophyte plants are adapted to saline environments and represent a novel type of crops given their possible uses at both culinary and industrial levels. In this work, the nutritional quality of different Mediterranean halophyte species, *Atriplex halimus*, *Salicornia fruticosa*, and *Cakile maritima*, was evaluated under conditions of high salinity. For this, plants were grown at different NaCl concentrations (0, 100, 200, and 300 mM) and the contents of proteins, total lipids, polyphenols, and mineral elements were analyzed as well as growth. Of the three species, *C. maritima* was the most sensitive to salt stress and therefore showed the highest phenolic compounds content. By contrast, whereas salinity increased the amounts of proteins and phenolics with respect to the control in *A. halimus* and *S. fruticosa*, it decreased them in *C. maritima*. Plants of *A. halimus* accumulated higher amounts of Na⁺ in their leaves, but the level of this ion, considering human consumption, was below that of other culinary halophyte species. In conclusion, all the results indicate that these three halophyte species grown at high salt levels represent optimal crops for—new foodstuff—production as green salt or spice due to their nutritional potential.

KEYWORDS

Atriplex halimus; *Cakile maritima*; minerals; phenolic compounds; *Salicornia fruticosa*; salinity.

2.16 INTRODUCTION

Soil and water salinization is an increasing problem worldwide [1,2]. Salinization has been widely studied and previous authors have already alerted society of how this problem can influence the future of humanity. While global food production will need to increase by 38% by 2025 and by 57% by 2050, to satisfy the growing population, about 15% of the total land area of the world is estimated to have been degraded by soil erosion and physical and chemical degradation, including soil salinization [3]. Therefore, progressive salinization of arable land has become one of the most important and global factors contributing to land degradation, especially in arid and semi-arid zones.

Salinity affects plant growth and water and nutrient uptake of glycophytes [4]. The adverse effects of salinity on plant growth are (1) water stress produced by the decrease in the osmotic potential of the soil solution, (2) nutritional imbalance, (3) salt stress caused by the specific effect of ions, or (4) the combination of any of these factors [5,6]. However, halophytes can grow at high levels of salinity, being defined as plants that live in naturally saline habitats or that complete their life-cycle at a salt concentration of at least 200 mM NaCl [7]. Facing the increasing salinization throughout the world, domestication of these plants has been suggested as a possible solution, using them as potential crops in “saline agriculture” or in new foodstuff [4,8–10]. There are two factors that make halophytes of special interest to be considered in the food industry: First, their economic potential, since their productivity in high-salinity and low-water intake environments, is much higher than that of traditional edible species. Second, their nutritional value in terms of their protein, phenolic, lipid contents and the great quantity of minerals, such as potassium, calcium, and magnesium, and other bioactive compounds, [11–13].

Salinity is an environmental stress that has been identified as a possible trigger for oxidative reactions in plants. The reactive oxygen species (ROS) generated in these reactions react with biological molecules causing cellular damage, metabolic disorders, and senescence processes. In order to decrease the ROS content, halophytes have been reported to increase the synthesis of antioxidant molecules such as phenolics compounds [11,14,15]. Phenolic compounds are secondary metabolites that are derivatives of the pentose phosphate, shikimate, and phenylpropanoid pathways in plants [16]. These compounds have been widely studied due to their preventive and therapeutic properties including anti-inflammatory, anti-allergenic, antioxidant, anti-atherogenic, anti-microbial, anti-thrombotic, and cardioprotective properties [15]. These beneficial properties contribute to the rising interest in the use of halophytic species as functional food [13,17,18]. In fact, the use of phenolic compounds as a supplement has already been studied in several foods and food models systems [19].

Among the halophytes, *Cakile maritima* (sea rocket) is a plant that tends to develop succulence under salt stress. This plant has been used as a flavoring agent for salads and as a dried ingredient in flours to make bread [20]. Moreover, it has been exploited for the appreciable amounts of oil in its seeds

(40% on dry weight basis) [21]. Moreover, during the past decade several studies have been carried out in *Salicornia* (*Salicornia fruticosa*) in order to trial its inclusion in several foods. *Salicornia*-derived salt and its production has been described already [22] and also, as a functional ingredient, it has been added to reduced-salt cooked sausages [23], and sport beverages [24] among other products. As a vegetable, young *Salicornia* shoots have been introduced into the European gourmet market [25]. Finally, *Atriplex halimus* leaves have traditionally been used as a condiment due to its salty flavor [26]. However, their consumption has mainly occurred at times when other sources of food were unavailable [27]. This might be the reason why very few examples can be found regarding the use of *A. halimus* as human food.

Therefore, it is of great interest to evaluate the bioactive compounds and minerals in these halophytes (*C. maritima*, *S. fruticosa*, and *A. halimus*) taking into consideration the influence of different levels of salinity on their yield, in terms of biomass. This is the aim of this work. Precisely, the response of these three halophytes to increasing levels of salinity in the nutrient solution at an early stage of growth was evaluated and the nutritional analysis of minerals, phenolic compounds, proteins, and lipids was performed.

2.17 MATERIAL AND METHODS

One-month-old plants of three halophyte species—*Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa*—were provided by Viveros Muzalén (Murcia, Spain) The plants were transferred to a controlled-environmental chamber, with a 16-h light and 8-h dark cycle with temperatures of 25 and 20 °C and relative humidities of 60% and 80%, respectively. Photosynthetically active radiation (PAR) of 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was provided by a combination of fluorescent tubes (Philips TLD 36 W/83, Jena, Germany, and Sylvania F36 W/GRO, Manchester, NH, USA) and metal halide lamps (Osram HQI, T 400 W, Berlin, Germany). The plants were placed in 15-L containers with continuously-aerated Hoagland nutrient solution [28]. After 1 month of growth, different saline treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) were applied for 2 weeks.

2.17.1 RELATIVE GROWTH RATE

To calculate the RGR, the formula described by Hunt et al. [29] was used.

$$\text{RGR} = \frac{\ln(W2) - \ln(W1)}{t2 - t1}$$

where W1 and W2 are the dry weight or ash-free dry weight of the plants at the initial and final harvests, respectively, and t2 - t1 is the time in days between the two harvests.

2.17.2 ANALYSIS OF MINERAL ELEMENTS

The concentrations of macronutrients and micronutrients were analyzed in oven-dried samples of plant material (young leaf and stem tissues) which had been ground finely in a mill grinder (IKA model A10, Staufen, Germany) to give particle sizes of 0.5 to 0.7 mm. The samples were digested in a microwave oven (CEM Mars Xpress, Mattheus, NC, USA) by HNO₃–HClO₄ (2:1) acid digestion. The elemental analysis was carried out using a Perkin–Elmer (Waltham, MA, USA) 5500 model ICP emission spectrophotometer (Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, TN, USA), at 589 nm. The concentrations were expressed as mg kg⁻¹ DW.

2.17.3 PHENOLIC COMPOUNDS

Freeze-dried powder (50 mg) from leaf and stem tissues was extracted in 1.5 mL of 70% MeOH for 30 min at 70 °C, vortexing every 5 min to improve extraction. Afterwards, the extract was centrifuged (20 min, 10,000x g, 4 °C) (Sigma 1–13, B. Braun Biotech Intl., Osterode, Germany). The supernatants were collected and the methanol was removed using a rotary evaporator; the dried residue was reconstituted in ultrapure water to 1 mL and filtered through a 0.2 µm inorganic membrane filter (ANOTOP10 plus, Whatman, Maidstone, UK). Each sample (20 µL) was analyzed in a Waters HPLC system (Waters Cromatografía S.A., Barcelona, Spain), consisting of a W600E multisolvent delivery system, inline degasser, W717plus autosampler and W2996 PAD. The compounds were separated in a Luna C₁₈ column (25 x 0.46 cm², 5 µm particle size; Phenomenex, Macclesfield, UK) with a security guard C₁₈-ODS (4 x 30 mm²) cartridge system (Phenomenex). The mobile phase was a mixture of water/trifluoroacetic acid (99.9:0.1, v/v) (A) and acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9:0.1, v/v) (B). The flow rate was 1 mL min⁻¹ in a linear gradient, starting with 1% B for 5 min to reach 17% B at 15 min, which was maintained for 2 min, then 25% B at 22 min, 35% B at 30 min, 50% B at 35 min and 99% B at 40 min. The monitored compounds eluted off the column in 35 min. The chromatograms of the phenolic compounds were recorded at 330 nm. The abundance of each tentatively identified polyphenol was calculated by measuring the area of the each peak and quantified using external standards: caffeoylquinic acid derivatives using chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), flavonoids with quercetin-3-rutinoside (Sigma-Aldrich) and sinapic acid derivatives using sinapinic acid (Sigma-Aldrich). The contents of phenolic compounds were expressed as mg g⁻¹ DW (dry weight).

2.17.4 PROTEIN AND TOTAL LIPID ANALYSIS

The method of Bradford was used to determine protein content [30], using the Bio-Rad reagent with BSA as standard, and was expressed as mg g DW⁻¹. Total lipids were extracted according to the method of Folch et al. [31], including some modifications. In order to denature phospholipases 100 mg of fresh material (leaves and stems) were soaked in boiling water for 5 min and then homogenized in a chloroform–methanol mixture (2:1, v/v). The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The

lower (chloroformic) phase, containing lipids, was isolated and evaporated under N₂ gas. The residue was weighed for determination of total lipid fraction.

2.5. Data Analysis

Statistical analyses were performed using Statgraphics XVII-X64 for Windows. Significant differences among the mean values were determined at $p \leq 0.05$, according to Tukey's test.

2.18 RESULTS

2.18.1 RELATIVE GROWTH RATE

Biomass (expressed as gr per plant) was evaluated following the two-week exposure to increasing salinity (0–100–200–300 mM NaCl) (Figure 1). *Cakile maritima* showed the greatest RGR for all treatments, followed by, *Atriplex halimus*, and *Salicornia fruticosa*. However, while the RGR in *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* was enhanced with salinity, in *Cakile maritima*, RGR was decreased with the increase in salinity.

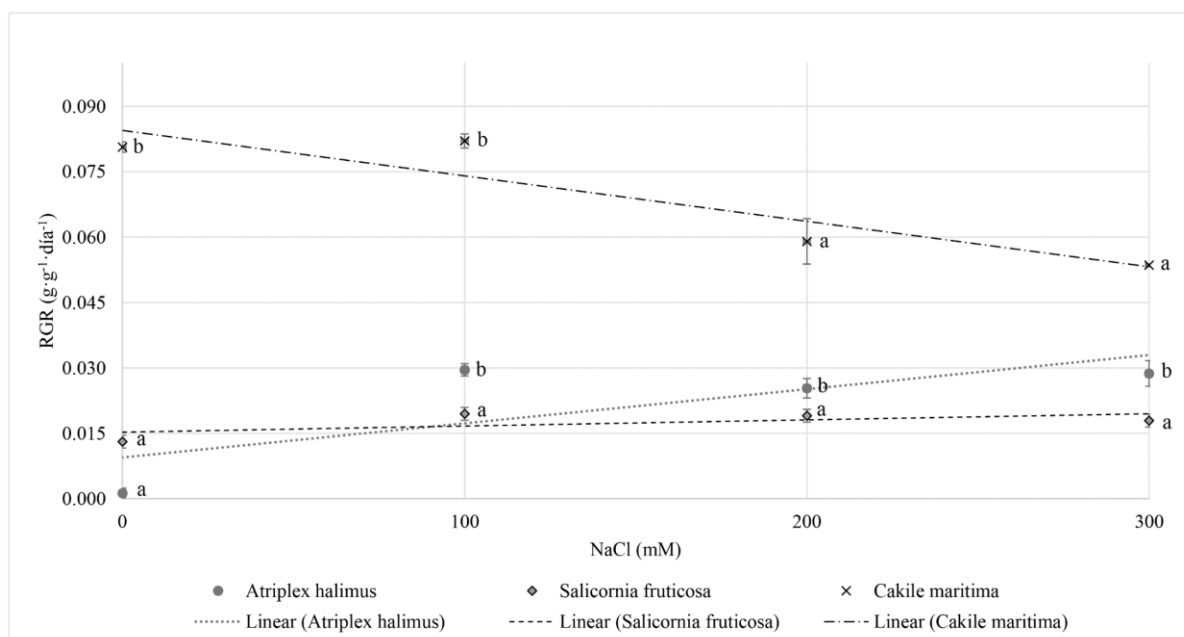


Figure 1. Relative Growth Rate, RGR ($g \cdot g^{-1} DW \cdot day^{-1}$) of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa* under different salinity treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) after two weeks of treatment. Means ($n = 5 \pm SE$) with different letter are significantly different at p -value < 0.05 , different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison.

2.18.2 MINERAL ELEMENTS

As expected, *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* accumulated the highest amount of Na⁺. The *Cakile maritima* tissues showed the highest values of Ca²⁺, P, and S (Table 1). Moreover, in this species, the Na⁺ content increased with the enhance in salinity and this was accompanied by a decrease

in the uptake of Ca^{2+} and Mg^{2+} and an imbalance in other elements. This imbalance effect was not found in *Atriplex halimus* or *Salicornia fruticosa*, which maintained the same levels of Ca^{2+} , Mg^{2+} , P, and S at moderate and high salinity.

Micronutrients were also determined in the studied halophytes (Table 2). The Fe content increased with salinity in *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* at 300 mM and 100 mM NaCl, respectively, but remained unaltered in *Cakile maritima*. Plants of *Cakile maritima* showed the highest Zn levels, being 10-fold higher than in *Atriplex halimus*; however, salinity did not modify Zn content in all species. Only in *Salicornia fruticosa*, Mo, B, and Mn contents increased by salinity; in the other species they were maintained or reduced, depending on the salt concentration.

2.18.3 PHENOLIC CONTENT

In *Atriplex halimus*, a total of 12 phenolic compounds corresponding to 5 phenolic acids derivatives and 7 flavonoids were detected. While in *Cakile maritima*, a total of seven peaks corresponding to five phenolic acids derivatives and two flavonoids were detected in *Salicornia fruticosa* a total of four phenolic compounds corresponding to one phenolic acid derivatives and three flavonoids were found. Total phenolic compounds were calculated as the sum of all of them.

Cakile maritima showed the highest level of phenolic content, but there was a negative correlation with the NaCl concentration, with the exception of flavonoids, whose content did not vary among the treatments (Table 3). In *Atriplex halimus*, there was a reduction in sinapic acid derivatives and an increase in flavonoids and total phenolics with the increase in the NaCl concentration. Even though *Salicornia fruticosa* had a greater content in chlorogenic acid derivatives and flavonoids than *Atriplex halimus*, it had the lowest levels of total phenolics. No sinapic acid derivatives were found and the greatest levels of phenolics were detected at 100 mM NaCl.

2.18.4 PROTEIN AND LIPID CONTENT

Total protein content was evaluated among all treatments and species (Table 4). The highest total protein content was identified for *Atriplex halimus* at moderate salinity (100mM NaCl), followed by *Salicornia fruticosa* and *Cakile maritima* presented the lowest content, under all salinity treatments. No significant correlation was found between the protein content and salinity, for any of the species studied.

Total lipid content, expressed as mg g^{-1} DW, did not show significant differences among the treatments in each specie. It was highest in *Cakile maritima* plants while *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* showed similar lipids contents.

Table 1. Macronutrient content in the leaves and stems of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa* grown with different salinity doses (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) for two weeks. Cation concentrations are expressed as mg/100 g⁻¹ DW (mean ± SE, n = 5). Values followed by different letters are significantly different at p-value < 0.05; upper-case letters indicate the differences among the salinity treatments for the same species, lower-case letters indicate the differences among the species for the same treatment. The Tukey HSD test was used for the comparison of means.

Species	Treatments (Mm)	Na	K	Ca	P	Mg	S
<i>Atriplex halimus</i>	0	989.37 ± 192.08 Ba	5725.03 ± 953.91 Bb	565.42 ± 83.93 ABb	140.19 ± 19.00 Ab	224.45 ± 36.20 Bb	127.50 ± 19.87 Ab
	100	4472.24 ± 665.96 Ab	2158.81 ± 251.95 Ba	93.60 ± 12.28 Aa	73.78 ± 9.29 Aa	70.11 ± 8.48 Aa	57.39 ± 7.33 Aa
	200	6507.30 ± 119.09 Bc	2029.97 ± 585.11 Aa	79.19 ± 13.19 Aa	85.92 ± 10.62 Aa	70.94 ± 17.06 Aa	80.18 ± 9.49 Aab
	300	7369.31 ± 162.34 Cc	1821.36 ± 44.51 ABa	133.83 ± 1.37 Aa	123.29 ± 1.65 Bab	174.46 ± 3.46 Ab	94.31 ± 1.69 Aab
<i>Cakile maritima</i>	0	23.71 ± 0.29 Aa	2940.52 ± 14.48 Ad	787.74 ± 5.91 Bc	209.10 ± 0.51 Ba	116.89 ± 0.99 Ac	243.37 ± 0.59 Bd
	100	2833.61 ± 16.27 Ab	1047.22 ± 20.90 Aa	370.31 ± 6.61 Bb	291.72 ± 8.44 Bc	69.33 ± 1.50 Ab	179.71 ± 4.03 Bc
	200	3422.74 ± 84.77 Ac	1295.66 ± 34.23 Ab	305.52 ± 7.95 Ba	236.29 ± 3.85 Bb	57.26 ± 1.60 Aa	154.84 ± 1.97 Bb
	300	3528.19 ± 49.49 Ac	1469.93 ± 11.92 Ac	320.34 ± 4.75 Ba	216.63 ± 4.09 Cab	55.79 ± 0.67 Aa	141.32 ± 1.72 Ba
<i>Salicornia fruticosa</i>	0	967.90 ± 88.80 Ba	4592.69 ± 460.27 ABb	341.42 ± 33.38 Ab	96.38 ± 9.79 Aa	177.71 ± 17.97 ABa	79.53 ± 7.33 Aa
	100	2733.93 ± 204.68 Ab	1139.77 ± 85.95 Aa	68.41 ± 22.53 Aa	120.11 ± 29.25 Aa	120.94 ± 12.56 Ba	59.35 ± 2.97 Aa
	200	3577.05 ± 146.44 Ac	1350.47 ± 238.35 Aa	57.15 ± 4.20 Aa	114.61 ± 31.05 Aa	98.13 ± 18.88 Aa	54.69 ± 6.13 Aa
	300	4314.28 ± 242.84 Bc	2029.20 ± 198.43 Ba	142.94 ± 37.82 Aa	87.87 ± 11.32 Aa	179.63 ± 55.45 Aa	86.61 ± 12.10 Aa

Table 2. Micronutrients content in the leaves and stems of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa* grown with different salinity doses (0, 100, 200, and 300 mM NaCl) for two weeks. Cation concentrations are expressed as mg 100 g⁻¹ DW (mean ± SE, n = 5). Values followed by different letters are significantly different at p < 0.05; upper-case letters indicate the differences among the salinity treatments for the same species, lower-case letters indicate the differences among the species for the same treatment. The Tukey HSD test was used for the comparison of means.

Species	Treatments (Mm)	Fe	Zn	Mo	B	Mn
<i>Atriplex halimus</i>	0	0.41 ± 0.07 Aa	0.41 ± 0.05 Aa	0.03 ± 0.00 Ab	2.50 ± 0.40 Ab	0.65 ± 0.10 Ab
	100	0.36 ± 0.05 Aa	0.23 ± 0.03 Aa	0.02 ± 0.00 Aa	1.52 ± 0.20 Aab	0.25 ± 0.03 Aa
	200	0.41 ± 0.05 Aa	0.28 ± 0.07 Aa	0.02 ± 0.00 Aab	1.35 ± 0.08 Aab	0.30 ± 0.07 Aa
	300	0.63 ± 0.01 Bb	0.30 ± 0.00 Aa	0.02 ± 0.00 Aab	1.49 ± 0.03 Aa	0.64 ± 0.01 Ab
<i>Cakile maritima</i>	0	1.14 ± 0.04 Ba	2.36 ± 0.03 Ba	0.07 ± 0.00 Ba	2.66 ± 0.00 Aa	0.68 ± 0.00 Aa
	100	0.69 ± 0.00 Aa	2.17 ± 0.09 Ba	0.05 ± 0.00 Ba	1.80 ± 0.03 Aa	0.61 ± 0.01 ABa
	200	0.63 ± 0.00 Aa	2.31 ± 0.03 Ba	0.05 ± 0.00 Aa	1.67 ± 0.02 Aa	0.56 ± 0.01 Aa
	300	0.57 ± 0.01 ABa	2.96 ± 0.58 Ba	0.05 ± 0.00 Ba	1.67 ± 0.00 Aa	0.56 ± 0.01 Aa
<i>Salicornia fruticosa</i>	0	0.47 ± 0.05 Ac	0.36 ± 0.03 Aa	0.02 ± 0.00 Ac	1.65 ± 0.16 Ac	0.63 ± 0.06 Ac
	100	0.86 ± 0.27 Ab	1.07 ± 0.43 ABa	0.04 ± 0.01 ABa	2.07 ± 0.50 Ab	1.28 ± 0.40 Bb
	200	0.70 ± 0.29 Aab	0.96 ± 0.40 Aa	0.03 ± 0.01 Ab	1.90 ± 0.58 Aa	1.06 ± 0.45 Aa
	300	0.44 ± 0.06 Aa	0.32 ± 0.03 Aa	0.02 ± 0.00 Aab	1.44 ± 0.26 Aa	0.62 ± 0.16 Aa

Table 3. Flavonoid glycosides, Sinapic and Chlorogenic acid derivatives, and Total (as the sum of all) in the leaves and stems of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa*, (mg g^{-1} DW) under different treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Means ($n = 5 \pm \text{SE}$) with different letter are significantly different at p -value < 0.05 ; different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison.

Species	Treatment (mM)	Sinapic Acid Derivatives	Flavonoid Glycosides	Chlorogenic Acid Derivatives	Total
<i>Atriplex halimus</i>	0	0.41 \pm 0.01 cB	0.98 \pm 0.02 aA	0.49 \pm 0.01 bA	1.88 \pm 0.04 bB
	100	0.20 \pm 0.06 bA	1.33 \pm 0.05 bA	0.18 \pm 0.01 aA	1.71 \pm 0.01 bA
	200	0.02 \pm 0.00 aA	1.10 \pm 0.01 aA	0.24 \pm 0.00 aA	1.37 \pm 0.01 aA
	300	0.17 \pm 0.02 abA	1.57 \pm 0.05 cA	0.52 \pm 0.03 bA	2.27 \pm 0.09 cB
<i>Cakile maritima</i>	0	3.22 \pm 0.17 cC	1.50 \pm 0.08 aC	0.45 \pm 0.04 cB	5.17 \pm 0.26 cC
	100	2.02 \pm 0.06 bB	1.77 \pm 0.06 aA	0.20 \pm 0.01 abA	3.99 \pm 0.12 bA
	200	2.08 \pm 0.05 bB	1.70 \pm 0.04 aB	0.27 \pm 0.01 bA	4.05 \pm 0.09 bB
<i>Salicornia fruticosa</i>	0	0.00 \pm 0.00 aA	0.38 \pm 0.01 aB	0.11 \pm 0.00 aB	0.49 \pm 0.01 aA
	100	0.00 \pm 0.00 aA	1.55 \pm 0.07 cA	0.24 \pm 0.01 cA	1.79 \pm 0.08 cA
	200	0.00 \pm 0.00 aA	0.32 \pm 0.01 aAB	0.10 \pm 0.00 aA	0.42 \pm 0.01 aA
	300	0.00 \pm 0.00 aA	0.75 \pm 0.02 bB	0.20 \pm 0.00 bA	0.96 \pm 0.02 bA

Table 4. Protein and Lipid content in the leaves and stems of *Atriplex halimus*, *Cakile maritima*, and *Salicornia fruticosa* (mg g^{-1} DW) under different treatments (0, 100, 200, and 300 mM NaCl). Means ($n = 5 \pm \text{SE}$) with different letter are significantly different at $p\text{-value} < 0.05$, different lower-case letters are significantly different among the same species under different treatments, and different capital letters are significantly different among different species under the same treatment. Tukey HSD test was used for mean comparison.

Species	Treatments (mM)	Protein Content	Lipid Content
<i>Atriplex halimus</i>	0	292.7 \pm 6.7 aB	10.4 \pm 0.4 aA
	100	316.4 \pm 0.8 bC	10.0 \pm 0.8 aA
	200	281.0 \pm 2.8 aB	10.7 \pm 2.0 aA
	300	320.4 \pm 1.3 bB	11.3 \pm 0.4 aA
<i>Cakile maritima</i>	0	128.0 \pm 21.9 aA	21.0 \pm 0.7 aB
	100	143.6 \pm 5.5 aA	23.1 \pm 6.8 aAB
	200	132.5 \pm 25.0 aA	19.2 \pm 0.6 aB
	300	168.2 \pm 47.4 aA	19.6 \pm 0.5 aB
<i>Salicornia fruticosa</i>	0	271.2 \pm 6.9 bB	9.9 \pm 0.6 aA
	100	250.9 \pm 4.6 abB	10.1 \pm 0.9 aA
	200	231.9 \pm 3.1 aB	12.1 \pm 1.1 aA
	300	263.5 \pm 2.6 bAB	12.2 \pm 0.3 aA

2.19 DISCUSSION

In most plants, growth gradually decreases as salinity increases above the threshold of salinity tolerance [32]. The exceptions are halophyte plants, whose growth can be stimulated by low or moderate salinity, but the threshold salt concentration that stimulates or limits growth strongly depends on the genotype [33]. Thus, despite the fact that Debez et al. [34] found a slight RGR enhancement at moderate salinity in *Cakile maritima*, no significant differences in RGR were detected in our *Cakile maritima* plants at 100 mM NaCl, relative to the control. This slight non-alignment may be due to the different ecotype used in their experiments. In fact, in other reports a correlation between the *Cakile maritima* ecotype and the response to salinity regarding growth was found [18,35–37]. However, in our work, at high levels of salinity the RGR of *Cakile maritima* was reduced with respect to the control (by ca. 27% at 200 mM NaCl and by 34% at 300 mM NaCl). These results are consistent with previous findings [34,36,38,39] indicating the facultative character of this halophyte, since its growth is not stimulated by salinity, but it can tolerate moderate salt stress.

On the other hand, *Atriplex halimus* showed a halophytic character with almost no growth in the non-salt treatment and a significant improvement in plant performance under NaCl treatments. These results correlate well with previous studies of *Atriplex halimus* under different NaCl concentrations, which showed that *Atriplex halimus* growth was not negatively affected by salinity until the NaCl concentration reached 400mM[40–42]. In fact, according to Belkheri and Mulas [43], there is a threshold at 300 mM NaCl above which leaf RGR decreases while stems and roots continue growing until the NaCl concentration reaches 600–800 mM.

Our results for *Salicornia fruticosa*, are in consonance with previous results showing an enhancement of its growth under salinity compared with control conditions [17]. However, we found RGR values lower than those reported in the literature [44–46]. These differences can be explained in part by the differences in the genotype used and in the experimental conditions, especially the duration of the salinity treatments and the growth chamber conditions. It is worthwhile noting that Katschnig, Broekman, and Rozema [44] reviewed 20 papers that study *Salicornia* spp. growth and for the majority of them (16 out of 20) an enhancement in performance was found at around 100 mM NaCl, considering this concentration optimal for *Salicornia* growth. Taking into account that for most of the ca. 5000 crop species that are cultivated throughout the world, growth and yield are severely affected at a soil salt level below 0.1% (17 mM NaCl) [47], the evidence from our study supports the idea of exploring halophytes for economic vegetable production, as has been suggested previously [48]. All the ecotypes studied here can be grown in saline areas without reductions in their biomass yield.

One of the main concerns regarding the use of halophytes as new food crops is the fact that they accumulate high amounts of Na⁺ and Cl⁻ in their edible parts. *Atriplex halimus* copes with salinity mainly by excreting Na⁺ and Cl⁻ into vesiculated hairs, which deposit them in crystals that form on the

leaves [27,43]. However, *Salicornia fruticosa* and *Cakile maritima* prevent the excessive accumulation of Na^+ in the cytosol by using compartmentation in the vacuole; therefore, the Na^+ remained in the tissue.

The World Health Organization (WHO) recommends that the daily intake of Na^+ does not exceed 2000 mg day, since it can cause pathologies such as hypertension and cardiovascular diseases [49]. Similarly, the nutritional guidelines in and outside Europe reflect the importance to strongly decrease the Na^+ intake [50], considering a maximum consumption of 5 g per day in most countries including Spain [51].

Based on our experiments, considering an average moisture percentage of 85% for *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* and 92% for *Cakile maritima* (data not shown), the consumption of 100 gr of these fresh vegetables would suppose a maximum intake of 1105.35 mg of Na^+ (for *Atriplex halimus* plants treated with 300 mM NaCl). This amount is below or similar to those obtained for other halophyte species of culinary interest, such as *Arthrocnemum macrostachyum*, *Sarcocornia perennis* alpini, and *Salicornia ramosissima*: 2049, 1029, and 1393 mg of Na^+ , respectively [52]. Other foods commonly used as a source of Na^+ , such as seaweed, have been found to accumulate up to 3960 Na^+ mg 100 g^{-1} DW [53]. In this sense, it is worth highlighting that for *Salicornia fruticosa* and *Cakile maritima* at 100 mM NaCl—when the accumulation of Na was lower, 2733.93 and 2833.61 mg 100 g^{-1} DW, respectively—an increase in growth occurred. However, considering WHO and European recommendations concerning Na daily intakes, the use of these species as fresh vegetables is not recommended, but they can be used as dish accompaniment or as new condiments. Thus, a high nutritional “green salt” based in two halophytes extracts was previously obtained (Antunes et al., 2018). Moreover, a freeze-dried powder of sea fennel has been elaborated as a flavoring spice (Renna and Gonnella, 2012). Similar uses can be proposed by our halophyte plants, but new agronomical and post-harvest strategies must be developed in order to reduce salinity levels in the plant edible parts, as indicated Renna and Gonnella (2018). Furthermore, the use of young leaves can ameliorate Na^+ accumulation regarding the older ones [54–56].

However, we should interpret carefully the results for the Na^+ concentration in the leaves of the plants since the time of NaCl exposure is the main determinant of the Na^+ concentration in tissues. Thus, the short exposure time could explain our lower levels of Na^+ in *Salicornia fruticosa* compared with those reported by Lv et al. [57]. In contrast, our findings for *Salicornia fruticosa* correlate well with those of Ushakiva et al. [58] and Tikhomirova et al. [59] for similar periods of exposure to salinity. Therefore, a controlled NaCl exposition during halophyte crop production cannot be ruled out.

At high salt concentrations, the competition between Na^+ and other ions increases and a nutrient imbalance in the plant could occur. Consequently, although halophytes accumulate Na^+ , the K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} contents may decrease. In *Atriplex halimus*, most authors have noted a decrease in the leaf

K^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} contents, while the Na^+ content increases, with increasing salinity [42,60]. However, in our plants, although the concentrations of the rest of the macronutrients were reduced with by salinity, relative to control, the K^+ , Ca^{2+} , P and S concentrations were maintained in all the salinity treatments, indicating that the increment in Na^+ ions did not impede the uptake or translocation of other cations. This behavior was previously found in *Salicornia fruticosa* and *Cakile maritima*, with an effective balance for the other macronutrients being maintained in spite of the rise in the external NaCl concentration [17,57].

From a nutritional point of view, it is important that the Na^+/K^+ ratio remains low, since diets with a high Na^+/K^+ ratio have been related to various cardiovascular diseases [61]. High concentrations of K^+ were found in *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* (ranging from 1139.77 to 2158.81 mg 100 g^{-1} DW) under saline stress conditions, exceeding the values reported for other halophytes of culinary interest, which ranged from 892 to 1580 mg 100 g^{-1} DW [61]. Moreover, the concentration of macronutrients as Ca^{2+} , Mg^{2+} , P, and S (essential elements for humans) must be considered in vegetables, since these minerals are required at doses higher than 50 mg/day in the adults (the amounts recommended by the Food by the Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine in Washington DC, 2002 [62]). The Ca^{+2} levels of *Cakile maritima* were higher than for the rest of the halophytes studied, comparable to others of interest (52–62 mg 100 g^{-1} DW [17], and within the range of other horticultural plants: between 2 and 190 mg 100 g^{-1} FW) [63].

Zinc and iron deficiencies are the most common and widespread nutritional deficiencies in the world [64]. *Cakile maritima* plants in our study presented levels of Zn ranged from 2.36 to 2.96 mg per 100 gr DW. Zn content of lettuce leaves were ranged from 3.41 to 4.68 mg/100 g DW depending on the variety and location [65,66]. Other baby leaf vegetables contained 0.84 mg/100 gr FW of Zn [67]. Thus, our *Cakile maritima* plants are a good source of Zn and the three species tested here, when cultivated in a hydroponic system, did not accumulate amounts of metals above those recommended by the Food and Drug Administration (FDA).

Previous findings suggested a higher phenolic content in *Cakile maritima* plants obtained from extreme climatic conditions in terms of salinity, low rainfall, and high radiation [11]. However, we found a negative correlation between increasing salinity and the total phenolics content, in consonance with analysis carried out under controlled growth conditions [18]. This variation in the response to salinity stress has been related to the ecotype used and the bioclimatic circumstances [37]. Taking into consideration the reduction in phenolics accumulation and the substantial reduction in growth caused by salinity, it seems that *Cakile maritima* is not the best candidate as a source of biochemical components under salt stress. However, the levels of phenolics are elevated regarding other halophytes in spite of salinity reduction. Soxhlet extracts of *Chrtymum maritimum* leaves [68], another promising food halophytic plant, showed a total phenolic compound levels ranged from 3.68 to 4.33 mg GAE g^{-1}

DW and a content of total flavonoids from 1.70 to 1.87 (mg of CE g⁻¹ DW), which values were similar to our *Cakile maritima* plants.

Flavonoids, in addition to the antioxidant properties of phenolic compounds, have other several potential health-promoting activities, including anti-allergic, anti-inflammatory, anti-microbial, and anti-cancer properties [69]. Thus, the use of edible parts of *Cakile maritima* must be considered as a source of these antioxidant compounds in the search of new salt tolerant crops with moderate–high nutritional value and agri-food industrial applications. Conversely, our results with *Atriplex halimus* show an increase in flavonoids and total phenolics with the increment in the salt concentration, while RGR increased at the same time. This is in agreement with Bendaly et al. [42] and Boestfleisch et al. [70], who reported that these correlations continue up to 400 mM NaCl, from which point growth and antioxidants were affected is reduced. Nevertheless, there is considerable literature on how salinity stress seems to promote the accumulation of phenolic compounds in *Atriplex halimus* [12,42,70]. For some *Salicornia* species, an increase in the phenolics content with increasing salinity has been reported [70]. However, our results show a peak around 100 mM NaCl. Even though the total phenolics content decreased when the salinity passed this point, at 300 mM NaCl the flavonoids content was still higher than in control plants, in contrast to the results of Mishra et al. [13]. These authors also found an increment in flavonoids with enhanced salinity.

Atriplex halimus had the highest amounts of proteins under salinity, followed by *Salicornia fruticosa*, their protein contents being higher than that obtained for the Nori alga grown at 100 mM NaCl (20 g/100 g DW); this alga is considered as a new foodstuff and is the most consumed seaweed in the world. Significantly, *Atriplex* spp. are known to have a high protein content, around 14–21% [71–73] which is higher than well-established crop species such as alfalfa. That is why these species have been studied to be as a partial replacement for other traditional forage sources which are not as well adapted as *Atriplex* spp. to cultivation in arid and semiarid areas [9,74]. Remarkably, our results showed up to a 32% crude protein content, which may be related to the early plant stage in which the analysis was carried out. In *Salicornia fruticosa*, the protein content was also in agreement with previous studies with different *Salicornia* spp. [14,17,75]. In fact, *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* showed almost twice total protein content of *Cakile maritima* and the consumption of *Atriplex* spp. have been reported in times of scarcity of other vegetable foods as a good source of protein [27]. An analysis of the fatty acids in these three halophytes was previously reported [76]. In general, halophytes have been reported to provide nutritional value due to their lipid composition [77], pointing that lipids were increased when they were grown in farms when compared to conspecifics from the wild conditions. Furthermore, previously *Cakile maritima* was described as a species with a high degree of unsaturated fatty acids when compared glycophytes plants [78]. The results showed that the most abundant fatty acids for the three species were linoleic, α -linoleic, and arachidic acids, which are part of the omega-3 and omega-6 series, the most important in human nutrition. The results obtained in other works point

to the lipid composition in these plants attempt to be healthy. Thus, the elevated lipid content in *Cakile* plants, even at high salinity, represents an added value to its nutritional profile, since main lipids have known bioactive properties. Accordingly, the specific composition of the lipids should be further determined.

2.20 CONCLUSIONS

Taking into account that from the about 5000 crops that are cultivated throughout the world, in most of them, growth and yield are severely affected under 0.1% soil salinity [47], the evidence from this study points out towards the idea of exploring halophytes for economic vegetable production, as it has been suggested in previous literature [48]. *Atriplex halimus* and *Salicornia fruticosa* were proved to have the best growth and biomass yield under salinity stress and so should be studied further for their application in degraded soils and coastal areas affected by salinity.

All the above results contribute to the promotion of halophytes crops as a source of valuable material for foodstuff production. Thus, these plant species, that due to their characteristics can tolerate saline soils and saline irrigation waters, may be an alternative to conventional crops for foodstuff, given their mineral nutritional potential. As some of them may result hyperaccumulators, heavy metals contamination of soil has to be considered when deciding whether to cultivate them. In any case, these species did not accumulated amounts of metals over than those recommended by Food and Drug Administration (FDA), when they are cultivated in a hydroponic system under controlled conditions.

Atriplex halimus may provide an acceptable level of proteins that can fulfil the growing demand to reduce the animal protein consumption. While *Cakile maritima* plants resulted less tolerant to salinity, they constitute a source of antioxidant compounds as total phenolics, especially flavonoids, with important contributions to human health. Thus, the use of these species as herbal salts or salt extracts for foodstuff substituting NaCl cannot be ruled out. Moreover, there are few directresses on how efficiently they must be cultivated, and research must be conducted through this direction. When taken into consideration the challenges future generation will face in terms of soil degradation, climate change, and increasing population, it is more probable that these species will be taken into consideration as new cash crop halophyte.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.d.C.M-B. and M.C. participated in the conceptualization, investigation, and methodology. A.A. developed investigation, formal analysis, and writing - original draft preparation. M.d.C.M-B. participated in the supervision and writing -review and editing. M.C. participated in writing - review and editing and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was partially funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN). Project “Retos Colaboración (RTC-2015-3536-2)” FEDER.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STATEMENT

Not applicable.

INFORMED CONSENT STATEMENT

Not applicable.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Diego Angel Moreno and Javier Marhuenda for their values comments of the manuscript and David Walker for the English corrections.

CONFLICTS OF INTEREST

Sakata Seed Iberica provides the field, seeds and fertilizers for the experiment. The company declares no conflicts of interest in the publication of the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kaushal, S.S.; Likens, G.E.; Pace, M.L.; Utz, R.M.; Haq, S.; Gorman, J.; Grese, M. Freshwater salinization syndrome on a continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, 115, E574–E583, doi:10.1073/pnas.1711234115.
2. Herbert, E.R.; Boon, P.; Burgin, A.J.; Neubauer, S.C.; Franklin, R.B.; Ardon, M.; Hopfensperger, K.N.; Lamers, L.P.M.; Gell, P.; Langley, J.A. A global perspective on wetland salinization: Ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere* 2015, 6, 1–43.
3. Wienhold, B.J. Soils, Land, and Food: Managing the Land During the Twenty-First Century. *Soil Sci.* 2003, 168, 748–749, doi:10.1097/01.ss.0000095147.68539.40.
4. Khan, W.-D.; Tanveer, M.; Shaukat, R.; Ali, M.; Pirdad, F. Salt and Drought Stress Tolerance in Plants: Signaling and Communication in Plants; Springer: Berlin, Germany, 2020; ISBN 9783030402761.
5. George, E.; Horst, W.J.; Neumann, E. Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions. In *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*; Elsevier Inc.: Hohenheim, Germany, 2011; pp. 409–472, ISBN 9780123849052.

6. Shannon, M.C.; Grieve, C.M. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hortic.* (Amsterdam) 1998, 78, 5–38, doi:10.1016/S0304-4238(98)00189-7.
7. Flowers, T.; Hajibagheri, M.; Clipson, N. Halophytes. *Q. Rev. Biol.* 1986, 61, 313–337.
8. Flowers, T.J.; Muscolo, A. Introduction to the Special Issue: Halophytes in a changing world. *AoB Plants* 2015, 7, plv020, doi:10.1093/aobpla/plv020.
9. Panta, S.; Flowers, T.; Lane, P.; Doyle, R.; Haros, G.; Shabala, S. Halophyte agriculture: Success stories. *Environ. Exp. Bot.* 2014, 107, 71–83, doi:10.1016/j.envexpbot.2014.05.006.
10. Flowers, T.J.; Galal, H.K.; Bromham, L. Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants. *Funct. Plant Biol.* 2010, 37, 604–612, doi:10.1071/FP09269.
11. Ksouri, R.; Megdiche, W.; Falleh, H.; Trabelsi, N.; Boulaaba, M.; Smaoui, A.; Abdelly, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biol.* 2008, 331, 865–873, doi:10.1016/j.crv.2008.07.024.
12. Benhammou, N.; Bekkara, F.A.; Kadifkova Panovska, T. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus Chim.* 2009, 12, 1259–1266, doi:10.1016/j.crci.2009.02.004.
13. Mishra, A.; Patel, M.K.; Jha, B. Non-targeted metabolomics and scavenging activity of reactive oxygen species reveal the potential of *Salicornia brachiata* as a functional food. *J. Funct. Foods* 2015, 13, 21–31, doi:10.1016/j.jff.2014.12.027.
14. Bertin, R.L.; Gonzaga, L.V.; Borges, G. da S.C.; Azevedo, Mô.S.; Maltez, H.F.; Heller, M.; Mücke, G.A.; Tavares, L.B.B.; Fett, R. Nutrient composition and, identification/quantification of major phenolic compounds in *Sarcocornia ambigua* (Amaranthaceae) using HPLC-ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* 2014, 55, 404–411, doi:10.1016/j.foodres.2013.11.036.
15. Buhmann, A.; Papenbrock, J. An economic point of view of secondary compounds in halophytes. *Funct. Plant Biol.* 2013, 40, 952–967, doi:10.1071/FP12342.
16. Randhir, R.; Lin, Y.T.; Shetty, K. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochem.* 2004, 39, 637–646, doi:10.1016/S0032-9592(03)00197-3.
17. Ventura, Y.; Wuddineh, W.A.; Myrzabayeva, M.; Alikulov, Z.; Khozin-Goldberg, I.; Shpigel, M.; Samocha, T.M.; Sagi, M. Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Sci. Hortic.* (Amsterdam) 2011, 128, 189–196, doi:10.1016/j.scienta.2011.02.001.
18. Ksouri, R.; Megdiche, W.; Debez, A.; Falleh, H.; Grignon, C.; Abdelly, C. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiol. Biochem.* 2007, 45, 244–249, doi:10.1016/j.plaphy.2007.02.001.

19. Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006, 99, 191–203, doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
20. Guil-Guerrero, J.L.; Giménez-Martínez, J.J.; Torija-Isasa, M.E. Nutritional composition of wild edible crucifer species. *J. Food Biochem.* 1999, 23, 283–294, doi:10.1111/j.1745-4514.1999.tb00020.x.
21. Khan, M.A.; Weber, D.J. *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2006.
22. Hoi, K.D.; Hyun, K.T. *Salicornia Spp.-Derived Salt and its Production Process*. U.S. Patent No 8,420,152, 16 April 2013.
23. Kim, H.-W.; Hwang, K.-E.; Song, D.-H.; Kim, Y.-J.; Ham, Y.-K.; Yeo, I.-J.; Jeong, T.-J.; Choi, Y.-S.; Kim, C.-J. Effects of Red and Green Glassworts (*Salicornia herbacea* L.) on Physicochemical and Textural Properties of Reduced-salt Cooked Sausages. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 2014, 34, 378, doi:10.5851/KOSFA.2014.34.3.378.
24. Kim, H.L.; Kim, I.C. *Sports Beverage Composition Comprising Salicornia Herbacia Extracts*. KR20110002392, 1 July 2019.
25. Zhongjin Lu; Roy, M. Hodges; Carlos, J. Mota-Urbina; Paul, L. Gallawa; Rahul Chaturvedi; Dominic, M.DeCianne; Edward, P. Glenn; Carl, N. Hodges. *Salicornia Bigelovii* (Chenopodiaceae)—A Seawater-Irrigated Crop with Versatile Commercial Products. In *Proceedings of the 5th New Crops Symposium, Atlanta, Georgia, 10–13 November 2001*; pp. 28–29.
26. Wright, J. *Edible Seashore: River Cottage Handbook*; Bloomsbury Publishing: London, UK, 2009; ISBN 0747595313.
27. Walker, D.J.; Lutts, S.; Sánchez-García, M.; Correal, E. *Atriplex halimus* L.: Its biology and uses. *J. Arid Environ.* 2014, 100, 111–121, doi:10.1016/j.jaridenv.2013.09.004.
28. Epstein, E. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*; Sinauer Associates, Inc.: Sunderland, MA, USA, 1972.
29. Hunt, R.; Causton, D.R.; Shipley, B.; Askew, A.P. A modern tool for classical plant growth analysis. *Ann. Bot.* 2002, 90, 485–488, doi:10.1093/aob/mcf214.
30. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
31. Folch, J.; Lees, M.; Stanley Sloane, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497–509, doi:10.1371/journal.pone.0020510.

32. Jenks, M.A.; Hasegawa, P.M.; Jain, S.M. *Advances in Molecular Breeding toward Drought and Salt Tolerant Crops*, 1st ed.; Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Jain, S.M., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2007; p. 1-32, ISBN 9781402055775.
33. He, Q.; Silliman, B.R.; Cui, B. Incorporating thresholds into understanding salinity tolerance: A study using salt-tolerant plants in salt marshes. *Ecol. Evol.* 2017, 7, 6326–6333, doi:10.1002/ece3.3209.
34. Debez, A.; Braun, H.-P.; Pich, A.; Taamalli, W.; Koyro, H.-W.; Abdelly, C.; Huchzermeyer, B. Proteomic and physiological responses of the halophyte *Cakile maritima* to moderate salinity at the germinative and vegetative stages. 2012, 75, 5667–5694, doi:10.1016/j.jprot.2012.08.012.
35. Amor, N.N.; Jimenez, A.; Megdiche, W.; Lundqvist, M.; Sevilla, F.; Abdelly, C. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiol. Plant.* 2006, 126, 446–457, doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00620.x.
36. Megdiche, W.; Amor, N.B.; Debez, A.; Hessini, K.; Ksouri, R.; Zuily-Fodil, Y.; Abdelly, C. Salt tolerance of the annual halophyte *Cakile maritima* as affected by the provenance and the developmental stage. *Acta Physiol. Plant.* 2007, 29, 375–384, doi:10.1007/s11738-007-0047-0.
37. Wided, M.; Nader, B.A.; Debez, A.; Kamel, H.; Riadh, K.; Chedly, A.; Ahmed, D.; Kamel, H.; Riadh, K.; Chedly, A. Physiological and biochemical traits involved in the genotypic variability to salt tolerance of Tunisian *Cakile maritima*. *Afr. J. Ecol.* 2009, 47, 774–783, doi:10.1111/j.1365-2028.2009.01073.x.
38. Debez, A.; Hamed, K.B.; Grignon, C.; Abdelly, C. Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Soil* 2004, 262, 179–189, doi:10.1023/B:PLSO.0000037034.47247.67.
39. Debez, A.; Saadaoui, D.; Ramani, B.; Ouerghi, Z.; Koyro, H.-W.; Huchzermeyer, B.; Abdelly, C. Leaf H⁺-ATPase activity and photosynthetic capacity of *Cakile maritima* under increasing salinity. *Environ. Exp. Bot.* 2006, 57, 285–295, doi:10.1016/j.envexpbot.2005.06.009.
40. Boughalleb, F.; Denden, M.; Tiba, B. Ben Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. *Acta Physiol. Plant.* 2009, 31, 947–960, doi:10.1007/s11738-009-0310-7.
41. Bankaji, I.; Sleimi, N.; López-Climent, M.F.; Perez-Clemente, R.M.; Gomez-Cadenas, A. Effects of Combined Abiotic Stresses on Growth, Trace Element Accumulation, and Phytohormone Regulation in Two Halophytic Species. *J. Plant Growth Regul.* 2014, 33, 632–643, doi:10.1007/s00344-014-9413-5.
42. Bendaly, A.; Messedi, D.; Smaoui, A.; Ksouri, R.; Bouchereau, A.; Abdelly, C. Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiol. Biochem.* 2016, 103, 208–218, doi:10.1016/j.plaphy.2016.02.037.

43. Belkheiri, O.; Mulas, M. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. *Environ. Exp. Bot.* 2013, 86, 17–28, doi:10.1016/j.envexpbot.2011.07.001.
44. Katschnig, D.; Broekman, R.; Rozema, J. Salt tolerance in the halophyte *Salicornia dolichostachya* moss: Growth, morphology and physiology. *Environ. Exp. Bot.* 2013, 92, 32–42, doi:10.1016/j.envexpbot.2012.04.002.
45. Pérez-Romero, J.A.; Idaszkin, Y.L.; Barcia-Piedras, J.M.; Duarte, B.; Redondo-Gómez, S.; Caçador, I.; Mateos-Naranjo, E. Disentangling the effect of atmospheric CO₂ enrichment on the halophyte *Salicornia ramosissima* J. Woods physiological performance under optimal and suboptimal saline conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 2018, 127, 617–629, doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.041.
46. Pérez-Romero, J.A.; Duarte, B.; Barcia-Piedras, J.-M.; Rita Matos, A.; Redondo-Gómez, S.; Caçador, I.; Mateos-Naranjo, E. Investigating the physiological mechanisms underlying *Salicornia ramosissima* response to atmospheric CO₂ enrichment under coexistence of prolonged soil flooding and saline excess. *Plant Physiol. Biochem.* 2019, 135, 149–159, doi:10.1016/j.plaphy.2018.12.003.
47. National Research Council. *Saline Agriculture: Salt-Tolerant Plants for Developing Countries*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 1990.
48. Ventura, Y.; Sagi, M. Halophyte crop cultivation: The case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. *Environ. Exp. Bot.* 2013, 92, 144–153, doi:10.1016/j.envexpbot.2012.07.010.
49. Burnier, M.; Wuerzner, G.; Bochud, M.; Aepli, S.; Arnold, M.; Conen, D.; Erne, P.; Hayoz, D.; Henzen, C.; Junker, T.; et al. Salt, blood pressure and cardiovascular risk: What is the most adequate preventive strategy? A Swiss perspective. *Front. Physiol.* 2015, 6, 227.
50. Commission, E. *Food-Based Dietary Guidelines in Europe* | EU Science Hub. Available online: <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/food-based-dietary-guidelines> (accessed on 18 December 2020).
51. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. *Guías alimentarias para la población española (SENC, diciembre 2016); la nueva pirámide de la alimentación saludable*. *Nutr. Hosp.* 2016, 33, 1–48.
52. Barreira, L.; Resek, E.; Rodrigues, M.J.; Rocha, M.I.; Pereira, H.; Bandarra, N.; da Silva, M.M.; Varela, J.; Custódio, L. Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits? *J. Food Compos. Anal.* 2017, 59, 35–42, doi:10.1016/j.jfca.2017.02.003.
53. El-Said, G.F.; El-Sikaily, A. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. *Environ. Monit. Assess.* 2013, 185, 6089–6099, doi:10.1007/s10661-012-3009-y.

54. Antunes, M.D.; Gago, C.; Branquinho, A.R.; Julião, M.; Guerreiro, A.; Miguel, G.; Faleiro, M.L.; Panagopoulos, T. Behavior of “Green salt” from *Salicornia ramosissima* and *Sarcocornia perennis* through storage. *Acta Hortic.* 2018, 1194, 777–783.
55. Renna, M.; Gonnella, M. The use of the sea fennel as a new spice-colorant in culinary preparations. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 2012, 1, 111–115, doi:10.1016/j.ijgfs.2013.06.004.
56. Sánchez-Faure, A.; Calvo, M.M.; Pérez-Jiménez, J.; Martín-Diana, A.B.; Rico, D.; Montero, M.P.; Gómez-Guillén, M. del C.; López-Caballero, M.E.; Martínez-Alvarez, O. Exploring the potential of common iceplant, seaside arrowgrass and sea fennel as edible halophytic plants. *Food Res. Int.* 2020, 137, 109613, doi:10.1016/j.foodres.2020.109613.
57. Lv, S.; Jiang, P.; Chen, X.; Fan, P.; Wang, X.; Li, Y. Multiple compartmentalization of sodium conferred salt tolerance in *Salicornia europaea*. *Plant Physiol. Biochem.* 2012, 51, 47–52, doi:10.1016/j.plaphy.2011.10.015.
58. Ushakova, S.A.; Kovaleva, N.P.; Gribovskaya, I.V.; Dolgushev, V.A.; Tikhomirova, N.A. Effect of NaCl concentration on productivity and mineral composition of *Salicornia europaea* as a potential crop for utilization NaCl in LSS. *Adv. Sp. Res.* 2005, 36, 1349–1353, doi:10.1016/j.asr.2004.09.017.
59. Tikhomirova, N.A.; Ushakova, S.A.; Shklavtsova, E.S.; Anishchenko, O. V.; Mikheeva, Y.A.; Tikhomirov, A.A. Effects of PAR Intensity and NaCl Concentration on Growth of *Salicornia europaea* Plants as Relevant to Artificial Ecological Systems. *Russ. J. Plant Physiol.* 2016, 63, 504–513, doi:10.1134/S1021443716040154.
60. Khan, M.A.; Ungar, I.A.; Showalter, A.M. Effects of salinity on growth, water relations and ion accumulation of the subtropical perennial halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Ann. Bot.* 2000, 85, 225–232, doi:10.1006/anbo.1999.1022.
61. Rupérez, P. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem.* 2002, 79, 23–26, doi:10.1016/S0308-8146(02)00171-1.
62. Triana, M.H. Recomendaciones nutricionales para el ser humano: Actualización. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 2004, 23, 266–292.
63. Nutrient Lists from Standard Reference Legacy (2018)|Food and Nutrition Information Center|NAL|USDA. Available online: <https://www.nal.usda.gov/fnic/nutrient-lists-standard-reference-legacy-2018> (accessed on 25 November 2020).
64. Guilbert, J.J. The world health report 2002—Reducing risks, promoting healthy life [2]. *Educ. Heal.* 2003, 16, 230.
65. Padash, A.; Shahabivand, S.; Behtash, F.; Aghaee, A. A practicable method for zinc enrichment in lettuce leaves by the endophyte fungus *Piriformospora indica* under increasing zinc supply. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 2016, 213, 367–372, doi:10.1016/j.scienta.2016.10.040.

66. Sularz, O.; Smoleń, S.; Koronowicz, A.; Kowalska, I.; Leszczyńska, T. Chemical composition of lettuce (*Lactuca sativa* L.) biofortified with iodine by KIO₃, 5-Iodo-, and 3,5-diiodosalicylic acid in a hydroponic cultivation. *Agronomy* 2020, 10, 1022, doi:10.3390/agronomy10071022.
67. Wong, K.W.; Yap C.K.; Nulit, R.; Omar, H.; Aris, A.Z.; Cheng, W.H.; Latif, M.T.; Leow, C.S. Zn in vegetables: A review and some insights. *Integr. Food Nutr. Metab.* 2019, 6, 1–7. doi:10.15761/ifnm.1000245.
68. Jallali, I.; Megdiche, W.; M’Hamdi, B.; Oueslati, S.; Smaoui, A.; Abdelly, C.; Ksouri, R. Changes in phenolic composition and antioxidant activities of the edible halophyte *Crithmum maritimum* L. with physiological stage and extraction method. *Acta Physiol. Plant.* 2012, 34, 1451–1459, doi:10.1007/s11738-012-0943-9.
69. Adebooye, O.C.; Vijayalakshmi, R.; Singh, V. Peroxidase activity, chlorophylls and antioxidant profile of two leaf vegetables (*Solanum nigrum* L. and *Amaranthus cruentus* L.) under six pretreatment methods before cooking. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2008, 43, 173–178, doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01420.x.
70. Boestfleisch, C.; Wagenseil, N.B.; Buhmann, A.K.; Seal, C.E.; Wade, E.M.; Muscolo, A.; Papenbrock, J. Manipulating the antioxidant capacity of halophytes to increase their cultural and economic value through saline cultivation. *AoB Plants* 2014, 6, 1–16, doi:10.1093/aobpla/plu046.
71. Barrett-Lennard, E.G.; Bathgate, A.; Malcolm, C.V. *Saltland Pastures in Australia: A Practical Guide*; Bulletin No. 4312; WA Government. Dept. of Agriculture and Food: Perth Australia, 2016; ISBN 192086007X.
72. Andueza, D.; Muñoz, F.; Delgado, I.; Correal, E. Intraspecific variation in *Atriplex halimus*: Chemical composition of edible biomass. *Options Mediterr.* 2005, 377–381.
73. El-Shatnawi, M.K.J.; Turuk, M. Dry matter accumulation and chemical content of saltbush (*atriplex halimus*) grown in mediterranean desert shrublands. *N. Z. J. Agric. Res.* 2002, 45, 139–144, doi:10.1080/00288233.2002.9513503.
74. Obeidat, B.S.; Mahmoud, K.Z.; Maswadeh, J.A.; Bsoul, E.Y. Effects of feeding *Atriplex halimus* L. on growth performance and carcass characteristics of fattening Awassi lambs. *Small Rumin. Res.* 2016, doi:10.1016/j.smallrumres.2016.03.007.
75. Min, J.-G.; Lee, D.-S.; Kim, T.-J.; Park, J.-H.; Cho, T.-Y.; Park, D.-I. Chemical Composition of *Salicornia Herbacea* L. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2002, 7, 105–107.
76. Yepes, L.; Chelbi, N.; Vivo, J.-M.M.; Franco, M.; Agudelo, A.; Carvajal, M.; Martínez-Ballesta, M. del C.; Del Carmen Martínez-Ballesta, M.; Martínez-Ballesta, M. del C. Analysis of physiological traits in the response of *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, and *Brassicaceae* plants to salinity stress. *Plant Physiol. Biochem.* 2018, 132, 145–155, doi:10.1016/j.plaphy.2018.08.040.

77. Maciel, E.; Domingues, P.; Domingues, M.R.M.; Calado, R.; Lillebø, A. Halophyte plants from sustainable marine aquaponics are a valuable source of omega-3 polar lipids. *Food Chem.* 2020, 320, 126560, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126560.
78. Chalbi, N.; Hessini, K.; Gandour, M.; Mohamed, S.; Smaoui, A.; Abdelly, C.; Youssef, N. Ben Are changes in membrane lipids and fatty acid composition related to salt-stress resistance in wild and cultivated barley? *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2013, 176, 138–147, doi:10.1002/jpln.201100413.

3 DISCUSIÓN GENERAL

Tras los estudios realizados con las plantas halofitas *Atriplex halimus*, *Salicornia fruticosa* y *Cakile maritima*, observamos que *Salicornia fruticosa* y *Atriplex halimus* mostraron el mejor comportamiento frente a la salinidad. Nuestros resultados están en consonancia con los diversos mecanismos descritos que usan estas especies para hacer frente al estrés salino. *Atriplex halimus* fue la especie que más vio estimulado su crecimiento; tras un mes de exposición a salinidad presentó incrementos en biomasa entorno al 75% respecto del riego sin salinidad (capítulo 1) y tras 15 días de aplicación de salinidad su tasa de crecimiento vegetativo aumentó con el nivel salinidad en el medio (capítulo 4). Además, se pudo observar el efecto de mecanismos de regulación tanto a nivel de osmolitos y potencial osmótico como una mayor eficiencia para la absorción de sodio que *Salicornia fruticosa*.

Desde un punto de vista de explotación comercial, ambas halofitas presentaron contenidos en proteínas que no se veían afectados por el estrés salino; además de contenidos muy interesantes en compuestos beneficiosos para la salud humana como son los compuestos fenólicos y ácidos grasos poliinsaturados. Más concretamente, a nivel de ácidos grasos, estas especies destacaron por los contenidos en ácido linoleico y α -linoleico, considerados ácidos grasos esenciales para la dieta, con múltiples beneficios para la salud (Hegde, Zanwar and Adekar, 2016).

Es por todo esto que coincidimos con autores previos en proponer el empleo de estas especies como fuente potencial de alimento para la población como medida de adaptación al cambio climático (Panta *et al.*, 2014). Para el caso particular de la Región de Murcia, no parece que estos cultivos vayan a ser rentables en las principales zonas productoras, donde cultivos tradicionales como el melón o el brócoli son muy competitivos (Romero Díaz and Belmonte Serrato, 2011), al menos en el corto plazo. No obstante, sí podrían suponer una solución para áreas empobrecidas o abandonadas por escasa rentabilidad debido a la salinización (Walker *et al.*, 2014). La selección de la especie más prometedora dependerá del objetivo comercial (formato, vida útil, tipo de alimento, etc.):

Como producto vegetal para venta en fresco parece que alguna *Salicornia* spp. podría ser la opción más recomendable. Si bien no presentó tan buen desarrollo vegetativo como *Atriplex halimus*, a diferencia de este, ya existen en el mercado formatos de este producto vegetal (Hasanuzzaman, Nahar and Öztürk, 2019). En este caso en particular, se trata de una *Salicornia persica* que se ha obtenido mediante programas de mejora y que se caracteriza por la producción de brotes finos y tiernos (Singh *et al.*, 2014). Al ser la parte vegetativa (brotes tiernos de las hojas) el órgano de interés comercial, su cultivo permite tener cosechas durante casi todo el año.

Por otro lado, como ingrediente funcional o para la producción sales vegetales, nuestros resultados indican que *Atriplex halimus* podría ser una buena candidata; dado los elevados contenidos en proteínas que no parecen disminuir con la salinidad y por la influencia positiva de la salinidad sobre el desarrollo vegetativo, el contenido en fenólicos y ácidos grasos. Por ejemplo, al contener altas concentraciones de Na⁺, podría emplearse como sazónador funcional.

No obstante, existen en la actualidad ciertas limitaciones a la utilización de las especies halofitas estudiadas. Por un lado, la respuesta fisiológica de estas especies a la salinidad es muy dependiente de la subespecie o el ecotipo (Andueza *et al.*, 2005; Hegde, Zanwar and Adekar, 2016; Barreira *et al.*, 2017) y se presentan grandes problemas taxonómicos para diferenciar el material, especialmente en el caso de *Salicornia* (Singh *et al.*, 2014). Por otro lado, al tratarse de cultivos marginales muy poco extendidos, no hay suficientes estudios sobre técnicas de cultivo (Ventura and Sagi, 2013). Además, siendo cultivos sin domesticar, es de esperar que las producciones no sean homogéneas y/o abundantes. Es por todo esto que para poder explotar su potencial son necesarios programas de domesticación y mejora que incluyan planes de selección de las especies, subespecies y ecotipos de mayor interés y estudios de producción en campo.

A nivel europeo, existe otra limitación a la explotación de los cultivos de halofitas de gran importancia. Se trata de la normativa que autoriza la producción, distribución y venta de productos alimenticios nuevos; más concretamente la legislación sobre los *novel food* (European Commission, 2008). Se considera *novel food* a cualquier alimento que no haya sido consumido en cantidades relevantes en Europa antes 15 de mayo de 1997. Esta normativa exige una serie de estudios de inocuidad para todas las sustancias presentes en el material que va a ser vendido como alimento. En el caso de un material vegetal, la cantidad de análisis necesarios complica mucho que las empresas decidan invertir en estos productos.

En lo que respecta a las Brassicaceae (*Cakile maritima*, *Brassica rapa* L. y *Brassica oleracea* L.) el comportamiento frente a estrés salino fue muy diferente. *Cakile maritima* mostró un comportamiento propio de una halofita facultativa; puede tolerar altas salinidades, pero no ve fomentado su crecimiento con la salinidad. Comparando esta especie con las halofitas, tras dos semanas de tratamiento salino mantenía mejor tasa de crecimiento vegetativo que *Atriplex halimus* y *Salicornia fruticosa*, aunque con una clara relación negativa con la salinidad. De hecho, cuando se prolongó su exposición a los tratamientos salinos hasta un mes, mostró menor producción de biomasa que las demás. Por otro lado, nuestros estudios muestran dos etapas en la respuesta a salinidad (100mM NaCl) de esta especie: Durante las primeras semanas sometida a estrés salino redujo el crecimiento (RGR) pero tras un mes en condiciones de baja salinidad el desarrollo vegetativo se vio ligeramente incrementado respecto del testigo sin salinidad. No obstante, para el resto de los tratamientos salinos, el crecimiento vegetativo se vio muy afectado. *Cakile maritima* se presenta como una alternativa para zonas de

salinidad baja o moderada, pero en el largo plazo, para obtener una mejor alternativa a los cultivos tradicionales, parece que *Salicornia* spp. o *Atriplex halimus* serían opciones más eficientes para hacer frente a la problemática. En cuanto a la forma de explotación, *Cakile maritima* se ha empleado como producto vegetal para consumo en fresco (Guil-Guerrero, Giménez-Martínez and Torija-Isasa, 1999) y en nuestros análisis presentó buenos contenidos en antioxidantes y Zn. No obstante, parecen más prometedores los resultados obtenidos del análisis del contenido en aceites de sus semillas, los cuales han mostrado ser similares a los de los cultivos tradicionales oleaginosos (Lieth and Mochtchenko, 2003; Hasanuzzaman, Nahar and Öztürk, 2019).

En los estudios realizados con *Brassica rapa* L., esta especie mostró un comportamiento típico de glicofita, con una disminución del desarrollo vegetativo importante, pérdida de succulencia, no se encontraron evidencias que sugirieran algún tipo de mecanismos de compartimentación de sodio, etc.

Tanto en el capítulo primero como el cuarto se compararon especies con diferentes respuestas a la salinidad (0, 100, 200 y 300 mM NaCl) en condiciones controladas. Mientras que las actividades realizadas en el capítulo segundo y parte de la del tercero se llevaron a cabo en campo. Si bien las condiciones de campo son más cercanas a la realidad comercial, es mucho más complicado realizar comparativas con experimentos similares; el gran número de variables no controladas en un experimento de campo constituyen un elemento de incertidumbre para la discusión de los resultados. Esto explica en gran medida las diferencias en el comportamiento de las especies de *Brassica* en el capítulo 2 respecto del capítulo 1. Si bien se trataba de especies diferentes (*Brassica rapa* L. y *Brassica oleracea* L. v. itálica), ambas han sido estudiadas previamente mostrando un comportamiento similar; aunque con algunas diferencias entre cultivares, ambas especies han sido catalogadas como muy tolerantes o medianamente tolerantes (Su *et al.*, 2013). Es por ello que se esperaba reducciones importantes en las producciones de brócoli del capítulo 2, tal y como se refleja en bibliografía (Di Gioia *et al.*, 2018) y como se observó en *Brassica rapa* en el capítulo 1. El motivo por el cual el brócoli solo presentó reducciones en el crecimiento en algunos cultivares y periodos concretos probablemente se deba a las condiciones ambientales del ensayo. Más concretamente, en un ensayo en maceta las sales aportadas se acumulan en el sustrato, mientras que en el ensayo de campo estas sales pueden acumularse en zonas alejadas del bulbo raquídeo mediante aportaciones adicionales de agua. Además, estas sales pueden ser lavadas por las lluvias.

Por otro lado, un cultivar en el mercado hortícola tiene una vida comercial media de 4-10 años. Esto se debe a la gran competitividad del sector obtentor que suministra a los agricultores cultivares con características superiores cada pocos años. En este sentido, puede que los resultados los ensayos realizados con los cultivares más antiguos no sean comparables con los realizados con cultivares de reciente incorporación en el mercado, especialmente si los cultivares tienen como nicho de mercado las zonas afectadas por salinidad y sequía. Excepcionales a la regla es el caso de Naxos y Parthenon que

por calidad en sus respectivos *slots* (anglicismo que hace referencia al periodo productivo óptimo recomendado asociado a una determinada zona productora) les ha permitido mantenerse en mercado por 14 y 16 años respectivamente.

A la hora de valorar los resultados de productividad de los distintos cultivares de brócoli, hay que tener en cuenta que no todos los cultivares tienen el mismo *slot* de cultivo. La genética detrás de los cultivares de primavera es bastante diferente de la genética para producciones de otoño e invierno. Un ejemplo de esto es que es extremadamente poco habitual ver plantaciones de Parthenon y Naxos a la vez. De hecho, a nivel comercial estos cultivares se podrían agrupar en 3 comportamientos: Marathon, Parthenon y Gea alcanzan su máximo potencial productivo en condiciones de frío; Naxos, Heraklion y Mykonos en el *slot* de primavera, de cara a verano; y Triton tiene un *slot* muy particular ya que se emplea la situación intermedia, plantaciones del 1 al 20 de septiembre y de finales de enero. Estos comportamientos no se han visto reflejados en los ensayos realizados para todos los cultivares. De hecho, no se aprecian grandes diferencias significativas en el comportamiento entre cultivares. Esto se debe muy probablemente a las condiciones climáticas en las que se llevaron a cabo los ensayos y a la variabilidad propia de los cultivares.

Parthenon es un cultivar muy robusto, se adapta a diferentes zonas de cultivo y condiciones climáticas. El *slot* de Parthenon cubre desde plantaciones de julio hasta marzo, no estando recomendada para plantaciones de abril a junio (SAKATA, 2019). Es por ello que se esperaban mejores resultados para los ensayos de otoño e invierno que para el de primavera, pero en el ensayo realizado ocurrió lo contrario. Cabe destacar que el ensayo estaba enfocado a comparar los efectos de la salinidad sobre el cultivo, no las diferencias productivas entre cultivares. Efectivamente, para realizar una comparativa de los niveles productivos de las variedades, habrían sido necesarios un mayor número de ensayos y en distintas localizaciones. Al respecto, en una empresa obtentora, un cultivar de brócoli es evaluado en fase de desarrollo (tras la obtención) durante 3-5 años en todas las zonas productoras más representativas y en fechas de plantaciones distintas. Es habitual una media de 5 ensayos el primer año, 20 el segundo y hasta 200 el tercer año. En este tercer año se ponen tantos ensayos porque se realizan en una misma zona productora plantaciones hasta cada dos semanas para poder comprender en qué zonas y en qué *slots* se puede recomendar un cultivar. No obstante, cabe destacar que no sólo se evalúa la producción como parámetro comercial, sino que se evalúan también parámetros de calidad como el color, la forma y la compacidad de la pella, el tamaño de los floretes y el tamaño de los granos de estos, entre otros.

Marathon es un cultivar antiguo con un *slot* muy similar al de Parthenon, siendo Parthenon mucho más productivo. De hecho, Parthenon ha sustituido a Marathon en casi todas las zonas productoras. El cultivar sigue teniendo ventas debido a que es apreciado por no ser CMS (*Cytoplasmic male sterility*) una condición por la cual la planta no puede producir polen funcional y sus ventas

actuales se concentran en los cultivos de brócoli ecológico. De nuevo, esto no se logra apreciar en el ensayo realizado donde llega a superar a Parthenon en el cultivo de otoño.

Gea es un cultivar con un *slot* productivo muy pequeño, se suele plantar en Lorca desde finales de septiembre a principios de octubre (SAKATA, 2017). No obstante, esta limitación se debe principalmente a parámetros de calidad, no sólo de producción, por lo que los resultados del ensayo fueron representativos del comportamiento de la variedad. Desafortunadamente, lo que destaca de esta variedad es precisamente la calidad comercial. Si bien es un poco más tardía que Parthenon, las pellas de esta variedad son muy abovedadas, en las que casi no se marcan los floretes (la inflorescencia tiene una superficie homogénea) y las cuales además tienen un grano muy fino. Este cultivar es muy apreciado por el atractivo visual de las inflorescencias. Es precisamente esto lo que la hace competitiva a nivel comercial a pesar de las limitaciones propias de un *slot* tan pequeño.

Heraklion y Naxos tienen un *slot* y comportamiento en campo similar. No obstante, Heraklion es un cultivar descatalogado ya que, para el mismo *slot*, Naxos presenta mejor calidad. El color de Naxos es de un verde oscuro muy apreciado y con un grano muy pequeño. Esta similitud de comportamientos sí se vio apreciada en los ensayos, aunque sin grandes distinciones con el resto de cultivares.

Naxos es el cultivar de primavera por excelencia, casi el único para producciones de pleno verano (SAKATA, 2019). Esperábamos apreciar esto en el ensayo de primavera, pero no fue así. Cabe destacar que esta variedad alcanza su máximo potencial para plantaciones de cara a verano y el ensayo de primavera se realizó a principios de esta. De hecho, Mykonos que también tiene un *slot* similar pero menos recomendado para producciones de pleno verano, sí mostró mejor comportamiento. Que Mikonos tenga mejores producciones que Naxos en plantaciones de principios de primavera sí que es habitual. Es más, Mikonos no tiene tan buena coloración como Naxos pero en esas fechas es apreciado por su productividad, motivo por el cual es un cultivar competitivo.

Tritón es un cultivar con mejor tolerancia a calor que Parthenon, aunque peor que Naxos. No obstante, es tolerante también a frío y es un poco más precoz (SAKATA, 2014). El tener ambas tolerancias está relacionado con el hecho que no sea la más tolerante, pero al presentar ciclo más corto resulta ser muy competitiva en los cambios de estación. Esta variedad se comportó acorde a lo esperado para las fechas en las que se realizaron los ensayos.

En lo que respecta a la evaluación del grado de afección por el estrés salino, en la obtención vegetal no es habitual el realizar ensayos con aplicación directa de sales. Los ensayos se realizan en distintas zonas productoras que pueden estar o no afectadas por salinidad y según esta información se pueden extraer conclusiones sobre distintos niveles de tolerancia a este estrés. Los ensayos de campo con riego salino, especialmente con niveles de salinidad elevado, son costosos por el efecto que se produce sobre el suelo; pudiendo desde alterar la productividad del campo hasta contaminarlo. Un

estudio interesante que podría ser el tomar muestras de suelos y aguas de riego de las distintas zonas productoras durante un año, medir los niveles de salinidad y compararlos con los resultados de productividad de los distintos cultivares empleados o incluso con las cuotas de mercado de cada cultivar en esas zonas.

Por otra parte, el efecto del estrés salino sí se pudo observar en los cambios metabólicos de las plantas, más concretamente en una activación de la síntesis de glucosinolatos. Este efecto estimulador del riego salino sobre el contenido en glucosinolatos ha sido previamente observado y puede constituir un elemento reclamo a nivel comercial. Por un lado, por los efectos beneficiosos atribuidos al consumo de productos ricos en glucosinolatos (Capuano *et al.*, 2017). Un ejemplo de este reclamo comercial lo encontramos en el cultivar Beneforte que emplea como reclamo publicitario el ser un cultivar con elevado contenido en glucorrafanina (Quadram Institute, 2013). Por otro lado, porque se ha relacionado el riego salino con mejoras en las propiedades organolépticas de las producciones (Di Gioia *et al.*, 2018). Esto puede estar relacionado con las variaciones en el perfil de glucosinolatos y/o el contenido en micro y macroelementos, y otros compuestos (Bell *et al.*, 2018).

Y por último, por aportar un valor adicional a los subproductos de cosecha que si se explotasen para la obtención de biomoléculas como los glucosinolatos (Domínguez-Perles *et al.*, 2010), supondrían una fuente de ingresos adicional para los agricultores.

Es por ello que conseguir cultivares enriquecidos en glucosinolatos puede suponer una ventaja competitiva para las empresas que los desarrollen. En este sentido, en la presente tesis doctoral fue posible desarrollar una metodología que permite incrementar el contenido en glucosinolatos en cultivares de brócoli tanto en pella como en el resto de los órganos de la planta. Esta innovación podría ser explotada para conseguir diferentes productos procedentes de los restos de cosecha. Desde ingredientes funcionales por el papel protector de los glucosinolatos frente a distintas formas de cáncer (Capuano *et al.*, 2017; Arumugam and Razis, 2018; Bayat Mokhtari *et al.*, 2018; Soundararajan and Kim, 2018), por su relación con propiedades antiinflamatorias y en el tratamientos de la osteoporosis (García-Ibañez *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2020), e incluso en la modulación de la microbiota intestinal para el control de la obesidad (García-Ibañez *et al.*, 2021). Por otro lado, los restos de cosechas elicidadas pueden tener aplicaciones interesantes en la desinfección de suelos y el control de enfermedades en la agricultura. Existe en el sector hortícola una necesidad por desarrollar nuevas estrategias sostenibles para el control de patógenos del suelo, especialmente en Europa por la prohibición de sustancias como el bromuro de metilo, metan sodio y el 1,3-dicloropropeno (Secretaria General de Medio Ambiente, 2004; MAPAMA, 2019). Los glucosinolatos y sus derivados, los isotiocianatos, han sido estudiados por sus propiedades fungicidas, nematocidas, herbicidas e insecticidas (Whitehead, Nichols and Senior, 1994; Avato *et al.*, 2013; Bangarwa and Norsworthy, 2015; Sotelo *et al.*, 2015; Agnihotri *et al.*, 2018). Además, la posible explotación de esta patente se alinea perfectamente con los objetivos de la estrategia

Europea, *Farm to Fork*, en la que se fomenta la obtención de productos fitosanitarios de origen biológico y con poco impacto medioambiental (European Commission, 2020).

Otra estrategia para abordar la adaptación a condiciones de salinidad y el fomento de los compuestos bioactivos en los cultivos es la mejora genética vegetal. Ya existe en las empresas obtentoras programas específicos con estos objetivos. No obstante, teniendo en cuenta que la obtención de una nueva variedad suele tardar entre 10 y 12 años (ANOVE, 2019), son las nuevas técnicas de mejora genética las podrían acelerar la puesta en manos de los agricultores de mejores cultivares adaptados a salinidad, sequía y con perfiles nutricionales mejorados. En el caso concreto de Europa, el marco regulatorio de las *new breeding techniques* impide la aplicación directa de tecnologías como la modificación genética o las nuevas tecnologías CRISPR-Cas9 en plantas ya que: por un lado, delega la potestad de prohibir la comercialización de un cultivar que haya sido obtenido por estas técnicas a cada estado miembro (European Commission, 2015) y por otro, por la ambigüedad en la definición de lo que es un Organismo Genéticamente Modificado (Wolt, Wang and Yang, 2016). En estas circunstancias, es poco probable que las empresas del sector dediquen fondos a la obtención de variedades específicas para las condiciones europeas mediante el empleo de estas tecnologías sin tener la certeza de que vayan a poder comercializarlas.

La problemática de la salinidad afectará de forma muy importante y directa al sector agrario. Tras los estudios realizados, fue posible identificar especies y variedades que según sus respuestas a la salinidad han servido para diseñar diferentes estrategias para enfrentarse este problema. En el caso concreto de Europa, tanto la aplicación de la patente como la domesticación de halofitas por técnicas mejora tradicionales parecen ser un buen recurso para hacer frente a la problemática a la que nos enfrentamos.

4 CONCLUSIONES

I.

Se identificaron dos comportamientos claramente diferenciados entre las especies en estudio. Por un lado, las halofitas obligadas (*Atriplex halimus* y *Salicornia fruticosa*) que ven incrementado su desarrollo vegetativo con la salinidad; y por otro, las glicofitas y halofitas facultativas (*Brassica rapa* L., *Brassica oleracea* L. y *Cakile maritima*) que se ven negativamente afectadas a medida que aumenta la salinidad en el medio de cultivo.

II.

Estrategias como el empleo del análisis canónico discriminante (DCA) nos permitieron elucidar qué rasgos fisiológicos son característicos entre los distintos grupos en estudio, en este caso halofitas y glicofitas. A nivel fisiológico, en las plantas halofitas se pudo identificar que parámetros como la succulencia de las hojas, la capacidad para la compartimentación de sodio y el mantenimiento de la conductancia de la raíz a medida que aumenta la salinidad en el medio las diferencian de las plantas glicofitas.

III.

Las plantas halofitas constituyen una oportunidad para las empresas dispuestas a explotarlo por sus contenidos en ácidos grasos insaturados, compuestos fenólicos y la capacidad para mantener o incrementar el contenido en proteínas en condiciones de salinidad. Sobre todo, teniendo en cuenta las condiciones ambientales que traerá consigo el cambio climático.

IV.

Para la Región de Murcia, las *Atriplex* spp. pueden suponer una buena fuente de ingredientes funcionales por ser la halofita con mayor resistencia a la salinidad y por las buenas propiedades nutricionales. Otra opción productiva pueden ser *Salicornia* spp. que pueden emplearse como producto hortícola para su venta en fresco. En salinidades moderadas *Cakile maritima* puede ser explotable por su contenido en Zn y antioxidantes, especialmente flavonoides, aunque basándonos en los resultados y la revisión bibliográfica, puede que resulte más atractiva para la producción de aceites. En este sentido, la domesticación y los estudios de productividad son claves para asegurar el futuro de la explotación de las especies halofitas.

V.

Existen diferentes niveles de sensibilidad a la salinidad moderada entre los cultivares de brócoli, siendo Tritón y Marathon las que mostraron mejor comportamiento.

VI.

Tanto la temperatura como la salinidad son estreses relacionados con el incremento y los cambios en el perfil de glucosinolatos en cultivares de brócoli. En algunos cultivares consiguen inducir la síntesis de complejos de glucosinolatos con fenólicos, lo cual no había sido descrito previamente en Brassicales. También se logra inducir la aparición de estos complejos mediante procesos de elicitación.

VII.

Es posible diseñar estrategias para incrementar el contenido nutricional de los cultivos comerciales de brócoli. En los cultivares estudiados, hay una relación entre el contenido en glucosinolatos de las cosechas, el genotipo empleado y el nivel de estrés en la planta, existiendo una interacción entre el genotipo y el estrés. Con la aplicación de estas estrategias sobre *Brassica* spp. es posible obtener productos de interés comercial, tanto para alimentación como para la obtención de ingredientes funcionales.

5 REFERENCIAS

Abbaoui, B. *et al.* (2018) 'Cruciferous Vegetables, Isothiocyanates, and Bladder Cancer Prevention', *Molecular Nutrition and Food Research*. HOBOKEN: WILEY, pp. e1800079-n/a. doi: 10.1002/mnfr.201800079.

ABROL, Y. P. (2004) 'Wild, A. Soils, land and food: managing the land during the twenty-first century.', *Annals of Botany*. Oxford University Press (OUP), 93(6), pp. 785–786. doi: 10.1093/aob/mch104.

Agnihotri, A. R. *et al.* (2018) 'Mechanistic insight in potential dual role of sinigrin against *Helicoverpa armigera*', *Phytochemistry*. England: Elsevier Ltd, 145, pp. 121–127. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.10.014.

Andueza, D. *et al.* (2005) 'Intraspecific variation in *Atriplex halimus*: Chemical composition of edible biomass', *ressources.ciheam.org*, (67), pp. 377–381. Available at: <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/a67/06600067.pdf> (Accessed: 17 November 2020).

Angelino, D. and Jeffery, E. (2014) 'Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin', *Journal of Functional Foods*. AMSTERDAM: ELSEVIER, 7(1), pp. 67–76. doi: 10.1016/j.jff.2013.09.029.

ANOVE (2019) *Datos de interés | Anove: Asociación Nacional de Obtentores Vegetales*. Available at: <https://www.anove.es/datos-del-sector/datos-de-interes/> (Accessed: 29 May 2021).

Arumugam, A. and Razis, A. F. A. (2018) 'Apoptosis as a mechanism of the cancer chemopreventive activity of glucosinolates: A review', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, pp. 1439–1448. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.6.1439.

Avato, P. *et al.* (2013) 'Nematicidal potential of Brassicaceae', *Phytochemistry Reviews*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 791–802. doi: 10.1007/s11101-013-9303-7.

Azam, A. *et al.* (2013) 'Yield, chemical composition and nutritional quality responses of carrot, radish and turnip to elevated atmospheric carbon dioxide', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley & Sons, Ltd, 93(13), pp. 3237–3244. doi: 10.1002/jsfa.6165.

Azcón-Bieto, J. and Talón, M. (2003) *Fundamentos de fisiología vegetal*, McGrawHill. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. (2006) 'Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses', *Food Chemistry*, 99(1), pp. 191–203. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.

Bangarwa, S. K. and Norsworthy, J. K. (2015) 'Herbicidal activity of three isothiocyanates against yellow nutsedge and their dissipation under two plastic mulches', *Crop Protection*. OXFORD: Elsevier Ltd, 74, pp. 145–149. doi: 10.1016/j.cropro.2015.04.012.

Barkla, B. J. *et al.* (2000) 'Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas', *Biotecnología*, 14, pp. 263–272.

Barreira, L. *et al.* (2017) 'Halophytes: Gourmet food with nutritional health benefits?', *Journal of Food Composition and Analysis*. Academic Press Inc., 59, pp. 35–42. doi: 10.1016/j.jfca.2017.02.003.

Barrett-Lennard, E., Bathgate, A. and Clive, M. (2003) *Saltland pastures, Agriculture*. Land, Water and Wool Sustainable Grazing on Saline Lands Sub-Program. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/305575511>.

- Bayat Mokhtari, R. *et al.* (2018) 'The role of Sulforaphane in cancer chemoprevention and health benefits: a mini-review', *Journal of Cell Communication and Signaling*. Dordrecht: Springer Netherlands, 12(1), pp. 91–101. doi: 10.1007/s12079-017-0401-y.
- Belkheiri, O. and Mulas, M. (2013) 'The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species', *Environmental and Experimental Botany*. Elsevier B.V., 86, pp. 17–28. doi: 10.1016/j.envexpbot.2011.07.001.
- Bell, L. *et al.* (2018) 'Taste and Flavor Perceptions of Glucosinolates, Isothiocyanates, and Related Compounds', *Molecular Nutrition and Food Research*. HOBOKEN: WILEY, pp. e1700990-n/a. doi: 10.1002/mnfr.201700990.
- Benzarti, M. *et al.* (2013) 'Environmental and economical opportunities for the valorisation of the genus *Atriplex*: New insights', in *Crop Improvement: New Approaches and Modern Techniques*. Springer US, pp. 441–457. doi: 10.1007/978-1-4614-7028-1_16.
- Bharucha, Z. and Pretty, J. (2010) 'The roles and values of wild foods in agricultural systems', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society, pp. 2913–2926. doi: 10.1098/rstb.2010.0123.
- BOER, B. (2008) *Halophyte Research and Development: What Needs To Be Done Next?, Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*.
- Bose, J. *et al.* (2015) '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), pp. 481–494. doi: 10.1093/aob/mcu219.
- Bulgari, R., Franzoni, G. and Ferrante, A. (2019) 'Biostimulants application in horticultural crops under abiotic stress conditions', *Agronomy*. MDPI AG, p. 306. doi: 10.3390/agronomy9060306.
- Calero Hurtado, A. *et al.* (2020) 'Silicon application induces changes C:N:P stoichiometry and enhances stoichiometric homeostasis of sorghum and sunflower plants under salt stress', *Saudi Journal of Biological Sciences*. Elsevier B.V., 27(12), pp. 3711–3719. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.08.017.
- Capuano, E. *et al.* (2017) 'Food as Pharma? The Case of Glucosinolates', *Current Pharmaceutical Design*. Bentham Science Publishers Ltd., 23(19), pp. 2697–2721. doi: 10.2174/1381612823666170120160832.
- Carletti, P. *et al.* (2021) 'Editorial: Towards a Functional Characterization of Plant Biostimulants', *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A., p. 677772. doi: 10.3389/fpls.2021.677772.
- Cartea, M. E. *et al.* (2011) 'Phenolic compounds in Brassica vegetables', *Molecules*, pp. 251–280. doi: 10.3390/molecules16010251.
- Chen, J. and Mueller, V. (2018) 'Coastal climate change, soil salinity and human migration in Bangladesh', *Nature Climate Change*, pp. 981–987. doi: 10.1038/s41558-018-0313-8.
- Comisión Europea (2018) *El Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea. HORIZON 2020 en breve*. doi: 10.2777/80075.
- Corwin, D. L. (2021) 'Climate change impacts on soil salinity in agricultural areas', *European Journal of Soil Science*, 72(2), pp. 842–862. doi: 10.1111/ejss.13010.
- Council, N. R. (1990) *Saline Agriculture: Salt-Tolerant Plants for Developing Countries*. Washington, DC: The National Academies Press. doi: 10.17226/1489.
- Davy, A. J., Scott, R. and Cordazzo, C. V. (2006) 'Biological flora of the British Isles: *Cakile maritima* Scop.', *Journal of Ecology*. Oxford, UK: British Ecological Society, pp. 695–711. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01131.x.

- Domínguez-Perles, R. *et al.* (2010) ‘Broccoli-Derived By-Products-A Promising Source of Bioactive Ingredients’, *Journal of Food Science*. Wiley/Blackwell (10.1111), 75(4), pp. C383–C392. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01606.x.
- European Commission (2008) *Novel Food*. Available at: https://ec.europa.eu/food/food/novel-food_en (Accessed: 20 June 2021).
- European Commission (2015) ‘Directiva (UE) 2015/412 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2015, por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados’, *Actualidad Jurídica Ambiental*. Bruselas, (45), pp. 14–15. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52015PC0177&from=EN> (Accessed: 13 June 2021).
- European Commission (2020) ‘Farm to Fork Strategy’, *DG SANTE/Unit ‘Food information and composition, food waste’*, (DG SANTE/Unit ‘Food Inf. Compos. food waste’), p. 23. Available at: https://ec.europa.eu/food/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en (Accessed: 13 June 2021).
- FAO (2009) ‘Responding to the challenges of a changing world: The role of new plant varieties and high quality seed in agriculture’, *PROCEEDINGS OF THE SECOND WORLD SEED CONFERENCE*. Available at: www.worldseedconference.org (Accessed: 29 May 2021).
- FAO (2017) *Water for Sustainable Food and Agriculture: A report produced for the G20 Presidency of Germany, Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Rome. Available at: www.fao.org/publications (Accessed: 25 May 2021).
- Flowers, T., Hajibagheri, M. and Clipson, N. (1986) ‘Halophytes’, *The Quarterly Review of Biology*, 61, pp. 313–337.
- Flowers, T. J. (2004) ‘Improving crop salt tolerance’, in *Journal of Experimental Botany*. OXFORD: Oxford University Press, pp. 307–319. doi: 10.1093/jxb/erh003.
- Flowers, T. J. and Colmer, T. D. (2008) ‘Salinity tolerance in halophytes’, *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 945–963. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x.
- Flowers, T. J., Galal, H. K. and Bromham, L. (2010) ‘Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants’, *Functional Plant Biology*, 37(7), pp. 604–612. doi: 10.1071/FP09269.
- Flowers, T. J. and Muscolo, A. (2015) ‘Introduction to the Special Issue: Halophytes in a changing world’, *AoB PLANTS*, 7(0), pp. plv020–plv020. doi: 10.1093/aobpla/plv020.
- Fung, F., Lopez, A. and New, M. (2010) *Modelling the Impact of Climate Change on Water Resources*. 1st ed., *Modelling the Impact of Climate Change on Water Resources*. 1st ed. Edited by M. New, C. F. Fung, and A. Lopez. Hoboken: John Wiley & Sons, Incorporated. doi: 10.1002/9781444324921.
- García-Ibañez, P. *et al.* (2021) ‘The Influence of Red Cabbage Extract Nanoencapsulated with Brassica Plasma Membrane Vesicles on the Gut Microbiome of Obese Volunteers’, *Foods*. MDPI AG, 10(5), p. 1038. doi: 10.3390/foods10051038.
- García-Ibañez, P. *et al.* (2020) ‘Brassica bioactives could ameliorate the chronic inflammatory condition of endometriosis’, *International Journal of Molecular Sciences*. BASEL: MDPI, pp. 1–20. doi: 10.3390/ijms21249397.
- George, E., Horst, W. J. and Neumann, E. (2011) ‘Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions’, in *Marschner’s Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. Elsevier Inc., pp. 409–472. doi: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00017-0.
- Di Gioia, F. *et al.* (2018) ‘Effects of application timing of saline irrigation water on broccoli production and quality’, *Agricultural Water Management*. Elsevier B.V., 203, pp. 97–104. doi: 10.1016/j.agwat.2018.01.004.

- Del Giudice, T. and Pascucci, S. (2010) ‘The Role of Consumer Acceptance in the Food Innovation Process: Young Consumer Perception of Functional Foods in Italy’, *International Journal on Food System Dynamics*, 1(2), pp. 111–122. doi: 10.18461/ijfsd.v1i2.123.
- Guil-Guerrero, J. L., Giménez-Martínez, J. J. and Torija-Isasa, M. E. (1999) ‘Nutritional composition of wild edible crucifer species’, *Journal of Food Biochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, 23(3), pp. 283–294. doi: 10.1111/j.1745-4514.1999.tb00020.x.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Öztürk, M. (2019) *Ecophysiology, abiotic stress responses and utilization of halophytes, Ecophysiology, Abiotic Stress Responses and Utilization of Halophytes*. doi: 10.1007/978-981-13-3762-8.
- Hegde, M. V., Zanwar, A. A. and Adekar, S. P. (2016) *Omega-3 fatty acids: Keys to nutritional health*. 1st ed. 20, *Omega-3 Fatty Acids: Keys to Nutritional Health*. 1st ed. 20. Edited by M. V. Hegde, A. A. Zanwar, and S. P. Adekar. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-40458-5.
- Herbert, E. R. *et al.* (2015) ‘A global perspective on wetland salinization: Ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands’, *Ecosphere*. Ecological Society of America. doi: 10.1890/ES14-00534.1.
- Hoi, K. D. and Hyun, K. T. (2013) ‘Salicornia SPP.-derived salt and its production process’.
- Hoogeveen, J. *et al.* (2015) ‘GlobWat - A global water balance model to assess water use in irrigated agriculture’, *Hydrology and Earth System Sciences*. Copernicus GmbH, 19(9), pp. 3829–3844. doi: 10.5194/hess-19-3829-2015.
- HortoInfo (2014) *Murcia, primera provincia exportadora de brócoli - Hortoinfo*. Available at: <http://www.hortoinfo.es/index.php/3600-brocoli-murcia-250915> (Accessed: 5 June 2021).
- Le Houérou, H. N. (1992) ‘The role of saltbushes (*Atriplex* spp.) in arid land rehabilitation in the Mediterranean Basin: a review’, *Agroforestry Systems*, 18(2), pp. 107–148. doi: 10.1007/BF00115408.
- Huang, J. *et al.* (2010) ‘Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress’, *Plant Physiology*. Plant Physiol, 153(4), pp. 1526–1538. doi: 10.1104/pp.110.157370.
- INNOVAGRI (2017) *Brócoli, la hortaliza estrella en Murcia*. Available at: <https://www.innovagri.es/comunidad/brocoli-la-hortaliza-estrella-en-murcia.html> (Accessed: 5 June 2021).
- Iwanaga, M. (2009) ‘Norman Ernest Borlaug (1914–2009) Nobel Prize Laureate and Honorary Member of the Japanese Society of Breeding’, *Breeding Science*. Japanese Society of Breeding, 59(4), pp. 327–329. doi: 10.1270/jsbbs.59.327.
- Jacobsen, T. and Adams, R. M. (1958) ‘Salt and Silt in Ancient Mesopotamian Agriculture’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 128(3334), pp. 1251–1258. Available at: <http://www.jstor.org/stable/1754565>.
- du Jardin, P. (2015) ‘Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation’, *Scientia Horticulturae*. Elsevier, pp. 3–14. doi: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.
- Kadereit, G. *et al.* (2007) ‘A taxonomic nightmare comes true: Phylogeny and biogeography of glassworts (*Salicornia* L., *Chenopodiaceae*)’, *Taxon*. International Association for Plant Taxonomy, 56(4), pp. 1143–1170. doi: 10.2307/25065909.
- Kadereit, G. *et al.* (2012) ‘Cryptic taxa should have names: Reflections in the glasswort genus *Salicornia* (*Amaranthaceae*)’, *Taxon*. International Association for Plant Taxonomy, pp. 1227–1239. doi: 10.1002/tax.616005.

- Kang, I. S. *et al.* (2020) ‘Effect of co-administration of panax ginseng and brassica oleracea on postmenopausal osteoporosis in ovariectomized mice’, *Nutrients*. Switzerland: MDPI AG, 12(8), pp. 1–11. doi: 10.3390/nu12082415.
- Kaushal, S. S. *et al.* (2018) ‘Freshwater salinization syndrome on a continental scale’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 115(4), pp. E574–E583. doi: 10.1073/pnas.1711234115.
- Keck, A. S., Qiao, Q. and Jeffery, E. H. (2003) ‘Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. WASHINGTON: American Chemical Society, 51(11), pp. 3320–3327. doi: 10.1021/jf026189a.
- Khan, M. A. and Weber, D. J. (2006) *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*, *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*. Edited by M. A. Khan and D. J. Weber. Dordrecht: Springer (Tasks for vegetation science 40). doi: 10.1007/1-4020-4018-0.
- Khan, W.-D. *et al.* (2020) *Salt and Drought Stress Tolerance in Plants: Signaling and Communication in Plants*. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-40277-8>.
- Lieth, H. and Mochtchenko, M. (2003) ‘Cash Crop Halophytes: Recent studies’, *Springer Science*, (September 2015), p. 253. doi: 10.1007/978-94-017-0211-9.
- Łuczaj, Ł. *et al.* (2012) ‘Wild food plant use in 21st century Europe: The disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles’, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. Polish Botanical Society, pp. 359–370. doi: 10.5586/asbp.2012.031.
- Lund, E. (2003) ‘Non-nutritive bioactive constituents of plants: Dietary sources and health benefits of glucosinolates’, in *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. Hogrefe and Huber Publishers, pp. 135–143. doi: 10.1024/0300-9831.73.2.135.
- MAPAMA (2019) [*Registro de Productos Fitosanitarios*] - Agricultura - magrama.gob.es, Abril. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp> (Accessed: 13 June 2021).
- Maroto Borrego, J. V., Pomares García, F. and Baixauli Soria, C. (2007) *El cultivo de la coliflor y el brócoli*. Edited by J. V. Maroto i Borrego, F. Pomares García, and C. Baixauli Soria. Valencia]; Madrid: Fundación Ruralcaja Valencia (Cuadernos de agricultura 8).
- McKell, C. M. (1975) ‘Shrubs - A neglected resource of arid lands’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, 187(4179), pp. 803–809. doi: 10.1126/science.187.4179.803.
- De Meester, F., Watson, R. R. and Zibadi, S. (2013) *Omega-6/3 fatty acids: Functions, sustainability strategies and perspectives*, *Omega-6/3 Fatty Acids: Functions, Sustainability Strategies and Perspectives*. Humana Press Inc. doi: 10.1007/978-1-62703-215-5.
- Megdiche, W. *et al.* (2007) ‘Salt tolerance of the annual halophyte *Cakile maritima* as affected by the provenance and the developmental stage’, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(4), pp. 375–384. doi: 10.1007/s11738-007-0047-0.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2019) *Perfil Ambiental de España 2019. Informe basado en indicadores*. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <https://cpage.mpr.gob.es>. Available at: https://www.miteco.gob.es/ca/calidad-y-evaluacion-ambiental/publicaciones/maqueta_pae_2019_11122020_tcm34-517758.pdf.
- Molina, J. L., García-Aróstegui, J. L. and Benavente, J. (2009) ‘Explotación intensiva de los acuíferos carbonatados del altiplano de Murcia’, *GEOGACETA*, 46, pp. 163–166. Available at: www.geogaceta.com (Accessed: 5 June 2021).
- Mukherjee, S., Gangopadhyay, H. and Das, D. K. (2008) ‘Broccoli: A unique vegetable that

protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. WASHINGTON: American Chemical Society, 56(2), pp. 609–617. doi: 10.1021/jf0728146.

Mukhopadhyay, R. *et al.* (2021) 'Soil salinity under climate change: Challenges for sustainable agriculture and food security', *Journal of Environmental Management*. Academic Press, p. 111736. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.111736.

Munns, R. (2011) *Plant Adaptations to Salt and Water Stress. Differences and Commonalities, Advances in Botanical Research*. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-387692-8.00001-1.

Munns, R. *et al.* (2016) 'Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops', *Functional Plant Biology*. CSIRO, pp. 1103–1113. doi: 10.1071/FP16187.

Munns, R. and Tester, M. (2008) 'Mechanisms of salinity tolerance', *Annual Review of Plant Biology*, pp. 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.

Nichols, P. D. and Miller, M. (2018) *Recent Advances in Omega-3: Health Benefits, Sources, Products and Bioavailability, Recent Advances in Omega-3: Health Benefits, Sources, Products and Bioavailability*. MDPI. doi: 10.3390/books978-3-906980-76-8.

Obeidat, B. S. *et al.* (2016) 'Effects of feeding *Atriplex halimus* L. on growth performance and carcass characteristics of fattening Awassi lambs', *Small Ruminant Research*. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.03.007.

Obregón-Cano, S. *et al.* (2016) 'Análisis del contenido en minerales en nabizas y grelos (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) mediante reflectancia en el infrarrojo cercano', *CYTA - Journal of Food*. Taylor & Francis, 14(2), pp. 359–367. doi: 10.1080/19476337.2015.1114528.

Orlowsky, B. and Seneviratne, S. I. (2012) 'Global changes in extreme events: Regional and seasonal dimension', *Climatic Change*. Springer, 110(3–4), pp. 669–696. doi: 10.1007/s10584-011-0122-9.

Panta, S. *et al.* (2014) 'Halophyte agriculture: Success stories', *Environmental and Experimental Botany*, 107, pp. 71–83. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.05.006.

Pedraza, A. C., Díaz, A. R. and Soto, I. E. (2015) 'Cambios paisajísticos y efectos medioambientales debidos a la agricultura intensiva en la Comarca de Campo de Cartagena-Mar Menor (Murcia)', *Estudios Geográficos*. CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas, pp. 473–498. doi: 10.3989/estgeogr.201517.

Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A. and García-Viguera, C. (2008) 'Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts', *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 88(5), pp. 904–910. doi: 10.1002/jsfa.3169.

Petropoulos, S. A. *et al.* (2018) 'Edible halophytes of the Mediterranean basin: Potential candidates for novel food products', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 74(December 2017), pp. 69–84. doi: 10.1016/j.tifs.2018.02.006.

Przybysz, A., Gawrońska, H. and Gajc-Wolska, J. (2014) 'Biological mode of action of a nitrophenolates-based biostimulant: Case study', *Frontiers in Plant Science*. LAUSANNE: FRONTIERS MEDIA SA, 5(DEC), pp. 713–713. doi: 10.3389/fpls.2014.00713.

Qadir, M. *et al.* (2014) 'Economics of salt-induced land degradation and restoration', *Natural Resources Forum*. Blackwell Publishing Ltd, 38(4), pp. 282–295. doi: 10.1111/1477-8947.12054.

Quadram Institute (2013) *Superbroccoli - Quadram Institute*. Available at: <https://quadram.ac.uk/superbroccoli/> (Accessed: 13 June 2021).

Rady, M., Elrys, A. S. and Desoky, E.-S. M. (2018) 'Exogenous application of moringa seed extract positively alters fruit yield and its contaminant contents of *Capsicum annum* plants grown on

a saline soil contaminated with heavy me Botanical Studies on Egyptian Henbane (*Hyoscyamus muticus* L.) I-Morphology’, *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8(6), pp. 591–601. doi: 10.15406/apar.2018.08.00390.

Randhir, R., Lin, Y. T. and Shetty, K. (2004) ‘Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors’, *Process Biochemistry*. Elsevier BV, 39(5), pp. 637–646. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00197-3.

Ranganathan, J. *et al.* (2018) ‘How to Sustainably Feed 10 Billion People by 2050’, in 21 Charts’, *World Resources Institute*, (1), pp. 1–14. Available at: <https://www.wri.org/insights/how-sustainably-feed-10-billion-people-2050-21-charts> (Accessed: 8 June 2021).

Raskin, I. and Ripoll, C. (2005) ‘Can an Apple a Day Keep the Doctor Away?’, *Current Pharmaceutical Design*, 10(27), pp. 3419–3429. doi: 10.2174/1381612043383070.

Rengasamy, P. (2006) ‘World salinization with emphasis on Australia’, in *Journal of Experimental Botany*, pp. 1017–1023. doi: 10.1093/jxb/erj108.

Romero Díaz, A. and Belmonte Serrato, F. (2011) ‘El Campo de Cartagena una visión global’, *Recorridos por el Campo de Cartagena. Control de la degradación y uso sostenible del suelo. Murcia, Instituto Mediterráneo del Agua*, pp. 17–48.

Rosa, E. A. S. *et al.* (1997) ‘Glucosinolates in Crop Plants’, in *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 99–215. doi: 10.1002/9780470650622.ch3.

Rouphael, Y. and Colla, G. (2020) ‘Editorial: Biostimulants in Agriculture’, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fpls.2020.00040.

SAKATA (2014) ‘Tritón (BC10544)’, *Data Sheet*. Available at: <https://www.sakataiberica.com/>.

SAKATA (2017) ‘Gea (BRO01600)’, *Data Sheet*. Available at: <https://www.sakataiberica.com/>.

SAKATA (2019) ‘Brócoli - Catálogo General’. Available at: <https://www.sakataiberica.com/>.

Scott, A. J. (1977) ‘Reinstatement and revision of Salicorniaceae J. Agardh (Caryophyllales)’, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 75(4), pp. 357–374. doi: 10.1111/j.1095-8339.1977.tb01493.x.

Secretaria General de Medio Ambiente (2004) *El protocolo de Montreal y el Bromuro de Metilo - El proceso de eliminación del uso del bromuro de metilo en España*. Available at: <https://www.camarazaragoza.com/medioambiente/docs/publicaciones/publicacion48.pdf> (Accessed: 13 June 2021).

Shabala, L. *et al.* (2012) ‘Oxidative stress protection and stomatal patterning as components of salinity tolerance mechanism in quinoa (*Chenopodium quinoa*)’, *Physiologia Plantarum*. Physiol Plant, 146(1), pp. 26–38. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01599.x.

Shainberg, I. and Shalhevet, J. (1984) *Soil salinity under irrigation: Processes and management*. Edited by I. Shainberg and J. Shalhevet. Berlin, etc: Springer (Ecological studies 51).

Shannon, M. C. and Grieve, C. M. (1998) ‘Tolerance of vegetable crops to salinity’, *Scientia Horticulturae*, 78(1–4), pp. 5–38. doi: 10.1016/S0304-4238(98)00189-7.

Singh, D. *et al.* (2014) ‘Salicornia as a crop plant in temperate regions: Selection of genetically characterized ecotypes and optimization of their cultivation conditions’, *AoB PLANTS*, 6. doi: 10.1093/aobpla/plu071.

Sotelo, T. *et al.* (2015) ‘In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products

against Brassica-pathogenic bacteria and fungi’, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), pp. 432–440. doi: 10.1128/AEM.03142-14.

Soundararajan, P. and Kim, J. S. (2018) ‘Anti-carcinogenic glucosinolates in cruciferous vegetables and their antagonistic effects on prevention of cancers’, *Molecules*. BASEL: MDPI, p. 2983. doi: 10.3390/molecules23112983.

Su, J. *et al.* (2013) ‘Comparison of Salt Tolerance in Brassicas and Some Related Species’, *American Journal of Plant Sciences*. Scientific Research Publishing, Inc, 04(10), pp. 1911–1917. doi: 10.4236/ajps.2013.410234.

Tuteja, N. (2007) ‘Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants’, in *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., pp. 419–438. doi: 10.1016/S0076-6879(07)28024-3.

United Nations (2020) ‘Climate Change - United Nations Sustainable Development’, *United Nations*. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/climate-change/> (Accessed: 27 May 2021).

Ventura, Y. *et al.* (2011) ‘Effect of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops’, *Scientia Horticulturae*, 128(3), pp. 189–196. doi: 10.1016/j.scienta.2011.02.001.

Ventura, Y. and Sagi, M. (2013) ‘Halophyte crop cultivation: The case for salicornia and sarcocornia’, *Environmental and Experimental Botany*. Elsevier B.V., 92(May 2017), pp. 144–153. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.07.010.

Vera Nicolás, P. (2004) ‘Murcia y el Agua: Historia de Una Pasión’, *Academia Alfonso X El Sabio*. Available online at http://servicios.laverdad.es/murcia_agua/, Murcia. Available at: <https://www.asambleamurcia.es/divulgacion/murcia-y-el-agua-historia-de-una-pasion> (Accessed: 5 June 2021).

Verkerk, R. *et al.* (2009) ‘Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health’, *Molecular Nutrition and Food Research*. Wiley-Blackwell, pp. 219–265. doi: 10.1002/mnfr.200800065.

Walker, D. J. *et al.* (2014) ‘*Atriplex halimus* L.: Its biology and uses’, *Journal of Arid Environments*. Elsevier Ltd, 100–101, pp. 111–121. doi: 10.1016/j.jaridenv.2013.09.004.

Whitehead, A. G., Nichols, A. J. F. and Senior, J. C. (1994) ‘The Control of Potato Pale Cyst-Nematode (*Globodera Pallida*) by Chemical and Cultural Methods in Different Soils’, *The Journal of Agricultural Science*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 123(2), pp. 207–218. doi: 10.1017/S0021859600068477.

Wolt, J. D., Wang, K. and Yang, B. (2016) ‘The Regulatory Status of Genome-edited Crops’, *Plant Biotechnology Journal*. 2015/08/08, 14(2), pp. 510–518. doi: 10.1111/pbi.12444.

Wright, J. (2009) *Edible Seashore: River Cottage Handbook*. London: Bloomsbury Publishing. Available at: <https://www.bloomsbury.com/uk/edible-seashore-9780747595311/> (Accessed: 20 November 2020).

Zaghdoud, C. *et al.* (2012) ‘Differential Responses of Two Broccoli (*Brassica oleracea* L. var *Italica*) Cultivars to Salinity and Nutritional Quality Improvement’, *TheScientificWorld*. LONDON: The Scientific World Journal, 2012, pp. 291435–12. doi: 10.1100/2012/291435.



PRESENTADA POR :

AGATHA AGUDELO SÁNCHEZ

INGENIERA AGRÓNOMA POR LA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Y MDES EN DISEÑO E INNOVACIÓN
PARA LA SOSTENIBILIDAD POR
CRANFIELD UNIVERSITY

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA POR LA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
MENCIÓN TESIS INDUSTRIAL

DIRECTORES :

DRA. MICAELA CARVAJAL ALCARAZ

DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA
GRUPO DE AQUAPORINAS
CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y
BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA
(CEBAS-CSIC)

DRA. MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ BALLESTA

DOCTORA EN BIOQUÍMICA
POR LA UNIVERSIDAD DE MURCIA
GRUPO DE HORTOFLORICULTURA MEDITERRÁNEA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

DR. JUAN JOSÉ RÍOS RUIZ

DOCTOR EN BIOLOGÍA
POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL
UNIVERSIDAD DE GRANADA

TUTOR:

DR. JOSE MIGUEL MULET SALORT

CATEDRÁTICO DE BIOTECNOLOGÍA DE
LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP)



SAKATA®



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

CEBAS-CSIC

CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA

