

RESUM

Les previsions de canvi climàtic mostren un agreujament de les condicions d'estrès salí, donant lloc a la inevitable pèrdua de biodiversitat i de producció agrícola, sent la regió Mediterrània una de les més amenaçades. El coneixement dels mecanismes de tolerància en les plantes halòfiles pot ajudar a comprendre la supervivència d'aquestes plantes en les dures condicions del seu entorn natural i a elaborar estratègies de recuperació, conservació i cultiu com a anticipació a la imparable desertització i augment de sòls afectats per la salinitat. Per a aquest projecte s'han escollit dues espècies de plantes halòfiles crasses *Plantago crassifolia* Forssk. i *Inula crithmoides* L. Per una banda s'ha analitzat la influència de la salinitat en el creixement d'aquestes espècies en condicions controlades de cultiu en càmera i per una altra l'acumulació de prolina i glicina betaïna tant en condicions controlades com naturals. L'evolució del creixement en ambdues plantes es correlacionà amb la seua ecologia. Els nivells de prolina en ambdues espècies, resultaren baixos en condicions de camp, no obstant en condicions controlades la síntesi de prolina s'incrementà amb els tractaments de NaCl de majors concentracions (450 mM i 600 mM). Els nivells de glicina betaïna per a *P. crassifolia* foren reduïts i mostraren de nou un increment quan es va sotmetre la planta a concentracions de NaCl elevades. En canvi, en *I. crithmoides* aquests nivells resultaren suficientment elevats en ambdós casos com per a actuar com a osmolit principal.

RESUMEN

Las previsiones de cambio climático muestran un agravamiento de las condiciones de estrés salino, dando lugar a la inevitable pérdida de biodiversidad y de producción agrícola, siendo la región Mediterránea una de las más amenazadas. El conocimiento de los mecanismos de tolerancia en las plantas halófilas puede ayudar a comprender la supervivencia de las mismas en las duras condiciones de su entorno natural y a elaborar estrategias de recuperación, conservación y cultivo como anticipación a la imparable desertización y aumento de suelos afectados por la salinidad. Para este proyecto se han escogido dos especies de plantas halófilas crasas *Plantago crassifolia* Forssk. e *Inula crithmoides* L. Por un lado se ha analizado la influencia de la salinidad en el crecimiento de estas especies en condiciones controladas de cultivo en cámara y por otra la acumulación de prolina y glicina betaína en condiciones tanto controladas como naturales. La evolución del crecimiento en ambas plantas se correlacionó con su ecología. Los niveles de prolina en ambas especies, resultaron bajos en condiciones de campo, sin embargo en condiciones controladas la síntesis de prolina se incrementó con los tratamientos de NaCl de mayores concentraciones (450 mM y 600 mM). Los niveles de glicina betaína para *P. crassifolia* fueron reducidos y mostraron de nuevo un incremento cuando se sometió a la planta a concentraciones de NaCl elevadas. En cambio, en *I. crithmoides* estos niveles resultaron suficientemente elevados en ambos casos como para actuar como osmolito principal.

ABSTRACT

Predictions of climate change are worsening the conditions of salt stress, resulting in an inevitable loss of biodiversity and agricultural production, being the Mediterranean one of the most threatened regions of world. Knowing the mechanisms of tolerance in halophytic plants may help to understand the survival of these plants in the harsh conditions of their natural environment and to propose strategies for recovery, conservation and cultivation as an anticipation of the unstoppable desertification and the increase of soils affected by salinity. Two halophytic succulent plant species, *Plantago crassifolia* Forssk. and *Inula crithmoides* L. were chosen for this project. The influence of salinity on the growth of these species under controlled cultivation chamber was analyzed. Moreover, the accumulation of proline and glycine betaine were analyzed in both controlled and natural conditions. The evolution of growth in both plants was correlated with their ecology. Proline levels in both species were low in field conditions, but under controlled conditions the synthesis of proline increased with higher concentrations of NaCl (450 mM and 600 mM). The levels of glycine betaine for *P. crassifolia* were low and showed an increase only when plants were subjected to higher NaCl concentrations. In contrast, levels of glycine betaine in *I. crithmoides* were sufficiently high in both cases to act as principal osmolyte.

INTRODUCCIÓ

Les plantes silvestres i cultivades estan sotmeses a constants alteracions que interfereixen amb el desenvolupament normal del seu cicle vital causant estrès. L'estrès que pateixen les plantes es classifica en biòtic i abiòtic. Els herbívors i patògens (fongs, bacteries, nematodes, virus i micoplasmes) són els causants de l'estrès biòtic. L'estrès abiòtic, en canvi, està constituït per les condicions ambientals externes als organismes vius.

La sequera i la salinitat son els tipus d'estrès abiòtic més importants per trobar-se àmpliament estesos, influir en la distribució de les plantes silvestres als ecosistemes i causar les pèrdues més importants en la producció agrícola mundial.

La salinitat és el resultat de l'acumulació excessiva d'ions al sòl (incloent sals solubles), en tal mesura que arriba inclòs a afectar negativament el desenvolupament de les plantes. És un problema creixent a zones cultivades. Flowers *et al.* (1995) estimaren que el 20% de les terres de regadiu del món són considerades salines i segons Syverstein *et al.* (1989) aquesta extensió augmenta aproximadament un 1% cada any com a conseqüència de l'escassa precipitació, l'evaporació de l'aigua del sòl, la meteorització de roques, i les alteracions antròpiques com la irrigació amb aigua salina, les pràctiques culturals pobres o l'ús abusiu i indiscriminat de fertilitzants.

A nivell general l'excés de salinitat redueix el creixement de les plantes i el seu rendiment. A més, en casos aguts produeix danys en fulles que poden acabar en la defoliació completa de les plantes i la consegüent dessecació i mort. Açò s'ha traduït al llarg del temps en l'agreujament de les condicions de cultiu, arribant a la pèrdua de nombroses zones cultivables i generant com a conseqüència grans pèrdues econòmiques. Els ecosistemes naturals també es troben afectats, cada vegada són més les zones transformades per la salinitat mitjançant la reducció de la supervivència de la flora preexistent.

Efectes de la salinitat en la planta

A nivell de planta, l'estrès salí redueix considerablement el potencial osmòtic de l'aigua, produint la deshidratació cel·lular i generant estrès osmòtic. Com a conseqüència d'açò es produeix el tancament estomàtic, reduint la capacitat fotosintètica de la planta i afectant al creixement de la planta que disminueix per la falta d'assimilació de C (Hasegawa *et al.*, 2000).

L'absorció i acumulació d'ions Na^+ i Cl^- pot produir toxicitat en la planta per l'efecte inhibidor que presenta en nombroses activitats enzimàtiques i processos cel·lulars; a més afecta a la integritat de la membrana plasmàtica i produeix interferències amb l'absorció d'alguns nutrients com K^+ i Ca^{2+} , afectant el seu equilibri natural (Geissler *et al.*, 2009; Tester i Davenport, 2003).

Un efecte secundari de l'estrès salí és la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), que resulten especialment destructives per als lípids, àcids nucleics i proteïnes de la planta (Geissler *et al.*, 2010; Kant *et al.*, 2006; Türkan i Demiral, 2009).

Plantes glicòfiles i halòfiles, diferències fonamentals

La major part de les plantes superiors, sobre tot les cultivades, no tenen la capacitat de sobreviure a concentracions elevades de sal, són glicòfiles. No obstant, existeixen plantes que creixen de manera natural en ecosistemes salins costaners i d'interior gràcies a les seues característiques adaptatives morfològiques i bioquímiques, que els permeten completar el seu cicle vital baix aquestes dures condicions ambientals, eliminant la competència amb les glicòfiles (Flowers *et al.*, 1986). Les espècies adaptades a la salinitat són classificades com halòfiles, algunes es desenvolupen més eficaçment en presència de concentracions elevades de sal. En general, les halòfiles són plantes que completen el seu cicle en presència de concentracions de sal d'almenys 200mM NaCl (Flowers i Colmer, 2008; Grigore *et al.*, 2011). Segons el grau de tolerància a la sal, les halòfiles poden classificar-se en obligades, facultatives i de subsistència o subhalòfiles (Braun-Blanquet, 1979). Les halòfiles obligades o extremes tenen la capacitat de tolerar concentracions salines superiors a les presents en l'aigua de la mar (Flowers *et al.*, 1986). Tot i que les halòfiles no necessiten sal per a desenvolupar-se, algunes extremes (dicotiledònies) creixen més òptimament en presència de concentracions moderades de sal (NaCl , CaCO_3 , MgSO_4 o Na_2SO_4). No obstant a concentracions majors el seu creixement s'inhibeix com en la resta de plantes.

Distribució de les plantes halòfiles i importància del seu hàbitats

Les plantes tolerants a la salinitat representen solament un 0,25% del total de les espècies angiospermes conegudes, és a dir, unes 350 espècies pertanyents a gèneres d'un nombre reduït de famílies, destacant les Chenopodiaceae (Flowers *et al.*, 2010). Aquestes plantes es troben àmpliament distribuïdes en ecosistemes salins, que comprenen gran varietat de medis humits i secs com ara, zones costaneres, maresmes, dunes, penya-segats, saladars interiors o marjals.

Els ecosistemes salins són d'elevat interès botànic i de gran importància ecològica. Malgrat l'escassa diversitat florística (Ungar, 1991), la fisonomia de les formacions vegetals és molt característica i contribueix a la diversificació del paisatge. Aquests ecosistemes allotgen comunitats de plantes summament adaptades a les seues dures condicions i sovint es troben exemplars endèmics íntimament lligats a les característiques edàfiques i hídriques d'aquest tipus d'hàbitat (Cirujano, 1989).

A la Península Ibèrica es troben molts exemples d'ecosistemes salins protegits com els saladars existents al Parc Natural de Doñana o al conegut Parc Natural de l'Albufera, on no sols s'aprecia la riquesa florística sinó també la presència de fauna molt específica (Cirujano, 1989).

Al llarg del temps les activitats antròpiques com la urbanització, la transformació del terreny per a usos agrícoles o la pol·lució industrial, han suposat una gran amenaça per als ecosistemes hipersalins, provocant la degradació irreversible d'aquests espais naturals. Per tant, el seu coneixement botànic i ecològic és necessari per a garantir la seua conservació i confeccionar estratègies de recuperació d'aquells que es troben degradats.

Resposta a estrès salí i tolerància

Quan es parla de plantes adaptades a estrès salí, és important recalcar la diferència entre el concepte de resposta i tolerància a dit estrès (Grigore *et al.*, 2011). Totes les plantes presenten mecanismes semblants de resposta, però sols en un nombre limitat d'espècies resulten eficients a l'hora de conferir tolerància i permetre la supervivència en medis salins. A més, la resposta fisiològica a la salinitat està basada en el canvi d'expressió de gens que codifiquen proteïnes implicades en nombrosos processos biològics i es creu que les diferències en els mecanismes de resposta i la resistència a la salinitat entre glicòfites i halòfites són el resultat de canvis en la regulació dels mateixos paquets bàsics de gens (Kant *et al.*, 2006; Xiong i Zhu, 2002; Zhu, 2000, 2001).

Mecanismes de tolerància de les halòfiles

La tolerància a l'estrès salí és molt complexa en tota la planta i a nivell cel·lular (Ashraf i Harris, 2004). Són nombroses les interaccions que tenen lloc entre els factors d'estrès i els diversos fenòmens moleculars, bioquímics i fisiològics que afecten al desenvolupament de la planta (Ashraf i Foolad, 2005).

Les halòfiles presenten una sèrie d'adaptacions morfològiques, fisiològiques i bioquímiques que fan possible l'osmorregulació i les doten de la capacitat de tolerar els efectes de l'estrès salí (Ortolà, 2003). Seguidament s'esmenten les més importants:

- Canvis en la via fotosintètica, estructura anatòmica Kranz.

- Selectivitat iònica a través de diversos mecanismes com el control de l'entrada de Na^+ a les arrels per mitjà de proteïnes específiques, la regulació del Cl^- en les arrels per part de membres de la família ClC i altres anions no selectius, la major afinitat per K^+ i l'intercanvi K^+-Na^+ en la membrana plasmàtica, on es regula el pas de Na^+ als brots prevenint el transport apoplàstic al xilema.

- Excreció iònica o eliminació de sals a través de l'emmagatzemament d'aquestes en la tija i fulla i posterior excreció sobre la superfície foliar per mitjà de cèl·lules secretores localitzades en glàndules o pèls vesiculars (*Limonium* sp., *Spartina* sp.). Els mecanismes de transport intercel·lular mobilitzen l'excés d'ions salins des de les cèl·lules de la superfície cap a l'exterior deixant un depòsit de cristalls visibles en evaporar-se l'aigua.

- Compartimentalització vacuolar de Na^+ i Cl^- evitant que s'acumulen al citoplasma, prevenint els efectes tòxics i reduint el potencial hídric de la cèl·lula per a mantindre l'absorció d'aigua del sòl.

- Presència d'estructures suculentes, normalment fulles, a causa de la compartimentalització vacuolar. (*Salicornia* sp., *Suaeda* sp., *Halimione* sp., *Inula crithmoides*, *Plantago crassifolia*, etc.).

- Control de l'absorció d'ions per les arrels i el transport en les fulles.

- Capacitat de retenció de Na^+ i Cl^- al llarg del sistema radicular i en les parts més baixes del brot amb l'objectiu de restringir la translocació cap a la resta de la planta.

- En el cas de les halòfiles obligades, presència d'arrels amb una capa protectora i una membrana interna amb elevat contingut en ceras.

- Inducció de sistemes antioxidants per a l'eliminació d'espècies reactives de l'oxigen, mitjançant compostos antioxidants químics (glutatió reduït, carotenoides, compostos fenòlics, etc) o enzimàtics com la superòxid dismutasa, la catalasa, l'ascorbat peroxidasa, la glutatió peroxidasa i la glutatió reductasa (Zhu, 2001; Munns, 2002; Wang *et al.* 2003, Vinocur i Altman, 2005; Umezawa *et al.*, 2006).

- Estimulació de fitohormones com l'àcid abscísic i l'àcid jasmònic.
- En casos extrems, eliminació de l'excés de sal a través de la caiguda de fulles i la pèrdua dels fruits.
- Síntesi i acumulació d'osmolits compatibles al citosol que disminueixen el potencial osmòtic intern compensant l'extern.

Funció dels osmolits

Els osmolits són substàncies que es sintetitzen com a resposta a diferents tipus d'estrès abiòtic que causen deshidratació cel·lular, com ara la sequera, les temperatures extremes i la salinitat. En grans quantitats exerceixen un paper fonamental en l'ajust osmòtic i a més, gràcies a la seua estructura específicament hidrofílica, actuen com a substàncies osmoprotectors, protegint els tilacoides, mantenint la integritat de la membrana plasmàtica (Ashraf, 2009), estabilitzant proteïnes en condicions de deshidratació i protegint les cèl·lules de l'estrès oxidatiu sense causar efectes negatius en el metabolisme de les plantes tot i trobant-se en grans concentracions al citoplasma (Cushman, 2001). Són substàncies que no sols s'acumulen en les plantes, sinó també en microorganismes d'altres regnes com a resposta a estrès hídric o salí. A les plantes es poden trobar com a osmolits alguns aminoàcids (prolina), substàncies derivades d'amonis quaternaris (glicina betaïna), sucres (sorbitol) i polialcohols.

El projecte present remarca la importància de les substàncies osmoprotectors com a mecanismes de tolerància a la salinitat, centrant l'estudi en la presència de prolina i glicina betaïna.

Prolina

La prolina és un aminoàcid que s'acumula al citosol de nombroses plantes superiors com a resposta a estrès abiòtic. La seua acumulació no sols està induïda per les condicions de salinitat i sequera, sinó també per l'elevada temperatura, deficiències nutricionals, presència de metalls pesats, pol·lució atmosfèrica, l'elevada radiació UV i algún estrès biòtic com la infecció patògena (Hare i Cress 1997; Saradhi *et al.*, 1995; Siripornadulsil *et al.*, 2002; Verbruggen i Hermans, 2008).

La biosíntesi de prolina té lloc al citosol i als cloroplastos i altres teixits verds, en canvi la seua degradació es produeix a la mitocondria (Elthon i Stewart, 1981). L'aparició de la prolina està relacionada amb l'augment en el contingut dels precursors de la seua biosíntesi, incloent l'àcid L-glutàmic, l'arginina i l'ornitina (Ashraf i Foolad, 2007). En la seua biosíntesi intervé l'ABA, regulant l'expressió del gen P5CS que juga un paper principal (Xiong *et al.*, 2001). El Ca i la fosfolipasa també actuen com a components senyalitzadors en la síntesi de prolina (Thiery *et al.*, 2004).

Contribueix substancialment a l'ajust osmòtic citoplasmàtic i estabilitza a més estructures subcel·lulars (membranes i proteïnes); buscant radicals lliures i esmorteint el potencial oxidoreductor de les cèl·lules baix condicions d'estrès. A més realitza la funció d'hidrotrop, alleujant l'acidosi citoplasmàtica i mantenint una proporció NADP/NADPH compatible amb el metabolisme (Hare i Cress, 1997; Ksouri *et al.*, 2010). La prolina també ajuda a la recuperació dels teixits quan alleuja o desapareix la situació d'estrès (Szabados i Savoure, 2010). La seua ràpida degradació pot proporcionar suficients agents reductors que reforcen la fosforilació oxidativa mitocondrial i la generació d'ATP per a la reparació dels danys induïts per l'estrès. A més es sap que la prolina induïx l'expressió dels gens de resposta a estrès salí que posseeixen elements de la resposta prolina en els seus promotors.

Glicina betaïna

La glicina betaïna és un compost amoni quaternari que apareix com a resposta a estrès hídric. Es troba ampliament distribuïda en els regnes metafites i metazoos (Adrian-Romero *et al.*, 1998). La síntesi de glicina betaïna es produeix als cloroplastos a través de diverses vies; però en plantes superiors predomina la síntesi a partir de la serina, via etanolamina, colina i betain-aldehid (Hanson i Scott, 1980; Rhodes i Hanson, 1993; Ashraf i Foolad, 2005). És per tant una substància abundant als cloroplastos on resulta vital en l'ajust i protecció de la membrana del tilacoide mantenint l'eficiència fotosintètica (Robinson i Jones, 1986; Genard *et al.*, 1991; Ashraf i Foolad, 2005).

La glicina betaïna contribueix millorar la tolerància a l'estrès salí a gràcies a la seua intervenció en l'homeostasi dels ions, a més sembla tindre un paper molt important en la transducció de senyals, per exemple el discerniment de les molècules Na^+/K^+ i ajuda a mantindre l'eficiència fotosintètica millorant la conductància estomàtica.

Prolina i glicina betaïna com a mecanismes de tolerància a estrès salí

L'acumulació de prolina i glicina betaïna en plantes superiors es relaciona amb la resposta a l'estrès hídric i salí, no obstant això, el seu paper definit en l'exercici de la tolerància a la salinitat continua sent un debat (Demiral i Türkan, 2006). S'ha mostrat que la seua concentració és en general més elevada en plantes tolerants que en plantes sensibles a l'estrès, però aquesta relació sembla no ser universal (Ashraf i Foolad, 2007), ja que no totes les plantes tolerants acumulen els mateixos osmolits baix condicions d'estrès.

Estudis realitzats sugereixen que l'acumulació dels diferents osmolis podria utilitzar-se com a criteri taxonòmic (Tipirdamaz *et al.*, 2006) ja que és possible agrupar algunes espècies de plantes en acumuladores de prolina, acumuladores de glicina betaïna i acumuladores d'ambdós osmolits. Futurs estudis com el present són necessaris per a esclarir la implicació i importància dels osmolits en la tolerància a la salinitat i la seua utilitat pràctica.

Aplicació exògena de prolina i glicina betaïna

Tot i que la prolina i glicina betaïna estan implicades en la tolerància a estrès, en moltes plantes cultivades l'acumulació d'aquests osmolits és troba molt per baix del nivell requerit per a millorar els efectes adversos de l'estrès osmòtic derivat de la salinitat (Subbarao *et al.*, 2001). Malgrat els èxits en la introducció de les vies de síntesi de glicina betaïna a través de l'enginyeria genètica en plantes no acumuladores (Sakamoto i Murata, 2002), les plantes transgèniques no arriben als nivells de glicina betaïna de les plantes acumuladores per natura (Sakamoto i Murata, 2000; Nawaz i Ashraf, 2007). Així doncs l'aplicació exògena d'aquests compostos podria ser una alternativa a l'enginyeria genètica per a millorar el rendiment dels cultius en condicions d'estrès (Itai i Paleg, 1982; Heuer, 2003; Demiral i Türkan, 2005).

Nombrosos estudis recolzen l'èxit de l'aplicació externa de glicina betaïna en la millora de la tolerància a l'estrès salí. Un estudi basat en l'ús extern de glicina betaïna sobre dos cultivars de dacsa sotmesos a estrès salí, mostrà una millora en la producció general i en el potencial de turgència de les plantes estressades (Nawaz i Ashraf, 2007). En el cas de l'arròs, un estudi dut a terme per Demiral i Türkan (2005) demostrarà que l'aplicació externa de glicina betaïna pot reduir l'impacte de l'estrès de la sal en el creixement i disminuir la senescència a més de millorar l'eficiència fotosintètica del PS-II i augmentar el contingut en proteïnes de les plàntules.

En alguns exemples d'aplicació externa de prolina sobre plantes sotmeses a estrès, aquesta actuava com a osmoprotector facilitant el creixement de les plantes en eixes condicions adverses. En arròs 30 mM de prolina contrarestaven els efectes adversos i danys produïts sobre la germinació i el creixement de plàntules però quantitats majors reduïen el creixement. En el cas de *Allenrolfea occidentalis*, l'aplicació de prolina millorà el creixement i aturà la major producció d'etilè conseqüència de l'estrès hídric o salí (Ashraf i Foolad, 2006). Altre estudi exitós és el realitzat per Kaya *et al.* (2007) en *Cucumis melo*, on l'aplicació externa de prolina i KNO₃ millorà significativament els efectes negatius de la salinitat sobre el creixement, el rendiment de la fruita i altres paràmetres fisiològics.

S'ha constatat que la glicina betaïna podria extraure's per exemple com un subproducte de plantes que la produeixen en grans quantitats, com ara la remolatxa sucrera (Rhodes i Hanson, 1993; Ashraf i Foolad, 2007), ja que en ser produïda naturalment, en general no es descompon a les plantes (Bray *et al.*, 2000). Per tant l'extracció i aplicació exògena de glicina betaïna podria ser econòmicament viable per a contrarestar els efectes adversos de l'estrès ambiental sobre la productivitat dels cultius (Ashraf i Foolad, 2007).

Els estudis de quantificació de prolina i glicina betaïna en plantes tolerants en condicions de laboratori podria ser interessant per a esclarir la capacitat de síntesi d'osmolits d'aquestes i esbrinar les condicions òptimes per a una major producció.

Antecedents

Sembla ser que tant les plantes glicòfiles com les halòfiles utilitzen els mateixos mecanismes de tolerància a estrès salí i que les diferències es troben en l'aspecte quantitatiu i no en el qualitatiu (Flowers *et al.*, 1986; Greenway i Munns, 1980; Zhu, 2001; Vicente *et al.*, 2004), fet que justifica l'ús de models glicòfils, com *Arabidopsis thaliana* (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2000) per a investigar aquests mecanismes. Però l'ús exclusiu d'aquest tipus de models ha presentat alguns inconvenients i limitacions, sobre tot en l'estudi de les substàncies osmoprotectors. És important canviar aquesta tendència i utilitzar plantes tolerants per a esclarir la importància i les implicacions dels osmoprotectors en la tolerància a estrès salí a través de la combinació d'estudis de camp i de laboratori.

Cal esclarir, no obstant, la dificultat existent en la correlació dels resultats obtinguts en estudis de camp amb aquells procedents d'assajos al laboratori, ja que en condicions de camp les plantes es troben sotmeses a factors ambientals impossibles de reproduir al laboratori i els resultats finals són la causa d'un conjunt de variables a banda de la salinitat. Per tant no es poden compara quantitativament però, malgrat les complicacions, els estudis combinats continuen sent de vital importància per a esbrinar el comportament de les plantes en el seu entorn natural i alhora, comprovar el seu potencial quan estan sotmeses a condicions controlades de laboratori.

Importància del projecte present

Els models actuals de canvi climàtic preveuen una sèrie de modificacions en alguns factors (augment de la temperatura mitjana, disminució, irregularitat i torrencialitat de les precipitacions, aparició, augment i intensificació dels grans períodes de sequera) que derivaran en l'agreujament de les condicions d'estrès que afecten a les plantes silvestres i cultivades (Epstein i Mills, 2005). La regió Mediterrània és una de les més amenaçades per aquestos canvis, que acceleraran els processos de desertificació als que ja es troba sotmesa (a causa dels incendis forestals, els llargs períodes de sequera i la pèrdua de sòl per salinització o per l'escolament en l'època de pluges torrencials), derivant en la inevitable pèrdua de biodiversitat i en l'agreujament de les condicions de cultiu.

El coneixement botànic, ecològic i bioquímic dels ecosistemes salins és de vital importància per a l'elaboració d'estratègies de recuperació, conservació i cultiu que garantisquen el manteniment de la biodiversitat i l'agricultura malgrat les fatals prediccions de canvi climàtic, imparable desertització i augment de sòls afectats per la salinitat. A més, el coneixement concret dels mecanismes de tolerància en les plantes halòfiles pot ajudar a comprendre la supervivència en les dures condicions del seu entorn natural i a elaborar estratègies per a anticipar-se a les adversitats que es preveuen.

El projecte present es centra en l'estudi de l'acumulació de prolina i glicina betaïna (osmolits més freqüents en plantes) en dues halòfiles crasses sotmeses a estrès salí en condicions controlades en càmera de cultiu i en condicions naturals. Paral·lelament i amb la finalitat de comprovar el nivell de tolerància d'ambdues espècies, s'ha estudiat la influència de la salinitat en el creixement d'aquestes plantes en condicions controlades.

MATERIALS I MÈTODES

1.MATERIAL VEGETAL

S'ha esmentat abans la importància de seleccionar per a aquest tipus d'estudis, material vegetal procedent de plantes adaptades a sòls salins. S'escolliren, per tant les espècies *Inula crithmoides* L. i *Plantago crassifolia* ForssK., dues espècies halòfiles amb una característica comuna, la presència de fulles suculentes, un mecanisme d'adaptació morfològica a estrès hídric i salí.

Inula crithmoides L.

Es coneix comunament com Salsona, Olivarda carnosa o Botja groga.

És un camèfit de la família Asteraceae, té port arbustiu i pot assolir els 100 cm d'alçada. El tret més característic són les seues fulles suculentes, simples i alternes, de contorn linear o linears-lanceolades de 2 a 4'5(6) x 0,2 a 0,4(0,9) cm de longitud, de marge sencer i sovint amb dues o tres dents a l'àpex.

Les bràctees estan disposades en diverses files, formant un involucre; les internes són linears i lleugerament més llargues que les externes.

El fruit és un aqueni angulós d'uns 2 o 3mm, no contret bruscament en l'àpex i amb un vilà format per uns 30 pèls lliures i simples en la base.

Presenta dos tipus de flors (Fig. 1), ambdues grogues, inserides en un receptacle aplanat o lleugerament convex sense escames i agrupades en inflorescències en capítols solitaris, corimbes o panícules.

Les flors externes, son ligulades i curtes, oscil·len entre els 14 o 25 mm de longitud, no obstant sobrepassen l'involucre; són flors femenines. En canvi les internes són tubulars i hermafrodites. La floració es produeix en dues èpoques: estiu (agost) i tardor (setembre-octubre).



Figura 1: Detall d'*I. crithmoides* en floració.

- **Hàbitat:** creix a zones litorals amb sòls salins, penya-segats i lloms salobres. S'estén des del nivell del mar fins als 450 m d'altitud.

- **Ecologia:** pertany al pis termomediterràni de la regió mediterrània i al colinat de l'eurosiberiana. No vegeta bé en condicions d'ombria, requereix calor per a la seua supervivència. Les gelades tardanes i les temperatures extremes resulten perjudicials per a aquesta planta. És típica de sòls entollats salins, rics en nitrogen.

- **Distribució:** és una planta plurirregional, es troba distribuïda especialment per tota la regió mediterrània i per l'atlàntic occidental (zones costaneres del nord i oest de la Península Ibèrica, França i sud de Gran Bretanya i Irlanda).

- **Fitosociologia:** es troba representada en les classes fitosociològiques que s'esmenten a continuació.

- **Classe *Salicornietea fruticosae* Br. - Bl. et Tüxen ex A. et O. Bolòs 1950 (*Sarcocornietea fruticosae* Br. - Bl. et Tüxen ex A. et O. Bolòs 1950):** caracteritzada per la presència de camèfits, geòfits i hemicriptòfits halòfils sobre sòls salobres i d'humitat variable. Són formacions d'halòfiles crasses perennes que constitueixen una vegetació camèfita vivaç fruticosa molt pobra en espècies i amb domini de les plantes llenyoses i suculentas, acompanyades d'alguna herbàcia vivaç. Les espècies característiques d'aquesta classe són *Aster tripolium*, *Festuca pruinosa*, *Frankenia laevis*, *Halimione portulacoides*, *Inula crithmoides*, *Juncus maritimus*, *Limonium humile*, *Limonium binervosum*, *Puccinellia maritima* i *Triglochin maritima*. En concret, *I. crithmoides* forma part de dues comunitats d'aquesta classe fitosociològica: *Arthrocnemo – Junceteum subulati* Brullo et Furnari 1976 i *Artemisio gallicae – Limonietum angustibracteati* Costa et Boira 1981.



Figura 2: *Inula crithmoides* en la Mallada Llarga.

- Classe *Juncetea maritimi* Br. - Bl. en Br. - Bl., Roussine et Nègre 1952: formen part d'aquesta classe les comunitats conegudes com praderes salades o jonqueres. Es troben a medis amb una incidència menor de la salinitat on no s'arriben a formar costres, com és el cas dels cinturons exteriors de les mallades. *I. crithmoides* es troba sols a una de les comunitats que componen aquesta classe: *Spartino – Juncetum maritimi* O. Bolòs 1962.

***Plantago crassifolia* Forssk.**

Comunament coneguda com a Plantatge marí o Pedrenca marina.

És un hemicriptòfit de la família Plantaginaceae. És una planta rizomatosa d'uns 6-30 cm. Presenta tiges subterrànies horitzontals (Fig. 3) que li permeten formar gespes denses. Les fulles, disposades en diverses rosetes bassals, són linears, d'uns 7-14 x 0,3 cm, semicilíndriques, glabres amb un sol nervi i en rares ocasions dentades al marge.



Figura 3: *P. crassifolia* en la Mallada Llarga.

Les bràctees mesuren aproximadament 3 mm, són ovades, agudes, amb el marge escariós i ciliat. La meitat dels sèpals es troben ocults per elles.

L'espiga (Fig. 4) mesura aproximadament 4-6 cm, és cilíndrica, densa i compacta, sovint amb les flors bassals un poc separades. El peduncle és molt més llarg que l'espiga, d'uns 5-20 cm, no presenta soles i és pubescent.



Figura 4: Detall de l'espiga de *P. crassifolia* al seu entorn natural.

Els sèpals són diferents entre sí, soldats únicament per la base; els anteriors són d'ovals a lanceolats, obtusos amb un nervi mitjà que assoleix l'àpex i amb marges escariosos asimètrics i amples; els posteriors són quillats amb una ala escariosa d'uns 0'5 mm en la part distal i decurrent cap a la base, ambdós mesuren uns 2'5-3 mm, amb el nervi mitjà estret i proveït d'alguns cilis en l'ala i la part superior del marge.

La corol·la presenta un tub llis finament pubescent d'uns 1-3'8 mm. Els lòbuls són ovats, aguts i glabres, d'1'5x1mm. Les anteres són grogues, amb filaments marrons. La floració de *P. crassifolia* té lloc al final de la primavera i a l'estiu. El fruit és una càpsula bilocular amb 2 llavors hemielipsoidals amb la cara interna plana. $2n = 20$.

- **Hàbitat:** Es troba a zones humides costaneres, als marges dels salobrans.

- **Ecologia:** té preferència per sòls salins arenosos o llimosos.

- **Distribució:** S'extén per tot el litoral de la regió mediterrània.

- **Fitosociologia:** la comunitat *Schoeno nigricantis-Plantaginietum crassifoliae* Br. - Bl. en Br. - Bl., Roussine et Nègre 1952 està caracteritzada per plantes moderadament halòfiles instal·lades sobre sòls arenosos, que formen un prat dens de cobertura molt alta on dominen les espècies *P. crassifolia* (molt constant) i *Schoenus nigricans*. A més, *P. crassifolia* és l'especie més representativa de l'aliança que engloba a aquesta comunitat, *Plantaginion crassifoliae* Br. - Bl. en Br. - Bl., Roussine et Nègre 1952 (classe *Juncetea maritimi* Br. - Bl. en Br. - Bl., Roussine et Nègre 1952), que es correspon amb pastures d'herbes de fulla suculent a sòls arenosos, humits i salins. Forma part també de la comunitat *Artemisio gallicae-Limonietum angustibracteati* Costa et Boira 1981 (classe *Salicornietea fruticosae* Br.-Bl. et Tüxen ex A. et O. Bolòs 1950), que està present a les zones més elevades dels saladars de la costa valenciana o a zones d'elevada salinitat derivada per l'escassa humitat.

2. ZONA DE MOSTREIG

Els mostrejos tingueren lloc a dues parcel·les ubicades en l'anomenada Mallada Llarga, dins de la zona de la Devesa del Parc Natural de l'Albufera. A la Figura 5 s'observa la ubicació de la parcel·la 1 (ED50 UTM 30 0731129 4359324), a la vora del saladar i de la parcel·la 2 (ED50 UTM 30 0731155 4359277) emplaçada en la part més deprimida i salina.

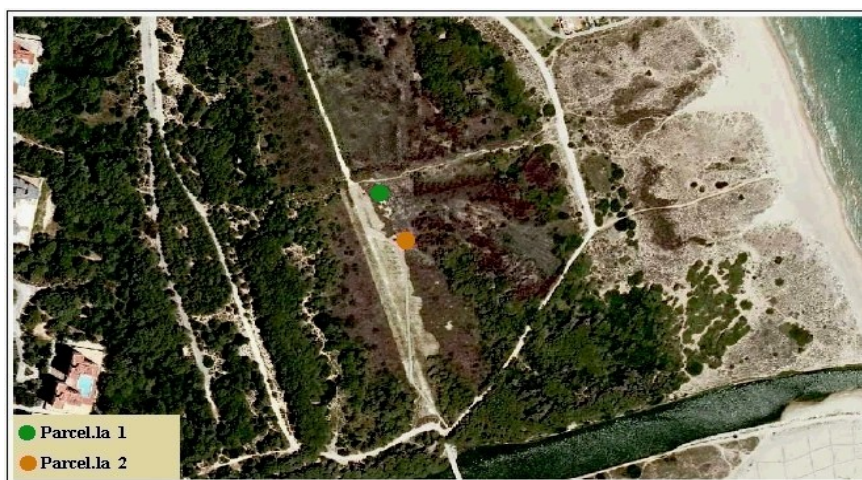


Figura 5: Zona de mostreig. Els punts indiquen la ubicació de les parcel·les 1 i 2. Font: <http://terrasit.gva.es/es/ver>

El Parc Natural de l'Albufera constitueix una àrea d'especial protecció en l'àmbit comunitari i internacional. Forma part de la Xarxa Natura 2000, fou declarat com a Zona d'Especial Protecció per a les aus (ZEPA) segons la Directiva Aus (79/409/CEE) i està proposat com a Lloc d'Interès Comunitari (LIC). Es troba inclòs també en la llista de zones humides d'importància del conveni Ramsar des de 1990 i a més poseeix hàbitats i espècies arreplegats en la Directiva Comunitària Hàbitats (92/43/CEE).

De les 21.000 ha d'extensió que presenta el Parc Natural de l'Albufera sols 500 ha constitueixen la Devesa, el sector millor conservat. Malgrat la seua reduïda dimensió s'hi conjuguen una sèrie de factors climàtics i edàfics que donen lloc a l'existència d'una diversitat d'ecosistemes d'elevat valor ecològic entre els que es diferencia el conjunt dunar exterior (més proper a la mar) i interior, el bosc estabilitzat, les depressions interdunars o mallades i la zona de ribera, caracteritzada per un tipus de vegetació higròfila.

La Devesa es caracteritza per la presència d'arenosols calcaris (de textura grossa, poc desenvolupats i amb material calcàric), solonachks gleycos (sòls amb exés d'aigua i salinitat elevada) i gleysols calcaris (amb excés d'aigua) a més dels grups intermedis o de transició (Sanchís *et al.*, 1986).

La Mallada Llarga està formada per una capa d'arena que s'extén fins els 15 m de profunditat seguida d'una capa contínua de llims i argiles que li confereixen impermeabilitat i per tant, capacitat de retenció d'aigua. Així doncs, la proximitat del nivell freàtic en aquesta zona i el caràcter impermeable del sòl, permeten el seu entollament (acumulació d'aigua) temporal en l'època de pluges. Amb les elevades temperatures de l'estiu, l'aigua acumulada s'evapora provocant l'augment de la concentració de sals, que es posa de manifest amb l'aparició de crostes blanquinoses de sal a la superfície el sòl (Fig. 6).



Figura 6: Crostes de sal trobades a la zona central de la Mallada Llarga en Juny de 2012.

En aquest tipus d'ecosistema la vegetació s'instal·la a mode d'anells concèntrics en funció del grau de salinitat edàfica, sent la zona central la de major concentració de sals i per tant absent de vegetació. A la zona que l'envolta s'ubica la vegetació de saladar constituïda per plantes generalment halòfiles i en la part més externa on la salinitat és menor apareixen comunitats de jonqueres.

El clima general de la comarca més propera a la zona de mostreig segons Thornthwaite (Fig. 7) és de tipus mediterrani semàrid. La temperatura mitjana anual es troba al voltant dels 17°C. L'oscil·lació tèrmica és molt reduïda a causa de la proximitat de la mar, sent la variació major entre 25°C (agost) i 11°C (gener).

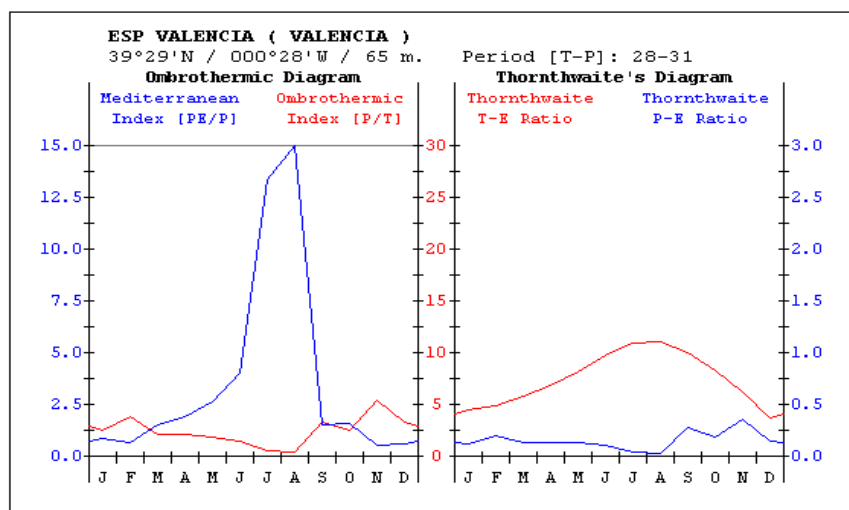


Figura 7: Diagrama Ombrothermic i de Tohrnthwaite de la zona de mostreig. Font: <http://www.globalbioclimatics.org/>.

Les precipitacions anuals són escasses (500 mm) i es concentren sobre tot durant la tardor a mode de plujes torrencials. La diferència entre les precipitacions totals i l'evapotranspiració assoleix un valor pròxim als 400 mm a l'any, provocant un dèficit hídric notable durant el període de maig a setembre (Rivas-Martínez, 2004).

3. OBTENCIÓ DE LES LLAVORS, GERMINACIÓ I TRASPLANT

Les llavors, procedents de plantes silvestres presents a la Mallada Llarga es recol·lectaren en estiu de 2010. De la parcel·la 1 s'obtingueren les llavors de *P. crassifolia* i de la parcel·la 2 les d' *I. crithmoides* (Fig. 5).

La sembrada va ser directa, sobre safates alveolades. Es sembraren aproximadament 100 llavors per espècie.

Un mes després de l'emergència de les plàntules, es trasplantaren un total de 50 plantes (10 per cada tractament) sobre cossiols individuals de 9 cm de diàmetre, utilitzant un substrat a base de torba i vermiculita en proporció 3:1.

4. CREIXEMENT EN CÀMERA I APLICACIÓ DE TRACTAMENTS

El cultiu tingué lloc a les instal·lacions de l'Escola Politècnica Superior de Gandia. Es realitzà en càmera de cultiu Infracca equipada amb tres llànties fluorescents Master TL - D 58W per a cada prestatge, assegurant una il·luminació PAR de $150 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ aproximadament. Les plantes estigueren sotmeses a un fotoperíode de 12 L a 25 °C i 12 D a 15°C.

Els tractaments s'aplicaren a través de l'aigua de reg. Es realitzà un tractament Control amb aigua destil·lada i 4 tractaments amb solucions salines de NaCl a diferents concentracions: 0 mM, 150 mM, 300 mM, 450 mM i 600 mM. La freqüència de reg va ser setmanal amb 150 ml de solució salina o aigua destil·lada (segons el tractament) per cossioll.

Dos mesos després de l'inici dels tractaments es recol·lectaren les plantes i es prengué mesura del pes fresc de cada planta i de la longitud a través de mètodes estàndard. En el cas de *P. crassifolia* en tindre una disposició de les fulles en roseta basal es mesurà la longitud de la fulla més llarga de cada individu. En *I. crithmoides*, en canvi, la longitud mesurada va ser la llargària total de cada planta. Una vegada mesurades, les plantes es ficaren en bossetes hermètiques degudament etiquetades indicant l'espècie, l'individu, la concentració de la dilució salina amb la que foren regades i el pes. Finalment, es conservaren en congelador a -70°C.

5. MOSTREIG DE MATERIAL VEGETAL AL CAMP

Els mostrejos tingueren lloc en les dues parcel·les de la Mallada Llarga descrites anteriorment. Igual que en el cas de les llavors, les mostres de material vegetal de *P. crassifolia* s'arreglaren a la parcel·la 1, i les d'*I. crithmoides* s'obtingueren de la parcel·la 2.

Es realitzaren un total de sis mostrejos en dates determinades al llarg de dos anys (primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010). Es mostrejaren 5 individus de cada espècie, arreglant aproximadament 20g de cadascun i procurant prendre les mostres sempre dels mateixos al llarg dels dos anys de durada del mostreig.

El material recol·lectat va ser dividit. Una part es va congelar i l'altra va ser assecada en una estufa a 65°C durant diversos dies fins arribar al un pes constant per a permetre el càlcul del percentatge de pes sec.

6. MOSTREIG I ANÀLISI DE SÒLS

Els mostrejos de sòl en camp s'esdevingueren en les parcel·les del saladar esmentades (2 i 3) i al mateix temps que els de material vegetal (6 mostrejos en diferents estacions durant 2 anys). Es prengueren mostres d'aproximadament 300 g de sòl a una profunditat de 0 - 20 cm.

Paral·lelament el substrat utilitzat en el cultiu en càmera va ser recollit de cadascun dels cossiols, ficat individualment en bosses de plàstic i transportat a la Universitat Politècnica de València.

Tots els anàlisis de sòls s'efectuaren al laboratori del departament d'Edafologia de l'E.T.S.I.A.M. Es mesurà la conductivitat elèctrica (CE) per mètodes estàndard fent ús d'un conductímetre Crinson Conductimeter Basic 30. Les mesures es prengueren per a un extracte de saturació 1:1 en el cas de les mostres de camp i 1:5 en els substrats emprats en el cultiu en càmera.

7. ANÀLISI CLIMÀTIC

Per al període dels mostrejos de camp, 2009 - 2010, s'han pres dades dels paràmetres climàtics més importants: precipitació, temperatura, evapotranspiració i humitat. La informació esmentada procedeix de la base de dades del Ministeri d'Agricultura i correspon al municipi de Benifaió, àrea més propera a la zona d'estudi.

8. QUANTIFICACIÓ D'OSMOLITS

Prolina

El mètode seguit per a l'extracció i quantificació de prolina és el de Bates *et al.* (1973) amb les modificacions proposades per Vicente *et al.* (2004). El mètode es basa en la reacció de la prolina amb la ninhidrina. El cromòfor va ser extret amb l'addició de 2 ml de tolué i mesurat amb espectrofotòmetre a 520 nm.

L'extracte de material vegetal es preparà a partir de 0,250 g de material fresc polvoritzat amb ajuda de nitrogen líquid i arregats en 2 ml d'àcid sulfosalicílic (3%).

Les dilucions pertinents es realitzaren en el moment de la lectura de l'absorbància, afegint tolué equitativament sobre les mostres i el blanc.

La concentració de prolina a les mostres es calculà a través de la fórmula obtinguda mitjançant l'ajust de mínims quadrats d'una corba patró amb concentracions conegudes.

Els valors finals s'expressen en $\mu\text{molg}^{-1}\text{Ps}$ (Ps = pes obtingut a partir de 3 mostres per tractament assecades a la estufa a 65°C fins pes constant).

Glicina betaïna

L'extracció i quantificació de glicina betaïna es realitzà seguint el mètode de Grieve i Grattan (1983) amb les modificacions proposades per Nawaz i Ashraf (2010), el qual està basat en la reacció de la glicina betaïna amb el dicloretà en un medi àcid. El mètode original prepara l'extracte a partir de material sec, en aquest estudi s'han realitzat modificacions per a l'obtenció de l'extracte a partir de material fresc conservat a -80°C.

L'extracte es realitzà a partir de 0,250 g de material vegetal fresc arregats en 2 ml d'aigua Milli-Q®. Les dilucions pertinents es realitzaren immediatament després amb aigua Milli-Q®. La resta de processos es realitzaren d'acord amb el mètode original, emprant 400ul d'HCl 2N per cada mostra, 80um de I₃K, 400 um de H₂O Milli-Q® freda.

La separació del cromòfor es realitzà afegint 4 ml d' 1,2dicloretà i es mesurà l'absorbància amb espectrofotòmetre a 365 nm.

Els valors finals s'expressaren en μmolg^{-1} de pes sec ($\mu\text{molg}^{-1}\text{Ps}$).

9. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Les dades s'analitzaren amb el programa estadístic SPSS, v.16. S'aplicà el test de Levene per a comprovar si els valors registrats complien els requeriments de l'anàlisi de variància.

Les diferències significatives entre tractaments s'han comprovat mitjançant un anàlisi de variància ANOVA de un factor. Per a l'anàlisi post-hoc s'ha emprat el test de Tukey. La comparació de l'efecte del tractament entre les dues espècies es realitzà mitjançant un ANOVA bifactorial. Per a analitzar el creixement, els valors s'han transformat percentualment.

RESULTATS

1. ANÀLISI DE SÒLS

Els resultats de l'anàlisi de la conductivitat elèctrica del substrat utilitzat per al cultiu en càmera de *P. crassifolia*, s'expressen a la Figura 8. Existeixen diferències significatives entre el tractament control (aigua destil·lada) i els tractaments posteriors (NaCl a concentracions de 150 mM, 300 mM, 450 mM i 600 mM) els quals, produeixen l'augment de la conductivitat elèctrica a mesura que la concentració de NaCl és major. El Test de Tukey no detecta diferències significatives entre els tractaments de 300 mM i 450 mM.

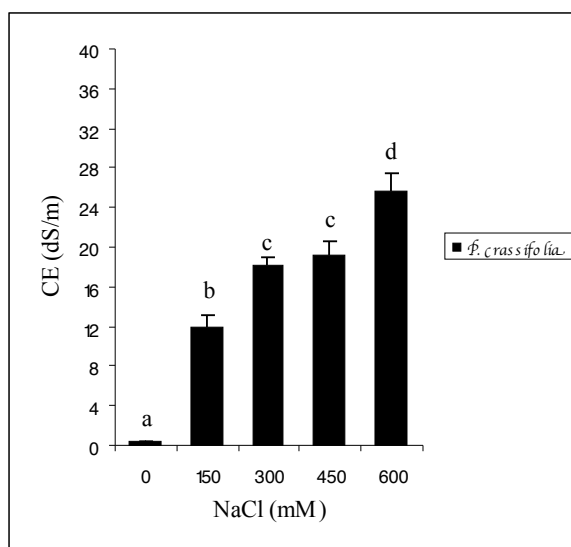


Figura 8: Valors mitjans de conductivitat elèctrica en extracte 1:5 del substrat ($n = 5$) utilitzat per al cultiu en càmera de plantes de l'espècie *P. crassifolia* sotmeses a les concentracions indicades de NaCl durant dos mesos. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

La conductivitat elèctrica en el substrat emprat per a *I. crithmoides* presenta un comportament anàleg al del substrat anterior.

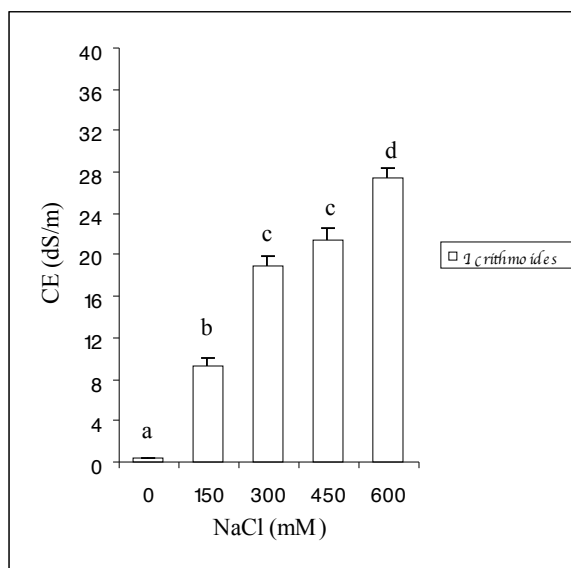


Figura 9: Valors mitjans de conductivitat elèctrica en extracte 1:5 del substrat ($n = 5$) utilitzat per al cultiu en càmera de plantes de l'espècie *I. crithmoides* sotmeses a les concentracions indicades de NaCl durant dos mesos. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En segon lloc es presenten els resultats de conductivitat elèctrica en camp (Fig. 10 i 11).

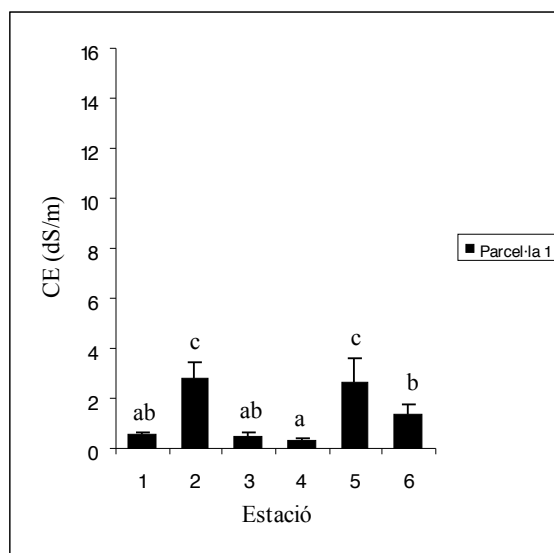


Figura 10: Valors mitjans de conductivitat elèctrica en extracte 1:1 de les mostres de sòl de camp ($n = 3$) procedent de la parcel·la 1 (vora del saladar). Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

La parcel·la 1 (Fig. 10), ubicada a la vora del saladar, presenta uns valors relativament baixos per al conjunt del saladar. S'observa un increment significatiu, segons els Test de Tukey ($\alpha = 0,05$), de la conductivitat elèctrica en els mostrejos realitzats en les estacions 2 i 5 (estiu 2009, estiu 2010 respectivament) que presenten valors màxims entorn als 3 dS/m.

En canvi en la parcel·la 2 (Fig.11) s'observen valors de conductivitat elèctrica generalment majors als de la parcel·la 1. Els valors màxims (de 8 a 12 dS/m) es presenten de nou en les estacions 2 i 5 (estiu 2009 i estiu 2010 respectivament) però en aquest cas no és significatiu segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

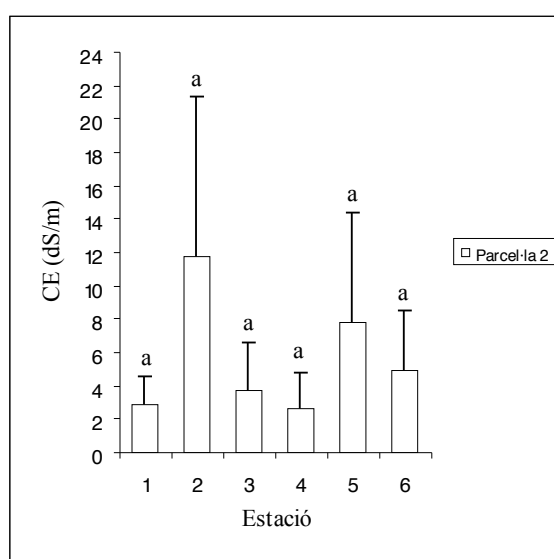


Figura 11: Valors mitjans de conductivitat elèctrica en extracte 1:1 de les mostres de sòl de camp ($n = 3$) procedent de la parcel·la 2 (zona deprimida del saladar). Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2. PARÀMETRES CLIMÀTICS

Les dades de precipitació i evapotranspiració durant el període dels mostrejos de camp es presenten en la Figura 12. Les precipitacions són en general escasses i es concentren sobre tot en hivern de 2009, hivern de 2010 i el període de finals d'estiu i inici de tardor de 2010. L'evapotranspiració és molt acusada durant els períodes de primavera-estiu de 2009 i 2010, superant en gran mesura a les precipitacions i provocant dèficit hídric en dos períodes molt diferenciats: des de primavera fins tardor de 2009 i des d'hivern fins tardor de 2010. Cal remarcar el període d'ausència de precipitacions durant els mesos d'abril i maig de 2009 ja que aquest fenomen de sequera extrema resultà determinà les condicions en que es trobaven les plantes en el moment del mostreig d'estiu de 2009 (estació 2).

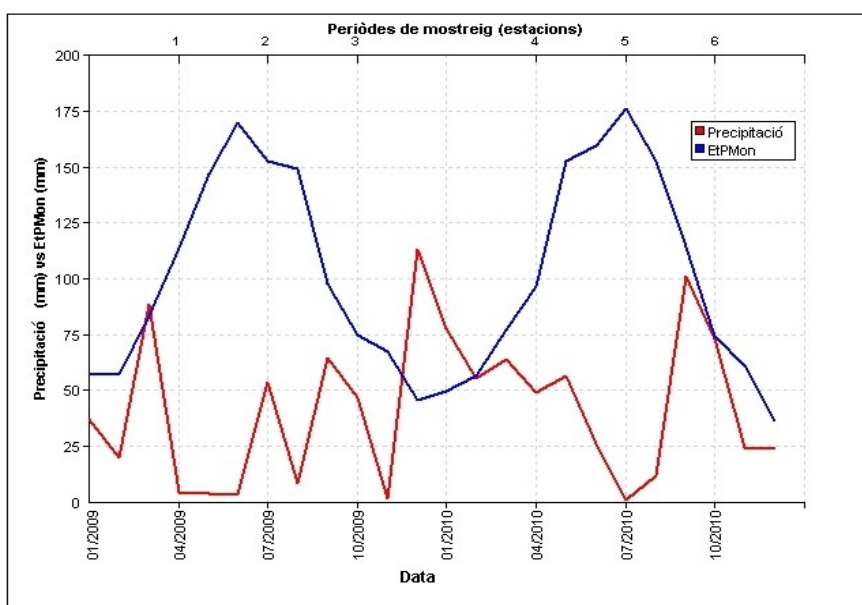


Figura 12: Evolució de les precipitacions i l'evapotranspiració en Benifaió (València), durant el període 2009-2010.

Font: <http://www.magrama.gob.es/siar/> (modificat).

3. CREIXEMENT

Longitud mitjana

P. crassifolia presenta valors màxims de longitud mitjana quan està sotmesa al tractament control. A mesura que augmenta la concentració de NaCl dels tractaments, el creixement longitudinal mitjà disminueix paulatinament.

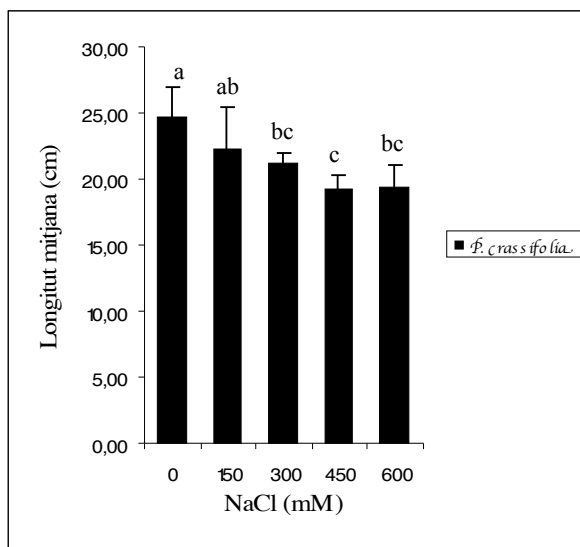


Figura 13: Influència de la salinitat sobre la longitud mitjana de la fulla més llarga de plantes de *P. crassifolia* tractades durant dos mesos amb les concentracions de NaCl indicades. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

La influència de la salinitat sobre la longitud mitjana d'*I. crithmoides* presenta un comportament marcadament diferent a l'anterior (Fig. 14).

El tractament de NaCl a concentracions de 150 mM estimula el creixement d'*I. crithmoides*, però a mesura que augmenta la concentració de sal (tractaments de 300 mM, 450 mM i 600 mM), aquest es veu inhibit significativament.

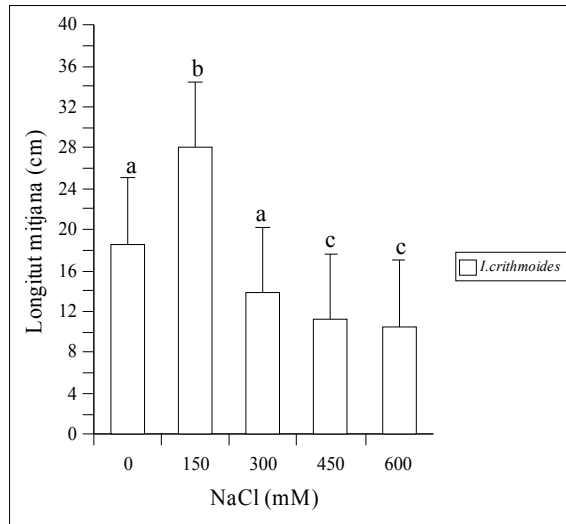


Figura 14: Influència de la salinitat en la longitud mitjana de plantes d' *I. crithmoides* tractades durant dos mesos amb les concentracions de NaCl indicades. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Quan es comparen els valors percentuals de la longitud mitjana d'ambdúes espècies el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) sols reconeix diferències significatives entre les espècies quan es troben sotmeses al tractament de 150 mM, que resulta més favorable per a *I. crithmoides*, la qual arriba a superar el 150% de la longitud mitjana del tractament control.

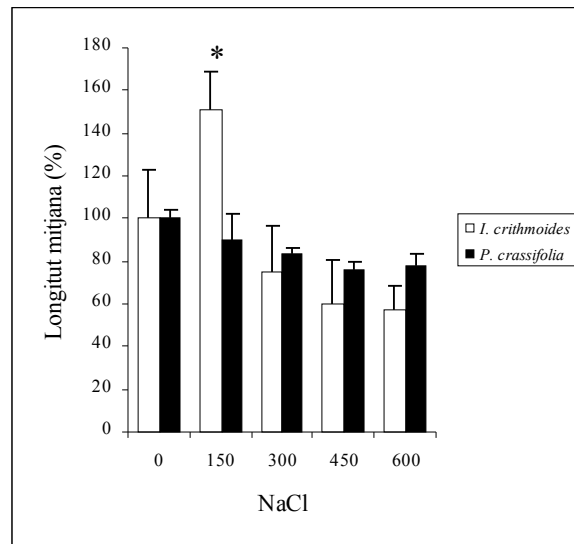


Figura 15: Diferències entre la longitud mitjana de *P. crassifolia* i *I. crithmoides* en condicions idèntiques de salinitat. La longitud mitjana s'expressa en %, prenent com a 100% la mitjana del tractament control de cada espècie. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Pes fresc

En l'evolució del pes mitjà de *P. crassifolia* es diferencien tres grups segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$). El pes mitjà presenta valors màxims en el tractament control i descén en augmentar la salinitat del sòl fins el tractament de 300 mM, a partir del qual no existeixen diferències significatives.

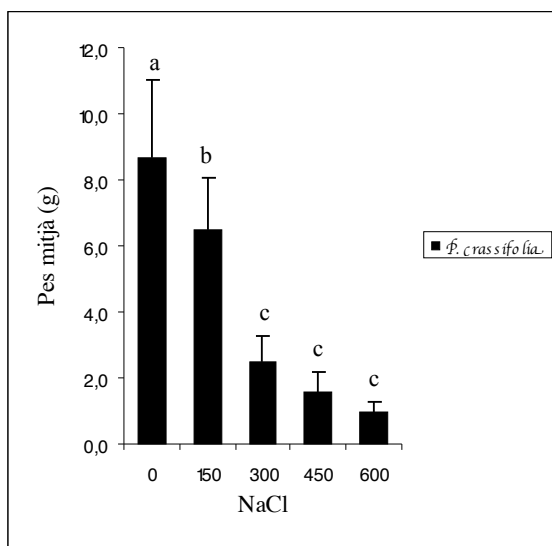


Figura 16: Influència de la salinitat en el pes mitjà de plantes de *P. crassifolia* tractades durant dos mesos amb les concentracions de NaCl indicades. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En el pes mitjà en *I. crithmoides* presenta un comportament semblant al de la longitud mitjana. Es produeix un increment del pes mitjà en el tractament de 150 mM respecte al tractament control, a partir del tractament de 300 mM els valors del pes mitjà disminueixen i es mantenen sense diferències significatives en les concentracions de 450 mM i 600 mM.

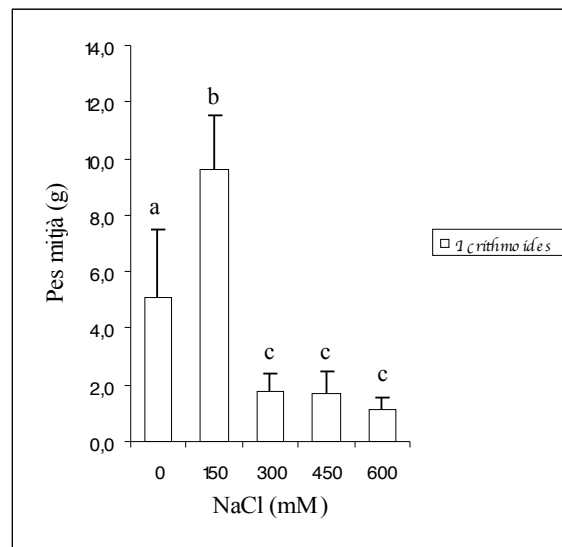


Figura 17: Influència de la salinitat sobre el pes mitjà de plantes d' *I. crithmoides* tractades durant dos mesos amb les concentracions de NaCl indicades. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En l'anàlisi bifactorial dels valors percentuals (Fig. 18), considerant com a factors el tractament i l'espècie del pes mitjà d'ambdúes espècies, de nou es troben diferències significatives en el tractament de concentració 150 mM.

Mentre el pes d'*I. crithmoides* es veu afavorit per la concentració de 150 mM, en *P. crassifolia* disminueix respecte al tractament control.

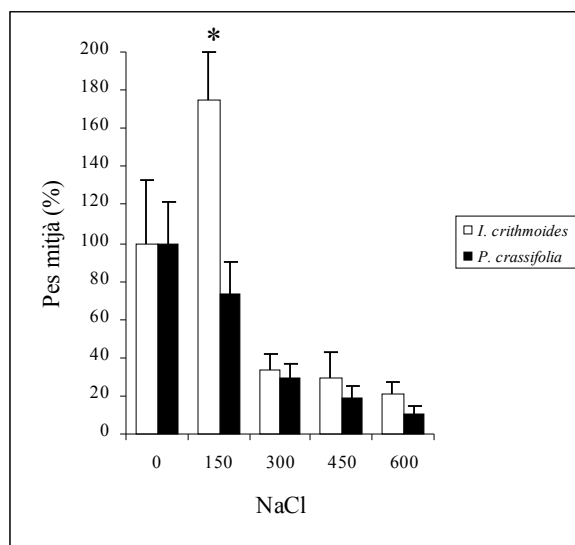


Figura 18: Diferències entre el pes mitjà de *P. crassifolia* i *I. crithmoides* en condicions idèntiques de salinitat. La longitud mitjana s'expressa en %, prenent com a 100% la mitjana del tractament control de cada espècie. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

4. QUANTIFICACIÓ D'OSMOLITS

Optimització de l'assaig

Els assajos han sigut optimitzats d'acord amb el protocol i les adaptacions proposades per a aquest estudi. Per a evitar possibles variacions en els diferents assajos produïdes per l'envelliment dels compostos o les fluctuacions en l'espectrofotòmetre, s'ha realitzat una corba patró per a cadascun.

En la Taula 1 es mostren els valors mitjans de la corba patró per a la quantificació de prolina.

Taula 1: Valors mitjans de la corba patró per a la quantificació de prolina.

Corba Patró Prolina	
Prolina ($\mu\text{mols/ml}$)	Absorbància (520nm)
0	0
0,01	0,05
0,03	0,12
0,05	0,25
0,07	0,36
0,1	0,47
0,15	0,72

Les dades anteriors es representen en la gràfica següent (Fig. 19). S'ha realitzat una recta de regressió i extret l'equació corresponent per ajust de mínims quadrats.

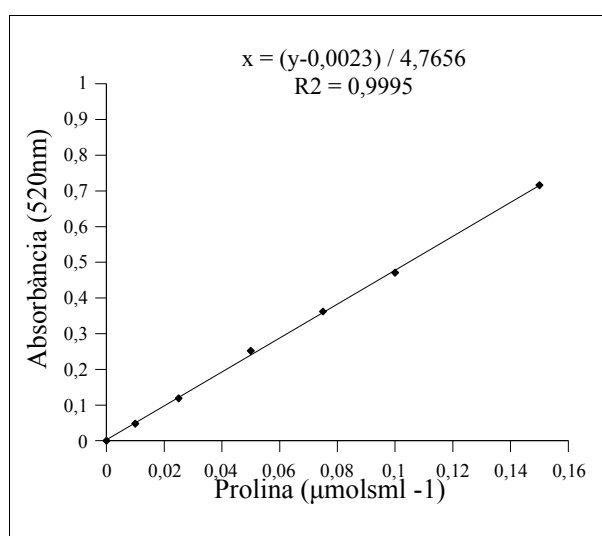


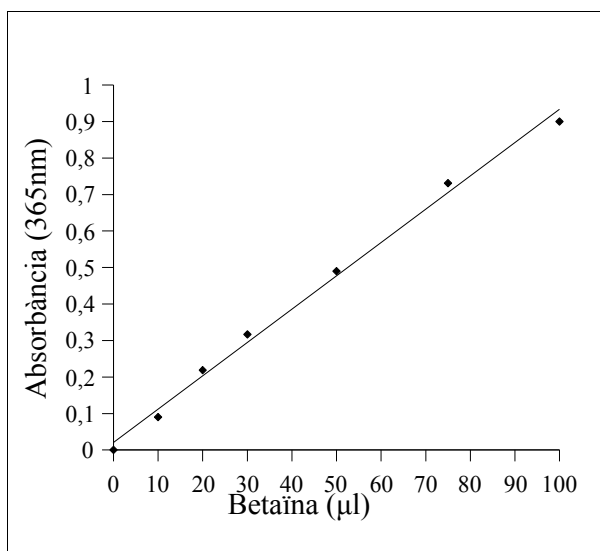
Figura 19: Corba patró de Prolina i equació obtinguda per ajust de mínims quadrats.

El procediment d'optimització per als assajos d'extracció i quantificació de glicina betaïna va ser igual a l'anterior. En la taula 2 queden reflexats els valors mitjans de la corba patró per a la seua quantificació.

Taula 2: Valors mitjans de la corba patró per a la quantificació de glicina betaïna.

Corba Patró Glicina Betaïna	
G.betaïna µl	Absorbància (365nm)
0	0
10	0,09
20	0,22
30	0,32
50	0,49
75	0,73
100	0,9

Aquestes dades queden representades en la gràfica següent (Fig. 20). A la gràfica es mostra també la recta de regressió amb l'equació corresponent obtinguda per mínims quadrats.



$$x = (y - 0,021) / 0,0091$$

$$R^2 = 0,9785$$

Figura 20: Corba patró de glicina betaïna i equació de la recta de regressió obtinguda per ajust de mínims quadrats.

Acumulació de prolina en condicions de cultiu en càmera

La prolina en *P. crassifolia*, presenta uns valors mínims en els tractaments control, 150 mM i 300 mM. A partir del tractament de concentració 450 mM els valors de prolina es disparen.

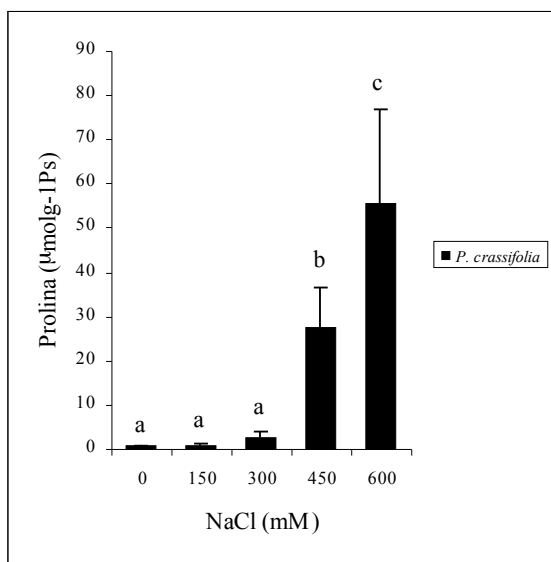


Figura 21: Quantitat de prolina en *P. crassifolia* a diferents concentracions de NaCl (n=5). Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

L'acumulació de prolina en *I. crithmoides* en condicions controlades difereix lleugerament de la de *P. crassifolia*.

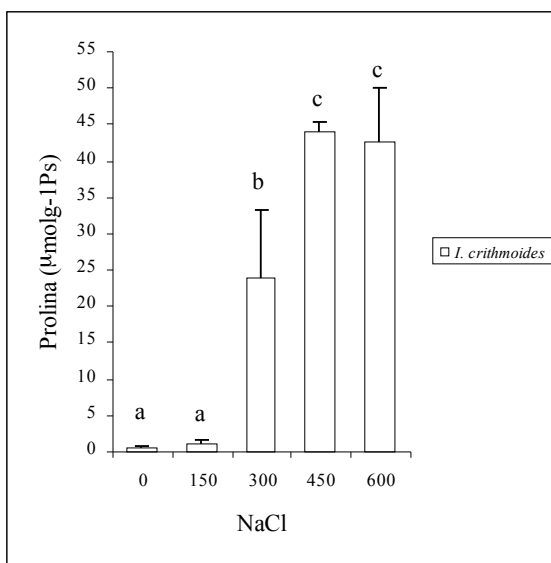


Figura 22: Quantitat de prolina en *I. crithmoides* a diferents concentracions de sal (n=5). Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En l'anàlisi bifactorial de les espècies i els tractaments, el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) revela tres grups amb diferències significatives. En el tractament control, *P. crassifolia* presenta valors de prolina superiors a *I. crithmoides*, en canvi, aquesta última presenta valors superiors en el tractament de 300 mM i 450 mM. No existeixen diferències significatives entre les dues espècies en els tractament 150 mM i 600 mM.

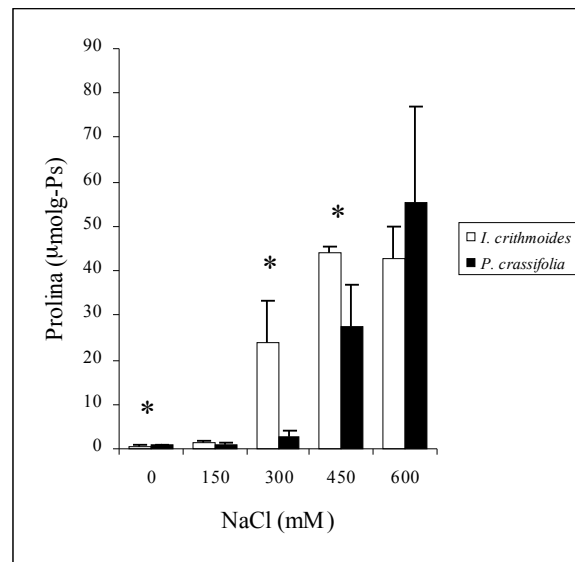


Figura 23: Diferències en la quantitat de prolina present en *I. crithmoides* i *P. crassifolia* quan estan sotmeses a diferents concentracions de NaCl. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Acumulació de prolina en condicions naturals

En condicions naturals els valors de prolina en *P. crassifolia* són molt baixos. Els valors màxims es donen en l'estació 3, corresponent al mostreig de tardor de 2009. Per a la resta d'estacions el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) no mostra diferències significatives en els valors de prolina.

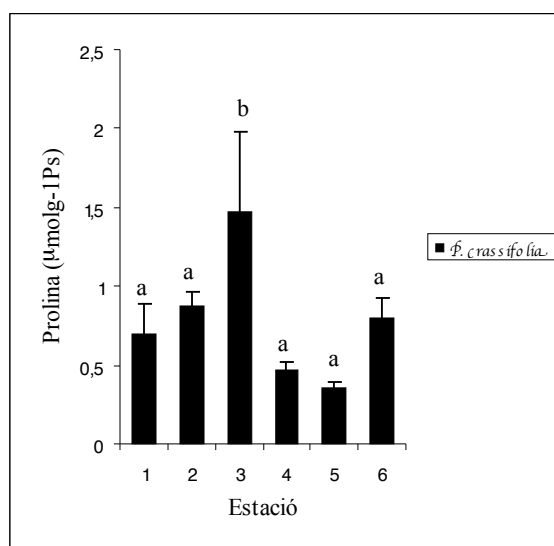


Figura 24: Quantitat de prolina en *P. crassifolia* en condicions naturals mesurada en diferents estacions durant dos anys. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

I. crithmoides en canvi, presenta un comportament diferent (Fig. 25). Els valors màxims de prolina tenen lloc en l'estació 2, que es correspon amb el mostreig d'estiu de 2009. No obstant, són valors molt baixos. Segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$), a la resta d'estacions els valors de prolina no presenten diferències significatives.

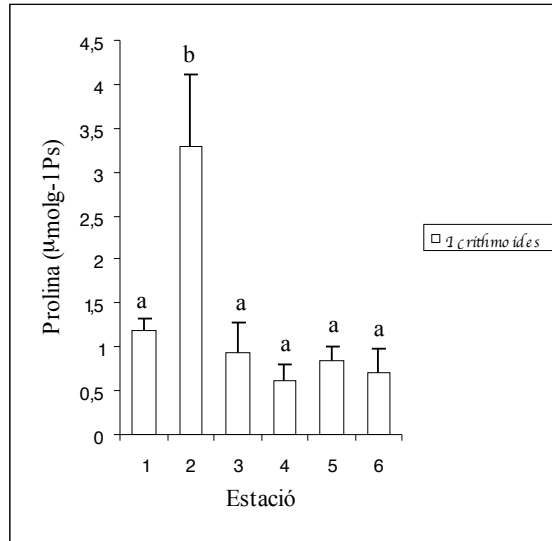


Figura 25: Quantitat de prolina en *I. crithmoides* en condicions naturals. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Quan s'analitza la diferència de la influència dels tractaments entre ambdúes espècies, el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$) mostra diferències significatives en totes les estacions exceptuant la 4, corresponent al mostreig de primavera de 2010.

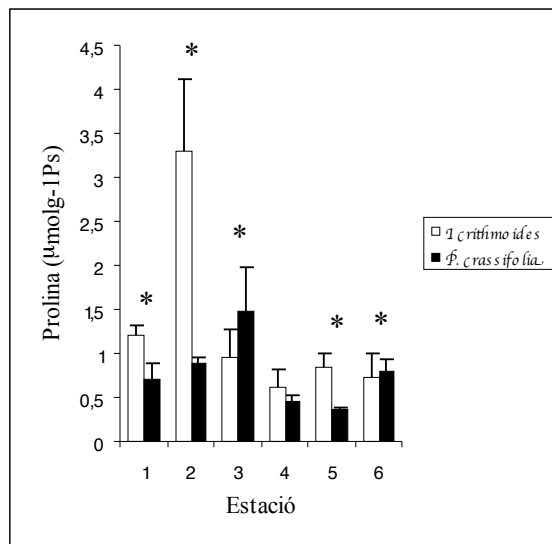


Figura 26: Diferències en la quantitat de prolina present en *I. crithmoides* i *P. crassifolia* en condicions naturals. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En les estacions 1, 2 i 5 (primavera 2009, estiu 2009 i estiu 2010 respectivament), els valors de prolina són majors en *I. crithmoides*. En canvi, en l'estació 6 (tardor 2010), *P. crassifolia* presenta major quantitat de prolina que *I. crithmoides*.

Acumulació de glicina betaïna en condicions de cultiu en càmera

En la Figura 24 es mostra la quantitat de glicina betaïna present en *P. crassifolia* en cadascun dels tractaments. La quantitat és aproximadament la mateixa en els tractaments de 0, 150, 300 i 450 mM, no obstant en el tractament de 600 mM la quantitat de glicina betaïna augmenta significativament segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

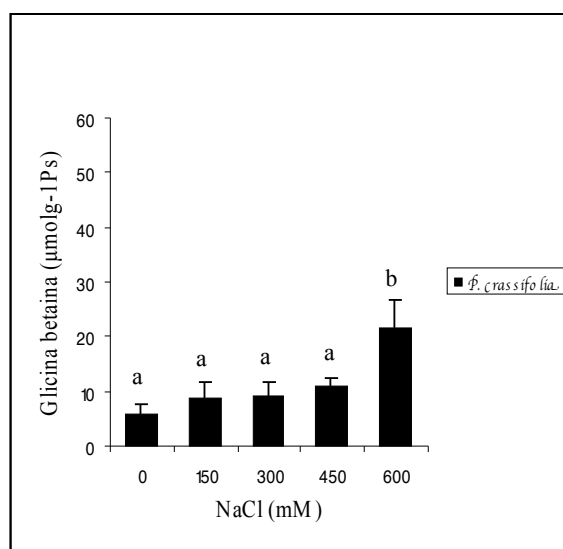


Figura 27: Quantitat de glicina betaïna en plantes de *P. crassifolia* sotmeses a diferents concentracions de NaCl durant dos mesos. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En el cas d' *I. crithmoides* els valors de glicina betaïna són semblants per a les concentracions de control, 150 mM i 300 mM. A partir de 450 mM, la quantitat de glicina betaïna augmenta significativament i roman més o menys constant en el tractament de 600 mM segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

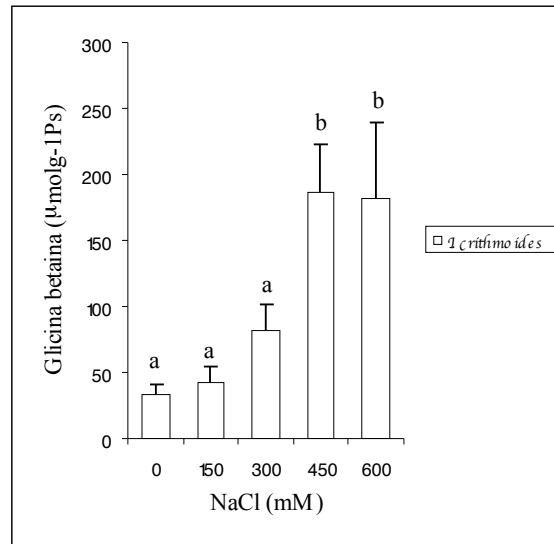


Figura 28: Quantitat de glicina betaïna en plantes *I. crithmoides* sotmesa a diferents concentracions de NaCl durant dos mesos. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

L'anàlisi bifactorial (ANOVA) d'ambdúes espècies per a comparar la influència del diferents tractaments, mostra diferències significatives per a tots els tractaments segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$). En tots els casos, els valors de glicina betaïna en *I. crithmoides* estan molt per damunt dels presents en *P. crassifolia*.

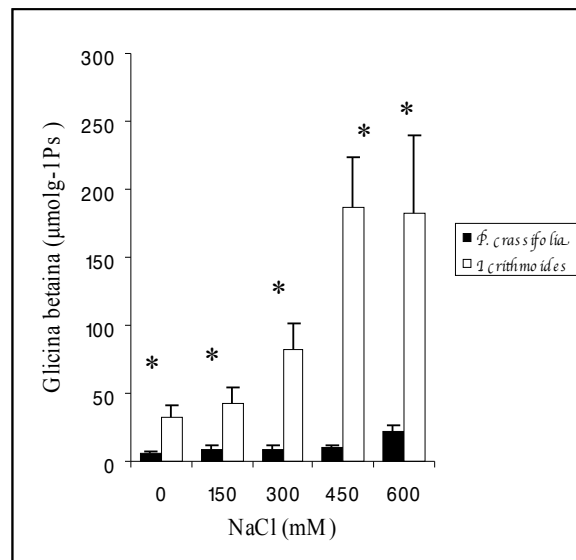


Figura 29: Diferències en la quantitat de glicina betaïna present en plantes d'*I. crithmoides* i *P. crassifolia* sotmeses a diferents concentracions de NaCl durant dos mesos. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Acumulació de glicina betaina en condicions naturals

En condicions naturals *P. crassifolia* presenta valors màxims en l'estació 2 (estiu 2009) i mínims en l'estació 6 (tardor 2010). No obstant aquestes dades no presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

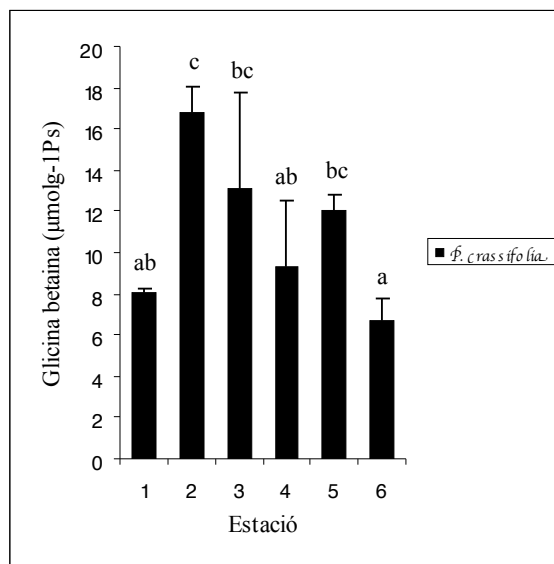


Figura 30: Quantitat de glicina betaina present en *P. crassifolia* en condicions naturals. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

L'anàlisi estadístic de la quantitat de glicina betaïna en *I. crithmoides* en condicions naturals revela que sols el valor corresponent a l'estació 2 (estiu 2009) presenta diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$). Els valors màxims de glicina betaïna tenen lloc en l'estació 2 i els mínims es presenten en l'estació 6.

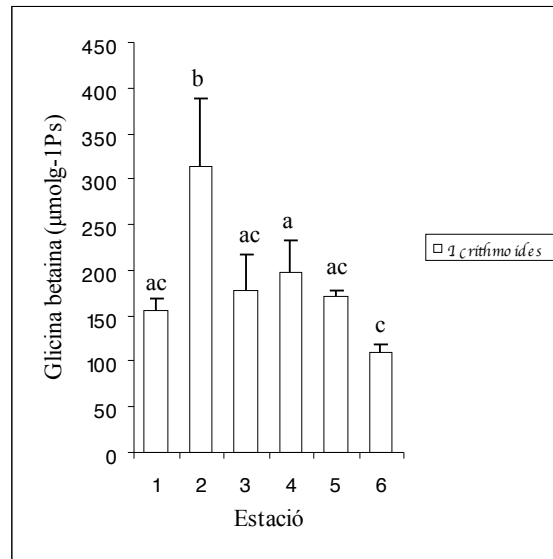


Figura 31: Quantitat de glicina betaïna present en *I. crithmoides* en condicions naturals. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb lletres diferents presenten diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Quan es compara la quantitat de glicina betaïna en ambdues espècies, apareixen diferències significatives en totes les estacions, segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$). *I. crithmoides* presenta quantitats significativament majors de glicina betaïna que *P. crassifolia* en totes les estacions.

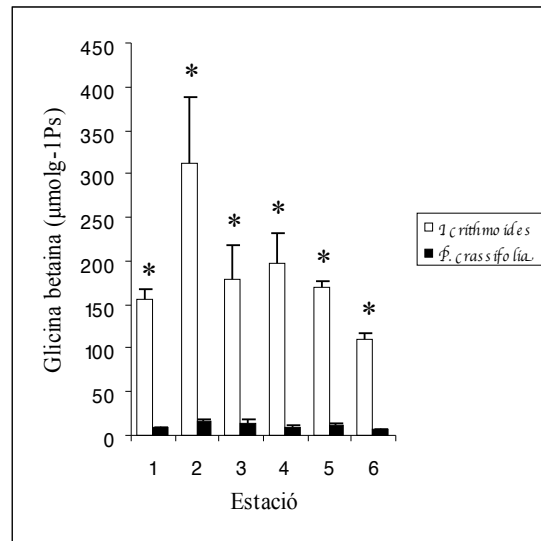


Figura 32: Diferències en la quantitat mitjana de glicina betaïna present en *I. crithmoides* i *P. crassifolia* en condicions naturals. Els nombres de les estacions 1, 2, 3, 4, 5 i 6 es corresponen amb els mostrejos de primavera 2009, estiu 2009, tardor 2009, primavera 2010, estiu 2010 i tardor 2010 respectivament. Els valors amb asterisc revelen diferències significatives segons el Test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

DISCUSSIÓ

La salinitat al sòl pot ser mesurada a través de la conductivitat elèctrica (paràmetre que augmenta a mesura que s'incrementa la concentració d'ions (incloent diverses sals solubles) presents al sòl (Bresler *et al.*, 1982). La conductivitat elèctrica del substrat utilitzat per al cultiu en càmera de *P. crassifolia* i *I. crithmoides* presenta valors molt similars, en ambdós casos els valors són mínims en el tractament control i augmenten en funció de la concentració de NaCl, assolint valors entorn els 25 dS/m en el tractament de 600 mM. Sembla ser que l'efecte planta no influeix en la conductivitat elèctrica, ja que no existeixen diferències significatives entre les espècies.

Els anàlisis de conductivitat elèctrica del sòl procedent dels mostrejos de camp revelen una correlació estacional. En general, la parcel·la 1 presenta valors de conductivitat elèctrica menors que la parcel·la 2. Aquesta diferència és conseqüència de l'emplaçament de cada parcel·la al saladar. Com que les mallades es comporten com una petita conca endorreica, la salinitat tendeix a ser major a causa de l'acumulació de sals procedents del rentat de les zones adjacents. La parcel·la 1 està situada a la vora del saladar on, per norma general, la salinitat és menor que a les zones més deprimides situades al centre, on es troba la parcel·la 2. Les zones deprimides de les mallades, es troben més prop del nivell freàtic i arriben a entollar-se en l'època de pluges gràcies a la capa de llims que presenten en profunditat, que els confereix la capacitat de retenció de l'aigua (Boira, 1988). Durant l'estació més calorosa aquesta aigua acumulada s'evapora provocant l'augment de la salinitat edàfica en les capes més superficials (Sanchís *et al.*, 1998).

L'augment considerable de la salinitat en les estacions 2 i 5 (estiu 2009 i estiu 2010 respectivament) sembla ser causada per les condicions climàtiques dels períodes previs al mostreig d'estiu de 2009 i estiu de 2010, els quals presenten una evapotranspiració molt acusada que supera inclòs els 150 mM, valor molt superior al nivell de precipitacions per als mateixos períodes, sent els mesos d'abril, maig i juny de 2009 especialment secs. Aquesta absència de precipitacions i augment de l'evapotranspiració es tradueix en un fort període de sequera i un increment considerable de la salinitat en la superfície del sòl, sometent a les plantes a nivells majors d'estrès hídric i salí que en la resta de períodes. Es possible que aquest increment afecte no sols a la conductivitat elèctrica del sòl sinó també a la resposta de les plantes a aquestes condicions climàtiques.

L'efecte més comú de l'estrès salí en glicòfiles és la inhibició del creixement de la planta i la reducció del seu rendiment (Mass i Hoffman, 1977), a causa dels dos components que caracteritzen a l'estrès salí (Greenway i Munns, 1980): l'estrès osmòtic i la toxicitat iònica. A més es creu que l'augment de la salinitat mitjana podria restringir la síntesi d'algunes substàncies promotores del creixement, com les cito-quinines i a més incrementar la producció d'inhibidors com l' ABA (Khan *et al.*, 1976; Ungar, 1991). En general, les plantes glicòfiles i les monocotiledònies halòfiles creixen de manera òptima en absència de sal o a concentracions de NaCl menors de 50mM. No obstant, les dicotiledònies halòfiles obligades o extremes presenten una estimulació del creixement a concentracions moderades de NaCl (50-250mm), tot i que a concentracions superiors també pateixen l'efecte inhibidor (Flowers *et al.*, 1986). *P. crassifolia* cultivada en càmera a diferents graus d'estrès salí presenta valors òptims de creixement en absència de NaCl. Els diferents tractaments de NaCl si bé no afecten significativament a la longitud mitjana, l'efecte inhibidor es fa plausible en el pes fresc. Aquests resultats queden recolzats per estudis anteriors sobre la influència de la salinitat en la fase vegetativa d'aquesta espècie on els tractaments de NaCl inhibiren el creixement, representat per diversos paràmetres com el nombre mitjà de fulles, la longitud mitjana i el pes fresc i sec de la planta (Vicente *et al.*, 2004). En el mateix estudi, la germinació va ser greument inhibida a concentracions molt per baix de les presents en condicions naturals com ocorre amb altres halòfiles (Flowers *et al.*, 1986), tanmateix la capacitat de germinació o viabilitat de les llavors pretractades amb diferents concentracions de NaCl no es va veure afectada. Nombrosos estudis demostren que la tolerància a la salinitat està influida per l'estadi de desenvolupament de la planta, de tal manera que les respostes a estrès salí en una mateixa espècie poden ser molt diverses en les diferents etapes del seu cicle biològic (Flowers *et al.*, 1986; Lauchli i Epstein, 1990; Johnson *et al.*, 1992; Vicente *et al.*, 2004).

Els valors de creixement d'*I. crithmoides* difereixen dels de *P. crassifolia* sotmeses als mateixos tractaments. El creixement d'*I. crithmoides* es veu estimulat pel tractament de NaCl 150 mM, assolint xifres superiors al 150% de la longitud mitjana i del pes fresc obtinguts amb el tractament control i 300 mM, que no presenten diferències significatives. En canvi a concentracions superiors a 300mM *I. crithmoides* pateix l'efecte inhibidor de la salinitat. Aleshores el creixement òptim d' *I. crithmoides* es dona a concentracions moderades de NaCl presentant una comportament típic de les plantes halòfiles obligades front a la salinitat. Aquesta teoria queda recolzada per nombrosos estudis realitzats en altres halòfiles obligades, com *Sarcocornia natalensis* (Naidoo i Rughunanan, 1990) i *Suaeda fruticosa* (Khan *et al.*, 2000), el creixement de les quals presenta un comportament anàleg al descrit en *I. crithmoides*. La diferència de comportament entre les espècies deriva de l'adaptació de cadascuna al seu medi natural. Com s'ha esmentat al capítol de materials i

mètodes, *P. crassifolia* és una planta típica de les vores dels saladars on la salinitat és inferior, en canvi *I. crithmoides* es troba a les zones més deprimides on la salinitat és major. Aleshores *I. crithmoides* presenta major grau de tolerància que *P. crassifolia*. En resum, els resultats en referència al creixement obtinguts per a ambdues espècies confirmen l'adaptació al seu medi natural, ja que es correlacionen bé amb la seua ecologia.

La síntesi d'osmolits és una de les respostes a estrès salí més comunes. De les nombroses substàncies que es sintetitzen com a osmolits, prolina i glicina betaïna semblen ser les més esteses.

En les plantes cultivades en càmera els valors de prolina existents a les concentracions més elevades de NaCl (450 mM i 600 mM) difereixen d'aquells obtinguts en condicions naturals. Cal aclarir que no és possible comparar quantitativament els resultats procedents de les plantes cultivades en càmera i els de camp, atès que existeixen paràmetres en camp impossibles de reproduir al laboratori i a diferència de les plantes cultivades en càmera, les procedents dels mostrejors de camp són adultes. A més el nivell d'estrès en el cultiu en càmera és major que l'existent en condicions naturals en ser els cossiols sistemes tancats i no permetre el creixement radicular cap a zones més òptimes, com ocorre en l'ambient natural.

En general, els nivells de prolina en ambdues espècies són menyspreables tant en condicions de camp com en els tractaments de concentracions menors. No obstant, en condicions de laboratori, els nivells de prolina es disparen a partir del tractament de 450 mM en *P. crassifolia* i de 300 mM en *I. crithmoides* arribant a assolir valors de 55 μmolg^{-1} i 45 μmolg^{-1} respectivament en el tractament de major concentració de NaCl. En condicions de camp, els valors de prolina són molt menors 1,5 μmolg^{-1} en *P. crassifolia* i 3,5 μmolg^{-1} en *I. crithmoides* però semblants als obtinguts en altres estudis realitzats en la mateixa zona de mostreig (Scridon *et al.*, 2010). Aquest patró d'acumulació de prolina en condicions artificials d'elevada salinitat confirma les dades publicades per Vicente *et al.* (2004). En base a aquestes dades, es suggereix que a elevada salinitat les plantes tracten d'alleujar la descompensació osmòtica activant mecanismes que permeten la síntesi simultània de diversos osmolits. En aquest cas, tot i que la quantitat de prolina en condicions artificials és major, probablement continua sent insuficient per a jugar un paper rellevant en l'ajust osmòtic (Vicente *et al.*, 2004), per tant no actua com a osmolit principal en cap de les dues espècies. Com s'ha vist en treballs anteriors el sorbitol sembla ser l'osmolit principal en les plantes halòfiles de la família Plantaginaceae (Gorham *et al.*, 1981; Flowers i Colmer, 2008), a més estudis recents confirmen que *P. crassifolia* és una espècie acumuladora de sorbitol igual que la congènere *P. maritima* (Gil *et al.*, 2011), a més sembla ser que aquest osmolit es troba específicament en plantes d'aquest gènere (Flowers *et al.*, 2010) inclòs en les glicòfiles. A més, en l'estudi de Gil *et al.* (2011) existeix

correlació entre els valors de sorbitol i els factors climàtics, sent major la quantitat de l'osmolit a nivells d'estrès hídric i salí més elevats. Les investigacions del present treball no han sigut encarades cap a la recerca de sorbitol, però ha sigut detectada una correlació anàloga entre els nivells de prolina en les plantes procedents de camp i les condicions climàtiques en el període de mostreig. Aquest fet es fa palpable en les plantes procedents del mostreig d'estiu de 2009, on la concentració de prolina en *I. crithmoides* és significativament major a causa de l'elevada evapotranspiració i l'absència de precipitacions durant el període anterior al mostreig.

Anàlogament als nivells de prolina en camp, els de glicina betaïna també poden correlacionar-se amb els factors climàtics, sent de nou l'estiu de 2009 el que presenta valors màxims en les dues espècies. Tot i això els valors són molt superiors en *I. crithmoides*, que supera els 300 μmolg^{-1} en la mateixa estació.

A diferència dels valors de prolina observats en *I. crithmoides* en condicions artificials, els de glicina betaïna són en tots els tractaments molt superiors. La quantitat en el control supera els 25 μmolg^{-1} i augmenta significativament a partir de la concentració de 450 mM mantenint uns nivells màxims entorn els 180 μmolg^{-1} . La presència d'aquest osmolit també és notòria en condicions naturals, amb valors que oscil·len entre els 100 μmolg^{-1} i els 300 μmolg^{-1} . Marcum i Murdoch (1992) va suggerir que concentracions de 200 a 300 mM d'osmolits compatibles al citoplasma son suficients per a l'ajust osmòtic en condicions d'elevada salinitat per a l'espècie *Sporobolus virginicus*. Extrapolant aquesta hipòtesi al present estudi, els nivells de glicina betaïna en *I. crithmoides* semblen ser suficients per a que funcione com a substància osmorreguladora. Adrian-Romero *et al.* (1998) detectaren per primera vegada que aquesta espècie és una halòfila acumuladora de glicina betaïna, fet confirmat per aquest present treball.

Tant en condicions artificials com en camp, els nivells de glicina betaïna en *I. crithmoides* són marcadament elevats en comparació amb els de *P. crassifolia* que presenta valors baixos constants fins la concentració 600 mM on augmenta significativament fins valors superiors a 20 μmolg^{-1} . Com ja s'ha vist *P. crassifolia* és acumuladora de sorbitol però igual que *I. crithmoides* en condicions d'elevada salinitat també sintetitza altres osmolits que podrien tindre un paper secundari en la tolerància a la salinitat. A més, Tipirdamaz *et al.* (2006) assenyalà que moltes espècies que es comporten com acumuladores de glicina betaïna, contenen alhora petites quantitats de prolina, fet que es confirma en aquest estudi per a *I. crithmoides* i a més recolza la idea de la síntesi simultània de diversos osmolits.

Tot i que en quantitats molt variables i en alguns casos insuficients per a l'ajust osmòtic, tant els nivells de prolina com els de glicina betaïna varien en paral·lel amb el nivell d'estrès, mostrant per tant una correlació amb la salinitat edàfica tant en condicions artificials com naturals. Per tant es pot dir que tan la prolina com la glicina betaïna influeixen en la tolerància a la salinitat de *P. crassifolia* i *I. crithmoides* sino com a osmorreguladores, com és el cas de la glicina betaïna en *I. crithmoides*, com a substàncies osmoprotectores.

CONCLUSIONS

La resposta del creixement d'ambdues plantes en condicions d'estrès salí controlades en càmera es correspon amb l'ecologia de les espècies, sent *P. crassifolia* una planta subhalòfila, que tot i tolerar la salinitat creix més òptimament en absència de sal. En canvi *I. crithmoides*, halòfila obligada, presenta un creixement major a concentracions entorn els 150 mM.

La prolina no actua com a osmolit principal en cap de les espècies, tot i que la seua síntesi augmenta quan els nivells d'estrès salí són elevats.

La glicina betaïna té un comportament anàleg al de la prolina en *P. crassifolia* però en *I. crithmoides* presenta nivells molt superiors tant en condicions controlades com naturals, trobant-se implicada en el balanç osmòtic.

Sembla ser que existeix una síntesi simultània d'osmolits quan les plantes estan sotmeses a nivells d'estrès salí molt elevats. En aquest cas els osmolits secundaris tot i no participar en el balanç osmòtic, podrien tindre una funció osmoprotectora. Per tant ambdues substàncies estarien implicades en major o menor mesura en la tolerància a la salinitat, ja que en els dos casos existeix una correlació positiva entre la seua acumulació per part de *P. crassifolia* i *I. crithmoides* i el nivell d'estrès salí patit per les mateixes tant en condicions controlades com naturals.

BIBLIOGRAFIA

- Adrian-Romero, M., Wilson S.J., Blunden, G., Yanga M., Carabot-Cuervo, A., Bashirc, A.K. 1998. Betaines in coastal plants. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 535-543.
- Ashraf, M.Y. 2009. Salt Tolerance Mechanisms in Some Halophytes from Saudi Arabia and Egypt. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5(3): 191-206.
- Ashraf, M.Y., Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206-216.
- Ashraf, M.Y., Harris, P.J. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Tear, L.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207
- Boira, H. 1988. La vegetación del marjal de Torreblanca-Ribera de Cabanes. Actes del Simposi Internacional de Botànica Pius Font i Quer. *Fanerogàmia* 2: 233-239.
- Braun-Blanquet, J. 1979. *Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales*. Ediciones Blume, Madrid.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stress. En: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiology, Rockville, MD. pp1158-1203.
- Bresler, E., McNeal, B.L., Carter, D.L. 1982. *Saline and Sodic Soils. Principles, Dynamics, Modeling*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 236pp.
- Cirujano, S. 1989. Los saladares de Cordovilla (Tobarra, Albacete). Caracterització e importancia. *Al-Basit: Revista de estudios albacetenses* 25: 209-217.
- Consejería de Territorio i Vivienda de la Generalitat Valenciana. 2006. *Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR)*. www.magrama.gob.es (25 febrer de 2012).
- Cushman, J.C. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture, *American Zoologist* 41: 758-769.

- Demiral, T., Türkan, I., 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany* 56: 72–79.
- Elthon, T. E., Stewart, C. R. 1981. Sub-mitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiology* 67: 780–784.
- Epstein, P.R., Mills E. (Eds.). 2005. *Climate Change Futures. Health, Ecological and Economic Dimensions*. The Center for Health and the Global Environment. Harvard Medical School.
- Flowers, T.J., Colmer, T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179: 945-963.
- Flowers, T.J., Galal, H.K., Bromham, L. 2010. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology* 37: 604-612.
- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A., Clipson, N.J.W. 1986. Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* 61: 313-335.
- Flowers, T.J., Yeo, A.R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 875-884.
- Geissler, N., Hussin, S., Koyro H.W. 2009. Interactive effects of NaCl salinity and elevated atmospheric CO₂ concentration on growth, photosynthesis, water relations and chemical composition of the potential cash crop halophyte *Aster tripolium* L. *Environmental and Experimental Botany* : 220-231.
- Geissler, N., Hussin, S., Koyro, H.W. 2010. Elevated atmospheric CO₂ concentration enhances salinity tolerance in *Aster tripolium* L. *Planta* 231: 583-594.
- Genard, H., Le Saos, J., Hillard, J., Tremolieres, A., Boucaud, J. 1991. Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 421-427.
- Generalitat Valenciana. 2011. Instituto cartográfico de valencia. 2011. <http://terrasit.gva.es/es/ver> (5 de març de 2012).
- Gil, R., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidón, A., Vicente, O. 2011. Soluble carbohydrates as osmolytes in several halophytes from a mediterranean salt marsh. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 39: 09-17
- Gorham, J., Hughes, L., Wyn, R.G. 1981. Low-molecular-weight carbohydrate in some salt stressed plants. *Physiologia Plantarum* 53: 27-33.
- Grigore, M.N., Boscaiu, M., Vicente, O. 2011. Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of halophytes under natural conditions. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 5: 12-19.

- Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31: 149-190.
- Hanson, A.D., Scott, N.A., 1980. Betaine synthesis from radioactive precursors in attached, water-stressed barley leaves. *Plant Physiology* 66: 342-348.
- Hare, P.D., Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Heuer, B. 2003. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* 165: 693-699.
- Itai, C., Paleg, L.G. 1982. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. *Plant Science Letters* 25: 329-335.
- Kant, S., Kant, P., Raveh, E., Barak, S. 2006. Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na uptake in *T. halophila*. *Plant, Cell and Environment* 29: 1220-1234.
- Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M., Altunlu, H. 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental And Experimental Botany* 60: 397-403.
- Khan, M.I., Khan, M.A., Khizar, T. 1976. Plant growth regulators from species differing in salt tolerance as affected by soil salinity. *Plant and Soil*. 45, 267-271.
- Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M. 2000. The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments* 45: 73-84.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H., Abdelly, C. 2010. Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Advances in Botanical Research* 53: 117-145.
- Lauchli, A., Epstein, E. 1990. Plant responses to saline and sodic conditions. En: Tanji, K.K. (Ed.), *Agricultural Salinity Assessment and Management*. American Society of Civil Engineering, New York. pp113-137.
- Marcum, K.B., Murdoch, C.L. 1992. Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. *New Phytologist* 120: 281-288.

- Mass, E.V., Hoffman, G.J. 1977. Crop salt tolerance current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*. American Society of Civil Engineering. 103: 115-134.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Naidoo, G.R., Rughunanan, R. (1990). Salt tolerance in the succulent halophyte, *Sarcocornia natalensis*. *Journal of Experimental Botany* 41: 497-502.
- Nawaz, K., Ashraf, M. 2007. Improvement in salt tolerance of maize by exogenous application of glycinebetaine: growth and water relations. *Pakistan Journal of Botany* 39: 1647-1653.
- Nawaz, K., Ashraf, M. 2010. Exogenous Application of Glycinebetaine Modulates Activities of Antioxidants in Maize Plants Subjected to Salt Stress. *Blackwell Verlag GmbH*. 196, 28-37.
- Ortolà, A. 2003. Ecofisiologia vegetal. Introducció a la fisiologia de l'estrés. Ed. UPV, Valencia.
- Rhodes, D., Hanson, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher-plants. *Annu. Rev. Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 44: 357-384.
- Rivas-Martinez, S. 2004. Clasificación Bioclimática de la Tierra. En: http://www.globalbioclimatics.org/book/bioc/global_bioclimatics_1.htm
- Robinson, S.P., Jones, G.P. 1986. Accumulation of glycine betaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 659-668.
- Sakamoto, A., Murata, N. 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of some stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 51: 81-88.
- Sakamoto, A., Murata, N. 2002. The role of glycinebetaine in the protection of plants from stress: clue from transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 25: 63-71.
- Sanchís, E., Rubio, J.L., Andreu, V. 1998. Los suelos de la Devesa de la Albufera. *Revista Valenciana d'estudis autonòmics* 22: 129-144.
- Sanchís, E., Rubio, J.L., Mansanet, J. 1986. Soils and vegetation in Mount Dehesa de La Albufera (Valencia). *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 26: 435-450.
- Saradhi, P., Alia, P., Arora, S., Prasad, K.V. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209: 1-5.
- Scridon, S., Boscaiu, M., Mora, E., Vicente, O. 2010. Determination of the level of Proline in different plant species tolerant to saline stress. *Bulletin USAMV Horticulture* 67: 86-90.

- Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D.P.S., Sayre R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14: 2837-2847.
- Subbarao, G.V., Wheeler R.M., Levine L.H., Stutte G.W. 2001. Glycinebetaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *Journal of Plant Physiology* 158: 767-776.
- Syverstein, J.P., Boman, B., Tucker, D.P.H. 1989. Salinity in Florida citrus production. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* 102: 61-64.
- Szabados, L., Savoure, A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15: 89-97.
- Thiery, L., Leprince, A., Lefebvre, D., Ghars, M.A., Debarbieux, E., Savoure, A. 2004. Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 14812-14818.
- Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhaze, C., Ainouche, A., Monnier, C., Ozkum, D., Larher F. 2006. Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany* 57: 139-153.
- Türkan, I., Demiral, T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* 67: 2-9.
- Umezawa, T., Fujita, M., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes unlock the future. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 113-122.
- Ungar, I.A. 1991. *Ecophysiology of vascular halophytes*. CRC Press, Boca Raton. 209pp.
- Universitat de les Illes Balears. 2007. Herbari virtual de les Illes Balears. <http://herbarivirtual.uib.es/cat-med/index.html> (13 de febrer de 2012).
- Verbruggen, N., Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M.A., Estrelles, E., Bellés, J.M., Soriano, P. 2004. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments* 58: 463-481.
- Vinocur, B., Altman, A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Wang, W.X., Vinocur, B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.

- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J.K. 2001. The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress and osmotic stress responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Xiong, L., Zhu, J.K. 2002a. Salt-stress signal transduction. En: Scheel, D., Wasternack, C. (Eds.). *Plant Signal Transduction, Frontiers in Molecular Biology Series*. Oxford University Press, England. pp165-197.
- Zhu, J.K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 941-948.
- Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.