

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

ESCUELA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

LICENCIADA EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA POLITECNICA
SUPERIOR DE GANDIA

**“Efectos de los cationes calcio y
magnesio sobre la germinación de
semillas de *Juncus* en condiciones de
estrés salino”**

***TRABAJO FINAL DE
CARRERA***

Autor/es:
Elena Sarria Perea

Director/es:
**Mónica Bosaciu Neagu
Óscar Vicente Meana**

GANDIA, 2010

*Dedicado a mi
tutora, familia,
amigos y a todas
aquellas personas
que con su apoyo han
hecho posible la
realización de este
proyecto.*

A todos gracias

ÍNDICE

ÍNDICE	4
INTRODUCCIÓN	4
1. La Albufera y su Devesa.....	5
2. Plantas halófitas	14
3. Características de las especies estudiadas.....	17
4. Efectos de las sales NaCl, CaCl ₂ , MgCl ₂ sobre las plantas	22
4.1. Efectos del NaCl.	22
4.2. Efectos del CaCl ₂	23
4.3. Efectos del MgCl ₂	23
Sobre los efectos que el cloruro de magnesio puede causar en la germinación de las plantas halófilas no se encuentra apenas información, se puede decir que es una gran desconocida. No obstante, está comprobado que todas las sales producen efectos inhibitorios sobre este tipo de plantas, si bien es cierto que no todas actúan con la misma intensidad	23
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y METODOS.....	28
1. Material	29
1.1. Material biológico.....	29
1.2. Material de laboratorio.....	29
2. Métodos	30
2.1. Germinación de las semillas.	30
2.2. Análisis de los datos.	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
1. FASE 1: Ensayos previos.	35
4.1.1. Efecto del NaCl.....	35
1.2. Efecto DE CaCl ₂	36
1.3. Efectos de MgCl ₂	38
2. Fase 2: Estudio sobre la influencia de los cationes Ca ²⁺ y Mg ²⁺ en la germinación de semillas de juncos en condiciones de estrés salino.	40
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	55

INTRODUCCIÓN

1. La Albufera y su Devesa.

A lo largo de la historia tanto del lago de la Albufera como de la Devesa fueron, durante siglos, propiedad real. Posteriormente pasaron a formar parte del patrimonio estatal hasta que en 1927 fueron “cedidos” al Ayuntamiento de Valencia. La larga pertenencia a la corona española y las restricciones en la explotación para los ciudadanos, explican que estos espacios naturales mantuvieran un estado de conservación aceptable a pesar de estar cerca de núcleos densamente poblados e intensamente desarrollados. A finales de los años 60, en pleno “boom” del turismo español, se inicia un proceso de urbanización en la Devesa que altera gravemente los ecosistemas, situación que se repite en todo el litoral mediterráneo español. El cordón dunar exterior fue arrasado casi en su totalidad, las depresiones interdunares rellenadas con arena y repobladas por eucaliptos y la alineación dunar interior fue fragmentada con la construcción de carreteras, edificios y estructuras hidráulicas y eléctricas. A finales de los años 70 la presión popular frenó la destrucción de este espacio y en 1983 el ayuntamiento de Valencia aprobó el Plan Especial de Protección y Reforma Interior del Monte de la Devesa de El Saler que constituyó el instrumento jurídico base en el principio de la recuperación de los ecosistemas. Hoy en día y desde 1986, la Devesa forma parte del Parque Natural de la Albufera de Valencia. En 1981 con la finalidad de conservar y recuperar, desde su ámbito competencial el conjunto natural constituido por la Devesa, la Albufera y el arrozal, el Ayuntamiento de Valencia crea la Oficina Técnica Devesa-Albufera (OTDA). Dependiente de esta y con objeto de producir la planta autóctona necesaria para recuperar estos espacios naturales, se crean los Viveros Municipales del Saler, pineros en estas características en toda España.

El Espacio Natural formado por el lago de la Albufera y su entorno fue declarado Parque Natural el 8 de julio de 1.986. Cuenta con una superficie de 21.000 hectáreas repartidas en trece términos municipales: Valencia, Alfafar, Catarroja, Silla, Sueca, Sollana, Massanassa, Sedaví, Albal, Albalat de la Ribera, Cullera, Beniparrell y Algemesí.

Es en la actualidad uno de los fenómenos litorales más interesantes de la Península Ibérica, tanto por su extensión como por ser uno de los pocos medios sedimentarios palustres todavía funcionales.

- Marjal: tierras que anteriormente formaban parte del lago y que ahora están dedicadas al cultivo del arroz. Sus cerca de 14.000 hectáreas son la área más extensa del Parque, representando las zonas llanas inundables y formando un paisaje agrario con gran significado histórico en el contexto valenciano. Aunque se trata de un medio antropizado y sometido a un régimen de explotación intensiva, el arrozal constituye un hábitat imprescindible para el funcionamiento del sistema ecológico de la Albufera y una actividad económica tradicional de la población de la zona.

El arrozal confiere una clara estacionalidad a todo el sistema, con las alternancias de inundación/desecación de los campos y el crecimiento de la planta, que hacen variar considerablemente la extensión y características de la superficie inundada.

- Lago: tiene una superficie media de 2800 Ha, de las cuales 350 son de vegetación palustre. En él hay que diferenciar, de una parte, las aguas libres y, por otra, las orillas y matas, cuya conjunción posibilita el desarrollo de su característica diversidad de comunidades vegetales y animales. La profundidad del lago es escasa, con una media inferior a los 80 cm, aunque en algunos puntos llega a alcanzar los 2 metros. El lecho del lago se compone, por lo general, de finos limos con un elevado contenido en materia orgánica.

- Monte: las zonas de montaña están escasamente representadas, únicamente cabe nombrar los relieves de origen cretácico situados en el término de Cullera (Cabeçol) y en el término de Sueca (relieve calcáreo dels Sants de la Pedra). Las parcelas 2 y 3 de nuestra zona de estudio se encuentran dentro de la Devesa o restinga del Parque Natural de la Albufera. Más concretamente los juncales que existen en la Devesa los encontramos en las llamadas “malladas”.

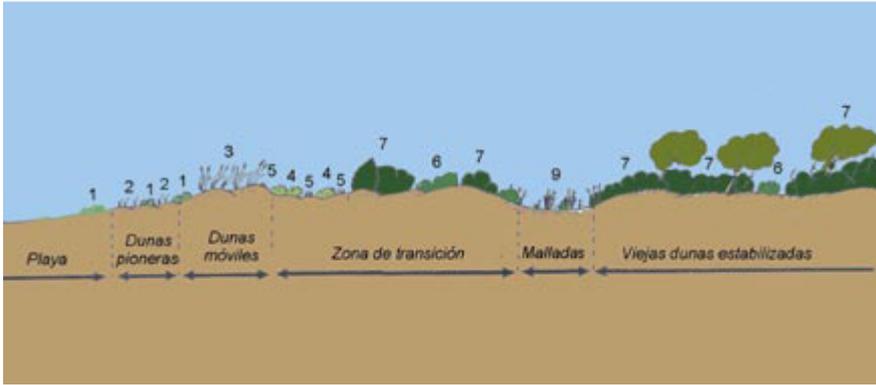


Figura 2: Reconstrucción de las unidades geomorfológicas de la Devesa .

Dentro de los cuatro habitat mencionados anteriormente, se prestará especial interés a la Devesa, ya que en ella se encuentran las formaciones conocidas con el nombre de “malladas”, en las cuales se hallan las especies estudiadas. Se trata de pequeñas cuencas endorreicas situadas entre los cordones dunares. Estas depresiones se caracterizan por la proximidad del nivel freático y la existencia de una capa impermeable de naturaleza limosa en su base, lo que permite su encharcamiento temporal, coincidiendo con la época de lluvias.

Originariamente las malladas ocupaban un extenso territorio en las costas valencianas. Esta superficie se vio disminuida por una serie de actuaciones realizadas sobre todo a partir de la década de los años cincuenta que han conducido a la casi total desaparición de las mismas, aunque en la actualidad se han llevado a cabo programas de recuperación de estos espacios (sobre todo a partir del año 1987) que consisten en el vaciado mecánico.

Las zonas de malladas se encuentran generalmente recubiertas de una delgada capa de limos y arcillas. En el subsuelo, las arenas continúan hasta una profundidad de unos 15 m y bajo ellas se ha detectado una capa continua de limos.

En la Comunidad valenciana, las malladas de la Devesa del Saler son las mejor estudiadas desde el punto hidrogeológico, edafológico y fitosociológico. Las aguas almacenadas en el subsuelo de la Devesa proceden de las lluvias y de las infiltraciones laterales desde el Lago de la Albufera. Como se ha mencionado anteriormente, el límite inferior del acuífero lo constituye una capa de limos, que por presentar una permeabilidad mucho más baja que la de las arenas impide o retrasa enormemente el descenso de las aguas a mayor profundidad.

La capa freática se extiende a modo de manto subterráneo por todo el subsuelo de la Devesa, a cotas siempre superiores del nivel del mar. Dicha capa freática entra en contacto con las masas de agua adyacentes: por el Este con el mar y por el Oeste con las aguas del lago. Es importante conocer que las cotas máximas que alcanza la capa freática las encontramos en la zona central de la Devesa, es decir, la zona en que se encuentran las malladas.

En las situaciones climatológicas habituales se produce una incorporación de agua desde el acuífero hacia los límites laterales (mar y lago) pero si se produjera un periodo prolongado de sequía la capa freática llegaría a adoptar una forma plana entre el nivel del mar y el del lago.

Se ha detectado incluso una alimentación directa de aguas del lago hacia el acuífero de la Devesa. Esto se produce cuando, en épocas de sequía prolongada en las que la capa freática se encuentra bastante deprimida y coincidiendo con los meses en los que el nivel de las aguas del Lago de la Albufera son los mayores del año (debido a la regulación artificial del las aguas del Lago mediante las compuertas de las Golas).

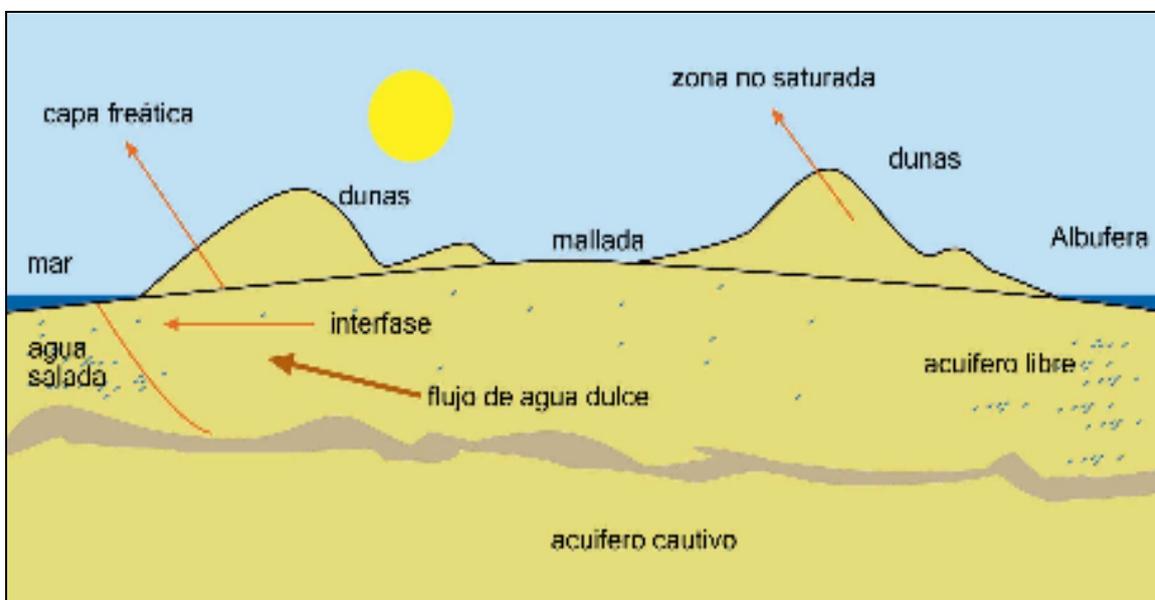


Figura 3: Corte hidrológico transversal de la Devesa (Modificado de Herrero González, 2000).

Según datos de la bibliografía consultada (Sanchis, 1983, Sanchis *et al.*, 1998) respecto a las características físico-químicas de los suelos de las malladas existe una

variabilidad zonal en la salinidad que va desde valores elevados hasta valores moderados.

En las zonas de mallada en las que existe una capa definida de limos en profundidad que es capaz de retener el agua, la salinidad es superior, llegando a valores de conductividad eléctrica en el extracto saturado a 25ª de 37,5 dS/m (en el suelo – de 0 a 20 cm de profundidad) y 140 dS/m en el subsuelo. En estas zonas el perfil del suelo está afectado por la salinidad y el hidromorfismo diferenciándose un horizonte superficial arenoso y en profundidad un importante aumento de la fracción de limos. En estas zonas existe mayor encharcamiento por el efecto de la capa de limos que evita el drenaje. Además, en la época estival puede aparecer en su superficie una costra salina. Las comunidades vegetales más características pertenecen a la clase de vegetación *Arthrocnemetea* Br. – Bl. & R.Tx.

Sin embargo existen zonas de mallada en las que la salinidad no alcanza valores tan elevados; estas son las llamadas praderas halófilas. Estos suelos tienen una elevada proporción de arenas y no presentan una capa de limos que retengan el agua. No obstante la presencia limos está suplida por una capa de arena muy compacta que puede asemejar en su comportamiento a los limos. Aún existiendo esta capa de arena compacta la dificultad del lavado es menor y por ello los niveles salinos son más bajos con valores en el suelo de 5,2 dS/m y de 7,5 dS/m en el subsuelo. Estas zonas no suelen inundarse excepto en la época de lluvias (otoño) pero mantienen la humedad en profundidad durante todo el año por la proximidad del nivel freático. Las comunidades características pertenecen a la clase de vegetación *Juncetea maritimi* Br. – Bl.

A continuación se presentan las comunidades vegetales de estas dos clases de vegetación mejor representadas en la Devesa del Saler según Costa y Boira (1981) y Costa *et al.*, 1986).

A) *Arthrocnemetea* Br. – Bl. & R.Tx.

Son muy frecuentes las formaciones de halófilas crasicuales perennes, que constituyen una vegetación caméfito vivaz fruticosa muy pobre en especies y con dominio de las plantas leñosas y suculentas, acompañadas de alguna herbácea vivaz. Se desarrollan fundamentalmente en suelos fuertemente salinos, con una elevada

proporción del ion sodio en su estructura, más o menos húmedos, que ocasionalmente pueden estar encharcados o inundados por agua salobre de procedencia marina, aunque también pueden darse en zonas endorréicas del interior continental. Se trata de una vegetación que tiene su óptimo en la cuenca mediterránea, teniendo una buena representación en nuestro territorio. Entre las especies dominantes destacan las cirialeras *Sarcocornia fruticosa*, *Arthrocnemum radicans* y *Arthrocnemum macrostachyum*; el dominio de una u otra va a depender del grado de humedad del suelo. La apariencia de estas formaciones es muy peculiar, ya que cubren grandes extensiones de aspecto uniforme alternando con las comunidades dunares y con los carrizales y juncales. A pesar de su aparente uniformidad, existen ciertas peculiaridades ecológicas y corológicas que condicionan algunas diferencias florísticas en base a las cuales se pueden establecer distintas comunidades.

- *Puccinellio festuciformis-Arthrocnemetum fruticosi* Br. – Bl. 1931 em. nom. J.M. Gehu 1976. Se trata de una comunidad muy localizada en la Devesa. Bien estructurada sólo se encuentra en la Mallada Llarga y en la del Garrofer. Es una formación en la que domina con gran biomasa *Sarcocornia fruticosa* confiriéndole un aspecto monoespecífico. Las zonas que ocupan cumplen lo ya comentado: encharcamiento temporal y desecación total en verano con formación de costras salinas. El suelo texturalmente suele variar desde franco arenoso al franco limoso. La textura del suelo es un factor condicionante. En la Devesa se reconoce una subasociación *sporoboletosum pungentes* en la que *Sporobolus pungens* y *Limonium girardianum* son los elementos diferenciales. Cuando el suelo se hace franco limoso entonces se hacen abundantes *Puccinella festuciformis* y *Halimione portulacoides*, reconociéndose una subasociación *halimionetosum portulacoidis*, muy rara en la Devesa.

- *Arthrocnemo-Juncetum subulati* Brullo & Furnari 1976. Se trata de una comunidad más halófila que la anterior. Tiene en Valencia buena representación en las costas de l'Horta Nord y Camp de Morvedre. En la Devesa de la Albufera es muy escasa y está mal estructurada. Debió tener muy buena representación antes de los destrozos infringidos en la Devesa.

B. *Juncetea maritimi* Br. – Bl.

Cuando el medio no es tan halófilo, bien por presentarse una textura arenosa que por su mayor permeabilidad y estructura grosera retiene poco las sales en disolución, o bien porque el mayor encharcamiento y mantenimiento de la humedad en verano no permite una elevada concentración en cloruros, por lo que no llegan a formarse costras salinas las comunidades comentadas de cirialeras y limonios son reemplazadas por formaciones muy ricas en juncáceas, ciperáceas y gramíneas, aún halófilas, aunque en menor medida. Son las conocidas "praderas saladas o juncales" tan características de estos ecotopos pudiéndose encontrar también en los cinturones exteriores de las malladas, al existir en esta zona una concentración salina menor. Estas comunidades con aspecto juncal desplazan a las formaciones de *Arthrocnemetea* con las que contacta y alterna según las condiciones ecológicas del enclave. El óptimo de este tipo de vegetación es eurosiberiano, aunque alcanza la región mediterránea donde llega a tener una buena representación.

Son varias las asociaciones que se encuentran en nuestro territorio pertenecientes a esta clase:

-*Schoeno-Plantaginetum crassifoliae* Br-Bl. 1931. Se encuentra orlando las malladas y representa la unión entre los saladares y la vegetación fruticosa de las dunas. Es una de las comunidades más frecuentes en las malladas y representa la unión entre los saladares y la vegetación fruticosa de las dunas. Suele situarse en suelos arenosos y muy permeables, de ahí la abundancia de la comunidad en el área estudiada, donde está representada por la asociación *plantaginetum crassifoliae*. Presenta un aspecto muy característico, dominando el junco negro (*Schoenus nigricans*) y *Plantago crassifolia*, acompañadas por otros halófilos, juncáceas y ciperáceas. Las especies características de esta asociación son: *Schoenus nigricans*, *Plantago crassifolia*, *Dorycnium gracile*, *Linum maritimum*, *Scirpus holoschoenus*.

- *Carici extensae-Juncetum maritimae* Rivas-Martinez & Costa ¿??. Es característica de ciertas depresiones del litoral en las que se da un mayor encharcamiento y retención de humedad en el verano haciendo que la halofilia disminuya, apareciendo las verdaderas praderas de juncales con dominancia de *Juncus maritimus*. Esta es una comunidad abundante que puede contactar, bien con la comunidad anterior, o bien con las

psamófilas cuando aparecen ciertas condiciones arenosas en la depresión interdunar. Las especies características de esta asociación son: *Carex extensa*, *Carex distans*, *Juncus maritimus*, *Centaurea dracunculifolia*, *Elymus elongatus*, *Linum maritimum*, *Dorycnium gracile*, *Epilobium hirsutum*, *Sonchus maritimus*

- *Spartino-Junceum maritimi* O.Bolos 1962. Probablemente de todas las praderas juncuales, es ésta la asociación menos exigente en humedad; representa el tránsito de las comunidades Halófitas a las de agua dulce y contacta frecuentemente con los carrizales de acequias y albuferas. *Spartina maritima*, *Juncus maritimus* y *Juncus acutus* forman la biomasa fundamental de la comunidad, que puede variar según sean las características texturales del suelo y la humedad.. Cuando el suelo es arenoso y muy húmedo, domina *Spartina*, cuando se hace más seco y arcilloso, *Juncus maritimus*. En todas las praderas juncuales halófilas no son raros algunos vegetales como *Inula crithmoides*, *Limonium vulgare*, *Limonium maritimu*, *Agropyrum elongatum* e incluso, en ocasiones, sobre todo en las situaciones más secas, *Sarcocornia fruticosa*.

Los saladares litorales participan en los procesos de sedimentación en las zonas costeras, así como en la conservación de la reserva natural de flora y fauna. Juegan también un papel esencial en las cadenas tróficas litorales, siendo una importante fuente de materia orgánica y nutrientes para un gran número de comunidades marinas. Actualmente este tipo de ecosistemas se ven muy amenazados, fundamentalmente por actividades antropogénicas (polución industrial, urbanización, cultivos agrícolas, etc.), que han deteriorado muchos los saladares existentes en el mundo. En la Comunidad Valenciana la situación de estos hábitats es particularmente crítica. Muchos de ellos ya habían sido destruidos en el pasado, debido a su transformación para usos agrícolas o su desecación por miedo al paludismo. El hecho de que la franja costera de la Comunidad Valenciana soporta prácticamente la totalidad de la actividad agrícola, gran parte de la actividad industrial y grandes núcleos de población, junto con una enorme presión turística, ha sometido los ecosistemas de dunas y saladares a grandes impactos durante las últimas décadas, provocando la degradación irreversible de muchos de estos espacios naturales, ya que los ecosistemas que integran las halófitas son muy frágiles y complejos. La flora de los marjales y saladares litorales valencianos incluye taxones de gran interés, algunos endémicos o amenazados, lo que ha llevado a que gran parte de los

que aún se mantienen sin alteraciones mayores sean hoy espacios protegidos. De acuerdo con las disposiciones de la ley 11/1994, de la Generalitat Valenciana, de Espacios Naturales Protegidos, todas las lagunas costeras han sido incluidas en el Catálogo de Zonas Húmedas, aprobado por el Gobierno Valenciano en 2002. De hecho, todas las lagunas costeras han sido propuestas como LICs y se integrarán próximamente en la red Natura 2000 como ZECs o ZEPAs. Además, muchas microreservas, algunas dedicadas a la protección de la vegetación halófila, también se localizan en estos humedales. Estas acciones se integran en importantes esfuerzos de conservación y reconstitución de los saladares dominados por comunidades de halófitas. Sin embargo, se requiere profundizar en el estudio de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas de saladar, para integrar los conocimientos sobre las comunidades vegetales que les constituyen, y en su ecofisiología, y poder así establecer medidas de conservación de los saladares existentes y estrategias apropiadas para la rehabilitación de zonas degradadas con alta salinidad del suelo.

2. Plantas halófitas

Entendemos por hábitat, cada uno de los ambientes homogéneos que, compartiendo una vegetación semejante, podemos encontrar en la naturaleza y en los lugares transformados por el hombre. Existen muchos tipos de hábitat, entre los cuales se encuentran los saladares. Estos son muy particulares debido a las condiciones adversas que los caracterizan. Las plantas que crecen en este tipo de hábitats están sometidas a inundaciones periódicas, abrasión y deposición causadas por las mareas y estrés salino (Ungar, 1991), estas reciben el nombre de halófitas o halófilas. Estas son las únicas capaces de crecer y reproducirse en este tipo de ambientes debido a sus adaptaciones fisiológicas.

El éxito de poblaciones de halófilas depende enormemente de la respuesta de germinación de sus semillas particularmente en climas templados, mientras la germinación de semilla en hábitats subtropicales confiere una ventaja optima. Los suelos donde crecen normalmente las halófilas se hacen más salinos debido a la evaporación rápida del agua particularmente durante el verano, por lo tanto, la salinidad

del suelo tiende a aumentar junto con los potenciales osmóticos. Además la germinación de las semillas en regiones áridas y semiáridas y concretamente en la zona mediterránea donde se encuentran la gran mayoría de las especies de halófilas en España, por lo general ocurre después de las lluvias por que es cuando la salinidad del suelo disminuye y tiene lugar para la época de otoño y primavera. La germinación de halófilas podría ser inhibida en condiciones de salinidad debido a; 1) una inhibición completa de la germinación por superar el límite de tolerancia a la salinidad de la especie, 2) el retraso de la germinación de semillas en las salinidades que causan alguna tensión a estas, 3) pueden causar la pérdida de viabilidad de semillas debido a la alta salinidad y la temperatura y 4) el trastornando del equilibrio regulador del crecimiento en el embrión. Hay muchos otros factores aparte de la salinidad que también afectan a la germinación como son la humedad, la luz, aumento de temperaturas y sus interacciones. (Khan & Weber, 2008).

Entre los diferentes factores que afectan a las plantas halófilas uno de los más relevantes es el estrés salino, el cual es producido por la elevada concentración de iones

El estrés salino tiene dos componentes que afectan negativamente al crecimiento de vegetal:

- Componente osmótico: La elevada concentración salina provoca un descenso del potencial hídrico del suelo, es decir, se hace más negativo aunque aumenta el valor absoluto, lo cual induce estrés hídrico en las plantas.
- Componente iónico: Son los efectos tóxicos provocados por altas concentraciones de iones. Caben destacar el Cl^- y Na^+ ya que son de los más abundantes y tóxicos para las plantas, aunque existen otros que también pueden ocasionar problemas(García Ortola, 2002).

Con el paso del tiempo las plantas halófitas, como todo ser vivo, han ido adaptándose a las condiciones hostiles que caracterizan a su entorno(habitat), mediante de una serie de mecanismos entre los que se encuentran:

- ELIMINACIÓN DE SALES (excreción): quizás es el comportamiento de auto-protección más inmediatamente observable. Este ajuste está caracterizado por la secreción de sales a través de poros epidérmicos, glándulas y cámaras localizadas en las raíces, brotes y hojas de las plantas. Los mecanismos de transporte intercelular movilizan el exceso de iones salinos desde las células de la superficie hacia el

exterior de la hoja o tallo dejando unos depósitos de cristales visibles una vez se ha evaporado el agua. Las halófitas más evolucionadas utilizan este mecanismo a menudo para desalinizar sus fluidos internos excretando iones de sodio y cloro en los periodos más críticos de su desarrollo (García Ortola, 2001).

- **COMPARTIMENTACIÓN:** la acumulación o compartimentación del exceso de sales en ciertos órganos de la planta es otro método de exclusión que predomina en el nivel radicular. Como resultado del cierre de los estomas y tasas de transpiración reducidas, muchas halófitas son capaces de confinar el exceso de sales en su extenso sistema radicular y en las partes más bajas del brote con el objetivo de restringir la translocación hacia el resto de la planta.
- **SELECTIVIDAD IÓNICA:** virtualmente, todas las halófitas y algunas glicófitas son capaces de excluir los iones sodio y cloro de su corriente de nutrientes absorbidos. La exclusión de las sales por parte de las raíces se describe habitualmente en términos de sustitución elemental o de selección iónica preferente por el potasio sobre el sodio. Además, las halófitas verdaderas son conocidas por tener raíces con una capa protectora externa y una membrana interna con ceras que filtra las sales efectivamente mientras permite pasar las sales.
- **OSMORREGULACIÓN:** el mantenimiento del equilibrio osmótico requiere la síntesis y acumulación en el citoplasma de osmolitos (compuestos solubles compatibles), que son metabólicamente inactivos y no tóxicos, incluso a concentraciones elevadas. Estos compuestos orgánicos son principalmente azúcares (trehalosa, sacarosa), polialcoholes (glicerol, sorbitol, manitol) y algunos aminoácidos y derivados (prolina, glicina betaina). Además de mantener el equilibrio osmótico en condiciones de estrés salino, los osmolitos actúan como sustancias osmoprotectoras, estabilizando directamente proteínas y membranas celulares en condiciones de deshidratación, y protegiendo a las células del estrés oxidativo, al inactivar “especies reactivas de oxígeno” (GENO).

- DILUCIÓN: Como respuesta al estrés salino algunas halófilas acumulan agua en las vacuolas de las células de sus tallos y hoja, que les confiere aspecto crasuláceo. El aumento del volumen de vacuola permite una mayor acumulación de iones tóxicos.

3. Características de las especies estudiadas

Las dos especies estudiadas en el proyecto pertenecen a la familia de las Juncáceas o Juncaceae, dentro de la cual se distinguen el género LUZULA y el género JUNCUS (Mateo Sanz & Crespo Villalba).

En general, las plantas del género *Juncus* son herbáceas, anuales o perennes (estas rizomatosas en la mayoría de las especies), siempre glabras. Tallos erectos o ascendentes, a veces radicales en los nudos (en ocasiones parcialmente sumergidos), cilíndricos o ligeramente comprimidos, lisos o estriados. Hojas todas basales o basales y caulinares; vainas foliares provistas en general de márgenes escariosos, los cuales en muchos casos se prolongan en dos aurícula; limbos foliares planos, canaliculados, convolutos, semicilíndricos, cauliformes, o cilíndricos septado nudosos. Inflorescencia pauciflora o multiflora frecuentemente en antela compuesta, formando a veces las ramas terminales cimas drepaniformes, fascículos o glómérulos (Fernández-Carvajal, 1981).

TAXONOMIA

Delimitación de los subgéneros: en la revisión del género *Juncus* en la Península Ibérica (Fernández-Carvajal, 1981) se adopta el sistema propuesto por Buchenau (1906) de separación del género *Juncus* en subgéneros, basándose fundamentalmente en la diferenciación de estos en caracteres foliares (estructura, disposición). El autor describe ocho subgéneros:

- I. *Juncus* subgen. *Juncus*
- II. *Juncus* subgen. *Genuini* Buchenau
- III. *Juncus* subgen. *Subulati* Buchenau

- IV. *Juncus* subgen. *Pseudotenageia* Krecz. & Gontsch. in Komarov
- V. *Juncus* subgen. *Poliophylli* Buchenau
- VI. *Juncus* subgen. *Juncinella* (Fourr.) Krecz. & Gontsch. in Komarov
- VII. *Juncus* subgen. *Septati* Buchenau
- VIII. *Juncus* subgen. *Alpini* Buchenau

Las dos especies estudiadas pertenecen al subgénero *Juncus* que presenta las características que se describen a continuación (según Fernández-Carvajal, 1982):

Plantas perennes, erectas, fuertes, punzantes, en general densamente cespitosas. Hojas todas basales, cilíndricas, no septadas, con vainas no auriculadas. Médula de los tallos y hojas continua, constituida por células parenquimatosas, redondeadas o redondeado-poliédricas. Inflorescencia terminal o pseudolateral, antelada. Flores originalmente reunidas en número de 2-5 en fascículos o glomérulos, sin bracteolas involucrales. Anteras más largas que los filamentos. Semillas apendiculadas por prolongación de la testa.

Especie tipo: *Juncus acutus* L.

Distribución general: por todo el mundo, aunque principalmente áreas templadas y subtropicales.

Representación en la Península Ibérica por las especies: *J. maritimus* Lam. , *J. acutus* L. y *J. littoralis* C.A.Meyer.(GENO).

ESPECIES ESTUDIADAS

JUNCUS ACUTUS. L.

Nombre común: Junco silvestre, junquera.

Descripción: Hierba perenne de (25-)40-180(-200) cm de alto, densamente cespitosa, con un grueso y breve rizoma. Tallos muy fuertes, erguidos, cilíndricos, (1,5-)2-4 mm diámetro, ligeramente estriados en seco. Vainas basales de color avellana o castaño, brillantes, algunas afilas y 2-5 provistas de limbo cilíndrico, muy fuerte, similar al tallo

y ordinariamente menor que éste, punzante; aurículas ausentes. Inflorescencia antelada, multiflora, 3-20(-28) cm de longitud pudiendo presentarse desde compacta, globosa hasta alargada, laxa. Bráctea inferior pareciendo continuación del tallo, 3-28 (-42) cm largo, con una amplia vaina; la superior casi siempre más corta que la inflorescencia, raramente igualándola; ambas punzantes. Flores solitarias o agrupadas en glomérulos, en número de 2-5. Tépalos iguales o subiguales, oblongos, 2,4-3,5(-4) mm largo, rígidos, de color castaño al menos superiormente; los externos subcimbiformes obtusos o subagudos, mucronados, con estrechos márgenes escariosos; los internos obtusos, mucronados, provistos de amplias aurículas escarioso-hialinas. Estambres en número de 6, poco más cortos que los segmentos perianticos; anteras de (1-) 1,3-1,8 mm, aproximadamente 3-4 veces más largas que los filamentos. Estilo 0,5-0,8 mm largo; estigmas 1,5-2 mm largo. Cápsula ferruginea o castaña, brillante, incompletamente trilobular, ovoide-subesferoidea, apicalmente cónica, brevemente mucronada, 4-5,5(-6) mm largo, alcanzando por tanto, 1,5-2 veces la longitud del perianto. Semillas ferrugíneas, oblicuamente ovoides, con estriación longitudinal apenas marcada, (1-) 1,2-1,7 mm incluyendo los apéndices escarioso-hialinos (iguales o subiguales) que forman la testa, generalmente en número superior a 80.

Ecología. Convive con *J. maritimus* formando parte de las praderas-juncuales salinas del litoral e interior, sobre suelos que permanecen húmedos prácticamente durante todo el año. También es frecuente formando amplios rodales en las dunas próximas a las desembocaduras de corrientes de agua dulce .

Corología: mediterraneo-atlantica

Distribución general: Europa occidental; región mediterránea; Islas Canarias; Madeira; este de Norteamérica; zonas cálido-templadas de Sudamérica; sur de África; Australia; Nueva Zelanda.

Tipo biológico: hemicriptófito, cespitoso

Fenología: mayo- julio.

Abundancia: media



Foto 1: *J. acutus* (herbário virtual)



Foto 2: *J. acutus* en habitat dunar.

JUNCUS MARITIMUS. Lam.

Nombre común: Junco marino.

Descripción: Planta verde-pajiza, perenne, con una altura de 4-15 dm aunque en muchas ocasiones puede sobrepasar 1 m de altura, con un grueso rizoma horizontal de 2,5-8 mm de diámetro y entrenudos de longitud muy variable. Tallos erectos, cilindricos de (1-) 1,5-2,5 (-3,5) mm de diámetro, lisos o suavemente estriados en seco, rodeados inferiormente de 2-5 vainas de color pardo, brillantes, afilas, mucronadas. Hojas todas basales, en número de 2-4, con el limbo cilindrico, punzantes, casi siempre más cortas que el tallo y, como éste, provistas de médula continua. Inflorescencia antelada, multiflora de 2,5-25(-42) cm de largo, ordinariamente laxa, aunque en ocasiones se presenta más o menos contraída. Bráctea inferior apareciendo como continuación del

tallo, punzante, igualando, no alcanzando o superando la longitud de la inflorescencia; bráctea superior también punzante pero mucho más breve y delgada que la anterior. Flores ordinariamente pajizas o verde-amarillentas, solitarias o en fascículos de 2-3(-7); segmentos del perianto desiguales, con anchos márgenes escarioso-hialinos, los externos ovados, cimbiformes, agudos, brevemente mucronados, (2,5-)3-3,6(-4) mm de largo; los internos más cortos (2,1-)2,5-3(-3,5) mm, estrechamente elípticos, obtusos. Seis estambres (raramente 3) alcanzando casi los 2/3 de la longitud del perianto; anteras de 0,8-1,5(-1,8) mm, aproximadamente (1,5-)2(-2,5) veces más largas que los filamentos (0,4-0,7 mm). Estilo 1,2-1,5 mm; estigmas cortos. Cápsula trilocular 2,5-4 mm de longitud, trigono-ovoide, obtusa o subaguda, mucronada, igualando o excediendo ligeramente el perianto, de color amarillento a pardo claro, poco brillante. Semillas oblicuamente ovoideas, apendiculadas por prolongación de la testa, de 0,7-1,2 mm de largo, longitudinalmente estriadas, pardas.

Ecología. Entra a formar parte de las praderas-juncuales, típicamente halófilas, que se desarrollan sobre suelos permanentemente húmedos, ricos en cloruros—especialmente cloruro sódico— y con carbonatos alcalino-térreos (juncuales calizo-subsalinos).

Dichas agrupaciones son incluíbles en la alianza *Junción marítimi* Br.-Bl.

1931 — *Juncetalia marítimi* Br.-Bl. 1931 *Juncetea marítimi* Br.-Bl. (1931)

Corología: subcosmopolita.

Distribución general: Europa occidental y central; región mediterránea; África septentrional; Asia occidental; introducida en Norteamérica, aunque, según SNOGERUP (NILSSON & SNOGERUP, 1972:208), ahora se ha extinguido. SNOGERUP (1971:4) señala que existen muchas citas incorrectas de otras áreas.

Tipo biológico: neófito, rizomatoso.

Fenología: julio-septiembre.

Abundancia: abundancia media.



Foto 3: *J. maritimus* (hebario virtual)



Foto 4: *J. maritimus*

4. Efectos de las sales NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 sobre las plantas

4.1. Efectos del NaCl .

El ión más tóxico en suelos salinos es el catión Na^+ aunque esto no significa que otros iones no lo puedan ser.

¿Cómo daña la presencia de Na^+ al metabolismo de la planta?

- (1) Las proteínas que proporcionan una estructura óptima a la planta necesitan de un ambiente iónico adecuado, si se incrementa la concentración de sales cambiamos la configuración de estas proteínas ya que disminuyen los enlaces electrostáticos y aumentan los enlaces hidrofóbicos, pudiendo cambiar la función de la proteína lo cual afecta al metabolismo.

- (2) La presencia elevada de iones también afecta a las membranas. El efecto más espectacular lo vemos cuando pasamos una planta de baja a alta concentración iónica, la planta halófila presentará síntomas de shock salino y se da un flujo de iones K^+ hacia el medio exterior y la consiguiente desecación de la planta.. Si realizamos el cambio más paulatinamente a un ambiente con más fuerza iónica también tendremos efectos en las membranas pero no tan drásticos, serán efectos más tardíos, se produce un incremento en la absorción de K^+ y consecuentemente semanas después daños en la mb.

- (3) Debido a la competencia entre iones nutritivos y el $NaCl$, por ejemplo inhibición competitiva del K^+ por el Na^+ , interacciones en la absorción de Ca y Mg y también déficit de P aunque no por inhibición competitiva del K^+ por el Na^+ , sino más bien por un menor crecimiento radicular, menor eficacia para captarlo del suelo con aumento del flujo de masa de Ca^{2+} .

4.2. Efectos del $CaCl_2$.

Para crecer, las plantas necesitan un suministro adecuado de calcio, el cual entra en la planta disuelto en el agua que las raíces absorben del suelo circundante. A medida que el agua circula a través de la planta, el calcio es fijado donde sea necesario para aportar a las células vegetales su rigidez estructural. Los suministros de calcio que entran en la planta oscilan en el transcurso del día, cayendo a un mínimo en la noche. El calcio es un regulador clave de las funciones fisiológicas vitales tanto en los vegetales como en los animales. Las plantas sometidas a estrés salino debido a la toxicidad ejercida por los iones de Na^+ y Cl se ven afectadas negativamente. En algunos estudios se ha observado que cuando se les añade calcio, la funcionalidad se reestablece en parte, ya que el $CaCl_2$ protege a la membrana de los efectos adversos de la salinidad proporcionándole más estabilidad.

4.3. Efectos del $MgCl_2$.

Sobre los efectos que el cloruro de magnesio puede causar en la germinación de las plantas halófilas no se encuentra apenas información, se puede decir que es una gran desconocida. No obstante, está comprobado que todas las sales producen efectos

inhibitorios sobre este tipo de plantas, si bien es cierto que no todas actúan con la misma intensidad

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

De acuerdo con trabajos anteriores donde se estudia la acumulación de iones mono y divalentes en respuesta a tratamientos con concentraciones crecientes de NaCl, en dos especies de juncos de saladar muy emparentadas a nivel taxónomico, *Juncus acutus* y *J. maritimus* y observando los resultados obtenidos permiten proponer la hipótesis de la existencia de mecanismos de defensa frente al estrés salino, constitutivos (en *J. maritimus*) o inducibles por sal (en *J. acutus*), basados en la acumulación de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en las plantas.

Uno de los efectos deletéreos de la sal a nivel celular consiste en la inhibición por sodio de numerosas enzimas; en algunos casos concretos se ha demostrado que el efecto negativo del Na^+ es debido al desplazamiento del centro activo de iones Mg^{2+} requeridos para la actividad enzimática. Según esto, un aumento de la concentración intracelular de magnesio, sin llegar a niveles tóxicos, debería conferir una cierta tolerancia frente al estrés salino. Sin embargo, mientras que el efecto protector del calcio en condiciones de alta salinidad está bien establecido, que se sepa nunca se ha propuesto una función similar para el magnesio.

El objetivo principal de este proyecto consiste en la demostración de la hipótesis anterior, es decir, comprobar si la inhibición del crecimiento y desarrollo de las plantas, inducida por NaCl, disminuye en presencia de iones Ca^{2+} y/o Mg^{2+} . Para ello el estudio se centrará en una de las fases del ciclo biológico de las plantas más sensibles a estrés, como es la germinación de las semillas, utilizando las mismas especies de juncos con las que se realizaron los trabajos anteriores. Concretamente, se determinará el efecto de CaCl_2 y de MgCl_2 sobre los porcentajes de germinación de las semillas en presencia de concentraciones inhibitorias de NaCl.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- El primer objetivo consiste en comprobar que las semillas de las dos especies de Juncos se encuentran en perfectas condiciones para proceder con el experimento.
- Una vez verificado el primero se da paso al siguiente. Este segundo persigue obtener las concentraciones apropiadas de las diferentes sales con el fin de

realizar el estudio propuesto, sobre el efecto de los cationes calcio y magnesio en el porcentaje de germinación de las semillas de Juncos en condiciones de estrés salino.

MATERIAL Y METODOS

1. Material

1.1. Material biológico.

En este trabajo se han utilizado semillas de *Juncus acutus* y *Juncus maritimus*, proporcionadas por la Oficina Técnica Devesa-Albufera (Ayuntamiento de Valencia) de El Saler.

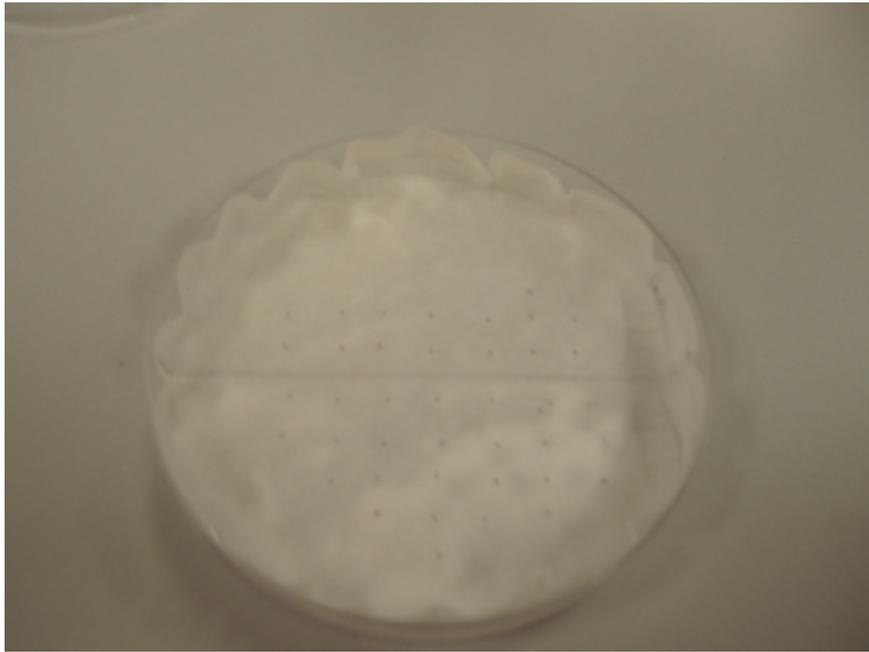


Foto 5: Ejemplo de placa con el material biológico incorporado.

1.2. Material de laboratorio.

La realización del presente trabajo ha requerido la utilización del equipo, pequeño instrumental de laboratorio y productos químicos que se indican a continuación:

- ❖ Balanza de precisión
- ❖ Microscopio
- ❖ Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- ❖ Micropipetas
- ❖ Matraces Erlenmeyer de 100 ml
- ❖ Matraces aforados de 100 ml
- ❖ Frascos
- ❖ Vasos de precipitados de 50 ml

- ❖ Espátulas
- ❖ Placas Petri
- ❖ Algodón
- ❖ Papel de filtro
- ❖ Pinzas
- ❖ Sales (NaCl, CaCl₂ y MgCl₂)
- ❖ Agua destilada

2. Métodos

2.1. Germinación de las semillas.

Fase 1: Ensayos previos

La fase 1, es una fase previa en la cual se pretende determinar la concentración más adecuada de cada una de las sales para llevar a cabo los experimentos finales. Esta tiene lugar durante los meses de noviembre y diciembre concretamente del 11-11-2008 al 20-12-2008. En los ensayos de germinación *in vitro* se determinó el efecto de cinco concentraciones distintas de NaCl (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200mM y 300mM) y de CaCl₂ (10 mM, 20 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM), y de ocho concentraciones de MgCl₂ (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM), junto con los correspondientes controles (germinación en ausencia de sal)

PROCEDIMIENTO

1. Se realiza una prueba previa (germinación en presencia de agua destilada) para ver si las semillas están en buenas condiciones.
2. Se toman dos placas Petri en las que se introduce algodón, encima un papel de filtro; este se divide en dos sectores, con el fin de obtener dos réplicas en cada placa
3. Se añaden las disoluciones salinas previamente preparadas en el laboratorio, o agua destilada (en los controles) y por último se agregan 25 semillas en

cada uno de los sectores de cada placa Petri. Es decir, se ponen dos placas con cuatro replicas y un total de 100 semillas para cada tratamiento y por especie.

4. Las placas se incuban en la cámara de germinación a 25°C
5. Se hace un recuento de las semillas germinadas durante un mes, en las distintas condiciones ensayadas.
6. Finalmente, en función de los resultados obtenidos, se deciden las concentraciones de las diferentes sales que se utilizarán en el procedimiento experimental.

Fase 2: Estudio sobre la influencia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en la germinación de semillas de juncos en condiciones de estrés salino.

Esta es la fase en la que se procede al experimento como tal. Se realiza durante un mes, entre los meses de enero y febrero de 2009, concretamente desde el 13-01-2009 al 15-2-2009

Las concentraciones elegidas han sido:

150 mM para el cloruro sódico, ya que a esta concentración de sal la germinación de las semillas de las dos especies se ve afectada, aunque el efecto no es tan negativo como para llegar a la completa inhibición de la germinación 10 mM y 20 mM para el cloruro de calcio y el cloruro de magnesio, concentraciones a las que se aprecia un ligero efecto inhibitorio de la germinación, para ambas sales.

A fin de establecer el posible efecto de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la inhibición de la germinación de semillas en condiciones de estrés salino (i.e., en presencia de NaCl), se realizaron los siguientes tratamientos de las semillas, en los ensayos de germinación:

- 1) Control (sin sal)
- 2) NaCl 150 mM.
- 3) NaCl 150 mM + CaCl_2 10 mM
- 4) NaCl 150 mM + MgCl_2 10 mM
- 5) NaCl 150 mM + CaCl_2 20 mM
- 6) NaCl 150 mM + MgCl_2 20 mM

7) NaCl 150 mM + CaCl_2 10 mM + MgCl_2 10 mM

8) NaCl 150 mM + CaCl_2 20 mM + MgCl_2 20 mM

PROCEDIMIENTO

Igual que el descrito en la fase anterior.



Foto 6 : Procedimiento en el laboratorio



Foto 7 : Estufa

2.2. Análisis de los datos.

El método estadístico con el que se ha llevado a cabo el análisis de los datos utilizados en el estudio, del efecto de los cationes calcio y magnesio sobre la germinación de semillas de *Juncus* en condiciones de estrés salino, ha sido el ANOVA. Para ello, previamente se necesita una conversión de los datos, que consiste en realizar el arcoseno del porcentaje medio de la germinación obtenida. Una vez normalizados los datos ya se procede a realizar el ANOVA de un factor con un nivel de confianza del 95%, tanto para *Juncus acutus* como *Juncus maritimus*, mediante el cual se pretende determinar si existen o no diferencias significativas entre los tratamientos. Las pruebas post-hoc (el test de Tukey) se aplica para distinguir las diferencias entre todos los tratamientos por pares.

Posteriormente se ha realizado un ANOVA de dos factores al igual que el anterior con un nivel de confianza del 95%, donde un factor son los tratamientos y el otro las especies, cuyo fin es averiguar si existen o no diferencias significativas entre las especies y entre los tratamientos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. FASE 1: Ensayos previos.

La primera fase del trabajo se realiza con el objeto de estudiar el efecto de las sales por separado, en cada una de las dos especies estudiadas, con el fin de escoger las concentraciones más adecuadas para lo que sería el propio experimento en si.

4.1.1. Efecto del NaCl

El cloruro sódico tiene un efecto inhibitor sobre la germinación en las dos especies. Tanto *J. acutus* como *J. maritimus* germinan mejor en condiciones sin sal es decir, en los tratamientos control. Conforme aumenta la concentración de la salinidad, la germinación en las dos especies disminuye de forma gradual.

En la Figura 4 se presentan los porcentajes finales de germinación para la especie *Juncus acutus*. En ella se observa un descenso desde un 82% en el control hasta un 1% en 200 mM NaCl y una completa inhibición de la germinación en el tratamiento de 300mM de cloruro sódico.

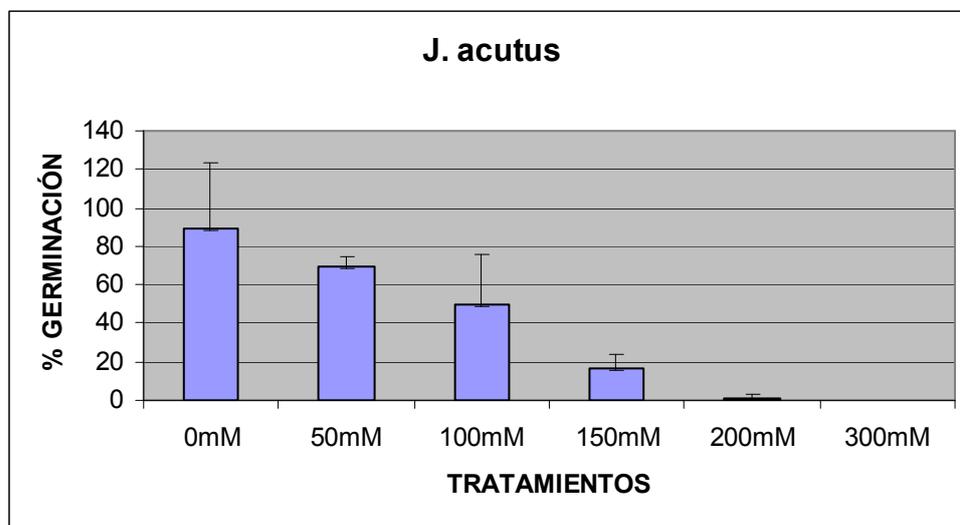


Figura 4: Efecto del NaCl en la germinación de *Juncus acutus*.

En la Figura 5 se observa que la respuesta del *Juncus maritimus* al cloruro sódico es parecida a la anterior si bien se aprecia una tolerancia a sal de la germinación ligeramente mayor; por ejemplo, las semillas de *J. maritimus* germinan incluso en

presencia de 300 mM NaCl, aunque en un porcentaje muy bajo. Los resultados obtenidos concuerdan con los datos previos publicados sobre estas especies (Boscaiu, 2009 y con el comportamiento general de las plantas halófilas.

La gran mayoría de halófilas germinan mejor en ausencia de estrés salino, siendo la germinación y el establecimiento de las plántulas el momento más crítico del ciclo biológico de estas plantas (Flowers *et al.*, 2008). Muchas plantas halófilas de las zonas mediterráneas germinan en otoño o primavera, cuando el estrés salino en su ambiente es reducido debido al aumento de precipitaciones. El hecho de que las semillas de *J. maritimus* germinan a mayor concentración de sal concuerda con la ecología de esta planta, siendo una planta aparentemente más tolerante a sal que *J. acutus*.

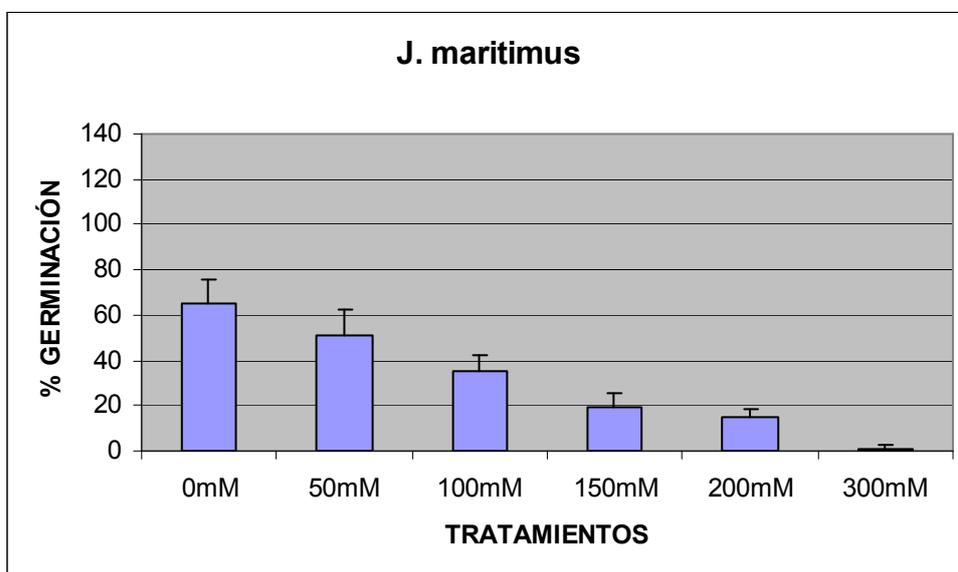


Figura 5: Efecto del NaCl en la germinación de *Juncus maritimus*.

1.2. Efecto DE CaCl₂

El efecto del CaCl₂ es bastante conocido en plantas. Hasta ciertas concentraciones tiene un efecto positivo para el desarrollo de las plantas, existiendo incluso fertilizantes agrícolas que contienen esta sustancia. También hay datos a nivel

de germinación, conociéndose su efecto paliativo en condiciones de estrés salino (Gul & Khan, 2008). Sin embargo, si la concentración de cloruro de calcio sobrepasa cierto umbral, el efecto sobre las plantas (incluyendo la germinación) es perjudicial. Por este motivo, se han testado una serie de concentraciones desde 1mM hasta 100mM CaCl₂.

Cómo se observa en la Figura 6. no surge ningún efecto que se pudiera considerar significativo hasta la concentración de 10mM CaCl₂, en la cual el porcentaje de germinación es algo mayor que en el control. A partir de la concentración de 20 mM CaCl₂ se observa una reducción de la germinación, llegando a mermar la germinación hasta la mitad en el tratamiento de 100mM CaCl₂.

El cloruro de calcio, como se puede apreciar en la Figura 3, a altas concentraciones resulta tóxico, y por esta razón la germinación va remitiendo conforme aumenta la concentración de la sal.

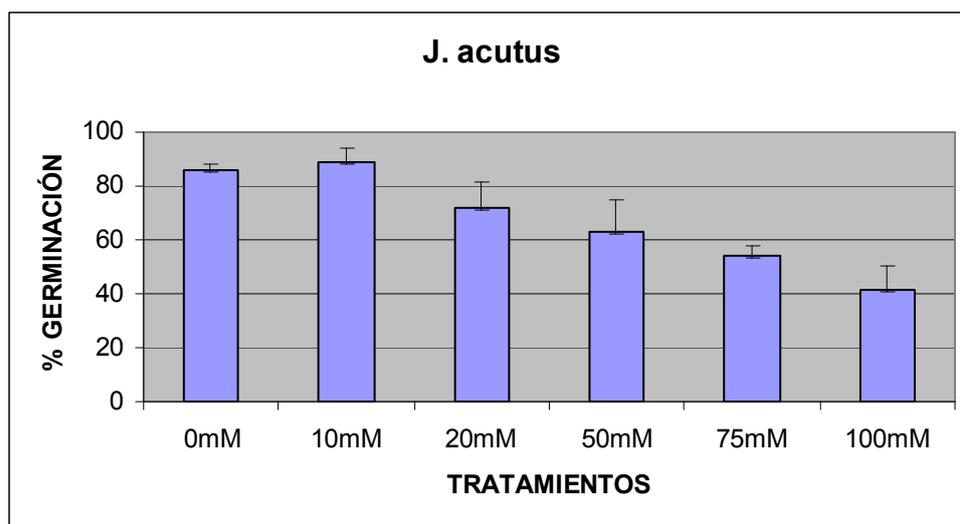


Figura 6: Efecto del CaCl₂ en la germinación de *Juncus acutus*.

En la Figura 7 se observa que para el *J. maritimus* esta sal resulta más perjudicial que para la especie anterior. El mayor porcentaje de germinación se registra en el control y llegando a unas condiciones de 75-100mM CaCl₂, la germinación decrece alcanzando valores de menos del 20%.

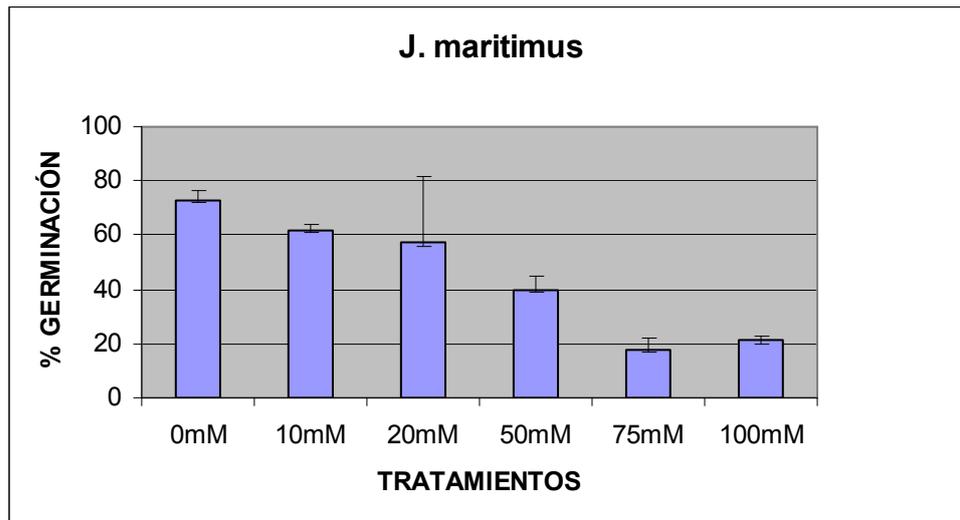


Figura 7: Efecto del CaCl₂ en la germinación de *Juncus maritimus*.

1.3. Efectos de MgCl₂

Así como el efecto del CaCl₂ es más estudiado, no hay mucha información sobre el efecto que el magnesio puede causar en la germinación de las semillas y posterior crecimiento de las plantas. Los efectos del magnesio sobre plantas sometidas a estrés no han sido apenas estudiados y, que sepamos, nuestra hipótesis no ha sido planteada con anterioridad. Sin embargo, está de acuerdo con datos previos del laboratorio (Boscaiu et al., 2009):

En *Juncus acutus*, los dos cationes divalentes, Ca²⁺ y Mg²⁺, se acumulan cuando las plantas se tratan con concentraciones crecientes de NaCl (unas dos veces, comparando las plantas tratadas con 500 mM NaCl y los controles crecidos en ausencia de sal).

En *Juncus maritimus*, que es más tolerante a sal, los niveles de Ca²⁺ y Mg²⁺, en ausencia de sal, son de dos a tres veces superiores a los medidos en *J. acutus* (aunque no aumentan significativamente al ser tratadas con sal).

Por este motivo, se comprueba el efecto a distintas concentraciones de cloruro de magnesio en la germinación de las dos especies.

En el caso de esta sal, las concentraciones testadas han sido menores (de 1 a 50 mM), justamente debido a su toxicidad para plantas. Se observa que concentraciones menores de 50 mM , prácticamente no tienen efecto sobre la germinación en *J. acutus* (Figura 5). Los porcentajes de germinación son muy parecidos a los obtenidos en el control de aproximadamente 80 % y solamente en una concentración de 50mM se puede notar una reducción del 50% en presencia de concentraciones de 50 mM de cloruro de magnesio.

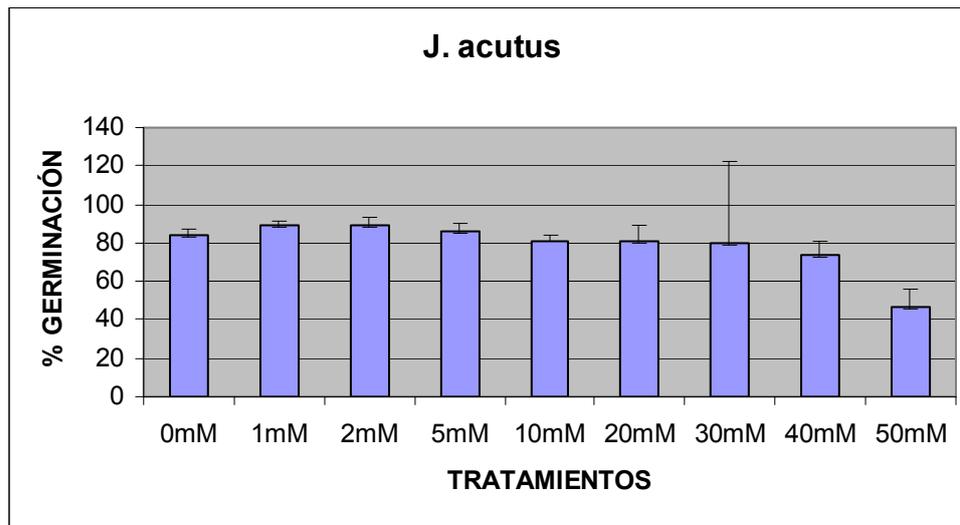


Figura 8: Efecto del $MgCl_2$ en la germinación de *Juncus acutus*.

En la Figura 9 se ve que en *J. maritimus*, al igual que para la otra especie tampoco hay mucha diferencia con el control (sin sal), el efecto inhibidor del magnesio se manifiesta ya en la concentración de 30mM, que surge una disminución drástica de la germinación.

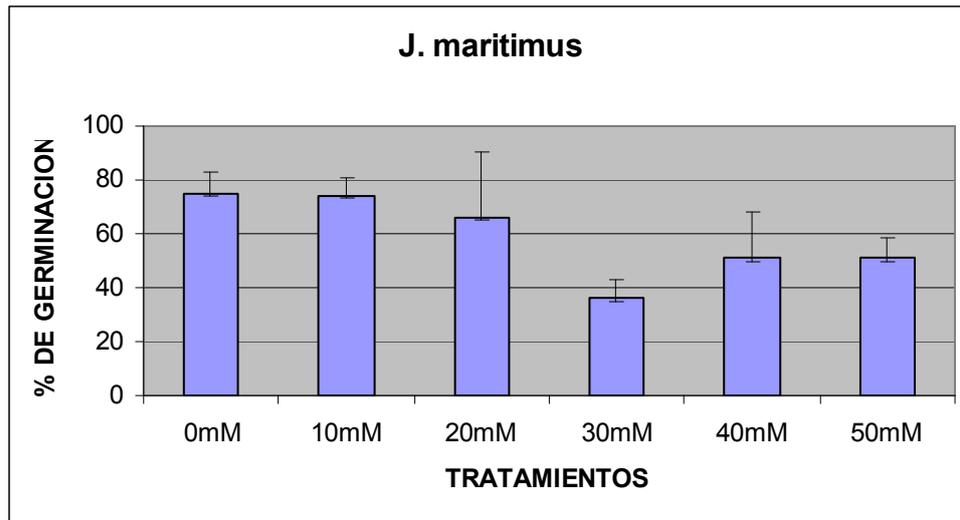


Figura 9: Efecto del $MgCl_2$ en la germinación de *Juncus maritimus*

2. Fase 2: Estudio sobre la influencia de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en la germinación de semillas de juncos en condiciones de estrés salino.

La concentración de NaCl elegida en base a los resultados previos ha sido la de 150mM. Se ha optado por esta concentración, porque se percibe un claro efecto negativo sobre la germinación, pero sin llegar a inhibir completamente este proceso. Las concentraciones de $CaCl_2$ y $MgCl_2$ seleccionadas han sido de 10 y 20 mM, ya que una concentración mayor sería perjudicial para la germinación de las semillas. En los ensayos de germinación para la segunda fase, se ha incluido siempre un control positivo solamente de agua destilada, y un control negativo con NaCl.

En la Figura 10 se observa que el porcentaje de germinación es muy elevado en el control sin sal exactamente de un 94 %, claramente distinto de los demás tratamientos según ANOVA de un factor (Tabla 1). El porcentaje de germinación en presencia de NaCl es muy bajo tan sólo un 4 %, incluso más bajo que el obtenido en el tratamiento

previo con NaCl. En presencia de otras sales se observa un aumento, especialmente en los tratamientos con 20 mM CaCl₂ y 20mM MgCl₂ (hasta 13%, y 14% respectivamente). Sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas según la prueba post-hoc aplicada, debido a los elevados niveles obtenidos e los controles sin sal.

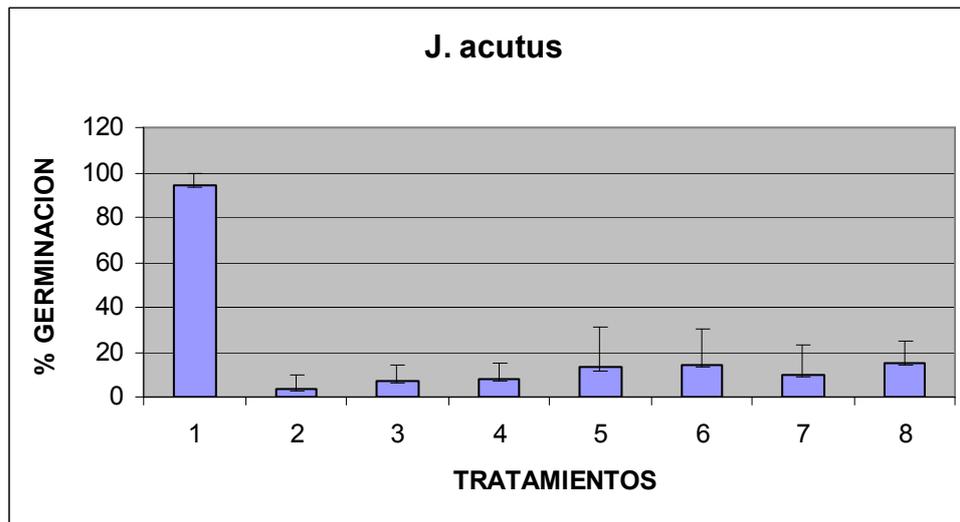


Figura 10: Efectos de los cationes Ca²⁺ y Mg²⁺ en *Juncus acutus* en condiciones de estrés salino.

Donde:

- 1: Control con agua destilada.
- 2: Control con 150mM de NaCl.
- 3: 150mM de NaCl + 10mM de CaCl₂
- 4: 150mM de NaCl + 10mM de MgCl₂
- 5: 150mM de NaCl + 20mM de CaCl₂
- 6: 150mM de NaCl + 20mM de MgCl₂
- 7: 150mM de NaCl + 10mM de CaCl₂ + 10mM de MgCl₂
- 8: 150mM de NaCl + 20mM de CaCl₂ + 20mM de MgCl₂

La Figura 11 representa la evolución de la germinación a lo largo del ensayo (30 días) para cada tratamiento en la especie *Juncus acutus*. Se aprecia una rápida germinación a partir del tercer día en el control sin sal, ya que son las condiciones más favorables, por esta razón, en este tratamiento han germinado prácticamente todas las semillas al final de la primera semana. En los tratamientos con diferentes sales la cinética es más lenta; la germinación empieza a mostrarse solamente partir del séptimo día y los porcentajes finales son mucho más bajos, cómo ya se ha discutido en el apartado anterior.

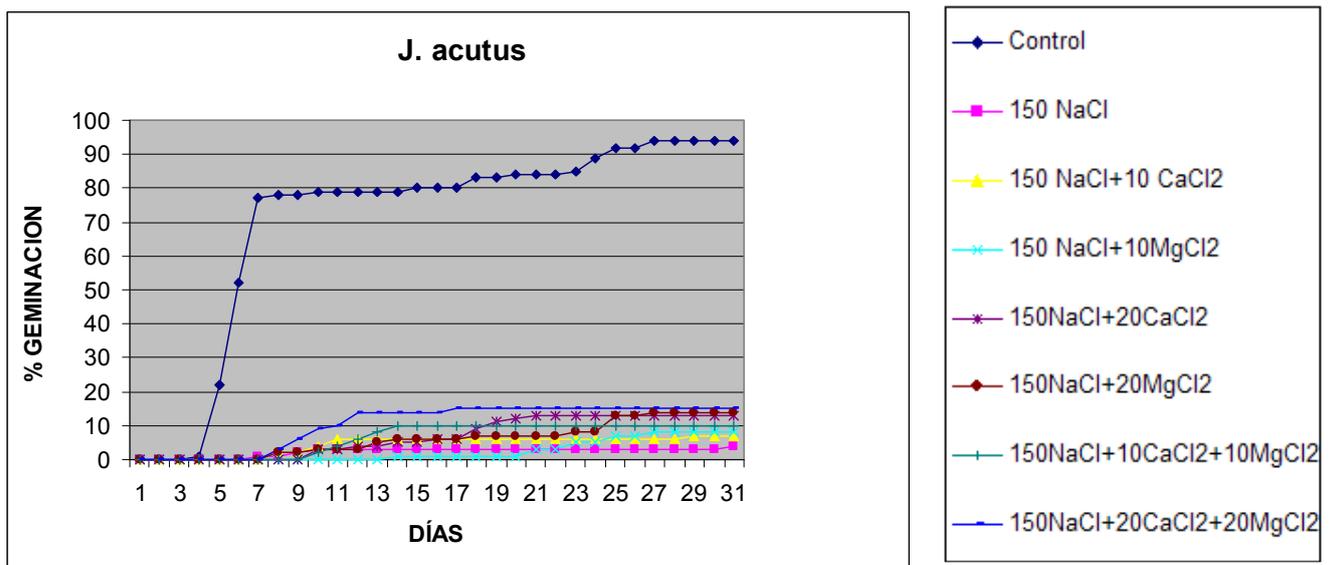


Figura 11: Evolución de la germinación en *Juncus acutus* con los distintos tratamientos.

La Tabla 1 refleja el resultado del ANOVA de un factor para el *Juncus acutus* con un nivel de confianza de 95%. La significación (P value) es menor del 0,05, es decir, que hay diferencias entre los tratamientos para la especie mencionada.

Tabla 1: ANOVA para *Juncus acutus*.

ANOVA^a

Trans	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,773	7	,539	67,611	,000

Intra-grupos	,191	24	,008
Total	3,964	31	

a. Especie = 1

Tras obtener el resultado del análisis anterior y saber con certeza que existen diferencias significativas, se utiliza el test Tukey de comparaciones múltiples para establecer cuales de los tratamientos son diferentes.

En la siguiente tabla se ve que el único tratamiento que difiere de los demás es el control, puesto que este es el que no se somete a ninguna sal, tan sólo contiene agua destilada, es decir las condiciones son óptimas para la germinación de las semillas.

Tabla 2: Pruebas post-hoc (comparaciones multiples) para *Juncus acutus*.

Comparaciones múltiples^a

Trans

DMS

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
Tratami ento	Tratami ento				Límite inferior	Límite superior
1	2	1,13618 [*]	,06313	,000	1,0059	1,2665
	3	1,06988 [*]	,06313	,000	,9396	1,2002
	4	1,05774 [*]	,06313	,000	,9274	1,1880
	5	,97095 [*]	,06313	,000	,8407	1,1012
	6	,95266 [*]	,06313	,000	,8224	1,0830
	7	1,01451 [*]	,06313	,000	,8842	1,1448
	8	,95424 [*]	,06313	,000	,8239	1,0845
	2	1	-1,13618 [*]	,06313	,000	-1,2665
3		-,06629	,06313	,304	-,1966	,0640
4		-,07843	,06313	,226	-,2087	,0519
5		-,16522 [*]	,06313	,015	-,2955	-,0349
6		-,18351 [*]	,06313	,008	-,3138	-,0532
7		-,12167	,06313	,066	-,2520	,0086
8		-,18194 [*]	,06313	,008	-,3122	-,0516
3		1	-1,06988 [*]	,06313	,000	-1,2002
	2	,06629	,06313	,304	-,0640	,1966
	4	-,01214	,06313	,849	-,1424	,1182

	5	-,09893	,06313	,130	-,2292	,0314
	6	-,11722	,06313	,076	-,2475	,0131
	7	-,05538	,06313	,389	-,1857	,0749
	8	-,11565	,06313	,079	-,2459	,0146
4	1	-1,05774 [*]	,06313	,000	-1,1880	-,9274
	2	,07843	,06313	,226	-,0519	,2087
	3	,01214	,06313	,849	-,1182	,1424
	5	-,08679	,06313	,182	-,2171	,0435
	6	-,10508	,06313	,109	-,2354	,0252
	7	-,04323	,06313	,500	-,1735	,0871
	8	-,10350	,06313	,114	-,2338	,0268
5	1	-,97095 [*]	,06313	,000	-1,1012	-,8407
	2	,16522 [*]	,06313	,015	,0349	,2955
	3	,09893	,06313	,130	-,0314	,2292
	4	,08679	,06313	,182	-,0435	,2171
	6	-,01829	,06313	,775	-,1486	,1120
	7	,04356	,06313	,497	-,0867	,1739
	8	-,01672	,06313	,793	-,1470	,1136
6	1	-,95266 [*]	,06313	,000	-1,0830	-,8224
	2	,18351 [*]	,06313	,008	,0532	,3138
	3	,11722	,06313	,076	-,0131	,2475
	4	,10508	,06313	,109	-,0252	,2354
	5	,01829	,06313	,775	-,1120	,1486
	7	,06185	,06313	,337	-,0684	,1921
	8	,00158	,06313	,980	-,1287	,1319
	1	-1,01451 [*]	,06313	,000	-1,1448	-,8842
	2	,12167	,06313	,066	-,0086	,2520
	3	,05538	,06313	,389	-,0749	,1857
	4	,04323	,06313	,500	-,0871	,1735
	5	-,04356	,06313	,497	-,1739	,0867
	6	-,06185	,06313	,337	-,1921	,0684
	8	-,06027	,06313	,349	-,1906	,0700
8	1	-,95424 [*]	,06313	,000	-1,0845	-,8239
	2	,18194 [*]	,06313	,008	,0516	,3122
	3	,11565	,06313	,079	-,0146	,2459
	4	,10350	,06313	,114	-,0268	,2338
	5	,01672	,06313	,793	-,1136	,1470

6	-,00158	,06313	,980	-,1319	,1287
7	,06027	,06313	,349	-,0700	,1906

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Especie = 1

En *Juncus maritimus* (ver Figura 12), al igual que en la otra especie también se ve como en el tratamiento con agua destilada la germinación de semillas es notablemente mejor que en el resto, si bien es cierto que en esta especie es relativamente menor el porcentaje de un 61% en el control que en la especie anterior. El NaCl inhibe completamente la germinación en este ensayo, pero se aprecia muy bien el efecto paliativo del CaCl_2 y MgCl_2 en concentraciones bajas con respecto al cloruro sódico, mientras que en los tratamientos más concentrados la germinación queda limitada o totalmente inhibida.

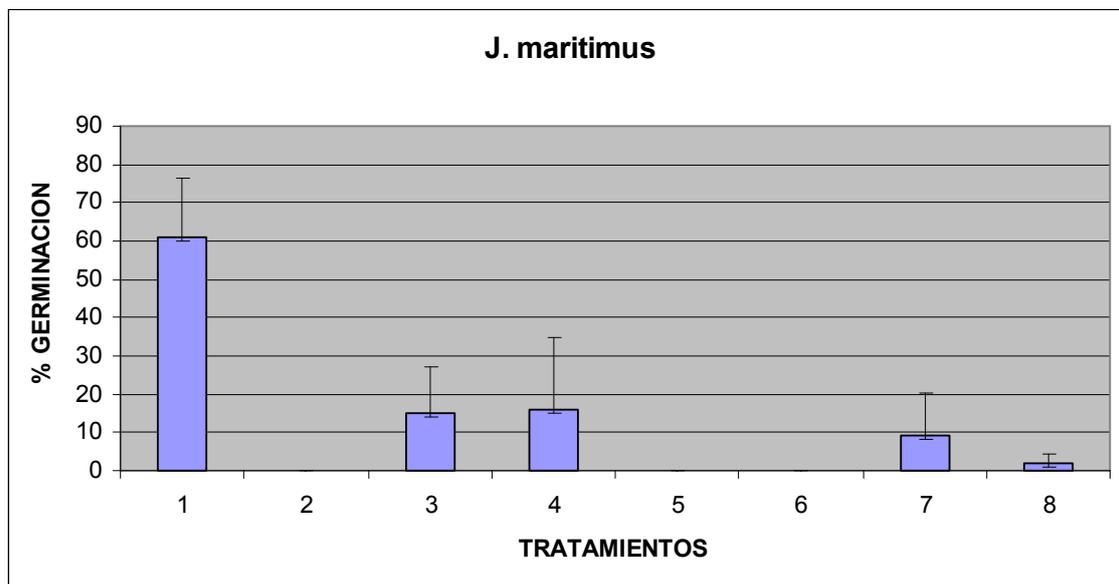


Figura 12: Efecto de los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en *Juncus maritimus* en condiciones de estrés salino.

Donde:

- 1: Control con agua destilada.
- 2: Control con 150mM de NaCl.
- 3: 150mM de NaCl + 10mM de CaCl_2
- 4: 150mM de NaCl + 10mM de MgCl_2
- 5: 150mM de NaCl + 20mM de CaCl_2

- 6: 150mM de NaCl + 20mM de MgCl₂
 7: 150mM de NaCl + 10mM de CaCl₂ + 10mM de MgCl₂
 8: 150mM de NaCl + 20mM de CaCl₂ + 20mM de MgCl₂

La Figura 13 muestra la evolución del porcentaje medio de germinación para cada tratamiento frente al tiempo que se prolonga el procedimiento (un mes). En general, tiene un auge de germinación entre hacia los últimos días (4-7) de la primera semana y después prácticamente no se aprecia apenas nada. El que mejor respuesta produce es el tratamiento control, por no poseer sal alguna y estar a una temperatura de 25°C que son las condiciones perfectas para que se de el fenómeno de la germinación, mientras que al ir aumentando la concentración de las sales experimenta un efecto adverso llegando a provocar su completa inhibición en algunos casos.

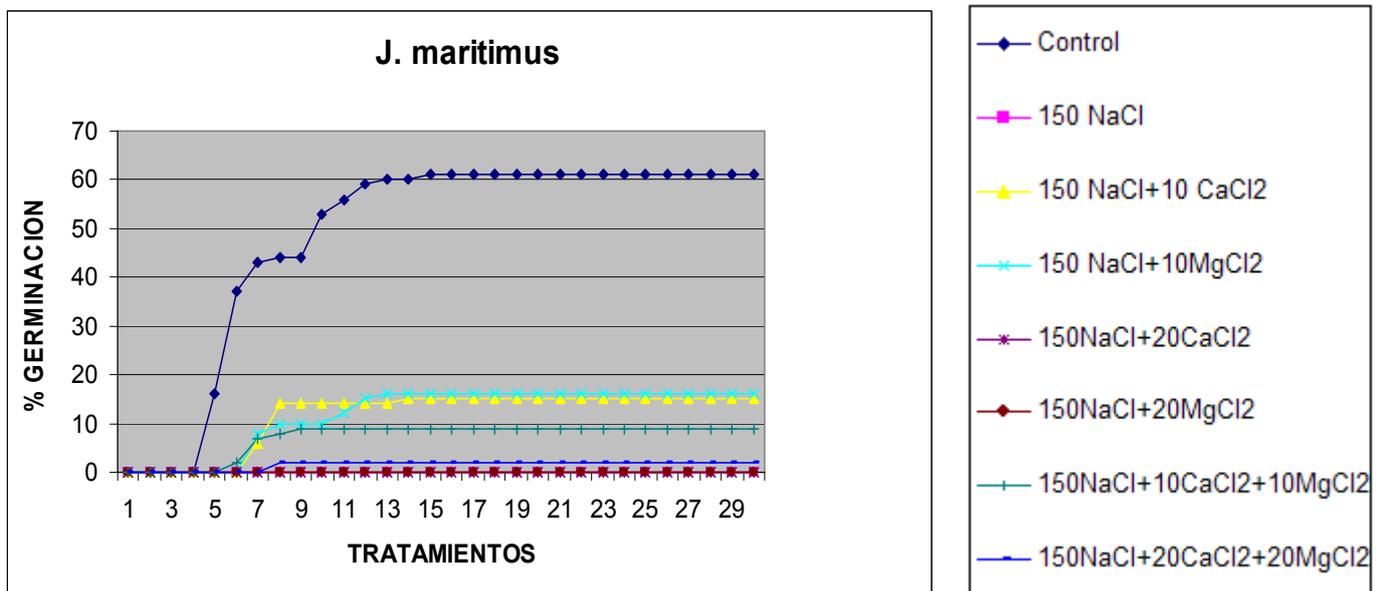


Figura 13: Evolución de la germinación en *Juncus maritimus* con los distintos tratamientos.

La significación (P value) estimada en la siguiente tabla es menor al 0,05, lo cual indica que existen diferencias significativas entre los grupos (tratamientos) para el *Juncus maritimus*.

Tabla 3: ANOVA para *Juncus maritimus*.

ANOVA^a

Trans

	Suma cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,089	7	,298	58,702	,000
Intra-grupos	,122	24	,005		
Total	2,211	31			

a. Especie = 2

En el test de comparaciones múltiples o pruebas post-hoc se observa, con un nivel de confianza del 95% , que existen tres grupos distintos entre sí. El tratamiento control sin sal es distinto a todos los demás. En el segundo se incluyen los tratamientos 2 (150mM de NaCl) , 5 (150mM NaCl + 20mM CaCl₂), 6 (150mM NaCl + 20mM MgCl₂) y 8(150mM NaCl + 20mM CaCl₂ + 20mM MgCl₂), y por último el tercer grupo lo forman los tratamientos 3(150mM NaCl + 10mM CaCl₂),4 (150mM NaCl + 10mM MgCl₂)y 7 (150mM NaCl + 20mM CaCl₂ + 10mM MgCl₂). Este último grupo de tratamientos, en los cuales se nota el efecto paliativo del CaCl₂ y MgCl₂ con respecto al NaCl, son los de menor concentración (10mM).

Tabla 4: Pruebas post-hoc (comparaciones multiples) para *Juncus maritimus*.

Comparaciones múltiples^a

Trans

DMS

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	,79962 [*]	,05041	,000	,6956	,9037
	3	,50547 [*]	,05041	,000	,4014	,6095
	4	,49102 [*]	,05041	,000	,3870	,5951
	5	,79962 [*]	,05041	,000	,6956	,9037
	6	,79962 [*]	,05041	,000	,6956	,9037
	7	,59877 [*]	,05041	,000	,4947	,7028
	8	,74903 [*]	,05041	,000	,6450	,8531
	2	1	-,79962 [*]	,05041	,000	-,9037
3		-,29415 [*]	,05041	,000	-,3982	-,1901
4		-,30860 [*]	,05041	,000	-,4126	-,2046
5		,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
6		,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
7		-,20085 [*]	,05041	,001	-,3049	-,0968
8		-,05060	,05041	,326	-,1546	,0535
3		1	-,50547 [*]	,05041	,000	-,6095
	2	,29415 [*]	,05041	,000	,1901	,3982
	4	-,01444	,05041	,777	-,1185	,0896
	5	,29415 [*]	,05041	,000	,1901	,3982
	6	,29415 [*]	,05041	,000	,1901	,3982
	7	,09330	,05041	,077	-,0107	,1974
	8	,24356 [*]	,05041	,000	,1395	,3476
	4	1	-,49102 [*]	,05041	,000	-,5951
2		,30860 [*]	,05041	,000	,2046	,4126
3		,01444	,05041	,777	-,0896	,1185
5		,30860 [*]	,05041	,000	,2046	,4126
6		,30860 [*]	,05041	,000	,2046	,4126
7		,10775 [*]	,05041	,043	,0037	,2118
8		,25800 [*]	,05041	,000	,1540	,3621
5		1	-,79962 [*]	,05041	,000	-,9037
	2	,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
	3	-,29415 [*]	,05041	,000	-,3982	-,1901
	4	-,30860 [*]	,05041	,000	-,4126	-,2046
	6	,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
	7	-,20085 [*]	,05041	,001	-,3049	-,0968
	8	-,05060	,05041	,326	-,1546	,0535

6	1	-,79962 [*]	,05041	,000	-,9037	-,6956
	2	,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
	3	-,29415 [*]	,05041	,000	-,3982	-,1901
	4	-,30860 [*]	,05041	,000	-,4126	-,2046
	5	,00000	,05041	1,000	-,1040	,1040
	7	-,20085 [*]	,05041	,001	-,3049	-,0968
	8	-,05060	,05041	,326	-,1546	,0535
	7	1	-,59877 [*]	,05041	,000	-,7028
2		,20085 [*]	,05041	,001	,0968	,3049
3		-,09330	,05041	,077	-,1974	,0107
4		-,10775 [*]	,05041	,043	-,2118	-,0037
5		,20085 [*]	,05041	,001	,0968	,3049
6		,20085 [*]	,05041	,001	,0968	,3049
8		,15026 [*]	,05041	,006	,0462	,2543
8		1	-,74903 [*]	,05041	,000	-,8531
	2	,05060	,05041	,326	-,0535	,1546
	3	-,24356 [*]	,05041	,000	-,3476	-,1395
	4	-,25800 [*]	,05041	,000	-,3621	-,1540
	5	,05060	,05041	,326	-,0535	,1546
	6	,05060	,05041	,326	-,0535	,1546
	7	-,15026 [*]	,05041	,006	-,2543	-,0462

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

a. Especie = 2

Finalmente, se han completado los resultados del estudio con la realización del ANOVA de dos factores, el cual se ha aplicado para comprobar si existen diferencias significativas entre las dos especies frente a las diferentes condiciones impuestas por los tratamientos. La significación es menor a 0,05, con un nivel de confianza del 95%: esto indica que la respuesta a los tratamientos es distinta en las dos especies.

Estos resultados son bastante lógicos si se tiene en cuenta que una de las especies, concretamente *Juncus maritimus* es más tolerante a la salinidad que la otra, el *Juncus acutus*, así que es normal encontrar diferencias entre ellas.

Tabla 5. Resultados de ANOVA de dos factores (un factor el tratamiento y el otro la especie).**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente:Trans

Fuente	Suma de cuadrados	de tipo gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	6,148 ^a	15	,410	62,795	,000
Intersección	8,944	1	8,944	1370,311	,000
Especie	,287	1	,287	43,935	,000
Tratamiento	5,275	7	,754	115,463	,000
Especie * Tratamiento	,586	7	,084	12,822	,000
Error	,313	48	,007		
Total	15,405	64			
Total corregida	6,461	63			

a. R cuadrado = ,952 (R cuadrado corregida = ,936)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera:

Efectos de NaCl (150 mM)

El NaCl ejerce una inhibición de la germinación en las dos especies. Los mayores porcentajes de germinación se registran en las dos especies en los tratamientos control sin sal, reduciéndose de forma gradual en los de 100, 150 y 200 mM, hasta una completa inhibición en el tratamiento de 300 mM NaCl en *Juncus acutus*, y un escaso 1% de germinación en *J. maritimus*.

A partir de estos resultados se selecciona una concentración de 150 mM NaCl para la segunda fase del trabajo, por tener un claro efecto, pero sin llegar a una inhibición completa de la germinación.

Efectos del CaCl₂

Se comprueba el efecto del CaCl₂ en un rango de cinco concentraciones de 10 mM, 20 mM, 50 mM, 75 mM y 100 mM, junto con los correspondientes controles (germinación en ausencia de sal).

En *J. acutus* se observa una estimulación de la germinación al menos de 10% hasta concentraciones de 10 mM y a partir de 20 mM Ca²⁺ una inhibición de la germinación (~ 10%).

En *J. maritimus* se observa una inhibición de la germinación, mayor a 10% en la concentración de 10 mM Ca²⁺ y a partir de 20 mM Ca²⁺ una inhibición de la germinación de hasta 20%.

Se eligen las concentraciones de 10 y 20mM CaCl₂ para seguir la germinación en presencia de 150 mM NaCl.

Efectos del CaCl₂ + NaCl

En *J. acutus* se registra una ligera estimulación de la germinación, dependiente de la concentración, más marcada en el tratamiento de 20 mM CaCl₂.

En *J. maritimus*, en la concentración de 10 mM Ca²⁺ se registra una estimulación de la germinación hasta > 15% (sobre 0% con NaCl solo) y en el tratamiento de 20 mM Ca²⁺ no se ve efecto.

Efectos del MgCl₂

Se comprueba el efecto del MgCl₂ en ocho concentraciones de MgCl₂ (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM), junto con los correspondientes controles (germinación en ausencia de sal).

En *J. acutus* la concentración de 10 mM Mg²⁺ o 20 mM Mg²⁺ no tienen ningún efecto sobre la germinación de semillas y concentraciones superiores ejercen un efecto inhibitorio.

En *J. maritimus* la concentración de 10 mM Mg²⁺ no afecta la germinación, pero la de 20 mM Ca²⁺ produce una ligera inhibición (~ 10%)

Se eligen las concentraciones de 10 y 20 mM MgCl₂ para seguir la germinación en presencia de 150 mM NaCl.

Efectos del MgCl₂ + NaCl

En *J. acutus* se nota una ligera estimulación de la germinación (sobre el 5% de NaCl solo), dependiente de la concentración (20 mM > 10 mM).

En *J. maritimus* la concentración de 10 mM Ca²⁺ induce la estimulación de la germinación hasta > 15% (sobre 0% con NaCl solo), mientras que a una concentración de 20 mM Mg²⁺ no se ve efecto.

El efecto producido por el magnesio es el mismo que el observado en presencia de calcio.

Efectos del $MgCl_2$ + $CaCl_2$ + $NaCl$

Se ve el mismo efecto de estimulación de la germinación que con cada uno de los cationes por separado, o ligeramente superior, pero no parece haber un efecto aditivo

Parece que el $CaCl_2$ contrarresta ligeramente la inhibición de la germinación causada por el $NaCl$. Esto está de acuerdo con el efecto protector del calcio en condiciones de estrés salino, que es bien conocido (Rengel, 1992; Bressan et al., 1998; Gul & Khan, 2008):

- El Mg^{2+} parece tener el mismo efecto que el Ca^{2+} , estimulando la germinación de semillas en condiciones de estrés salino, como se muestra en este trabajo

Proponemos que el magnesio, al igual que el calcio, tiene un efecto protector frente al estrés salino en plantas.

Tanto el calcio como el magnesio podrían actuar en mecanismos de respuesta contra el estrés salino, que serían constitutivos en *J. maritimus* e inducibles en *J. acutus*, que es menos tolerante a sal.

La inhibición en presencia de $NaCl$ de diversas actividades enzimáticas (uno de los efectos tóxicos de la sal) se debe al desplazamiento del magnesio, que actúa como cofactor, del centro activo del enzima. Esto se ha comprobado experimentalmente, por ejemplo, en el caso de la enzima Hal2p de levadura, que es inhibida por sodio y litio (Albert et al. 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT A, YENUSH L, Gil-MASCARELL MR, RODRÍGUEZ PL, PATEL S, MARTÍNEZ- RIPOLL M, BLUNDELL TL, SERRANO R. (2000). X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *J Mol Biol* 295: 927-938.
- BALLESTEROS AMAT, G (). Respuestas al estrés salino en dos especies del género *Juncus*.
- BOSCAIU, M., BALLESTEROS, G. NARANJO, M.A., VICENTE, O. y BOIRA, H. (2009). Responses to salt stress in *Juncus acutus* and *J. maritimus*. *Plant Biosystems (en prensa)*.
- BRESSAN RA, HASEGAWA PM, PARDO JM. (1998). Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends Plant Sci* 3: 411-412.
- COSTA, M. & BOIRA, M. 1981. Los ecosistemas costeros levantinos. Los saladares. *Anales Jard. Bot. Madrid* 38: 233-244.
- COSTA, M., PERÍS J.B.& FIGUEROLA, R. 1986. La vegetación de la Devesa de La albufera de Valencia. Monografies 1. Ayuntamiento de Valencia, 87pp.
- FERNÁNDEZ-CARVAJAL, M.C. 1982. Revisión del género *Juncus* L. en la Península Ibérica.II. Subgéneros *Juncus* y *Genuini* Buchenau. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38 (2): 417-467.
- FERNÁNDEZ-CARVAJAL, M.C. 1981. Revisión del género *Juncus* L. en la Península Ibérica.I. Categorías supraespecíficas y clave para las especies. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 38 (1): 79-89.
- FLOWERS, T.J., HAJIBAGHERI, M.A. & CLIPSON, N.W.J. 1986. Halophytes. *The Quarterly Review of Biology* 61: 313-335.
- FLOWERS, T.J., TROKE, P.F. & YEO, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 89-121.

GUL B, KHAN MA. (2008). Role of calcium in alleviating salinity effects in coastal halophytes. In: Khan MA, Weber DJ, editors. Ecophysiology of high salinity tolerant plants. Dordrecht: Springer. p 107-114.

GUL, B.y KHAN, M.A. (2008). Role of calcium in alleviating salinity effects in coastal halophytes. *En*: KHAN, M.A.y WEBER, D.J. “Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants”. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 399 pp. ISBN 1-4020-9298-5.

MATEO SANZ, G. & CRESPO VILLALBA, M.B. (1995). Flora Abreviada de la Comunidad Valenciana.

RENGEL Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ* 15: 625-632.

ORTLA, A.G. (2001). Ecofisiología vegetal: Introducción a la fisiología del estrés”

SANCHIS, E. 1983. Suelos y vegetación de la Devesa de l’Albufera. Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia, Valencia.

SANCHIS, E., RUBIO, J.L. & ANDREU, V. 1998. Los suelos de la Devesa de l’Albufera, *Revista valenciana d’estudis autonòmics*. Número 22.

UNGAR, I.A. 1991. Ecophysiology of vascular halophytes. CRC Press, Boca Raton, Florida.

PAGINAS WEB

<http://herbarivirtual.uib.es/cas-med/especie/4937.html>

<http://www.lifeduna.com/lifeduna/RestDunasDevesa2.pdf>

<http://www.elergonomista.com/fisiologiavegetal/salino.htm>

<http://fresqui.com/ciencia/otras/como-la-gestion-vegetal-del-calcio-puede-reducir-los-efectos-de-la-lluvia-acida/-28464?relevancia=reciente>

<http://www.cebas.csic.es/Departamentos/Nutricion/Pagina%20Web%20Aquaporinas/objetivos%20y%20resultados.htm>